

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

DATUM 7 mei 2020
KENMERK CGM/200507-01
ONDERWERP Generieke milieurisicobeoordeling klinische studies met vrije virusdeeltjes

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van de uitkomsten van een in opdracht van de COGEM uitgevoerd onderzoeksproject, welke van invloed zijn op de Europese milieurisicobeoordeling van gentherapiestudies met *ex vivo* genetisch gemodificeerde cellen, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

Voor gentherapiestudies waarbij gebruik wordt gemaakt van humane cellen die buiten het lichaam genetisch zijn aangepast en daarna weer in de patiënt worden teruggeplaatst, is er Europa-breed een generieke milieurisicobeoordeling opgesteld, met als doel vergunningaanvragen voor deze studies te vereenvoudigen.

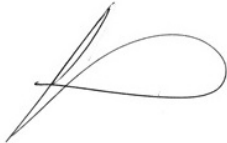
In de generieke risicobeoordeling zijn verschillende vereisten geformuleerd waaraan voldaan moet worden. Eén van deze vereisten betreft de afwezigheid van zogenaamde 'vrije' virusvectordeeltjes. Dit zijn mogelijke 'restproducten' die overblijven na de genetische modificatie van de cellen. De afwezigheid van vectordeeltjes kan experimenteel worden bepaald, maar ook theoretisch worden geschat. In de Europese risicobeoordeling wordt hiertoe verwezen naar een eerder door de COGEM opgestelde rekenformule.

De COGEM heeft deze formule voor de meest gebruikte virusvectoren, de zogenaamde lentivirale vectoren, experimenteel laten valideren. Uit het onderzoek blijkt dat de formule aanpassing behoeft en dat het aantal vrije vectordeeltjes in het verleden onderschat is. Een consequentie hiervan is dat het bij toekomstige aanvragen waarschijnlijk niet altijd mogelijk zal zijn om uit te sluiten dat op het moment van toediening aan de patiënt nog vectordeeltjes in het medisch product aanwezig zijn, waardoor de vergunningaanvraag niet voldoet aan de eisen van de Europese milieurisicobeoordeling.

De COGEM heeft uitgaande van een 'worst case scenario' berekend wat de kans is dat derden bij dergelijke studies aan vrije vectordeeltjes worden blootgesteld. Aangezien 16 uur na toediening van het medisch product de virusdeeltjes uit de patiënt geklaard lijken te zijn, en overdracht door standaard ziekenhuishygiënische en enkele aanvullende maatregelen voorkomen kan worden, adviseert de COGEM dat patiënten na toediening minimaal 16 uur in het ziekenhuis moeten verblijven. Onder inachtneming van de beschreven voorwaarden, is de COGEM van oordeel dat ook studies met genetisch aangepaste cellen waarbij nog vrije lentivirale vectordeeltjes aanwezig zijn, onder de Europese generieke milieurisicobeoordeling kunnen vallen.

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
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
DG Milieu en Internationaal
 - Dr. K.R.J. Vanmolkot, Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek
 - Mr. N. Gušić, Ministerie van VWS

Generiek advies over de milieurisicobeoordeling van klinische studies met *ex vivo* lentiviraal getransduceerde cellen: aanwezigheid van vrije vectordeeltjes in het medisch product

COGEM advies CGM/200507-01

1. Inleiding

Bij steeds meer genterapiestudies wordt gebruik gemaakt van genetisch gemodificeerde (gg-)cellen. Hierbij worden bepaalde cellen bij de patiënt afgenomen, genetisch aangepast en weer teruggeplaatst. Voor de genetisch modificatie (transductie) worden virale vectoren gebruikt die afgeleid zijn van lentivirussen en retrovirussen (lenti- en retrovirale vectoren; zie §2). Na transductie ondergaan de gg-cellen diverse kweek- en wasstappen, met mede als doel de overmaat aan zogenaamde 'vrije' (niet in de cel geïnternaliseerde) vectordeeltjes te verwijderen.

De genterapieën blijken zeer succesvol, onder andere voor de behandeling van bepaalde soorten bloedkankers, zoals leukemie.^{1,2,3} Vanwege de sterke toename van dit type genterapiestudies, hebben de nationale bevoegde autoriteiten ('competent authorities') van de EU-lidstaten in samenwerking met de 'Commission services' in 2019 een generiek 'Good practice document' ontworpen, met als doel binnen Europa de milieurisicobeoordeling van vergunningaanvragen voor deze studies te faciliteren en te stroomlijnen.^{4,5} Het 'Good practice document' behandelt specifiek de milieurisico-aspecten gerelateerd aan de toepassing van lenti- en retrovirale vectoren. In het document zijn verschillende vereisten opgesteld waaraan de vectoren en gg-cellen moeten voldoen. Eén van deze vereisten betreft de afwezigheid van vrije vectordeeltjes in de gg-celsuspensie (het medisch product). Deze vrije vectordeeltjes worden als een risicofactor gezien omdat ze mogelijk tumoren zouden kunnen veroorzaken (zie §2.2 en §2.3).

Het afwezig zijn van vrije lentivirale of retrovirale vectordeeltjes kan met behulp van een gevalideerde test experimenteel worden bepaald, bijvoorbeeld door tijdens het kweken of na het wassen van de gg-cellen het kweksupernatant of de wasvloeistof te analyseren op afname in aantallen vrije vectordeeltjes.⁶

Het is ook mogelijk om aan de hand van een eerder door de COGEM opgestelde rekenformule (de zogenaamde 'COGEM-formule') de reductie van de hoeveelheid vrije vectordeeltjes theoretisch te benaderen.⁷ Deze formule schat de afname aan vrije vectordeeltjes gedurende het bereidingsproces van de gg-cellen, en relateert deze aan het aantal tijdens de transductie toegevoegde vectordeeltjes. De afname wordt weergegeven in de vorm van de zogenaamde 'reductieratio'. Wanneer de reductieratio gelijk aan of groter is dan de vereiste grenswaarde, wordt aangenomen dat er geen vrije vectordeeltjes meer in het medisch product aanwezig zijn.

Het Europese 'Good practice document' refereert naar de COGEM-formule, en stelt de vereiste grenswaarde van de reductieratio voor lenti- en retrovirale vectordeeltjes op 100.⁵ Dit komt overeen met maximaal 0,01 vrij vectordeeltje per batch gg-cellen.

In 2019 heeft de COGEM een advies uitgebracht betreffende een generieke milieurisicobeoordeling van genterapiestudies waarbij cellen worden gebruikt die *ex vivo* genetisch gemodificeerd zijn.⁷ In haar advies heeft zij de vereiste grenswaarde van de hierboven genoemde reductieratio voor bepaalde lentivirale vectoren bijgesteld naar 1 (overeenkomend met maximaal één vectordeeltje per batch gg-cellen), omdat zij de risico's voor mens en milieu bij het gebruik van dit type vectoren lager achtte.

In het advies is eveneens aangegeven dat de COGEM in afwachting was van de resultaten van een op dat moment lopend onderzoeksproject naar de stabiliteit van lentivirale vectordeeltjes. Het project had als doel enkele aannames in de COGEM-formule experimenteel te onderbouwen en nieuwe data te genereren over de stabiliteit van lentivirale vectordeeltjes. Het onderzoeksproject is inmiddels afgerond, en de consequenties van de bevindingen van het project (zie §3) zijn deels in het voorliggende generieke advies verwerkt.

1.1 Onderzoeksproject COGEM-formule en consequentie onderzoeksresultaten

In de COGEM-formule wordt gebruik gemaakt van een aantal parameters. De waarden voor deze parameters zijn gebaseerd op spaarzame literatuurgegevens en op enkele theoretische aannames.^{8,9} Uit het onderzoeksproject is gebleken dat de meeste parameters in de formule aanpassing behoeven, omdat de experimenteel gemeten waarden anders zijn dan eerder werd aangenomen. Berekeningen met behulp van de eerdere waarden blijken het aantal vrije deeltjes te hebben onderschat (voor een uitgebreidere toelichting, zie §3.2).

Op basis van haar ervaringen met al eerder beoordeelde genterapiestudies, schat de COGEM in dat het bij toekomstige aanvragen niet altijd uit te sluiten is dat het aantal vrije vectordeeltjes zo ver is gereduceerd dat voldaan wordt aan de vereiste grenswaarden in het Europese 'Good practice document'. Dit betekent dat er op het moment dat het medisch product aan de patiënt wordt toegediend, nog resterende infectieuze vectordeeltjes in de gg-celsuspensie aanwezig kunnen zijn.

1.2 Doel COGEM advies

In het voorliggende advies stelt de COGEM ten behoeve van genterapieën, waarbij in het medisch product resterende vrije *lentivirale* vectordeeltjes aanwezig zijn (het betreft de zogenaamde 'self-inactivating' (SIN), VSV-G gepseudotypeerde, lentivirale vectordeeltjes), generieke beheersmaatregelen voor. Wanneer deze in acht worden genomen, is zij van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij deze studies verwaarloosbaar klein zijn. Het advies vormt in die zin een aanvulling op het eerdere uitgebrachte advies over de generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met *ex vivo* retro- en lentiviraal getransduceerde cellen.⁷

In het advies zullen eerst kort de belangrijkste verschillen tussen lenti- en retrovirale vectoren worden besproken en zal worden toegelicht wat het mogelijke risico is wanneer er bij genterapieën met *ex vivo* getransduceerde cellen resterende vrije vectordeeltjes in het medisch product aanwezig zijn (zie §2). Daarna zullen de bevindingen van het onderzoeksproject kort uiteen worden gezet (zie §3). Tot slot volgen de overwegingen die ten grondslag liggen aan de in dit advies door de COGEM geadviseerde beheersmaatregelen (zie §4).

2. Achtergrondinformatie lenti- en retrovirale vectoren

Lenti- en retrovirale vectoren worden veel voor gentherapie gebruikt omdat het genetische materiaal van deze vectoren in het DNA van de cellen van de gastheer integreert. Voor uitgebreidere informatie over de virussen waarvan deze vectoren zijn afgeleid, zie het kader 'Lenti- en retrovirussen'.

Lenti- en retrovirussen

Lenti- en retrovirussen vormen verschillende genera binnen de familie van de *Retroviridae*.¹³ De virussen 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 gammaretrovirussen van muizen of vectoren afgeleid van lentivirussen van mensen.

Het RNA genoom van lenti- en retrovirale 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 lenti- en retrovirussen 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 gedeeltelijk ontmanteld. In het cytoplasma wordt het virale RNA via een complex stappenplan omgezet in een ds DNA kopie, die in het cellulaire genoom integreert. Aan zowel het 5'- en het 3'-uiteinde van het 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 gastheer 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 de envelopeiwitten.

Een belangrijk verschil tussen retro- en lentivirussen is dat het ds DNA 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.

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*.

2.1 Risico van vrije vectordeeltjes in gg-celsuspensies bij gentherapie toepassingen

De aanwezigheid van resterende vrije vectordeeltjes in gg-celsuspensies (het medische product) wordt als risicofactor gezien. Na toediening aan de patiënt kunnen de vectordeeltjes cellen transduceren (zogenaamde secundaire transductie). Vervolgens kan de sequentie coderend voor het vectorgenoom in

het DNA van de lichaamscellen integreren. Dit proces wordt insertionele mutagenese genoemd.^a In het ernstigste geval kan insertionele mutagenese door verstoring (inactivatie) van een tumorsuppressorgen of door activatie van een proto-oncogen tot het ontstaan van kanker (oncogenese) leiden.^{10,11} Als bijkomstige effecten zouden de infectieuze vectordeeltjes daarnaast een immuunreactie te weeg kunnen brengen, of zou door de secundaire transductie het transgen in andere dan de beoogde lichaamscellen tot expressie kunnen komen.¹⁰

2.1.1 Risico's bij gammaretrovirale vectoren

De COGEM merkt op dat het optreden van insertionele oncogenese voornamelijk gebaseerd is op gegevens uit experimenten en klinische studies met gg-cellen die *ex vivo* getransduceerd zijn met gammaretrovirale vectoren afgeleid van het Moloney Murine leukemia virus (MoMLV). Deze vectoren hebben een voorkeur voor integratie nabij 'transcription start sites'. De promoteractiviteit op het uiteinde van het ingebouwde vectorgenoom (de zogenaamde 3' long terminal repeat (3' LTR)), kan daarbij leiden tot de activatie van proto-oncogenen aanwezig op het gastheergenoom.^{12,13,14}

Tot op heden is er voor drie klinische toepassingen, waarbij cellen *ex vivo* waren getransduceerd met op MoMLV gebaseerde vectoren, het ontstaan van leukemie beschreven, doordat ten gevolge van de insertie van het transgen activatie van een proto-oncogen of inactivatie van een tumorsuppressorgen plaatsvond.^{15,16,17,18,19} Dit trad op bij de eerste klinische toepassingen met dit type vectoren, namelijk gentherapieën voor de behandeling van 'X-linked Severe Combined Immunodeficiency' (X-SCID),^{20,21} X-linked Chronic Granulomatous Disease' (X-CGD),¹⁷ en het Wiskott-Aldrich syndroom.²² In totaal betrof het 14 van in totaal 32 behandelde patiënten.

Overigens werd bij een klinische studie ter behandeling van Adenosine Deaminase (ADA)-SCID (42 patiënten), geen insertionele oncogenese waargenomen, terwijl voor de transductievector dezelfde MoMLV 'backbone' was gebruikt.^{23,24,25} Onderzoek naar de integratiesites in het genoom bij de X-SCID en ADA-SCID studies toonden weinig verschillen aan.^{26,27,28} Mogelijkerwijs spelen ook andere factoren een rol bij het ontstaan van de oncogenese, zoals de aard van het gebruikte transgen.²⁹

2.1.2 Risico's bij lentivirale vectoren

Andere vectoren die veelvuldig gebruikt worden voor *ex vivo* gemedieerde transductie van cellen, zijn de zogenaamde SIN lentivirale vectoren van de derde generatie. Deze vectoren zijn afgeleid van het *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1). In deze vectoren ontbreekt een bepaald domein in de 3' LTR. Hierdoor is de kans op mobilisatie van de vector uit het gastheergenoom aanzienlijk gereduceerd. Daarnaast wordt verondersteld dat de mogelijke activering van proto-oncogenen na integratie van het vector DNA in het genoom, teniet is gedaan.³⁰

Sinds de eerste toepassing van deze lentivirale vectoren in 2009 is er geen melding gemaakt van het optreden van tumorvorming ten gevolge van insertionele mutagenese die gerelateerd kan worden aan

^a De COGEM merkt op dat de termen insertionele mutagenese en insertionele oncogenese soms door elkaar gebruikt worden. Indien ten gevolge van de integratie van het vectorgenoom in het genoom van de cel kanker ontstaat, gebruikt de COGEM de term insertionele oncogenese. Indien de integratie niet tot kanker leidt, gebruikt zij de term insertionele mutagenese.

het gebruik van de vector.^{31,32,33,34,35,36} In de afgelopen jaren zijn er veel klinische studies uitgevoerd met T-cellen en CD34+ hematopoïetische stamcellen die *ex vivo* met dit type lentivirale vectoren getransduceerd zijn.³⁷ Hierbij zijn er voor zover bekend nooit gevallen van leukemie gerapporteerd. Wel zijn niet-kwaadaardige klonale expansies van cellen beschreven bij een gentherapiestudie voor de behandeling van adrenoleukodystrophie,³¹ en bij een gentherapiestudie voor de behandeling van thalassemie.³⁸ Dit duidt erop dat door insertie van het vectorgenoom onverwachte effecten kunnen optreden.

In de literatuur wordt er op gewezen dat bij het toepassen van SIN-lentivirale vectoren na de integratie in het genoom, 'read-through' transcriptie van het transgen zou kunnen optreden, wat tot de vorming van onbedoelde en ongewenste cellulaire-virale fusietranscripten of tot activatie van niet-actieve genen kan leiden.³⁹ Ter verdere verbetering van de bioveiligheid wordt er daarom nog steeds onderzoek naar lentivirale vectoren gedaan, en worden er nog steeds aanpassingen aan deze vectoren gemaakt.⁴⁰

3. Onderzoeksproject experimentele validatie COGEM-formule

Het onderzoeksproject naar de experimentele validatie van de COGEM-formule is uitgevoerd door dr. I.J.C. Dautzenberg en prof. dr. R.C. Hoeben van het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC). Het resulterende onderzoeksrapport 'The COGEM formula revisited, experimental validation of the reduction ratio formula for free lentiviral particles' (CGM 2020-01)⁴¹ is van de COGEM-website te downloaden.

De doelen van het onderzoeksproject betroffen het experimenteel valideren van de gebruikte waarden van de verschillende parameters in de COGEM-formule voor SIN derde generatie VSV-G gepseudotyperde lentivirale vectordeeltjes, en het onderzoeken of deze gevalideerde waarden eveneens toepasbaar zijn voor dit type vectordeeltjes, maar dan gepseudotyperd met andere heterologe envelop-eiwitten. Dit waren de envelopewitten van het Feline endogenous virus RD114, *Gibbon ape leukemia virus* (GALV), MoMLV (zowel ecotroop als amfotroop), de hemagglutinine (H) en fusion (F) glycoproteïnen van *Measles morbillivirus* (Mazelenvirus), en het glycoproteïne van *Rabies lyssavirus* (Rabiësvirus).

De COGEM merkt op dat VSV-G veel bij klinische studies en laboratoriumexperimenten wordt toegepast. De andere envelopewitten worden met name bij laboratoriumexperimenten gebruikt.

3.1 COGEM-formule nader toelicht

Oorspronkelijk is de COGEM-formule ontwikkeld ten behoeve van de risicobeoordeling van laboratoriumwerkzaamheden met replicatiedeficiënte VSV-G gepseudotyperde lentivirale vectoren (Ingeperkt Gebruik), in het bijzonder voor werkzaamheden met lentiviraal getransduceerde hechtende cellen.^{8,9} Met behulp van de formule wordt de al eerder genoemde reductieratio berekend. Deze ratio geeft het verlies aan infectieuze titer van vrije replicatiedeficiënte vectordeeltjes weer na de bereiding van de gg-cellen.

Aspecten die bij de reductie van de infectieuze titer een rol spelen, betreffen a) de 'natuurlijke' inactivatie van de infectieuze deeltjes (verdisconteerd in de halfwaardetijd), b) de inactivatie van deeltjes

onder invloed van trypsine of humaan serum, c) het verlies aan deeltjes door het wassen of passeren van de gekweekte celculturen, en d) het verlies aan deeltjes door de opname in cellen (de transductie). De gecombineerde effecten van deze reducerende stappen kunnen worden gerelateerd aan de totale hoeveelheid infectieuze deeltjes in het voor de transductie gebruikte inoculum (e).

In de COGEM-formule zijn aspecten a, b, c en e verwerkt. Aspect d is buiten beschouwing gelaten omdat deze lastig te standaardiseren is en per experiment varieert. De aspecten worden in de formule als volgt weergegeven:

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

Hierin zijn W het aantal wasstappen, I het aantal inactiverende wasstappen met trypsine of humaan serum, en T 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 (in uren) van het vectordeeltje ($T_{1/2}$). C_i is het oorspronkelijke aantal infectieuze vectorsdeeltjes in het inoculum. De constante waarde '20' (overeenkomend met een reductie van 95%) is door middel van praktische inschatting uit het veld ('expert judgment') vastgesteld.^{8,9}

Voor VSV-G gepseudotyperde lentivirale vectordeeltjes wordt voor $T_{1/2}$ 10 uur aangehouden. Als additionele reductiefactor voor een inactiverende wasstap met trypsine of humaan serum, wordt de waarde 10 aangehouden ($10 \times 20 = 200$). Beide waarden ($T_{1/2}$ en de additionele reductiefactor) zijn afgeleid uit de toentertijd in de wetenschappelijke literatuur spaarzaam aanwezige gegevens.^{42,43,44}

Voor op MoMLV gebaseerde retrovirale vectordeeltjes, worden in de literatuur, afhankelijk van de pseudotypering, verschillende waarden voor de $T_{1/2}$ bij 37°C vermeld. Deze variëren van 4 tot 13 uur.^{44,45,46,47,48,49}

3.2 Bevindingen onderzoeksproject

Uit het onderzoek blijkt dat de basisstructuur van de formule klopt, maar dat de meeste waarden van de parameters in de formule moeten worden aangepast,⁴¹ waardoor de berekende reductieratio in de praktijk lager uitkomt dan voorheen werd aangenomen. Zo blijkt uit de uitgevoerde experimenten dat de stabiliteit van de vectordeeltjes (het natuurlijke verval) in sterke mate bepaald wordt door de kweekomstandigheden waaronder de transductie heeft plaatsgevonden, en dat de stabiliteit (weergegeven in de vorm van $T_{1/2}$ en de hiervan afgeleide reductiefactor F) sterk afhankelijk is van de pseudotypering (zie pg. 32-33 rapport). Daarnaast blijkt de inactivatie van lentivirale vectordeeltjes door trypsine minder te zijn dan voorheen werd aangenomen, en is de mate van inactivatie eveneens sterk afhankelijk van de pseudotypering (zie pg. 30-31 rapport). Tevens concluderen de onderzoekers op basis van gegevens uit de literatuur dat complement-gemedieerde inactivatie per serumdonor verschilt (pg. 38-39 rapport). Tot slot merken de onderzoekers op dat het vaststellen van de titer van een vectorbatch methode-afhankelijk is (zie pg. 34-36 en pg. 40-41). Bepaalde titerbepalingen kunnen daardoor tot een onderschatting van het startinoculum leiden. De uitvoerders stellen daarom voor in de formule de gehanteerde waarde voor het startinoculum met 10 te vermenigvuldigen.

In het rapport is op pg. 46 een vernieuwde formule opgenomen. Tevens wordt op dezelfde pagina een overzichtstabel weergegeven, waarin per pseudotypering de in de COGEM-formule toe te passen waarden voor factor F en de reductiefactor na trypsine-inactivatie (Tryp) staan vermeld. Deze tabel wordt in vereenvoudigde vorm ook in het onderstaande kader weergegeven.

De auteurs benadrukken dat de vernieuwde formule alleen te gebruiken is voor cultures met hechtende cellen, dat het reducerende effect van wasstappen afhankelijk is van de grootte van de gebruikte kweekschaaltjes, en dat de waarden alleen betrekking hebben op lentivirale vectoren.

TABEL Reductiefactoren en halfwaardetijden (pg. 31, 33, 46 onderzoeksrapport)			
	Tryp ¹	T _{1/2} (in uren)	F
VSV-G	1	34,7	0,7
Mazelen	4	14,1	1,7
GALV	79	8,3	2,9
Rabies	2	15,4	1,6
RD114	110	21,2	1,1
MoMLV 4070A (amfotroop)	4	36,6	0,7
MoMLV 10A1 (amfotroop)	-	13,8	1,7
MoMLV (ecotroop)	10	18,6	1,3

¹ Trypsinebehandeling van cellen (tenminste 5 minuten bij 37°C)

4. Overwegingen

De COGEM merkt op dat bij verschillende studies met gg-cellen getransduceerd met VSV-G gepseudotyperde lentivirale vectoren, zowel *in vitro* als *in vivo* is aangetoond dat niet alle vectordeeltjes na kweek- en wasprocedures uit gg-celsuspensies zijn verwijderd.^{50,51,52,53,54} Tijdens klinische studies zouden daardoor, behalve de patiënt, ook derden mogelijk aan vrije vectordeeltjes in het medisch product blootgesteld kunnen worden. Zij acht het daarom ten aanzien van de milieurisicobeoordeling van belang dat in kaart gebracht wordt óf, en zo ja in welke mate, een dergelijke blootstelling plaatsvindt.

4.1 Manieren waarop derden aan vrije vectordeeltjes blootgesteld kunnen worden

Tijdens de klinische studies met *ex vivo* getransduceerde cellen, worden deze via een infuus in de bloedbaan van de patiënt ingebracht. De COGEM merkt op dat in publicaties over dit type genterapiestudies, nauwelijks tot geen gegevens kenbaar worden gemaakt of infectieuze vectordeeltjes worden uitgescheiden, bijvoorbeeld via urine, feces of andere lichaamssecretia. Door uitscheiding ('shedding') zouden derden aan de vectordeeltjes blootgesteld kunnen worden.

Studies bij muizen, waaraan VSV-G gepseudotyperde lentivirale vectordeeltjes intraveneus waren toegediend, hebben laten zien dat de vectordeeltjes niet via feces of urine worden uitgescheiden, en niet

via de kiembaan worden overgedragen.^{55,56} Ook vond er geen aerogene overdracht plaats toen behandelde en niet-behandelde muizen (zogenaamde 'sentinel' dieren) in dezelfde kooi verbleven.⁵⁶

Volgens wetenschappelijke publicaties zijn de meest waarschijnlijke routes waarlangs derden aan vectordeeltjes blootgesteld kunnen worden, bloed-bloedcontact (bijvoorbeeld bij een prikaccident) of contacttransmissie (bijvoorbeeld door het met besmette handen aanraken van de slijmvliezen van oog, neus of mond).⁵⁷

De COGEM is van oordeel dat de hierboven vermelde experimentele 'shedding-gegevens' van muizen, waarbij is aangetoond dat er geen uitscheiding via lichaamssecretora plaatsvindt, naar de mens geëxtrapoleerd kunnen worden. Dit mede gezien het feit dat, voordat de vectordeeltjes in bijvoorbeeld urine of feces terecht komen, deze al vele soorten cellen hebben moeten passeren, wat de kans op het optreden van secundaire transductie aanzienlijk verhoogt. Hierdoor zal het aantal vrije deeltjes gereduceerd zijn. Daarnaast zijn er geen redenen om aan te nemen dat eventueel nog resterende vectordeeltjes onder de in urine en feces heersende milieuomstandigheden stabiel blijven.

Het bovenstaande in overweging nemende, concludeert de COGEM dat de meest waarschijnlijke route waarlangs een derde aan vectordeeltjes zou kunnen worden blootgesteld, bestaat uit bloed-bloedcontact, of via contacttransmissie van (met bloed) besmette handen naar slijmvliezen van mond, neus of ogen. Daarbij schat zij in dat de kans op overdracht het grootst is bij bloed-bloedcontact. De COGEM acht de kans op blootstelling van derden aan vectordeeltjes via aerogene transmissie, of door 'shedding' via urine of feces verwaarloosbaar klein.

4.2 Afname aanwezigheid vectordeeltjes in de patiënt

Bij de klinische studies die de COGEM tot nu toe heeft beoordeeld en waarbij *ex vivo* getransduceerde cellen werden toegepast (periode 2011 tot begin 2020, 17 studies), varieerde de hoeveelheid gebruikte infectieuze vectordeeltjes voor de transducties van 10^6 tot 10^{12} deeltjes.^{58,59} Uitgaande van een theoretisch 'worst case scenario', betekent dit dat er in het medisch product maximaal 10^{12} deeltjes aanwezig kunnen zijn. Er vanuit gaande dat het vaatbedvolume van de mens 5 liter bedraagt, levert dit na toediening van het medisch product in de bloedbaan van de patiënt, een concentratie vectordeeltjes op van ongeveer 2×10^8 deeltjes per ml ($10^{12}/5000$).

De COGEM merkt op dat het hier geschetste zeer theoretische scenario een overschatting betreft, waarbij voorbij wordt gegaan aan het feit dat het aantal vrije vectordeeltjes in het medisch product gedurende het bereidingsproces van de gg-cellen zal afnemen, onder meer ten gevolge van biologisch verval en door het uitvoeren van wasstappen.

Indien na toediening door een incident overdracht van vectordeeltjes naar een derde plaats zou vinden, (bijvoorbeeld bij bloed-bloedcontact, of door besmetting van slijmvliezen na contact met handen die tijdens het verzorgen van de infuusinsteekopening besmet zijn geraakt), schat de COGEM in dat het maximaal overgedragen volume 100 μ l is. Uitgaande van een concentratie vectordeeltjes van 2×10^8 deeltjes per ml (zie hierboven), betekent dit dat in het geschetste 'worst case scenario' de maximale transmissie 2×10^7 vectordeeltjes zal bedragen.

De in de gg-celsuspensie nog aanwezige vrije vectordeeltjes zullen na toediening aan de patiënt door natuurlijk verval, inactivatie door complement, en eventuele secundaire transductie van lichaamscellen in aantal afnemen. DePolo *et al.* (2000) en Schaubler-Plewa *et al.* (2005) hebben *in vitro* aangetoond dat op humane cellijnen geproduceerde VSV-G gepseudotypeerde lentivirale vectordeeltjes bij 37°C door humaan serum geïnactiveerd kunnen worden, maar dat de inactivatie sterk per donor verschilt.^{43,60} Schaubler-Plewa *et al.* hebben daarnaast aangetoond dat de seruminactivatie ook sterk per pseudotypering verschilt. Zo bleek bijvoorbeeld dat amfotroop gepseudotypeerde lentivirale vectordeeltjes niet door humaan serum werden geïnactiveerd.⁶⁰

De inactivatie van de vectordeeltjes wordt gemedieerd door het in bloed aanwezige complement-systeem (een component van het aangeboren niet-specifieke immuunsysteem), maar ook antilichamen lijken hierbij een rol te spelen.^{43,60,61} Indien verschillende donoren met elkaar werden vergeleken, varieerde de reductie van het aantal vectordeeltjes na een uur van een factor 6 tot een factor 100.⁶⁰ Bij ratten is aangetoond dat van 10^7 VSV-G gepseudotypeerde lentivirale vectordeeltjes 1 uur na intraveneuze toediening minder dan 1% in het plasma konden worden aangetoond.⁶²

Bij een overdrachtsincident van 2×10^7 vectordeeltjes zal in het minst gunstige geval (reductiefactor 6 per uur) het aantal vectordeeltjes in de bloedbaan na een uur, door onder meer complementinactivatie, $\frac{1}{6} \times 2 \times 10^7 = 3,3 \times 10^6$ deeltjes bedragen. Na 9,5 uur zal er nog minder dan één vectordeeltje over zijn ($(\frac{1}{6})^{9,5} \times 2 \times 10^7 = 0,8$ deeltje). Indien het aantal deeltjes moet voldoen aan de in het Europese 'Good practice document' gestelde vereiste grenswaarde van 0,01 vectordeeltje (zie §1), zal dit 12 uur duren.

Dit zeer onwaarschijnlijke 'worst case scenario' in overweging nemende concludeert de COGEM op grond van het bovenstaande dat het aantal vectordeeltjes in de bloedbaan van de patiënt na circa 12 uur tot een verwaarloosbaar kleine hoeveelheid zal zijn gereduceerd.

De COGEM merkt op dat het geschetste scenario een extrapolatie van experimentele gegevens is, waarin verschillende aannames worden gedaan. Een belangrijke aanname is dat de inactivatie in de bloedbaan vergelijkbaar verloopt als die in serum *in vitro*. Zij sluit echter niet uit dat *in vivo* deze kinetiek anders is, bijvoorbeeld omdat de vectordeeltjes in het lichaam sneller of langzamer zullen afbreken, of omdat de deeltjes aan lichaamscellen binden, waardoor hun aantal ten gevolge van secundaire transductie mogelijk afneemt. Een andere belangrijke aanname betreft het eerder genoemde feit dat bij het geschetste theoretische scenario voorbij wordt gegaan aan de reductie van vrije vectordeeltjes tijdens de bereiding van het medisch product.^b

^b De COGEM signaleert, mede op basis van de bevindingen uit het begeleidende onderzoeksrapport,⁴¹ dat het vanuit het oogpunt van de milieurisicobeoordeling wenselijk is dat er meer onderzoek wordt gedaan naar het opzetten van goed gevalideerde methoden, die de titer van infectieuze deeltjes in vectorbatches bepalen, en meer onderzoek wordt gedaan naar goed gevalideerde methoden waarmee vrije infectieuze vectordeeltjes in gg-celsuspensies geïnactiveerd kunnen worden. Tevens is het wenselijk dat de gegevens, die bij het gebruik van deze methoden verkregen worden, beschikbaar worden gemaakt.

Al het bovenstaande in overweging nemende, acht de COGEM het uit voorzichtigheidsoverwegingen raadzaam om voor klaring van vectordeeltjes uit het lichaam van de patiënt een ruime veiligheidsmarge in acht te nemen, en hiervoor minimaal 16 uur (in plaats van de theoretisch berekende 12 uur) aan te houden.^c

4.3 Beheersingsmaatregelen

Zoals eerder gemeld, acht de COGEM de kans op transmissie van vectordeeltjes naar derden het grootst bij de overdracht van of contact met bloed van de patiënt. Een maatregel om de kans hierop te minimaliseren, is de patiënt na toediening van het medisch product minimaal 16 uur in het ziekenhuis opgenomen te houden (zie §4.2). Andere beheersingsmaatregelen bestaan uit het toepassen van adequate wondontsmetting om vectordeeltjes die in het bloed aanwezig kunnen zijn te inactiveren, en het in acht nemen van standaard ziekenhuishygiënemaatregelen tijdens de verzorging van de patiënt (zoals vastgelegd in onder meer de richtlijn genterapie van de Werkgroep Infectie Preventie (WIP)).^{63,64} De COGEM merkt daarbij op dat het risico op blootstelling aan vectordeeltjes het grootst is op en rondom de toedieningsplek kort na de toediening van het medisch product.

Tot slot acht de COGEM het van belang dat de patiënt en zijn naasten (bijvoorbeeld aanwezig tijdens bezoeken), worden geïnformeerd over de aard van het medisch product en de mogelijke risico's van blootstelling hieraan gedurende de eerste 16 uur na toediening van het medisch product. Op deze manier wordt voorkomen dat ook naasten in contact komen met mogelijk besmet materiaal of bloed.

5. Conclusies en advies

Op basis van experimentele validatie van de COGEM-formule blijkt dat de waarden van de parameters, die tot nog toe gebruikt werden, moeten worden aangepast.⁴¹ De COGEM concludeert dat de uitkomsten uit het onderzoek ertoe leiden dat mogelijk niet voor alle genterapeutische toepassingen, waarbij *ex vivo* getransduceerde cellen worden gebruikt, de - in het Europese 'Good practice document' - vereiste grenswaarde voor de reductieratio van vectordeeltjes kan worden behaald. Gezien haar eerdere ervaringen met ingediende vergunningaanvragen, onderkent de COGEM de mogelijkheid dat er in de toekomst meer vergunningaanvragen ingediend zullen worden waarbij in het aan de patiënt toe te dienen medisch product (de gg-celsuspensie) resterende, niet-geïnternaliseerde, infectieuze lentivirale vectordeeltjes aanwezig kunnen zijn. Hoewel zeer onwaarschijnlijk, kan op basis van de huidige kennis niet worden uitgesloten dat blootstelling hieraan potentieel tot nadelige effecten zou kunnen leiden, waaronder het optreden van insertionele oncogenese (zie §2.2 en §2.3).

Ten einde de veiligheid voor mens en milieu te waarborgen, acht de COGEM het daarom van belang dat de kans dat derden bij dit type genterapiestudies aan 'vrije' vectordeeltjes worden blootgesteld, tot een minimum wordt beperkt. Op basis van een theoretische berekening (zie §4.2) concludeert zij dat in

^c De COGEM merkt op dat tot nu toe bij dit soort genterapiestudies in de betreffende medische protocollen is vastgelegd dat behandelde patiënten minimaal 7 dagen in het ziekenhuis opgenomen blijven vanwege de mogelijke behandeling van eventueel optredende nadelige effecten bij de patiënt zelf, zoals het 'cytokine release syndrome'.

het meest ongunstige geval en daarbij een ruime veiligheidsmarge in acht nemend, de hoeveelheid resterende vectordeeltjes 16 uur na toediening aan de patiënt tot een verwaarloosbare hoeveelheid is gereduceerd. Zij is daarom van oordeel dat, indien bij de gentherapie gg-cellen worden toegepast die getransduceerd zijn met SIN replicatiedeficiënte VSV-G gepseudotypeerde lentivirale vectoren, en indien de juiste maatregelen worden getroffen, de risico's voor mens en milieu, onafhankelijk van het ingebouwde transgen, verwaarloosbaar klein zijn.

De COGEM adviseert daarom om, als er eventueel in het medisch product nog vrije infectieuze lentivirale vectordeeltjes aanwezig zijn, in aanvulling op haar eerdere advies⁷ de volgende generieke aanvullende maatregelen in acht te nemen:

- na toediening van het medisch product (*ex vivo* lentiviraal getransduceerde gg-cellen) blijft de patiënt minimaal 16 uur in het ziekenhuis opgenomen, zodat de standaard ziekenhuishygiënische maatregelen in acht genomen kunnen worden;
- na toediening van het medisch product wordt de infuusinsteekopening afgedekt, en wordt de door de WIP opgestelde richtlijn voor gentherapie gevolgd;
- patiënt, medisch personeel en bezoekers worden voorgelicht hoe de eerste 16 uur na toediening van het medisch product er ten aanzien van wondverzorging en besmet materiaal moet worden omgegaan.

Onder in achtneming van deze aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's voor mens en milieu bij gentherapie studies met gg-cellen, die *ex vivo* getransduceerd zijn met een lentivirale vector (SIN, VSV-G gepseudotypeerd), en waarbij niet uitgesloten kan worden dat er op het moment van toediening nog vrije lentivirale vectordeeltjes in het medisch product aanwezig zijn, verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Basset M (2019). Year in Review: CAR-T Therapy. Chimeric antigen receptor T cell therapy continues to be a research hotspot for immunotherapy. MedPage Today. www.medpagetoday.com/hematologyoncology/hematology/83946 (bezoekt: 24 april 2020)
2. Brown CE & Mackall CL (2019). CAR T cell therapy: inroads to response and resistance. Nat. Rev. Immunol. 19: 73-74
3. Subklewe M *et al.* (2019). Chimeric antigen receptor T cells: A race to revolutionize cancer therapy. Transfus. Med. Hemother. 46: 15-24
4. https://ec.europa.eu/health/human-use/advanced-therapies_en (bezoekt: 1 mei 2020)
5. https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/advtherapies/docs/gmcells_gp_en.pdf (bezoekt: 1 mei 2020)
6. COGEM (2019). Klinische studie met lentiviraal getransduceerde CD34+ cellen ter behandeling van cerebrale adrenoleukodystrofie (CALD). COGEM advies CGM/191114-01

7. COGEM (2019). Generieke milieurisicobeoordeling van klinische studies met *ex vivo* retro- en lentiviraal getransduceerde cellen. COGEM advies CGM/190729-01
8. COGEM (2005). Handelingen met lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen. COGEM advies CGM/051215-01
9. COGEM (2009). Inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met lentivirale vectoren. COGEM advies CGM/090331-03
10. Sadelain M (2004). Insertional oncogenesis in gene therapy: how much of a risk? *Gene Ther.* 11: 569-573
11. Schlimgen R *et al.* (2016). Risks associated with lentiviral vector exposures and prevention strategies. *J Occup Environ Med* 58: 1159-1166
12. Bushman F *et al.* (2005) Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 848–858
13. Cattoglio C *et al.* (2007) Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells. *Blood* 110: 1770–1778
14. 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
15. Hacein-Bey-Abina S *et al.* (2008). Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J. Clin. Investig.* 118: 3132-3142
16. Howe SJ *et al.* (2008). Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J. Clin. Investig.* 118: 3143-3150
17. Ott MG *et al.* (2006). Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of *MDS1-EVII*, *PRDM16* or *SETBP1*. *Nat. Med.* 12: 401-409
18. Stein S *et al.* (2010). Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease. *Nat. Med.* 16: 198–204
19. Braun CJ *et al.* (2014). Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome-long-term efficacy and genotoxicity. *Sci. Transl. Med.* 6: 227ra33
20. Cavazzana-Calvo M *et al.* (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science.* 288: 669-672
21. Gaspar HB *et al.* (2004). Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector. *Lancet* 364: 2181-2187
22. Boztug K *et al.* (2006). Development of hematopoietic stem cell gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 8: 390-395
23. Aiuti A *et al.* (2002). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science* 296: 2410-2413
24. Aiuti A *et al.* (2009). Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N. Engl. J. Med.* 360: 447-458
25. Fischer A *et al.* (2015). 'Gene therapy for primary immunodeficiencies', *Clin Genet* 88: 507-15
26. Deichmann A *et al.* (2007). Vector integration is nonrandom and clustered and influences the fate of lymphopoiesis in SCID-X1 gene therapy. *J. Clin. Investig.* 117: 2225-2232

27. Schwarzwaelder K *et al.* (2007). Gammaretrovirus-mediated correction of SCID-X1 is associated with skewed vector integration site distribution in vivo. *J. Clin. Investig.* 117: 2241-2249
28. Aiuti A *et al.* (2007). Multilineage hematopoietic reconstitution without clonal selection in ADA-SCID patients treated with stem cell gene therapy. *J. Clin. Investig.* 117: 2233-2240
29. Wu C & Dunbar CE (2011). Stem cell gene therapy: the risks of insertional mutagenesis and approaches to minimize genotoxicity. *Front. Med.* 5:356–71
30. Zufferey R *et al.* (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo delivery. *J. Virol.* 72: 9873-9880
31. Cartier N *et al.* (2009). Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 326: 818-823
32. Schambach A *et al.* (2013). Biosafety features of lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 24: 132-142
33. Han EQ *et al.* (2013). Chimeric antigen receptor-engineered T cells for cancer immunotherapy: progress and challenges. *J. Hematol. Oncol.* 6: 47
34. Oldham RA *et al.* (2015). Lentiviral vectors in cancer immunotherapy. *Immunother.* 7: 271-284
35. Milone MC & O'Doherty U (2018). Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia* 32: 1529-1541
36. Anguela XM & High KA (2019). Entering the modern era of gene therapy. *Ann. Rev.* 70: 273-288
37. ClinicalTrials.gov. U.S. National Library of Medicine.
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=CD34%2B%2C+lentiviral&cntry=&state=&city=&dist=> (bezoekt: 1 mei 2020)
38. Cavazzana-Calvo M *et al.* (2010). Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature* 467: 318-322
39. Scholz SJ *et al.* (2017). Lentiviral vector promoter is decisive for aberrant transcript formation. *Hum. Gene Ther.* 28: 875-885
40. Song L *et al.* (2019). Improved biosafety of a lentiviral vector by reducing cellular gene activation. *J. Gene Med.* 21: doi.org/10.1002/jgm.3087
41. Dautzenberg IJC & Hoeben RC (2020). The COGEM formula revisited. Experimental validation of the reduction ratio formula for free lentiviral particles. COGEM rapport CGM 2020-01
42. Tang SB & Levy JA (1991). Inactivation of HIV-1 by trypsin and its use in demonstrating specific virus infection of cells. *J. Virol. Methods.* 33: 39-46
43. DePolo NJ *et al.* (2000). VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol. Ther.* 2: 218-222
44. Higashikawa F & Chang L (2001). Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology* 280: 124-131
45. Andreadis ST *et al.* (1997). Moloney murine leukemia virus-derived retroviral vectors decay intracellularly with a half-life in the range of 5.5 to 7.5 hours. *J. Virol.* 71: 7541-7548
46. Uckert W *et al.* (2000). Efficient gene transfer into primary human CD81 T lymphocytes by MuLV-10A1 retrovirus pseudotype. *Hum. Gene Ther.* 11: 1005– 1014
47. Ghani K *et al.* (2007). Generation of a high-titer packaging cell line for the production of retroviral vectors in suspension and serum-free media. *Gene Ther.* 14: 1705–1711

48. Ghani, K *et al.* (2009). Efficient human hematopoietic cell transduction using RD114- and GALV-pseudotyped retroviral vectors produced in suspension and serum-free media. *Hum. Gene Ther.* 20: 966-974
49. Carmo M *et al.* (2009). Stabilization of gammaretroviral and lentiviral vectors: from production to gene transfer. *J. Gene Med.* 11: 670-678
50. Blomer U *et al.* (2005). Shuttle of lentiviral vectors via transplanted cells in vivo. *Gene Ther.* 12: 67-74
51. Pan YW *et al.* (2007). Prolonged adherence of Human immunodeficiency virus-derived vector particles to hematopoietic target cells leads to secondary transduction in vitro and in vivo. *J. Vir.* 81: 639-649
52. Oneill LS *et al.* (2010). Entry kinetics and cell-cell transmission of surface-bound retroviral vector particles. *J. Gene Med.* 12: 463-476
53. Cesani M *et al.* (2015). Shedding of clinical-grade lentiviral vectors is not detected in a gene therapy setting. *Gene Ther.* 22: 496-502
54. Schambach A *et al.* (2013). Biosafety features of lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 24: 132-142
55. Ellison SM *et al.* (2019). Pre-clinical safety and efficacy of lentiviral vector-mediated ex vivo stem cell gene therapy for the treatment of mucopolysaccharidosis IIIA. *Mol. Ther.* 13: 399-413
56. Reuter JD *et al.* (2012). Assessment of hazard risk associated with the intravenous use of viral vectors in rodents. *Comper. Med.* 62: 361-370
57. Schlimgen R *et al.* (2016). Risks associated with lentiviral vector exposures and prevention strategies. *J Occup Environ Med* 58: 1159-1166
58. COGEM (2016). Klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen tegen B-cel maligniteiten. COGEM advies CGM/160229-01
59. COGEM (2019). Klinische studie met lentiviraal getransduceerde CD34+ cellen ter behandeling van RAG-1-SCID en RAG-2-SCID. COGEM advies CGM/190805-01
60. Schaubert-Plewa C *et al.* (2005). Complement regulatory proteins are incorporated into lentiviral vectors and protect particles against complement inactivation. *Gene Ther.* 12: 238-45
61. Annoni A *et al.* (2019). Modulation of immune responses in lentiviral vector-mediated gene transfer. *Cell. Immunol.* 342: 103802
62. Karlen S & Zufferey R (2007). Declassification of rodents exposed to third generation HIV-based vectors into class 1 animals. *Appl. Biosafety* 12: 93-99
63. Werkgroep Infectiepreventie. www.rivm.nl/nieuws/beschikbaarheid-wip-richtlijnen (bezoekt: 1 mei 2020)
64. Werkgroep Infectiepreventie (2008). WIP-Richtlijn Gentherapie. www.rivm.nl/documenten/wip-richtlijn-gentherapie (bezoekt: 1 mei 2020)