

> Retouradres: RIVM/VSP/BGGO, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven.

**Directoraat-generaal  
Milieu en Internationaal**  
Directie Veiligheid en  
Risico's

RIVM/VSP/Bureau GGO  
Antonie van  
Leeuwenhoeklaan 9  
Postbus 1  
3720 BA Bilthoven  
www.ggo-  
vergunningverlening.nl

**Contactpersoon**  
Bureau GGO

T 030 274 2793  
F 030 274 4401  
bggo@rivm.nl

**Ons kenmerk**  
IM-MV 17-006\_000.ob.1

**Uw kenmerk**

# Ontwerpbeschikking GGO IM-MV 17-006\_000

## 1. AANLEIDING<sup>1</sup>

1.1 De Staatssecretaris van Infrastructuur en Waterstaat (hierna: de Staatssecretaris) heeft op 29 november 2017 een aanvraag, gedateerd 15 november 2017, van het Prinses Máxima Centrum voor Kinderoncologie B.V., te Utrecht ontvangen. Deze aanvraag heeft het kenmerk IM-MV 17-006.

1.2 Het gaat om een aanvraag om een vergunning voor doelbewuste introductie voor overige doeleinden, als bedoeld in artikel 3.7, eerste lid, van het Besluit genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013 (hierna: Besluit ggo). De aanvraag heeft betrekking op klinische studies waarin autologe T-cellen van patiënten met B-cel maligniteiten *ex vivo* getransduceerd (genetische modificatie) worden met een lentivirale vector welke een transmembrane, chimere anti-CD19 receptor (CAR-19) tot expressie brengt. De getransduceerde T-cellen worden weer teruggegeven aan de patiënten met als doel het induceren van een afweerreactie tegen de B-cel maligniteiten.

1.3 In deze studies worden *ex vivo*, lentiviraal getransduceerde, autologe T-cellen gebruikt. De cellen zijn getransduceerd met een lentivirale vector, waarin een transmembrane, chimere anti-CD19 receptor (CAR-19) gekloneerd is. De lentivirale vector is afgeleid van *Human Immunodeficiency Virus 1* (HIV-1). De virale vector is door verwijdering van een aantal virale genen replicatiedeficiënt gemaakt, waardoor het virus zich in de cel niet kan vermenigvuldigen. De getransduceerde T-cellen, welke CAR-19 tot expressie brengen, worden teruggegeven aan de patiënten met de verwachting dat ze de B-cel maligniteiten kunnen herkennen en opruimen. Het doel van de klinische studies is om de veiligheid en werkzaamheid van de getransduceerde T-cellen te beoordelen om zodoende een nieuwe therapie tegen B-cel maligniteiten te ontwikkelen.

1.4 De voorgenomen werkzaamheden zullen plaatsvinden in de gemeente Utrecht.

---

<sup>1</sup> Voor definities van gebruikte begrippen zie ook artikel 1 van de vergunning.

## **2. BEOORDELINGSKADER**

2.1 Een studie waarbij genterapie wordt toegepast in proefpersonen valt onder de doelbewuste introductie voor overige doeleinden.

### ***Wettelijk kader***

2.2 Het wettelijk beoordelingskader voor aanvragen om een vergunning voor doelbewuste introductie voor overige doeleinden bestaat uit paragraaf 9.2.2 van de Wet milieubeheer en hoofdstuk 3 van het Besluit ggo.

2.3 Uit artikel 3.2, eerste lid, van het Besluit ggo volgt de bevoegdheid om te beslissen op aanvragen om een vergunning als bedoeld in dat artikel voor de doelbewuste introductie voor overige doeleinden.

2.4 Een vergunning voor de doelbewuste introductie voor overige doeleinden kan slechts om een beperkt aantal redenen worden geweigerd (zie artikel 9.2.2.3, tweede lid, van de Wet milieubeheer). Het belang van de bescherming van de gezondheid van de mens en van het milieu is in dit geval het enige, rechtstreeks bij deze beschikking betrokken belang dat kan worden meegewogen. Voorschriften en beperkingen mogen slechts in het belang van de bescherming van de gezondheid van de mens en van het milieu aan de vergunning worden verbonden (zie artikel 9.2.2.3, vijfde lid, van de Wet milieubeheer).

## **3. PROCEDURELE ASPECTEN**

3.1 De aanvraag moet onder meer een milieurisicobeoordeling bevatten overeenkomstig bijlage II bij richtlijn nr. 2001/18/EG van het Europees Parlement en de Raad van de Europese Unie van 12 maart 2001 inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu en tot intrekking van richtlijn nr. 90/220/EEG van de Raad van de Europese Gemeenschappen van 23 april 1990 (PbEU L 106) (hierna: richtlijn 2001/18), zoals aangevuld met daarop betrekking hebbende besluiten of aanbevelingen van de Raad van de Europese Unie of van de Europese Commissie. Zie ook de definitie van "milieurisicobeoordeling" in artikel 1.5 van het Besluit ggo.

3.2 De aanvraag is getoetst aan de milieurisicobeoordeling over de risico's voor mens en milieu die aan de voorgenomen handelingen met ggo's verbonden kunnen zijn.

3.3 De aanvraag is aangevuld. De aanvullingen zijn ontvangen op 8 januari 2018 en 12 januari 2018.

3.4 De aanvraag, inclusief de aanvullende informatie, is gecontroleerd op volledigheid. Deze beschikking is gebaseerd op een volledige aanvraag.

3.5 Een deel van de bijlagen bij de aanvraag is door de aanvrager als vertrouwelijk gekenmerkt. Op grond van Artikel 19.3 van de Wet milieubeheer heeft de Staatssecretaris van Infrastructuur en Waterstaat ingestemd met het verzoek van de aanvrager om deze bijlagen vertrouwelijk te behandelen. Bij de aanvraag heeft de aanvrager al een openbare samenvatting van deze vertrouwelijke informatie geleverd waaruit de risicoanalyse navolgbaar is.

**Directoraat-generaal  
Milieu en Internationaal**  
Directie Veiligheid en  
Risico's

**Ons kenmerk**  
IM-MV 17-006\_000.ob.1

3.6 Deze beschikking is voorbereid met toepassing van afdeling 3.4 van de Algemene wet bestuursrecht, afdeling 13.2 van de Wet milieubeheer, en de paragrafen 3.2.1 en 3.2.2 van het Besluit ggo. De toepassing van afdeling 3.4 van de Algemene wet bestuursrecht en afdeling 13.2 van de Wet milieubeheer is in overeenstemming met artikel 9.2.2.3, vierde lid, van de Wet milieubeheer.

3.7 Bij de voorbereiding van deze beschikking is ook toepassing gegeven aan artikel 3.10, eerste lid, van het Besluit ggo. Ingevolge deze bepaling wordt binnen 30 dagen na ontvangst van de aanvraag een samenvatting van de aanvraag aan de Europese Commissie gezonden. Bij de beslissing op de aanvraag neemt de Staatssecretaris in aanmerking de opmerkingen die andere lidstaten van de Europese Unie hebben gemaakt (artikel 3.10, tweede lid, tweede volzin, van het Besluit ggo).

Directoraat-generaal  
Milieu en Internationaal  
Directie Veiligheid en  
Risico's

Ons kenmerk  
IM-MV 17-006\_000.ob.1

#### **4. KENMERKEN VAN DE IN DEZE AANVRAAG GEBRUIKTE GGO'S EN HUN INTRODUCTIE**

##### **4.1. Het uitgangsgenoom (HIV-1)**

*Algemeen:*

De virale vector die in deze studie wordt gebruikt is gebaseerd op HIV-1. Dit virus behoort tot de familie *Retroviridae* en het genus *Lentivirus*. Het wildtype HIV-1 genoom bevat negen open leesramen (*Open Reading Frames*, ORFs) coderend voor de structurele genen *gag*, *pol* en *env*, de accessoire genen *vif*, *vpr*, *vpu* en *nef* en de regulatoire genen *tat* en *rev*. Aan het uiteinde van het genoom bevinden zich aan weerszijden de *Long Terminal Repeats* (LTR), welke een rol spelen bij reverse transcriptie, integratie van het provirus in het genoom van de gastheer en regulatie van de synthese van het lentivirale RNA. Verder bevat het HIV-1 genoom cis-acterende sequenties betrokken bij virale replicatie en genexpressie: de *primer binding site* (PBS), het *packaging signaal* ( $\psi$ ), de *polypurine tract* (PPT), de *central polypurine tract* (cPPT) en het *Rev response element* (RRE).

Het gastheerbereik van HIV-1 is beperkt tot mensen en chimpansees. HIV-1 infecteert vooral lymfocyten (T-cellen), maar kan ook macrofagen en microglia (macrofaag cellen in de hersenen) infecteren. HIV-1 wordt verspreid via seksueel contact, bloedtransfusie, besmette injectiespuiten en van moeder naar kind gedurende de zwangerschap, bevalling en via borstvoeding. Infectie met HIV-1 kan resulteren in AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*). Een HIV-1 infectie wordt doorgaans onder controle gehouden met behulp van antiretrovirale medicatie.

*Infectie, replicatie en uitscheiding*

In de genetisch gemodificeerde lentivirale vector is ongeveer 85% van de HIV-1 sequenties verwijderd om een replicatiedeficiënte lentivirale vector te produceren. Het virusdeeltje kan slechts éénmaal een cel infecteren, waardoor het effect uitdovend zal zijn. Door het gebruik van het *Vesicular Stomatitis Virus* glycoproteïne (VSV-G) envelop eiwit is het tropisme van de vector verbreed. VSV-G gepseudotyperde lentivirale vectoren hebben een breed gastheerbereik en kunnen de meeste zoogdiercellen, en ook niet-zoogdiercellen, infecteren.

##### **4.2. De modificaties (CAR-19)**

In de lentivirale vector is een gen gekloneerd dat codeert voor een transmembrane, chimere anti-CD19 receptor (CAR-19). CAR-19 bestaat uit een muizen anti-CD19 antigeen bindend domein, een linker en transmembraan domein afkomstig van humaan CD8 $\alpha$  en humane 4-1BB (CD137) en CD3 $\zeta$  (T-cel receptor  $\zeta$ ) intracellulaire signaleringsdomeinen. CAR-19 is gericht tegen het CD19 antigeen, een component van een celoppervlaktecomplex dat signaaltransductie via de B-cel receptor reguleert. CD19 komt tot expressie op B-cellen, maar is niet aanwezig op pluripotente bloedstamcellen en de meeste normale weefsels. De beperkte expressie van CD19 op

B-cellen en diens voorlopers maakt CD19 tot een relatief veilige target voor therapeutische interventie van B-cel tumoren.

### 4.3. Het ggo

#### *Constructie*

Voor de constructie van het ggo is een niet-replicerende, recombinante lentivirale vector gebruikt welke gebaseerd is op HIV-1. Het betreft hier een zogeheten derde generatie zelf-inactiverend (SIN) lentiviraal vectorsysteem. De virale vector is ontworpen om het ontstaan van replicatiecompetent lentivirus (RCL) te voorkomen door het transgen en de virale genen coderend voor de eiwitten benodigd voor packaging, reverse transcriptie en integratie te verdelen over vier plasmiden. De ORFs coderend voor de virale genen *tat*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *env* en *nef* zijn verwijderd. Verder is er gebruik gemaakt van een heteroloog envelop eiwit en een codon geoptimaliseerd ORF coderend voor de genen *gag* en *pol*, waardoor sequentie homologie met HIV-1 geminimaliseerd is.

Met de virusdeeltjes zijn autologe T-cellen geïnfecteerd waarna het lentivirale vectorgenoom stabiel geïntegreerd is in het genomisch DNA van de T-cel.

#### *Virulentie en stabiliteit*

Het ggo bestaat uit *ex vivo* lentiviraal getransduceerde, autologe T-cellen. De getransduceerde T-cellen kunnen gedurende lange tijd in patiënten aanwezig blijven en kunnen in de patiënt een afweerreactie opwekken tegen B-cel maligniteiten. De getransduceerde T-cellen kunnen vanuit de patiënt in het milieu terecht komen en verspreiden naar derden via bloed of lymfe. Dit kan zich voordoen bij afname van bloed of bij contact met een open wond of het slijmvlies van de ogen, neus en mond. Echter, de T-cellen kunnen buiten het lichaam niet overleven.

### 4.4. Beschrijving van het onderzoek

Het onderzoek zal plaatsvinden in het Prinses Máxima Centrum voor Kinderoncologie in de gemeente Utrecht. In totaal zullen maximaal 200 patiënten worden geïncludeerd. Verschillende klinische studies met het ggo voor verschillende soorten B cel maligniteiten zullen worden uitgevoerd onder deze vergunningaanvraag. Het doel van de klinische studies is om de veiligheid en werkzaamheid van de getransduceerde T-cellen te beoordelen om zodoende een nieuwe therapie tegen B-cel maligniteiten te ontwikkelen.

In deze studies worden *ex vivo* lentiviraal getransduceerde, autologe T-cellen toegediend aan patiënten. De patiënten krijgen maximaal  $2,5 \times 10^{10}$  getransduceerde T-cellen toegediend. De T-cellen van de patiënt worden op twee opeenvolgende dagen getransduceerd met in totaal  $1,8 \times 10^8 - 3,9 \times 10^8$  transducerende eenheden, wat overeenkomt met  $8,8 \times 10^{10} - 2,3 \times 10^{12}$  vector RNA kopieën. De getransduceerde T-cellen worden pas na een kweekperiode van minimaal 8 dagen na de laatste lentivirale transductie bij 37 graden Celsius en 7 wasstappen aan de patiënt toegediend.

Het ggo bevindt zich in een enkele-dosis cryobag voor infusie. De cryobag met het ggo wordt op de patiëntenafdeling ontdooid volgens lokale ziekenhuisrichtlijnen en direct aan de patiënt toegediend via intraveneuze infusie. De cryobag met het ggo wordt voor ontdooien in een waterbad gecontroleerd op breuken en scheuren en in een secundaire zak gedaan om contact tussen de cryobag en het water te voorkomen en om, in geval van lekkage, besmetting van het waterbad te voorkomen. Toediening vindt plaats conform het document Autologe SCT reïfusie Verpleegkundig. Medisch personeel zal het ggo intraveneus toedienen waarbij standaard medische voorzorgsmaatregelen voor immuungecompromitteerde patiënten worden gehanteerd. Het personeel dat de cryobag met het ggo hanteert zal het document Autologe SCT reïfusie Verpleegkundig volgen. De patiënten krijgen, afhankelijk van de studie, een enkele infusie met het ggo tot drie infusies met het ggo verspreid over drie dagen. Iedere cryobag zal tussen de  $2 \times 10^6$  tot  $5 \times 10^8$  getransduceerde, levende T cellen bevatten.

Directoraat-generaal  
Milieu en Internationaal  
Directie Veiligheid en  
Risico's

Ons kenmerk  
IM-MV 17-006\_000.ob.1

De patiënten worden gehospitaliseerd vanwege medische redenen, niet uit oogpunt ter voorkoming van verspreiding van het ggo naar het milieu. Deelnemende patiënten zijn vrij van HIV, humaan T-cel-lymfotroop virus (HTLV), Hepatitis B en Hepatitis C virus infecties. Daarnaast worden behandelde patiënten uitgesloten van het doneren van bloed, organen, weefsels en cellen voor transplantatie.

#### **4.5. Productie, vervoer, bemonstering en afvalbehandeling**

##### *Productie*

Productie van de lentivirale vector en de transductie van de autologe T-cellen vindt buiten Nederland plaats en maken geen deel uit van de onderhavige vergunning. Zowel productie van de lentivirale vector als transductie van de T-cellen vinden plaats volgens *Good Manufacturing Practices* (GMP).

De lentivirale transfervector wordt transiënt getransfecteerd in 293 cellen (humane embryonale niercellijn) samen met packaging vectoren coderend voor de gag/pol en rev eiwitten en voor het VSV-G envelop eiwit. De 293 cellen zijn vrij van lentivirus waardoor recombinatie met en complementatie van de virale vector niet mogelijk is. Zowel de cellen gebruikt voor virusproductie als de virusbatch worden voorafgaand aan vrijgifte getest op de aanwezigheid van RCL via een op celweek gebaseerde test. De virusbatch wordt daarnaast ook getest op onder andere identiteit, steriliteit en afwezigheid van mycoplasma, virale verontreinigingen en endotoxines.

T-cellen geïsoleerd uit de patiënt worden op twee opeenvolgende dagen getransduceerd met de lentivirale vector. De getransduceerde T-cellen worden pas vrijgegeven voor infusie in de patiënt indien er geen RCL gedetecteerd is en de identiteit bevestigd is. Het ggo wordt geanalyseerd op de aanwezigheid van andere celpopulaties naast de T-cellen. Tot nu toe zijn er geen monocysten, macrofagen of dendritische cellen in batches van het ggo gedetecteerd. De getransduceerde T-cellen worden daarnaast ook getest op onder andere viabiliteit, CAR-19 expressie, identiteit, steriliteit en afwezigheid van mycoplasma en endotoxines.

##### *Vervoer*

De getransduceerde T-cellen worden naar het Universitair Medisch Centrum Utrecht vervoerd. Dit maakt geen deel uit van de onderhavige vergunning. Vervolgens worden de cellen naar de patiëntenafdeling van het Prinses Maxima Centrum vervoerd conform ggo richtlijnen.

##### *Monstername en analyse*

Monstername van bloed, urine, beenmerg en lymfklierbiopten zal op meerdere momenten na toediening van de getransduceerde T-cellen plaatsvinden.

Monstername, transport van de monsters in het ziekenhuis, opslag en bewerking maken deel uit van de onderhavige vergunning en zullen plaatsvinden volgens standaard ziekenhuisprocedures, aangezien de monsters geen lentivirale partikels bevatten en de getransduceerde T-cellen geen specifiek veiligheidsrisico vormen. De monsters worden gehanteerd zoals reguliere ziekenhuismonsters en worden beschouwd als potentieel infectieus humaan diagnostisch/studiemateriaal gedurende alle fasen van monsterafname, opslag en transport.

Afname van bloed- en beenmergmonsters wordt uitgevoerd volgens lokale procedures. Bloedafname zal plaatsvinden met een gesloten buizensysteem en het gebruikte materiaal zal worden afgevoerd in een gesloten container voor besmet materiaal. De monsters zullen onder andere worden getest op de aanwezigheid van RCL via een qPCR test voor VSV-G DNA en de aanwezigheid van de getransduceerde T-cellen.

**Directoraat-generaal  
Milieu en Internationaal**  
Directie Veiligheid en  
Risico's

**Ons kenmerk**  
IM-MV 17-006\_000.ob.1

#### *Afval en besmet materiaal*

Al het afval dat in aanraking is geweest met het ggo wordt afgevoerd als speciaal ziekenhuisafval. De patiëntenkamer zal worden schoongemaakt volgens standaard ziekenhuisprocedures met een waterstofperoxide oplossing.

#### **4.6. Interactie met het milieu**

De getransduceerde T-cellen kunnen buiten de gastheer (de patiënt) niet overleven, tenzij er sprake is van weefselkweek waarbij speciale condities worden toegepast. In de getransduceerde T-cellen is de lentivirale vector stabiel geïntegreerd.

**Directoraat-generaal  
Milieu en Internationaal**  
Directie Veiligheid en  
Risico's

**Ons kenmerk**  
IM-MV 17-006\_000.ob.1

### **5. MILIEURISICOBEOORDELING**

De milieurisicobeoordeling is een technisch-wetenschappelijk werkproces waarbij de mogelijke risico's voor de menselijke gezondheid en het milieu die verbonden zijn aan de werkzaamheden inzichtelijk worden gemaakt. Deze technisch-wetenschappelijke milieurisicobeoordeling is bij de aanvraag gevoegd.

De milieurisicobeoordeling is uitgevoerd voor de in de aanvraag beschreven werkzaamheden.

#### **5.1. Algemeen**

In de milieurisicobeoordeling wordt beoordeeld of en hoe derden blootgesteld kunnen worden aan het ggo, en of vervolgens infectie van derden met het ggo op kan treden. Daarnaast wordt ook in beschouwing genomen welke schadelijke effecten op kunnen treden als derden geïnfecteerd raken met het ggo.

#### **5.2. Het ggo**

##### *Persistentie, invasiviteit en selectieve voordelen*

In de genetisch gemodificeerde lentivirale vector is ongeveer 85% van de HIV-1 sequenties verwijderd. Als gevolg van de deletie van deze sequenties is de lentivirale vector niet meer in staat om te repliceren in een geïnfecteerde cel. Het virusdeeltje kan dus slechts éénmaal een cel infecteren, waarna er geen replicatie plaatsvindt en waardoor eventuele verspreiding van het virus uiteindelijk zal uitdoven. Door het gebruik van het *Vesicular Stomatitis Virus* glycoproteïne (VSV-G) envelop eiwit is het tropisme van de vector verbreed. VSV-G gepseudotyperde lentivirale vectoren hebben een breed gastheerbereik en kunnen de meeste zoogdiercellen, en ook niet-zoogdiercellen, infecteren.

##### *Replicatiecompetent lentivirus (RCL)*

Tijdens de productie van de virale vector is er een theoretische kans aanwezig op het ontstaan van RCL. Het betreft hier een zogeheten derde generatie SIN lentiviraal vectorsysteem dat ontworpen is om het ontstaan van RCL te voorkomen. Hiertoe zijn het transgen en de virale genen verdeeld over vier plasmiden. Voor de generatie van een RCL zijn minimaal 3 aparte recombinatie gebeurtenissen nodig. Er zijn geen aanwijzingen in de literatuur voor het ontstaan van RCL met derde generatie SIN lentivirale vectorsystemen.

Het is bovendien onwaarschijnlijk dat in de getransduceerde T-cellen recombinatie optreedt tussen de lentivirale vector en humane retrovirussen die mogelijk in de T-cellen aanwezig kunnen zijn aangezien de mate van homologie tussen deze virussen gereduceerd is door deleties en mutaties in de lentivirale vector. Bovendien zijn de patiënten vrij van HIV, HTLV, Hepatitis B en Hepatitis C virus infecties. Daarnaast is de lentivirale transfervector zelf-inactiverend (SIN). Dit houdt in dat uit de vector een deel van de 3' LTR, het zogenaamde U3 domein, verwijderd is. Dit reduceert de kans op mobilisatie van de vector uit het genoom van de gastheer. In het geval van een infectie

van de getransduceerde cel met een wildtype lentivirus, dan kan de transfervector niet meer worden gemobiliseerd uit het genoom van de gastheercel.

In theorie is er ook een mogelijkheid tot het ontstaan van RCL door recombinatie van de virale vector met humane endogene retrovirale (HERV) sequenties. HERV sequenties zijn aanwezig in het humane genoom. De meerderheid van de HERVs zijn gerelateerd aan beta retrovirussen, maar ook sequenties gerelateerd aan gamma retrovirussen zijn geïdentificeerd. Voor recombinatie tussen de virale vector en HERVs is de aanwezigheid van sequentie homologie noodzakelijk. De virale vector bevat slechts een gedeelte van het lentivirale genoom (de LTR's en het packaging signaal), waardoor recombinatie onwaarschijnlijk is.

**Directoraat-generaal  
Milieu en Internationaal**  
Directie Veiligheid en  
Risico's

**Ons kenmerk**  
IM-MV 17-006\_000.ob.1

Tenslotte worden voorafgaand aan vrijgifte de virusbatch en de getransduceerde T-cellen getest op de aanwezigheid van RCL via respectievelijk een op celkweek gebaseerde test en via een qPCR test voor VSV-G DNA.

De kans dat er daadwerkelijk een infectieus RCL aanwezig is in de virusbatch of de getransduceerde T-cellen is op grond van de bovenstaande overwegingen verwaarloosbaar klein.

#### *Vrije virusdeeltjes*

Na transductie van de T-cellen is er een kans aanwezig dat er nog vrije virusdeeltjes aanwezig zijn die in de patiënt terecht kunnen komen en andere cellen kunnen infecteren. De getransduceerde T-cellen worden pas na een kweekperiode van minimaal 8 dagen na de laatste lentivirale transductie bij 37 graden Celsius en 7 wasstappen aan de patiënt toegediend. Aangenomen dat de halfwaardetijd van het virus ongeveer 10 uur bedraagt bij 37 graden Celsius en dat elke wasstap van de cellen het aantal aanwezige virusdeeltjes met een factor 20 reduceert, zorgt dit voor een reductie van de hoeveelheid vrije virusdeeltjes met een factor  $7,7 \times 10^{14}$  ten opzichte van het oorspronkelijke virale inoculum van  $2,3 \times 10^{12}$ . Dit betekent dat op het moment van infusie van de getransduceerde T-cellen aan de patiënt de kans verwaarloosbaar klein is dat er nog een vrij virusdeeltje aanwezig is (CGM/090331-03). Vanuit de patiënt kunnen er dus geen vrije virusdeeltjes terechtkomen in het milieu. Mocht dit toch gebeuren, dan kunnen de virusdeeltjes alleen overleven als ze via direct bloed-bloed contact worden overgedragen. Indien er infectieuze lentivirale partikels bij de getransduceerde T-cellen aanwezig zijn, dan zullen deze na toediening aan de patiënt of bij accidentele toediening aan derden geïnactiveerd worden door het complement systeem in humaan serum.

De kans dat derden geïnfecteerd worden met vrije virusdeeltjes is verwaarloosbaar klein.

### **5.3. Mogelijk schadelijke effecten van het ggo en de evaluatie van de mogelijke gevolgen van deze effecten**

De lentivirale vector wordt gebruikt voor de *ex vivo* transductie (genetische modificatie) van autologe humane T-cellen. De getransduceerde T-cellen, welke CAR-19 tot expressie brengen, binden het CD19 antigeen dat aanwezig is op B-cellen. Hierdoor herkent het afweersysteem specifiek B-cellen en vernietigt deze cellen. De getransduceerde T-cellen welke CAR-19 tot expressie brengen kunnen zodoende een afweerreactie opwekken tegen B-cel maligniteiten. Van CAR-19 is niet bekend dat het effecten heeft op de virusbiologie van HIV-1. Er is ook geen scenario denkbaar waarlangs zo'n effect zou kunnen optreden. De insertie zal dan ook geen invloed hebben op bijvoorbeeld het wefseltropisme en het gastheerbereik van de virale vector.

Na infectie van de T-cel zal de virale vector op een willekeurige plek in het gastheer genoom integreren. Hierdoor bestaan de kans op ontregeling van genen betrokken bij proliferatie waardoor T-cel tumoren kunnen ontstaan.

De verloren functies van de lentivirale vector kunnen in theorie gecompenseerd worden indien een retrovirus in dezelfde cel aanwezig is als de vector. De expressie-producten van het wildtype virus kunnen in dat geval gebruikt worden door de vector, wat de vector de mogelijkheid biedt te repliceren en andere cellen te infecteren. Hierdoor is er een theoretische kans op verspreiding naar derden.

**Directoraat-generaal  
Milieu en Internationaal**  
Directie Veiligheid en  
Risico's

**Ons kenmerk**  
IM-MV 17-006\_000.ob.1

#### **5.4. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijk effect**

De kans dat insertionele mutagenese van de lentivirale vector direct carcinogeen is, is beperkt doordat insertie van retrovirale vectoren bijna altijd mono-allelisch is, gen inserties de overlevingskans van de cel beïnvloeden en, voor zover bekend, een enkele insertionele mutatie niet voldoende is voor het ontwikkelen van een kwaadaardige fenotype. Indien een lentivirale vector in het genoom van de gastheer integreert in de buurt van een proto-oncogen kan het U3 domein leiden tot de activering van het betreffende proto-oncogen. In de SIN vectoren is het U3 domein echter uit de 3' LTR verwijderd, waardoor mogelijke activering van naburige proto-oncogenen door het U3 domein teniet gedaan wordt. Tevens zijn er geen aanwijzingen in de literatuur voor kwaadaardige transformatie van volwassen T-cellen welke CARs tot expressie brengen.

De getransduceerde T-cellen kunnen gedurende lange tijd in patiënten aanwezig blijven als memory T-cellen. Minstens 6 maanden na infusie van het GGO kunnen lage niveaus van de getransduceerde T-cellen aangetoond worden in op de behandeling reagerende patiënten en deze T-cellen blijven detecteerbaar in patiënten met een aanhoudende remissie. De getransduceerde T-cellen kunnen vanuit de patiënt in het milieu terechtkomen via bloed of lymfe. Dit kan zich voordoen bij afname van bloed of bij verwondingen waarbij een open wond ontstaat. De getransduceerde cellen kunnen verspreid worden naar derden via accidentele injectie of contact met een open wond of het slijmvlies van de ogen, neus en mond. De kans op nadelige effecten van getransduceerde T-cellen in het milieu is zeer klein omdat T-cellen buiten het lichaam niet kunnen overleven.

Indien de getransduceerde T-cellen in een ander individu dan de patiënt terechtkomen, dan zullen deze cellen vernietigd worden door de afweerreactie tegen deze lichaamsvreemde cellen. Behalve deze afweerreactie zijn hierbij geen bijwerkingen te verwachten. Indien de getransduceerde T-cellen in een immuungecompromiteerd persoon terechtkomen dan bestaat er een theoretische kans dat de getransduceerde T-cellen in deze persoon kunnen persisteren. In dit geval kunnen dezelfde effecten optreden als in de patiënt. Doordat de hoeveelheid getransduceerde T-cellen in derden vele malen kleiner zal zijn dan in patiënten, is de kans op negatieve effecten verkleind ten opzichte van de situatie in patiënten. De kans dat derden geïnfecteerd raken met de getransduceerde T-cellen en dat daardoor een schadelijk effect kan optreden is verwaarloosbaar klein.

De waarschijnlijkheid dat de verloren functies van de lentivirale vector gecompenseerd worden, indien een retrovirus in dezelfde cel aanwezig is als de lentivirale vector, is verwaarloosbaar klein. Ten eerste wordt vooraf getest op de aanwezigheid van RCL. Ten tweede zijn de patiënten vrij van HIV, HTLV, Hepatitis B en Hepatitis C virus infecties. Hierdoor is complementatie en/of recombinatie van de vector met deze virussen niet mogelijk. Daarbij is het onwaarschijnlijk dat recombinatie optreedt tussen de lentivirale vector en HERVs die mogelijk in de T-cellen aanwezig kunnen zijn.



Geconcludeerd kan worden dat de waarschijnlijkheid van het optreden van mogelijke schadelijke effecten voor mens en milieu verwaarloosbaar klein is.

### **5.5. Schatting van het risico van het ggo**

In de bovenstaande overwegingen wordt geconcludeerd dat voor de behandeling van proefpersonen met het ggo de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn. Er zijn geen schadelijke effecten geïdentificeerd. Derhalve kan geconcludeerd worden dat met de introductie van het ggo de milieurisico's verwaarloosbaar klein zullen zijn.

**Directoraat-generaal  
Milieu en Internationaal  
Directie Veiligheid en  
Risico's**

### **5.6. Maatregelen voor risicobeheer**

In de aanvraag is opgenomen dat patiënten die behandeld zijn, worden uitgesloten van het doneren van bloed, organen, weefsels en cellen voor transplantatie, zodat introductie van de getransduceerde T-cellen in het milieu voorkomen wordt. Daarnaast worden alleen patiënten geïncubeerd die vrij zijn van HIV, HTLV, Hepatitis B en Hepatitis C virus infecties. Aangezien de milieurisico's van de toepassing van het ggo verwaarloosbaar klein zijn, is het voorschrijven van additionele risicobeheersmaatregelen uit oogpunt van de veiligheid voor mens en milieu niet noodzakelijk.

**Ons kenmerk  
IM-MV 17-006\_000.ob.1**

## **6. CONCLUSIES VAN MOGELIJKE MILIEUEFFECTEN VAN DE INTRODUCTIE**

In Bijlage II, onder D1 van de richtlijn 2001/18 wordt een aantal punten opgesomd die, waar passend, dienen als basis voor de conclusies over de mogelijke milieueffecten van de voorgenomen introductie van de ggo's in het milieu. Voor de volledigheid van de risicobeoordeling worden al deze punten hieronder opgesomd voor de in deze vergunning aangevraagde werkzaamheden, met hun bijbehorende conclusies.

### **1. Waarschijnlijkheid dat het ggo in natuurlijke habitats persistent en invasief wordt onder omstandigheden van de voorgestelde introductie**

De waarschijnlijkheid dat het ggo persistent en invasief wordt is verwaarloosbaar klein, omdat de genetisch gemodificeerde cellen op zichzelf, buiten de patiënt, niet levensvatbaar zijn. De kans dat derden geïnfecteerd raken met de getransduceerde T-cellen én dat daardoor een schadelijk effect kan optreden is verwaarloosbaar klein. De voor de vervaardiging gebruikte lentivirale vector is stabiel geïntegreerd in het cellulaire genoom en zal niet als vrij deeltje aanwezig zijn. Daarnaast is de kans dat RCL aanwezig is in de getransduceerde T-cellen verwaarloosbaar klein. Het risico dat het ggo in natuurlijke habitats persistent en invasief wordt onder de omstandigheden van de voorgestelde introductie is verwaarloosbaar klein.

### **2. Selectieve voordelen of nadelen die op het ggo zijn overgedragen en de waarschijnlijkheid dat zulks geschiedt onder de omstandigheden van de voorgestelde introductie**

De waarschijnlijkheid van een verhoogd selectief voordeel bij toepassing van het ggo is verwaarloosbaar klein. De genetisch gemodificeerde T-cellen zijn op zichzelf, buiten de patiënt, niet levensvatbaar en zullen in het milieu niet persisteren. De kans dat derden geïnfecteerd raken met de getransduceerde T-cellen én dat daardoor een schadelijk effect kan optreden is verwaarloosbaar klein. De voor de vervaardiging gebruikte lentivirale vector is stabiel geïntegreerd in het cellulaire genoom en zal niet als vrij deeltje aanwezig zijn. Daarnaast is de kans dat RCL aanwezig is in de getransduceerde T-cellen en de waarschijnlijkheid dat de verloren functies van de geïnserteerde lentivirale vector gecompenseerd worden verwaarloosbaar klein. Derhalve zijn de risico's voor mens en milieu van het gebruikte ggo verwaarloosbaar klein.

**3. Kans op overdracht op andere soorten onder de omstandigheden van de voorgestelde introductie van het ggo en selectieve voordelen of nadelen die op deze soorten kunnen worden overgedragen**

De voor de vervaardiging gebruikte lentivirale vector is stabiel geïntegreerd in het cellulaire genoom en zal niet als vrij deeltje aanwezig zijn. Daarnaast is de kans dat RCL aanwezig is in de getransduceerde T-cellen verwaarloosbaar klein. De waarschijnlijkheid dat de verloren functies van de geïnserteerde lentivirale vector gecompenseerd worden indien een retrovirus in dezelfde cel aanwezig is als de vector is verwaarloosbaar klein. De kans dat transmissie van de lentivirale vector plaatsvindt en dat, als er transmissie plaatsvindt, daardoor mogelijke schadelijke effecten optreden, is verwaarloosbaar klein.

Directoraat-generaal  
Milieu en Internationaal  
Directie Veiligheid en  
Risico's

Ons kenmerk  
IM-MV 17-006\_000.ob.1

**4. Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde milieueffecten van de directe en indirecte interacties tussen het ggo en de proefpersoon, en tussen het ggo en niet-doelwitorganismen**

De waarschijnlijkheid van milieueffecten op niet-doelwitorganismen bij toepassing van het ggo is verwaarloosbaar klein. De getransduceerde T-cellen kunnen gedurende lange tijd in patiënten aanwezig blijven als memory T-cellen en kunnen dus gedurende deze periode CAR-19 tot expressie brengen. De kans dat de getransduceerde T-cellen terechtkomen in het lichaam van een derde én dat daardoor een schadelijk effect kan optreden is verwaarloosbaar klein. In het zeer onwaarschijnlijke geval dat de getransduceerde T-cellen in een ander individu dan de patiënt terechtkomen dan zullen deze cellen vernietigd worden door de afweerreactie tegen deze lichaamsvreemde cellen.

**5. Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde effecten op de menselijke gezondheid van mogelijke directe en indirecte interacties tussen het ggo en personen die werken met, in contact komen met of in de nabijheid komen van ggo-introductie**

De waarschijnlijkheid van effecten op de menselijke gezondheid bij toepassing van het ggo is verwaarloosbaar klein. De kans dat derden geïnfecteerd raken met de getransduceerde T-cellen én dat daardoor een schadelijk effect kan optreden is verwaarloosbaar klein. In het zeer onwaarschijnlijke geval dat de getransduceerde T-cellen in een ander individu dan de patiënt terechtkomen dan zullen deze cellen vernietigd worden door de afweerreactie tegen deze lichaamsvreemde cellen.

**6. Mogelijke verandering in de staande medische praktijk**

De waarschijnlijkheid van verandering in de staande medische praktijk bij toepassing van het ggo is verwaarloosbaar klein. Het doel van de studies is om een nieuwe therapie tegen B-cel maligniteiten te ontwikkelen. Hierdoor zal het arsenaal aan mogelijke behandelingen voor kankerpatiënten toenemen. Hier zijn geen nadelige gevolgen voor mens of milieu aan verbonden.

**7. ADVIES**

Naar aanleiding van een eerdere studie die vergelijkbaar is met de onderhavige aanvraag, maar die uitgevoerd wordt in de gemeente Amsterdam, heeft de COGEM op 29 februari 2016 (CGM/160229-01) advies uitgebracht.

Patiënten met B-cel kanker worden behandeld met eigen T-cellen die in het laboratorium genetisch gemodificeerd zijn met behulp van een lentivirale vector. Hierdoor krijgen deze T-cellen een zogenaamde chimere antigeen receptor op hun celoppervlak die hun in staat stelt de B-cellen te herkennen en te vernietigen. Risico's die bij de klinische studie kunnen optreden, hebben met name betrekking op de eventuele vorming en verspreiding van replicatiecompetent lentivirus, de aanwezigheid van vrije virusdeeltjes in het te testen medische product en de effecten van de mogelijke verspreiding van de lentiviraal getransduceerde T-cellen in het milieu. De

COGEM is van mening dat het productiesysteem waarmee de lentivirale vector wordt geproduceerd zodanig is ontworpen, dat de kans op het ontstaan van een replicatiecompetent lentivirus tot een minimum wordt beperkt. Tevens wordt de geproduceerde batch lentivirale vector door de aanvrager getest op de aanwezigheid van RCL. De COGEM acht de kans op de aanwezigheid van RCL in het medische product derhalve verwaarloosbaar klein.

Door de kweek- en wasprocedures die de aanvrager hanteert bij de productie van de lentiviraal getransduceerde T-cellen, worden eventueel aanwezige infectieuze virusdeeltjes zodanig verdund dat de kans dat er nog infectieuze virusdeeltjes in het preparaat zitten op het moment dat het aan de patiënt wordt toegediend, verwaarloosbaar klein is. Indien de lentiviraal getransduceerde T-cellen door een incident in derden of in het milieu terecht komen, acht de COGEM de kans op nadelige effecten verwaarloosbaar klein. De patiënt-specifieke T-cellen worden in vrijwel alle mensen direct afgestoten en de T-cellen kunnen buiten het lichaam niet overleven.

Op basis van bovenstaande is de COGEM van mening dat de milieurisico's verbonden aan de klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen verwaarloosbaar klein zijn.

Gezien het gegeven dat in de onderhavige aanvraag vergelijkbare werkzaamheden worden beschreven, zij het in een andere gemeente, is het voorgaande COGEM advies (CGM/160229-01) van toepassing.

**Directoraat-generaal  
Milieu en Internationaal**  
Directie Veiligheid en  
Risico's

**Ons kenmerk**  
IM-MV 17-006\_000.ob.1

## **8. OPMERKINGEN VAN ANDERE LIDSTATEN**

Lidstaten kunnen opmerkingen maken naar aanleiding van de bij de Europese Commissie ingediende samenvatting van deze aanvraag.

## **9. CONCLUSIE**

Het ggo dat aan de patiënten wordt toegediend bestaat uit T-cellen die getransduceerd zijn met een lentivirale vector, afgeleid van HIV-1, waarin een transmembrane, chimere anti-CD19 receptor gekloneerd is. De virale vector is door verwijdering van een aantal virale genen replicatiedeficiënt gemaakt, waardoor het virus zich in de cel niet kan vermenigvuldigen. De kans dat tijdens de toediening van de getransduceerde T-cellen vrije lentivirale deeltjes of RCL aanwezig zijn is verwaarloosbaar klein. Tevens is de kans verwaarloosbaar klein dat de verloren functies van de geïnserteerde lentivirale vector gecompenseerd worden, waardoor recombinante virusdeeltjes ontstaan in de patiënt. De getransduceerde T-cellen welke CAR-19 tot expressie brengen kunnen in de patiënt een afweerreactie opwekken tegen B-cel maligniteiten. Vanuit de patiënt kunnen de T-cellen alleen via bloed of lymfe in het milieu komen. Echter, buiten het lichaam kunnen de cellen niet overleven. De kans dat derden geïnfecteerd raken met de getransduceerde T-cellen én dat daardoor een schadelijk effect kan optreden is verwaarloosbaar klein. Concluderend kan gesteld worden dat het risico voor mens en milieu bij toepassing van het ggo verwaarloosbaar klein is.

Op basis van het voorgaande is de Staatssecretaris van oordeel dat aan de aangevraagde werkzaamheden, als deze onder de voorwaarden zoals aangevraagd worden uitgevoerd, geen mogelijke effecten verbonden te zijn die onaanvaardbaar zijn voor mens en milieu. De aanvraag voldoet daarmee aan de wettelijke vereisten. Er zijn op basis van artikel 9.2.2.3, tweede lid van de Wet milieubeheer dan ook geen redenen om de aangevraagde werkzaamheden te weigeren.

Naar aanleiding van deze overwegingen zal de vergunning worden verleend.

## Besluit

- I. Aan het Prinses Máxima Centrum voor Kinderoncologie B.V., te Utrecht, wordt vergunning verleend voor doelbewuste introductie voor overige doeleinden als bedoeld in artikel 3.2, eerste lid, van het Besluit ggo.
- II. De vergunning heeft uitsluitend betrekking op de in de aanvraag beschreven werkzaamheden in de Gemeente Utrecht.
- III. De aanvraag met bijbehorende aanvullingen maakt deel uit van deze vergunning.
- IV. Aan de vergunning worden de navolgende voorschriften verbonden.

**Directoraat-generaal  
Milieu en Internationaal**  
Directie Veiligheid en  
Risico's

**Ons kenmerk**  
IM-MV 17-006\_000.ob.1

## Voorschriften

### Artikel 1.    **Definities en begrippen**

1. Op deze vergunning zijn de volgende definities van toepassing:
  - a. COGEM: de Commissie genetische modificatie, ingesteld bij artikel 2.26 van de Wet milieubeheer;
  - b. de Staatssecretaris: de Staatssecretaris van Infrastructuur en Waterstaat;
  - c. Het Besluit ggo: het Besluit genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013;
  - d. De Regeling ggo: de Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013;
  - e. ggo: genetisch gemodificeerd organisme;
  - f. CAR-19: chimere anti-CD19 receptor;
  - g. HIV-1: *Human Immunodeficiency Virus 1*;
  - h. ORF: *Open Reading Frame*;
  - i. LTR: *Long Terminal Repeat*;
  - j. PBS: *primer binding site*;
  - k.  $\psi$ : *packaging signaal*;
  - l. PPT: *polypurine tract*;
  - m. cPPT: *central polypurine tract*;
  - n. RRE: *Rev response element*;
  - o. AIDS: *Acquired Immune Deficiency Syndrome*;
  - p. VSV-G: *Vesicular Stomatitis Virus glycoproteïne*;
  - q. SIN: zelf-inactiverend;
  - r. RCL: replicatiecompetent lentivirus;
  - s. HTLV: humaan T-cel-lymfotroop virus;
  - t. GMP: Good Manufacturing Practices;
  - u. HERV: humaan endogeen retrovirus.
2. Voor het overige zijn de definities van het Besluit ggo en de Regeling ggo op deze vergunning van toepassing.
3. Bij ieder voorschrift van deze vergunning kunnen, met het oog op de bescherming van de gezondheid van de mens en van het milieu, door de Staatssecretaris nadere eisen worden gesteld. De vergunninghouder dient aan de gestelde nadere eisen te voldoen.

## Artikel 2.    **Algemene voorschriften**

1. De werkzaamheden als bedoeld onder II, mogen uitsluitend doorgang vinden voor zover die zijn opgenomen in een beschrijving van voorgenomen werkzaamheden als bedoeld in artikel 4 en voor zover er minstens 15 dagen zijn verstreken na verzending van die beschrijving conform artikel 4 aan de Staatssecretaris of zodra de ontvangst van de beschrijving van voorgenomen werkzaamheden schriftelijk is bevestigd.
2. De vergunninghouder dient zich tijdens de uitvoering van de werkzaamheden als bedoeld onder II, te verzekeren van de volledige zeggenschap over de werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen.
3. De medewerkers die worden betrokken bij de werkzaamheden, worden van de inhoud van deze vergunning in kennis gesteld voordat zij met de werkzaamheden aanvangen.

**Directoraat-generaal  
Milieu en Internationaal**  
Directie Veiligheid en  
Risico's

**Ons kenmerk**  
IM-MV 17-006\_000.ob.1

## Artikel 3.    **Bijzondere voorschriften**

1. Zowel de cellen gebruikt voor virusproductie als de virusbatch worden voorafgaand aan vrijgifte getest op de aanwezigheid van RCL via een op celkweek gebaseerde test.
2. De patiënten zijn vrij van HIV, HTLV, Hepatitis B en Hepatitis C virus infecties.
3. De getransduceerde T-cellen worden pas na een kweekperiode van minimaal 8 dagen na de laatste lentivirale transductie bij 37 graden Celsius en 7 wasstappen aan de patiënt toegediend.
4. De patiënten die behandeld zijn worden uitgesloten van het doneren van bloed, organen, weefsels en cellen voor transplantatie.

## Artikel 4.    **Voorschriften met betrekking tot de beschrijving van voorgenomen werkzaamheden**

1. De vergunninghouder is verplicht voor de aanvang van de werkzaamheden een beschrijving van de voorgenomen werkzaamheden in overeenstemming met artikel 42 van de Regeling ggo aangetekend te zenden aan de Staatssecretaris.

## Artikel 5.    **Voorschriften met betrekking tot controle**

1. Iedere wijziging van gegevens met betrekking tot de vergunningaanvraag (bijvoorbeeld wijziging van contactpersoon of milieuveiligheidsfunctionaris) moeten in het logboek worden opgenomen en onverwijld schriftelijk aan de Staatssecretaris worden gemeld.
2. Gedurende het uitvoeren van de onder II bedoelde werkzaamheden op de locatie moet regelmatig en doelmatig gecontroleerd worden op afwijkingen ten opzichte van de gegevens in de onderliggende aanvraag. Deze afwijkingen dienen te worden genoteerd in het logboek.
3. Afwijkingen, zoals bedoeld in het tweede lid, die van invloed kunnen zijn op de risico's van de werkzaamheden voor mens en milieu, dienen onverwijld telefonisch en schriftelijk aan de Inspectie Leefomgeving en Transport gemeld te worden.
4. Iedere onvoorziene omstandigheid die de werkzaamheden betreft zoals beschreven onder II moet onverwijld aan de Inspectie Leefomgeving en Transport worden gemeld. De gegevens voor het melden staan vermeld op de website van de Inspectie Leefomgeving en Transport en op de website van Bureau GGO.

**Artikel 6. Inwerkingtreding**

1. Deze beschikking treedt in werking overeenkomstig artikel 20.3 van de Wet milieubeheer.

NIET VERWIJDEREN BEGIN BLADWIJZER

Hier komt de officiële ondertekening van dit document

EINDE BLADWIJZER NIET VERWIJDEREN

**Directoraat-generaal  
Milieu en Internationaal**  
Directie Veiligheid en  
Risico's

**Ons kenmerk**  
IM-MV 17-006\_000.ob.1