

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 29 juli 2019

KENMERK CGM/190729-01

ONDERWERP Advies 'Generieke milieurisicobeoordeling voor klinische studies met *ex vivo* getransduceerde cellen'

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een generieke milieurisicobeoordeling voor werkzaamheden met *ex vivo* getransduceerde cellen (COG 19-001) van Bureau GGO, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

Het Bureau GGO heeft de COGEM gevraagd te adviseren over een door haar, mede op basis van een Europese nota, opgestelde generieke milieurisicobeoordeling voor klinische studies met *ex vivo* getransduceerde cellen (COG 19-001). Het doel van deze generieke milieurisicobeoordeling is om de vergunningverleningsprocedure voor dit soort studies te kunnen vereenvoudigen.

De COGEM stemt in met de voorgelegde generieke milieurisicobeoordeling zoals die is opgesteld voor klinische studies met *ex vivo* getransduceerde cellen. Dit onder voorwaarde dat deze milieurisicobeoordeling autologe cellen betreft die worden getransduceerd met retrovirale vectoren gebaseerd op het Moloney murine leukemia virus (MoMLV) of met self-inactivating (SIN) lentivirale vectoren gebaseerd op HIV-1 en geproduceerd met een productiesysteem van de derde generatie.

Voor de generieke milieurisicobeoordeling is het van belang dat (i) het gebruikte transgen niet codeert voor sequenties die in staat zijn de replicatiedeficiënte retro- of lentivirale vector te complementeren, (ii) de plasmiden nodig voor de productie van de vector en de vector moleculair gekarakteriseerd zijn, en (iii) er geen vrije infectieuze vectordeeltjes in het terug te plaatsen medische product aanwezig zijn. Wanneer aan de bovenstaande en een aantal specifieke aanvullende voorwaarden is voldaan, is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's van dergelijke klinische studies verwaarloosbaar klein zijn.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW

Generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met *ex vivo* retro- en lentiviraal getransduceerde cellen

COGEM advies CGM/190729-01

1. Inleiding

Het Bureau GGO (BGGO) heeft de COGEM gevraagd te adviseren over een door haar, op basis van een Europese nota, opgestelde generieke milieurisicobeoordeling voor klinische studies met *ex vivo* getransduceerde cellen (COG 19-001). Het doel van deze generieke milieurisicobeoordeling is om de vergunningverleningsprocedure voor dit soort studies te kunnen vereenvoudigen.

Bij de milieurisicobeoordeling heeft BGGO de volgende vijf vragen gesteld, die door de COGEM in dit advies zijn meegenomen:

1. *Zijn alle aspecten die de COGEM van belang acht met betrekking tot de mogelijke risico's voor mens en milieu in de ERA verwerkt en stemt de COGEM in met de voorgestelde conclusies?*
2. *In de generieke ERA wordt gesteld 'De retro/lentivirale virusbatch die gebruikt wordt voor transductie moet getest zijn op aanwezigheid van RCV middels een gevalideerde test'. Is het noodzakelijk dat zowel de virusbatch (en de end-of- production-cellen) als de getransduceerde cellen (eindproduct) worden getest op afwezigheid van RCV? Of is het aantonen van de afwezigheid van RCV in ofwel de virusbatch ofwel het eindproduct afdoende, mits er een afdoende onderbouwing wordt gegeven door de aanvrager waarom één test volstaat? Geef s.v.p. een toelichting.*
3. *In de voorwaarden bij de generieke ERA wordt gesteld 'Er is aangetoond dat de kans verwaarloosbaar klein is dat er nog vrije infectieuze virusdeeltjes in het genterapieproduct aanwezig zijn'.*
 - a. *Dit kan volgens bureau GGO onder andere door gebruik te maken van de COGEM formule, waarbij de veiligheidsmarge van de reductieratio op >100 gesteld is. Kan de COGEM hiermee instemmen?*
 - b. *Vooralsnog is er een reductieratio van >100 gehanteerd, maar in een recent advies (CGM/181231-01) is er een marge van >1 gehanteerd. De COGEM wordt gevraagd of deze reductieratio van >1 ook aangehouden kan worden voor deze generieke ERA?*
 - c. *Acht de COGEM het toepassen van de COGEM formule strikt noodzakelijk om aan te tonen dat de kans verwaarloosbaar klein is dat er nog vrije infectieuze virusdeeltjes in het genterapie product aanwezig zijn? Zijn er volgens de COGEM nog andere manieren waarop kan worden aangetoond dat de kans verwaarloosbaar klein is dat er nog vrije infectieuze virusdeeltjes in het genterapie product aanwezig zijn? Zo ja, welke manieren worden afdoende geacht om dit te bereiken?*

4. *Moeten macrofaagachtige cellen worden uitgesloten van de generieke milieurisicobeoordeling? Indien ja, geef aan waarom en includeer uitleg over de kans dat door de aanwezigheid van deze macrofaagachtige cellen in het gentherapie product derden kunnen worden geïnfecteerd met de virale vector met een schadelijk effect tot gevolg.*
5. *Moeten de cellen die getransduceerd zullen worden vrij zijn van HIV en/of HTLV?*

1.1 Klinische studies met ex vivo getransduceerde cellen

De COGEM heeft de laatste jaren regelmatig geadviseerd over klinische studies waarbij autologe T-cellen *ex vivo* getransduceerd werden met behulp van retro- of lentivirale vectoren.^{1,2 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12} Transductie van deze cellen leidt tot de integratie en expressie van een transgen in het genoom. Na de transductie worden de genetisch gemodificeerde (gg-)cellen via een infuus teruggebracht in de patiënt.

In alle gevallen werd een retrovirale vector gebruikt die gebaseerd was op het Moloney murine leukemia virus (MoMLV, een virus binnen de species *Murine leukemia virus*), of een derde generatie 'self-inactivating' (SIN) lentivirale vector die gebaseerd was op het *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1) en gepseudotypeerd was met het oppervlakte-eiwit G van Vesicular stomatitis Indiana virus (VSV-G). De transgenen die via de retrovirale vector tot expressie werden gebracht waren T-cel receptoren (TCR's) of chimere antigen receptoren (CAR's) met als doel melanomen of hematologische maligniteiten, waaronder B-cel leukemie, te behandelen.

Dit generieke advies beperkt zich tot het gebruik van retrovirale vectoren gebaseerd op het MoMLV en self-inactivating (SIN) HIV-1 lentivirale vectoren geproduceerd met een derde generatie productiesysteem, omdat deze vectoren het meest bij klinische studies met *ex vivo* getransduceerde cellen gebruikt worden. Over de bioveiligheid van deze vectoren is veel kennis opgedaan en gepubliceerd in de wetenschappelijke literatuur. De milieurisicobeoordeling van deze vectoren is inmiddels door de COGEM in haar verschillende opeenvolgende adviezen uiteengezet.

1.2 Achtergrondinformatie

Gammaretrovirussen en lentivirussen zijn twee verschillende genera binnen de subfamilie *Orthoretrovirinae*, familie *Retroviridae*.¹³ Retrovirussen bezitten een enkelstrengs RNA genoom dat door een virus-specifiek polymerase, het reverse transcriptase, wordt omgezet naar dubbelstrengs (ds) DNA dat integreert in het genoom van de geïnfecteerde cel.^{14,15} De laatste jaren wordt er bij het behandelen van patiënten met gentherapie steeds meer gebruik gemaakt van vectoren afgeleid van gammaretro- of lentivirussen. In deze paragraaf wordt de levenscyclus van retro- en lentivirussen uiteengezet.

Het RNA genoom van retro- en lentivirale virusdeeltjes is ingepakt in capsid-eiwitten en wordt omhuld door een lipidenmembraan, de zogenoemde 'envelop'. De virusdeeltjes bevatten alle componenten die nodig zijn om de virale levenscyclus te kunnen opstarten, waaronder de enzymen reverse transcriptase, integrase, en protease. Deze eiwitten worden in het virale genoom gecodeerd

door het *pol* gen. Ingebed in de lipidenmembraan zitten de zogenoemde envelopeiwitten die het gastheertropisme van het virus bepalen. Deze eiwitten worden gecodeerd door het *env* gen.

De levenscyclus van retro- en lentivirussen is vergelijkbaar. Infectie van de cel wordt geïnduceerd door specifieke binding van de envelopeiwitten aan een cellulaire receptor, al dan niet in combinatie met een co-receptor. Tijdens dit proces wordt het virusdeeltje ontmanteld en komt het virale genoom vrij in het cytoplasma. Daar wordt het virale RNA via een complex stappenplan omgezet in een dsDNA kopie, die in het cellulaire genoom integreert. Aan zowel het 5'- en het 3'-uiteinde van het geïntegreerde provirale DNA zijn identieke zogenoemde 'long terminal repeats' (LTR's) aanwezig. Deze sequenties spelen een belangrijke regulatoire rol bij onder meer de integratie van het provirale DNA en de transcriptie van het virale genoom.

De transcriptiemachinerie van de gastheercel zorgt voor de synthese van viraal RNA vanaf het geïntegreerde provirale DNA. Na transport naar het cytoplasma, worden twee kopieën van het virale RNA ingepakt in het capsid-eiwit (gecodeerd door het *gag*-gen). Voor de binding van het capsid-eiwit met het virale RNA en de uiteindelijke vorming van virusdeeltjes is het 'packaging' signaal Ψ in het RNA essentieel. Tijdens de 'budding' aan het plasmamembraan worden de infectieuze virusdeeltjes gevormd. Bij dit proces wordt het ingepakte virale genoom omhuld door een lipidenmembraan met daarin geïntegreerd het envelop eiwit.

Een belangrijk verschil tussen retro- en lentivirussen is dat het dsDNA bij de laatst genoemde virussen actief de kern in wordt getransporteerd via het 'nuclear pore complex', terwijl bij de retrovirussen gewacht moet worden tot het moment dat het kernmembraan uiteengevallen is tijdens de mitose. Als gevolg hiervan kunnen retrovirussen en de daarvan afgeleide vectoren, in tegenstelling tot lentivirussen, alleen delende cellen infecteren dan wel transduceren.

Een ander belangrijk verschil tussen retro- en lentivirussen is dat de lentivirale virussen naast de al eerder genoemde genen *pol*, *env* en *gag*, in het bezit zijn van de vier accessoire genen *vif*, *vpr*, *vpu* en *nef*, en de twee regulatoire genen *rev* en *tat*. Aangezien er daardoor aanzienlijke verschillen zijn tussen de op MoMLV gebaseerde retrovirale vectoren en de met een derde generatie productiesysteem gegenereerde SIN lentivectoren, en deze verschillen van invloed zijn op de milieurisicobeoordeling, worden beide vectorsystemen in dit advies gescheiden behandeld.

2. Retrovirale vectorsystemen

Er bestaan verschillende gammaretrovirussen, echter de vectorsystemen die tot nu toe beoordeeld zijn in de adviezen van de COGEM, zijn alle afgeleid van MoMLV. Dit generieke advies beperkt zich daarom tot retrovirale vectoren afgeleid van MoMLV.

Het MoMLV is een ecotroop muizengammaretrovirus dat leukemie kan veroorzaken bij muizen. Het virus is alleen pathogeen wanneer de infectie optreedt in pasgeboren muizen en er sprake is van meerdere integraties en persisterende viremie.¹⁶ Tot op heden is er geen bewijs gevonden dat blootstelling aan MoMLV infectie en ziekte bij de mens kan veroorzaken.^{16,17}

Voor de productie van de retrovirale vector worden drie plasmiden gebruikt. Het transferplasmide bevat de retrovirale 5' en 3' LTR sequenties, het 'packaging' signaal Ψ en het therapeutische transgen.

De *gag/pol* genen en het envelop coderende gen worden apart aangeleverd op twee zogenoemde 'packaging' of helperplasmiden. De retrovirale vector wordt meestal in twee stappen geproduceerd: Eerst worden de drie plasmiden getransfecteerd naar zogenoemde 'primary packaging cells'. Met de resulterende replicatie-deficiënte virusdeeltjes worden 'secondary packaging cells' getransduceerd waarbij wederom de *gag/pol* genen en een envelopeiwit coderend gen *in trans* aangeboden worden. Deze laatste cellen vormen de productiecellen waaruit de retrovirale vector geoogst wordt ('end of production cells' (EOP cells)).

De retrovirale vector is altijd gepseudotypeerd. Mogelijke envelopeiwitten voor pseudotypering zijn het VSV-G, het rabiësvirus G-eiwit, het *Gibbon ape leukemia virus* envelopeiwit, het hemagglutinine/fusie glycoproteïne van het *Measles morbillivirus* (stam Edmonston), het Feline endogenous virus RD114 envelop glycoproteïne, het *Murine leukemia virus* envelop glycoproteïne, het *Murine leukemia virus* 10A1 eiwit, en het *Murine leukemia virus* 4070A eiwit.

Ten behoeve van de bereiding van het medisch product, worden de benodigde cellen uit de patiënt geïsoleerd en *ex vivo* met de retrovirale vector getransduceerd. Na de integratie van het transgen in het cellulaire genoom, worden de gg-cellen *in vitro* door middel van kweek vermeerderd, onderworpen aan één of meer wasstappen, en teruggebracht in de patiënt.

2.1 Overwegingen retrovirale vectorsystemen

De volgende aspecten zijn van belang voor de milieurisicobeoordeling van het gebruik van retrovirale vectoren voor *ex vivo* transductie van cellen: (i) de mogelijke vorming van replicatiecompetent retrovirus (RCR) tijdens de productie van de retrovirale vector, (ii) de aanwezigheid van vrije vectordeeltjes in het medische product, en (iii) recombinatie of complementatie van de vector in het medisch product. Hieronder zullen deze aspecten puntsgewijs behandeld worden.

2.1.1 De mogelijke vorming van replicatiecompetent retrovirus (RCR) tijdens de productie van de retrovirale vector

Een risico bij de productie van retrovirale vectordeeltjes is het ontstaan van RCR. RCR zou kunnen ontstaan door recombinatie tussen de verschillende plasmiden benodigd voor de productie van de virale vector, of met endogene retrovirussequenties die in het genoom van de gebruikte cellijn aanwezig zijn.

De transferplasmide, die gebruikt wordt voor de productie van de retrovirale vector, is gebaseerd op de genoomsequentie van MoMLV waaruit de genen die essentieel zijn voor de levenscyclus van het virusdeeltje, (*gag*, *pol* en *env*), zijn verwijderd. De vector is hierdoor niet meer in staat om zelfstandig te repliceren. De genen voor deze virale eiwitten bevinden zich op helperplasmiden die in de cellijn getransfecteerd worden. Omdat de essentiële genen zich niet in het vectorgenoom bevinden, zijn er meerdere recombinaties nodig om een replicatiecompetente vector te verkrijgen en wordt de kans op het ontstaan van RCR verminderd.¹⁸ De kans hierop kan verder verkleind worden door sequentieovereenkomst tussen de vector, helperplasmiden en de 'packaging' cellijnen te minimaliseren.

Hoewel voor de reconstructie van het gehele retrovirale genoom meerdere recombinatie 'events' nodig zijn om een infectieus virusdeeltje te construeren, is de COGEM van oordeel dat theoretisch

gezien de kans op het ontstaan van RCR bij de productie van de virale vector niet geheel uit te sluiten is. Zij acht het daarom noodzakelijk dat aan de hand van een gevalideerde test uitgesloten wordt dat er RCR aanwezig is. Daarbij is het voldoende om de te gebruiken vectorbatch, de ‘end of production’ (EOP) cellen, of het uiteindelijke medische product (de getransduceerde cellen) te testen op aanwezigheid van RCR. In de literatuur zijn geen gevallen bekend van de vorming van RCR bij de patiënt, wanneer bij de productie van de retrovirale vector de vorming van RCR is uitgesloten.^{18,19,20}

2.1.2 Aanwezigheid van vrije vectordeeltjes in het medische product

Na transductie van de cellen kunnen vrije infectieuze vectordeeltjes in het te testen medisch product achterblijven. In het geval van calamiteiten zouden deze vrije vectordeeltjes naar derden kunnen verspreiden, zoals bij een prikincident waardoor de behandelend arts of iemand van het verplegend personeel besmet kan raken. Deze vrije retrovirale vectordeeltjes zouden in zo'n geval theoretisch kunnen leiden tot transductie van cellen in de ontvanger. Naast dat deze cellen het door de vector gecodeerde genproduct kunnen gaan produceren, kan dit leiden tot insertionele mutagenese bij de ontvanger, omdat muizenretrovirale vectoren een voorkeur hebben voor integratie nabij ‘transcription start sites’, waarbij de promoteractiviteit van de 3’LTR kan leiden tot activatie van oncogenen.^{21,22,23} Om deze reden wordt de aanwezigheid van vrije vectordeeltjes in het therapeutische product als risicofactor gezien.

Blootstelling van derden aan vrije retrovirale vectordeeltjes kan plaatsvinden bij bloedcontact door bijvoorbeeld prikincidenten (zoals bij toediening van het medische product, of bij monsterafname). Bij prikincidenten tijdens monsterafname zullen beduidend minder vrije vectordeeltjes overgedragen worden dan aanwezig zijn in het medische product.

Wanneer een met VSV-G gepseudotypeerde lentivirale vector is gebruikt voor *ex vivo* transductie van cellen, is de kans op uitscheiding van vrije vectordeeltjes klein, omdat eventueel aanwezige vrije vectordeeltjes na toediening snel geïnactiveerd worden (wegens de inactivatie door het complementsysteem en de korte halfwaardetijd van de vectordeeltjes). In geval van onbedoelde blootstelling van derden aan vrije retrovirale VSV-G gepseudotypeerde vectordeeltjes, zal de hoeveelheid aanwezige vectordeeltjes om dezelfde redenen snel afnemen.²⁴ Desalniettemin kan niet uitgesloten worden dat de vrije vectordeeltjes cellen kunnen transduceren bij onbedoelde blootstelling. Het is onwenselijk dat derden worden blootgesteld aan vrije retrovirale deeltjes, met name wanneer een andere pseudotypering dan VSV-G wordt gebruikt. De COGEM wijst daarom op het belang dat er zorgvuldig gewerkt wordt voor, tijdens en na de toediening van het medische product, om de kans op onbedoelde blootstelling te beperken.

Het aantal vrije vectordeeltjes kan gereduceerd worden door kweek- en wasprocedures te introduceren voordat het uiteindelijke medisch product wordt teruggegeven aan de patiënt. Voordat de getransduceerde cellen aan de patiënt worden teruggegeven dient de aanvrager met behulp van een gevalideerde test aan te tonen dat geen vrije vectordeeltjes aanwezig zijn. Wanneer een gevalideerde test niet kan worden uitgevoerd, kan de COGEM formule worden toegepast die is opgesteld om de

reductie van vectordeeltjes als gevolg van de kweek- en wasprocedures te berekenen.²⁵ De resulterende reductieratio is voor de COGEM mede van belang voor de risicoanalyse, waarop zij de inschaling van de werkzaamheden met lenti- en retrovirale vectoren baseert:

$$\text{Reductieratio} = (20^W \times 200^I \times 2^{F \times T}) / C_i$$

In deze formule is W het aantal wasstappen, I het aantal inactiverende wasstappen met trypsine of humaan serum, en staat T voor de kweektijd in dagen (etmalen) na transductie. De factor F wordt berekend door het getal 24 (het aantal uren in een etmaal) te delen door de halfwaardetijd van het vectordeeltje. C_i is het oorspronkelijke aantal virusdeeltjes in het inoculum.

De formule is oorspronkelijk opgesteld voor inschaling van werkzaamheden met lentivirale vectoren onder ingeperkt gebruik (in laboratoria). Echter, de COGEM signaleert dat de formule steeds breder wordt ingezet, onder andere bij het beoordelen van aanvragen voor klinische studies. Daarbij worden zowel de aanwezigheid (of afwezigheid) van vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes berekend, maar ook retrovirale vectordeeltjes die gepseudotypeerd zijn met envelopeiwitten van verschillende oorsprong.

De COGEM wijst er op dat bij gebruik van deze formule zorgvuldigheid is geboden. De halfwaardetijd van het vectordeeltje is afhankelijk van het envelopeiwit en kan voor retrovirale en lentivirale vectordeeltjes verschillen. Voor bijvoorbeeld lentivirale vectoren gepseudotypeerd met VSV-G geldt bij 37°C een halfwaardetijd van 10 uur,²⁶ waardoor F het getal 2,4 bedraagt. Voor MoMLV vectoren gepseudotypeerd met VSV-G geldt een halfwaardetijd van 4,5 uur,²⁶ waardoor F het getal 5,3 bedraagt. Eveneens dient experimenteel te zijn vastgesteld dat wassen met humaan serum resulteert in inactivatie van de vector wanneer de vector is gepseudotypeerd met een ander envelopeiwit dan VSV-G.

Voor retrovirale (op MoMLV gebaseerde) vectoren in klinische studies hanteert de COGEM veiligheidsmarge van de reductieratio van minimaal 100. Deze waarde betekent dat er minder dan 0,01 infectieus vectordeeltje in het medische product aanwezig is.

2.1.3 Recombinatie of complementatie van de vector in het medisch product

In theorie zou recombinatie met of complementatie van de virale vector kunnen plaatsvinden in de getransduceerde cellen met mogelijk het ontstaan van RCR of recombinant virus tot gevolg. Een eerste vereiste hiervoor is de aanwezigheid van een verwant lenti- of retrovirus in dezelfde cel als de retrovirale vector, die de verloren functies van de vector kan complementeren of waarmee deze kan recombineren. In veel aanvragen worden patiënten met acute of chronische infectie met HIV (en daarnaast ook HTLV) uitgesloten van deelname. De COGEM merkt op dat de kans op recombinatie met of complementatie door infectie met HIV of HTLV verwaarloosbaar klein is, omdat MoMLV vanwege beperkte sequentiehomologie zeer slecht kan recombineren met, of gecomplementeerd kan worden door humane lentivirussen of endogene retrovirussen.

De kans op recombinatie met of complementatie van de retrovirale vector met gammaretrovirussen is eveneens verwaarloosbaar klein aangezien er geen gevallen bekend zijn van infecties van MoMLVs

en andere gammaretrovirussen in mensen.^{16,17} In het uitzonderlijke geval dat er complementatie van de retrovirale vector plaatsvindt, zal dit alsnog een verwaarloosbaar klein milieurisico geven, aangezien de virale vector replicatiedeficiënt is en zich niet verder kan verspreiden. In conclusie is de COGEM van oordeel dat HIV of HTLV positieve patiënten niet uitgesloten hoeven te worden van studies waarin retrovirale vectoren gebruikt worden.

3. SIN lentivirale vectoren geproduceerd met derde generatie productiesystemen

Zoals eerder vermeld worden in klinische studies hoofdzakelijk derde generatie SIN lentivirale vectoren gebruikt die zijn afgeleid van HIV-1. HIV-1 is de typesoort van het genus *Lentivirus*.¹³ Van nature infecteert HIV-1 verschillende cellen van het immuunsysteem zoals T-cellen), macrofagen en monocytten.¹⁵

In de Regeling ggo 2013 worden de volgende criteria genoemd waaraan het productiesysteem van een derde generatie SIN lentivirale vector moet voldoen:²⁷

- de genen *gag/pol*, *rev*, het transgen en het gen dat codeert voor de pseudotyperingsenvelop zijn verdeeld over vier individuele plasmiden;
- de accessoire en regulatoire genen *vif*, *vpr*, *tat*, *vpu* en *nef* ontbreken;
- uitsluitend het plasmide met het transgen (de transfer vector) bevat het packaging signaal en de LTR's, waarbij uit de 3'LTR sequentie de promoter en enhancer sequenties zijn verwijderd (de zogenoemde selfinactiverende (SIN) vector);
- de genen voor replicatie en packaging zijn verdeeld over de andere drie plasmiden, het packaging signaal en de LTR's ontbreken en het pseudotyperingsenvelopeiwit is afkomstig van het vesiculaire stomatitis virus (VSV-G).

De COGEM merkt op dat pseudotypering met VSV-G geen kenmerk is van een derde generatie SIN lentiviraal vectorsysteem, en dat derde generatie lentivirale vectoren gepseudotypeerd met andere envelopeiwitten ook vallen onder de generieke milieurisicobeoordeling.

De gepseudotypeerde lentivirale SIN vectordeeltjes voor transductie van autologe cellen worden geproduceerd door co-transfectie van cellen met de transferplasmide en de drie helperplasmiden.²⁸ Doordat de lentivirale genen over de verschillende plasmiden verdeeld zijn, wordt de kans op het ontstaan van replicatiecompetent lentivirus (RCL) tijdens de productie sterk gereduceerd. Bij SIN-vectoren is een deel van de 3'LTR, het zogenaamde U3 domein, verwijderd. Tijdens reverse transcriptie naar het provirale genoom wordt deze deletie overgenomen in de 5'LTR waardoor de vector geen functionele LTR's meer bezit. Met deze deletie is de Tat afhankelijke promoteractiviteit uit het LTR domein verwijderd en wordt de transcriptie via Tat verhinderd. Dit reduceert de kans op mobilisatie van de vector uit het genoom van de gastheer aanzienlijk.²⁹

In het U3 domein van de LTR bevinden zich zogenoemde promoter en enhancer sequenties. Indien het provirale DNA afkomstig van een wildtype lentivirale vector in het genoom van de gastheer integreert in de buurt van een proto-oncogen kan de aanwezigheid van het U3 domein leiden tot de activering van het betreffende proto-oncogen. Door de deletie van het U3 domein uit de 3'LTR in de

SIN vectoren wordt, naast de reductie op mobilisatie van de vector, tevens de mogelijke activering van naburige proto-oncogenen door het U3 domein teniet gedaan.³⁰

3.1 Overwegingen SIN lentivirale vectoren geproduceerd met derde generatie productiesystemen

Een generieke milieurisicobeoordeling is mogelijk bij gebruik van derde generatie SIN lentivirale vectoren afgeleid van HIV-1. Eender als bij de milieurisicobeoordeling bij retrovirale systemen zijn de volgende aspecten van belang voor de milieurisicobeoordeling van lentivirale vectoren: (i) de mogelijke vorming van replicatiecompetent lentivirus (RCL) tijdens de productie van de lentivirale vector, (ii) de aanwezigheid van vrije vectordeeltjes in het uiteindelijke genproduct, en (iii) de kans op complementatie en mobilisatie van de lentovirale vector. Hieronder zullen deze aspecten puntsgewijs behandeld worden.

3.1.1 De mogelijke vorming van replicatiecompetent lentivirus (RCL) tijdens de productie van de lentivirale vector

Een mogelijk risico bij de productie van lentivirale vectordeeltjes is het ontstaan van RCL. In theorie zou RCL kunnen ontstaan door recombinatie tussen de verschillende plasmiden benodigd voor de productie van de virale vector, of met endogene retrovirussequenties die in het genoom van de gebruikte cellijn aanwezig zijn.

De kans op het ontstaan van RCL tijdens de productie van de virale vector is afhankelijk van het aantal recombinatie gebeurtenissen dat nodig is om een replicatiecompetent vectordeeltje te construeren. Tijdens de productie van lentivirale SIN vectoren met het productiesysteem van de derde generatie moeten minimaal drie recombinatie gebeurtenissen plaatsvinden, moeten de ontbrekende accessoire genen worden opgenomen in het genoom van de vector en dient de deletie in de LTR van het SIN-construct gerepareerd te worden, alvorens RCL zou kunnen ontstaan. In de wetenschappelijke literatuur zijn nooit meldingen geweest van RCL bij gebruik van een derde generatie SIN productiesysteem.^{20,31,32} In het verleden heeft de COGEM gesteld dat vorming van RCL tijdens de productie van derde generatie SIN lentivirale vectoren niet mogelijk is;²⁵ derhalve is het niet nodig te testen op RCL in de productiecellen of in de vectorbatch die voor transductie gebruikt wordt.

3.1.2 De aanwezigheid en concentratie van vrije vectordeeltjes in het uiteindelijke genproduct

Na transductie van de T-cellen kunnen vrije infectieuze vectordeeltjes in het te testen medisch product achterblijven. In het geval van calamiteiten zouden deze vrije vectordeeltjes naar derden kunnen verspreiden, zoals bij een prikincident, waardoor de behandelend arts of iemand van het verplegend personeel besmet kan raken.

In tegenstelling tot de overwegingen voor retrovirale vectoren (zoals uiteengezet in paragraaf 2.1.2) is het risico op insertionele mutagenese verwaarloosbaar klein door aanwezigheid van de SIN deletie in derde generatie lentivirale vectoren. Echter, ook voor lentivirale vectoren geldt dat vrije vectordeeltjes in het terug te geven medische product gezien kunnen worden als een milieurisico. De aanvrager kan met behulp van een gevalideerde test aan tonen dat geen infectieuze vrije vectordeeltjes aanwezig zijn. Wanneer een gevalideerde test niet kan worden uitgevoerd, kan de COGEM formule (zie paragraaf 2.1.2) worden toegepast, waarbij de COGEM een reductieratio van minimaal 1 hanteert

bij gebruik van SIN lentivirale vectoren geproduceerd met een derde generatie systeem.³³ Deze waarde komt overeen met minder dan 1 infectieus vectordeeltje in het medische product.

3.1.3 De kans op complementatie en mobilisatie van de vector

In theorie zou recombinatie met of complementatie van de virale vector kunnen plaatsvinden in de getransduceerde cellen met mogelijk het ontstaan van RCL of recombinant virus tot gevolg. Een eerste vereiste hiervoor is de aanwezigheid van een verwant lenti- of retrovirus in dezelfde cel als de lentivirale vector, die de verloren functies van de vector kan complementeren. In veel aanvragen worden patiënten met retrovirale infecties (HIV-1, en -2, en HTLV-1, en -2) uitgesloten van deelname aan klinische studies. De COGEM heeft eerder geconcludeerd dat het niet uitsluiten van patiënten met HTLV infectie geen invloed heeft op de milieurisicobeoordeling.^{4,11} De aanwezigheid van de SIN deletie in lentivirale vectoren verkleint de kans op mobilisatie door een mogelijke HIV superinfectie, maar kan mobilisatie niet geheel voorkomen.^{34,35} De kans op mobilisatie zal verder gereduceerd worden door het gebruik van anti-retrovirale middelen (geïndiceerd bij HIV infectie), die de ‘viral load’ verlagen, waarmee ook de kans op transductie door een eventueel gemobiliseerde vector afneemt. Aangezien mobilisatie bij HIV-seropositieve proefpersonen niet geheel uitgesloten kan worden, is het eventuele risico mede afhankelijk van het transgen dat tot expressie wordt gebracht. Dit risico zal daarom casusgewijs beoordeeld moeten worden. Alleen klinische studies waarbij HIV-1 en HIV-2 seropositieve patiënten worden uitgesloten, vallen derhalve onder de hier voorgelegde generieke milieurisicobeoordeling.

4. Algemene overwegingen:

De COGEM beperkt de onderhavige generieke milieurisicobeoordeling tot retrovirale vectoren afgeleid van MoMLV en SIN lentivirale vectoren geproduceerd met een derde generatie productiesysteem. Het transgen dat tot expressie gebracht wordt dient niet te coderen voor sequenties die in staat zijn de replicatiedeficiente retro- of lentivirale vector te complementeren.

4.1 Transduceren van autologe cellen

De generieke milieurisicobeoordeling is voorbehouden aan klinische studies waarbij autologe cellen *ex vivo* getransduceerd worden, dat wil zeggen dat cellen uit een patiënt na transductie aan dezelfde patiënt worden teruggegeven. Omdat tot nu toe alleen aanvragen betreffende transductie van autologe cellen beoordeeld zijn door de COGEM, is in deze gevallen voldoende ervaring opgedaan om een generieke milieurisicobeoordeling te kunnen uitvoeren.

4.2 Moleculaire karakterisering

Volgens de criteria die de COGEM in 2013 heeft vastgesteld voor de moleculaire karakterisering van ggo's voor medische toepassingen, dient het insert inclusief eventueel gebruikte recombinatiesequenties volledig gesequenced te worden.³⁶ Bij *ex vivo* transductie van patiëntencellen zijn de integratie-sites van de retro- en lentivirale vector in het gastheergenoom tot op zekere hoogte willekeurig. Dit heeft als gevolg dat de uitkomst van de sequentie-analyse van elk van de getransduceerde cellen binnen het medische product verschilt. Daarnaast verschillen de te

transduceren cellen tussen patiënten onderling. Een exacte moleculaire karakterisering van de gg-cellen is daarom praktisch gezien niet haalbaar.

De COGEM acht een volledige moleculaire karakterisering van de gebruikte transfer- en helperplasmiden afdoende. Als de sequentie van het geïntegreerde vectorgenoom in de 'EOP' cellen overeenkomt met de beoogde sequentie, acht zij het medisch product afdoende gekarakteriseerd. De COGEM sluit niet uit dat er tijdens het productieproces van het medische product enkele puntmutaties in het geïntegreerde virale vectorgenoom in de getransduceerde cellen ontstaan. Echter, deze puntmutaties hebben geen invloed op de milieurisicobeoordeling omdat de mutaties geen gevolgen kunnen hebben voor mogelijke verspreiding van de gg-vector.

4.3 Uitsluiten van macrofagen en dendritische cellen

Met betrekking tot vraag 4 van BGGO merkt de COGEM op dat HIV virusdeeltjes na interactie van het envelopeiwit met het dendritische cel specifieke C-type lectine (DC-SIGN), geïnternaliseerd kunnen worden in macrofagen en dendritische cellen. Zonder dat HIV in deze cellen repliceert, is vervolgens infectie van naburige cellen mogelijk. Dit proces wordt *trans*-infectie genoemd.³⁷

De in klinische studies gebruikte lentivirale vectordeeltjes worden gepseudotypeerd met andere eiwitten dan het HIV-1 envelopeiwit. De COGEM acht het niet waarschijnlijk dat macrofagen en dendritische cellen via DC-SIGN met gepseudotyperde lentivirale vectordeeltjes zullen interacteren en deze zullen internaliseren. Echter, als desalniettemin derden blootgesteld worden aan macrofagen of dendritische cellen die lentivirale vectordeeltjes geïnternaliseerd hebben, kan op basis van de huidige kennis niet geheel worden uitgesloten dat macrofagen geïnternaliseerde vectordeeltjes hebben overgedragen, voordat deze als lichaamsvreemd zijn herkend en zijn afgebroken. De COGEM adviseert daarom om, indien het medisch product getransduceerde macrofagen betreft, deze niet onder de generieke milieurisicobeoordeling te laten vallen.

4.4 Effecten van de mogelijke blootstelling van het milieu aan de getransduceerde cellen

De *ex vivo* getransduceerde cellen kunnen zich buiten het lichaam niet handhaven. Een situatie waarin eventuele overdracht van gg-lichaamscellen zou kunnen plaatsvinden is door prikincidenten, echter de COGEM acht het milieurisico hiervan verwaarloosbaar klein omdat het afweersysteem van de ontvanger deze cellen vernietigt.

De COGEM merkt op dat gg-T-cellen en CD34+-cellen die zich differentiëren naar gg-T-cellen bijzondere aandacht verdienen indien deze na transductie een specifieke TCR of een CAR tot expressie brengen. Overdracht van gg-T-cellen vanuit de patiënt naar andere personen kan behalve door prikincidenten, plaatsvinden door donatie van weefsels/organen of bloed, overdracht via de placenta (naar ongeboren kind), via moedermelk, of via het semen (seksueel contact).^{38,39} Uit studies blijkt dat getransduceerde T-cellen maanden of zelfs jaren na toediening nog gedetecteerd kunnen worden in patiënten.^{40,41,42,43,44,45,46} In een enkele studie zijn 11 jaar na toediening nog gg-T-cellen ontdekt, met een geschatte halfwaardetijd van meer dan 16 jaar.⁴⁷ De COGEM acht het aannemelijk dat gg-T-cellen na toediening langere tijd (meerdere jaren) kunnen persisteren in het lichaam.

Op basis van de informatie uit een in opdracht van de COGEM opgesteld onderzoeksrapport³⁸ en de wetenschappelijke literatuur, heeft de COGEM gesignaleerd dat overdracht van gg-T-cellen na gg-T-cel therapie in specifieke gevallen een potentieel risico voor derden kan vormen, mede afhankelijk van de specifieke modificaties van de receptor op de gg-T-cel.³⁹ Bij overdracht via prikincidenten, semen en bloeddonatie is het verwachte effect verwaarloosbaar klein omdat overgedragen gg-T-cellen door het afweersysteem van de ontvanger vernietigd zullen worden. Bij overdracht via weefsel-/orgaan-/stamceldonatie, borstvoeding of de placenta kan niet uitgesloten worden dat gg-T-cellen een schadelijk effect kunnen veroorzaken in de ontvanger. De gevolgen van blootstelling aan gg-T-cellen via de placenta (ongeboren kind), borstvoeding (pasgeborenen) of door transplantatie van weefsels, organen of stamcellen zijn vooralsnog lastig te bepalen. Deze kunnen vergelijkbaar zijn met die van de beoogde patiënt, maar zijn mede afhankelijk van de specifieke geïntroduceerde receptor op de gg-T-cel.³⁹

In haar begin dit jaar uitgebrachte signalering gaat de COGEM verder in op de problematiek rond mogelijke overdracht van gg-T-cellen.³⁹ Zij signaleert dat overleg noodzakelijk is over de eventuele risico's en dringt er op aan dat instanties, die betrokken zijn bij de beoordeling en uitvoering van klinische studies, in overleg treden over hoe om te gaan met deze eventuele risico's en waar de verantwoordelijkheden hierover liggen.

5. Onderzoeksproject naar stabiliteit van lentivirale vectordeeltjes

Er is op dit moment een door de COGEM geïnitieerd onderzoeksproject gaande, waarin onder meer de stabiliteit van lentivirale vectordeeltjes gepseudotyped met verschillende envelopeiwitten geanalyseerd wordt. De uitkomsten van dit onderzoek zullen in het najaar gepubliceerd worden en kunnen invloed hebben op generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies waarbij retro- en lentivirale vectoren gebruikt worden. Naar aanleiding van dit onderzoeksrapport zal een nieuw advies betreffende het gebruik van retro- en lentivirale vectoren worden opgesteld.

6. Advies

De COGEM stemt in met de voorgelegde generieke milieurisicobeoordeling zoals die is opgesteld voor klinische studies met *ex vivo* getransduceerde cellen. Dit onder de voorwaarde dat deze milieurisicobeoordeling autologe cellen betreft die worden getransduceerd met retrovirale vectoren gebaseerd op het Moloney murine leukemia virus (MoMLV), of met self-inactivating (SIN) lentivirale vectoren gebaseerd op HIV-1 die geproduceerd zijn met een derde generatie productiesysteem.

Voor de generieke milieurisicobeoordeling acht de COGEM het verder van belang dat:

- het gebruikte transgen niet codeert voor sequenties die in staat zijn de replicatiedeficiente retro- of lentivirale vector te complementeren,
- de plasmiden nodig voor de productie van de vector, alsmede het geïntegreerde vectorgenoom in de 'end of production' cellen, moleculair gekarakteriseerd zijn,
- er geen vrije infectieuze vectordeeltjes in het terug te plaatsen medische product aanwezig zijn,

- bij het gebruik van een retrovirale vector, de vectorbatch, de ‘end of production’ cellen, of het uiteindelijke medische product (de getransduceerde cellen) gecontroleerd worden op de afwezigheid van RCR,
- bij het gebruik van een lentivirale vector getransduceerde macrofagen van de generieke milieuriscobeoordeling worden uitgesloten,
- bij het gebruik van een lentivirale vector HIV-1 en HIV-2 positieve patiënten van de generieke milieuriscobeoordeling worden uitgesloten.

Wanneer aan bovenstaande voorwaarden is voldaan, is de COGEM van oordeel dat de milieurisiko's van dergelijke klinische studies verwaarloosbaar klein zijn.

7. Signalering

In de schriftelijke reactie van de minister van IenW,⁴⁸ en bijlage daarbij,⁴⁹ op de inbreng van de Tweede Kamer tijdens het Algemeen Overleg Biotechnologie en Kwekersrecht van 25 april 2019, wordt opgemerkt dat er geen formele belemmering is om in Nederland een vergunning voor genterapie onder ingeperkt gebruik aan te vragen, mits afdoende kan worden onderbouwd dat het gebruikte ggo niet in het milieu terecht kan komen en daardoor geen risico's voor mens en milieu kunnen ontstaan. Tevens is gesteld dat het benutten van mogelijkheden om medische toepassingen als ingeperkt gebruik te behandelen verder verkend en gerealiseerd moeten worden.

De COGEM signaleert dat, gezien het verwaarloosbaar kleine risico en het feit dat er geen verspreiding in het milieu optreedt bij klinische studies waarbij gebruik gemaakt wordt van retrovirale vectoren gebaseerd op MoMLV of derde generatie SIN lentivirale (HIV-1) vectoren voor de transductie van autologe cellen, dergelijke aanvragen (die voldoen aan de in dit advies gestelde voorwaarden) in aanmerking zouden kunnen komen om vergund te worden onder ingeperkt gebruik. Dit zou betekenen dat de vergunningverleningsprocedure voor dergelijke studies aanzienlijk verkort zal worden.

Referenties

1. COGEM (2011). Klinische studie met retroviraal getransduceerde humane T-lymfocyten. COGEM advies CGM/110831-01
2. COGEM (2011). Klinische studie met retroviraal getransduceerde T-cellen tegen leukemie. COGEM advies CGM/110913-01
3. COGEM (2016). Klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen tegen B-cel maligniteiten. COGEM advies CGM/160229-01
4. COGEM (2016). Klinische studie met getransduceerde T-cellen tegen B-cel maligniteiten. COGEM advies CGM/161130-01
5. COGEM (2017). Klinische studie met TEG001 ter behandeling van hematologische en solide tumoren. COGEM advies CGM/171013-02
6. COGEM (2018). Klinische studie met retroviraal getransduceerde T-cellen tegen hematologische maligniteiten. COGEM advies CGM/180103-02

7. COGEM (2018). Klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen (JCAR017) tegen B-cel maligniteiten. COGEM advies CGM/180612-01
8. COGEM (2018). Klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen (KITE-585) tegen B-cel maligniteiten. COGEM advies CGM/181206-01
9. COGEM (2018). Klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen (JCAR017) tegen B-cel maligniteiten (Princes Máxima Centrum). COGEM advies CGM/181231-01
10. COGEM (2019). Klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen (JNJ-68284528) tegen B-cel maligniteiten. COGEM advies CGM/190624-03
11. COGEM (2019). Klinische studie met retroviraal getransduceerde T-cellen gericht tegen MAGE-C2 maligniteiten. COGEM advies CGM/190722-01
12. COGEM (2019). Klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen (bb2121) ter behandeling van multipel myeloom. COGEM advies CGM/190726-01
13. International Committee on Taxonomy of Viruses. Taxonomy. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht 24 juli 2019).
14. Goff SP (2013) Retroviridae. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM et al. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
15. Freed EO & Martin MA (2013), Human Immunodeficient Viruses: Replication. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM et al. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
16. Molony murine leukemia virus safety data sheet. <https://healthsciences.ucsd.edu/som/pediatrics/research/labs/miyanohara-lab/safety/Pages/moloney-murine.aspx> (bezocht: 5-10-2017)
17. Brooks J *et al.* (2012). No evidence of cross-species transmission of mouse retroviruses to animal workers exposed to mice. *Transfusion* 52: 317-325
18. Bear AS *et al.* (2012). Replication-competent retroviruses in gene-modified T cells used in clinical trials: is it time to revise the testing requirements? *Mol. Ther.* 20: 246-249
19. Lyon, N *et al.* (2018). Absence of replication-competent retrovirus in vectors, T cell products, and patient follow-up samples. *Mol. Ther.* 26: 6-7
20. Marcucci, KT *et al.* (2018). Retroviral and lentiviral safety analysis of gene-modified t cell products and infused HIV and oncology patients. *Mol. Ther.* 26: 269-279
21. Bushman F *et al.* (2005) Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 848–858
22. Cattoglio C *et al.* (2007) Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells. *Blood* 110: 1770–1778
23. Cattoglio C *et al.* (2010). High-definition mapping of retroviral integration sites identifies active regulatory elements in human multipotent hematopoietic progenitors. *Blood.* 116: 5507-5517
24. Carmo M *et al.* (2009). Stabilization of gammaretroviral and lentiviral vectors: from production to gene transfer. *J. Gene Med.* 11: 670-678
25. COGEM (2009). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. COGEM advies CGM/090331-03

26. Higashikawa F & Chang L-J (2001). Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology*. 280: 124-131
27. Regeling GGO 2013. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2019-07-01#Bijlage5> (bezoekt 24 juli 2019)
28. Cockrell AS & Kafri T (2007). Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol. Biotechnol.* 36: 184-204
29. Kappes JC and Wu X (2002) Safety consideration in vector development *Somat. Cell Mol. Genet.* 126: 147-158
30. Zufferey *et al.* (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery. *J. Virol.* 72: 9873-9880
31. Sastry L *et al.* (2003). Certification assays for HIV-1-based vector: frequent passage of gag sequences without evidence of replication-competent viruses. *Mol. Ther.* 8: 830-839
32. Cornetta K *et al.* (2018). Absence of replication competent lentivirus in the clinic: analysis of infused T cell products. *Mol Ther.* 26: 280-288
33. COGEM (2018). Vrije virusdeeltjes in klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen (JCAR017) tegen B-cel maligniteiten. COGEM advies CGM/180702-01
34. Grunwald TFS *et al.* (2004). Reducing mobilization of simian immunodeficiency virus based vectors by primer complementation. *J. Gene Med.* 6:147-154
35. Hanawa H *et al.* (2005). Mobilization and mechanism of transcription of integrated self-inactivating lentiviral vectors. *J. Virol.* 79: 8410-8421
36. COGEM (2013). Criteria voor moleculaire karakterisering van ggo's voor medische en veterinaire toepassing. COGEM advies CGM/130227-05
37. Geijtenbeek TBH *et al.* (2000). DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100: 587-597
38. Bergmans H *et al.* (2018). Milieurisicoanalyse van klinische toepassingen van genetisch gemodificeerde T-cellen. COGEM onderzoeksrapport 2018-5
39. COGEM (2019). Immunotherapie met genetisch gemodificeerde T-cellen: onbedoelde blootstelling en potentiële risico's. COGEM signalering CGM/190227-01
40. Morgan RA *et al.* (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314: 126-129
41. Porter DL *et al.* (2011). Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 365: 725-733
42. Kalos M *et al.* (2011). T-cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci. Transl. Med.* 3: 95ra73
43. Maude SL *et al.* (2014). Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N. Engl. J. Med.* 371: 1507-1517
44. Oliveira G *et al.* (2015). Tracking genetically engineered lymphocytes long-term reveals the dynamics of T cell immunological memory. *Sci. Transl. Med.* 7: 317ra198.
45. Walker RE *et al.* (2000). Long-term *in vivo* survival of receptor-modified syngeneic T cells in patients with human immunodeficiency virus infection. *Blood* 96: 467-474

46. Mitsuyasu RT *et al.* (2000). Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects . *Blood* 96: 785-793
47. Scholler J *et al.* (2012). Decade-long safety and function of retroviral-modified chimeric antigen receptor T cells. *Sci. Transl. Med.* 4: 132ra53
48. Kamerbrief minister IenW 'Reactie op inbreng Tweede Kamer tijdens AO Biotechnologie en Kwekersrecht op 25 april 2019' (20 juni 2019).
49. Bijlage bij de brief reactie op inbreng Tweede Kamer tijdens AO Biotechnologie en Kwekersrecht