

> 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 16-006\_000.ob.1

**Uw kenmerk**

# Ontwerpbeschikking GGO IM-MV 16-006\_000

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

1.1 De Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu (hierna: de Staatssecretaris) heeft op 15 april 2016 een aanvraag, gedateerd 13 april 2016, van het Prinses Máxima Centrum voor Kinderoncologie B.V., te Utrecht ontvangen. Deze aanvraag heeft het kenmerk IM-MV 16-006.

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* genetisch gemodificeerd worden. Na genetische modificatie worden de T-cellen weer teruggegeven aan de patiënten, met als doel het opwekken van een afweerreactie tegen de B-cel maligniteiten.

1.3 De autologe T-cellen worden *ex vivo* getransduceerd met een retrovirale vector die is afgeleid van *Moloney murine leukemia virus* (MoMLV). De virale vector is door verwijdering van virale genen replicatiedeficiënt gemaakt, waardoor het virus zich in de cel niet kan vermenigvuldigen. De getransduceerde T-cellen, welke een chimere anti-CD19 receptor (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.

## 2. BEOORDELINGSKADER

---

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

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).

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

**Ons kenmerk**  
IM-MV 16-006\_000.ob.1

### **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 12 juli 2016 en op 15 september 2016.

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 Milieu 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 risicobeoordeling navolgbaar is.

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

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

Ons kenmerk  
IM-MV 16-006\_000.ob.1

##### **4.1. Het uitgangsgenoom (MoMLV)**

###### *Algemeen:*

De virale vector die in deze studie wordt gebruikt is gebaseerd op MoMLV. Dit virus behoort tot de familie *Retroviridae* en het genus *gammaretrovirus*. Het wildtype MoMLV genoom bevat de sequenties coderend voor de genen *gag*, *pol* en *env*. 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 retrovirale RNA. Verder bevat het MoMLV genoom cis-acterende sequenties betrokken bij virale replicatie en genexpressie: de *primer binding site* (PBS), het *packaging signaal* ( $\psi$ ), en een *polypurine tract* (PPT).

Het gastheerbereik van MoMLV is beperkt tot muizen. Infectie met MoMLV kan resulteren in leukemie. MoMLV wordt meestal verspreid via bloed van muizen, van moeder op nageslacht. MoMLV kan echter ook via moedermelk op het nageslacht worden overgebracht tijdens het zogen.

###### *Infectie, replicatie en uitscheiding*

In de genetisch gemodificeerde retrovirale vector is het merendeel van de MoMLV sequenties verwijderd om een replicatiedeficiënte retrovirale vector te produceren. Het virusdeeltje kan slechts éénmaal een cel infecteren, waardoor het effect uitdovend zal zijn. Door het gebruik van het *Gibbon ape Leukemia Virus* (GALV) envelop eiwit is het tropisme van de vector verbreed. GALV gepseudotyperde retrovirale vectoren hebben een breed gastheerbereik en kunnen cellen van onder andere rat, hamster, rund, kat, hond, aap en mens infecteren.

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

In de retrovirale vector is een gen gekloneerd dat codeert voor een transmembrane, chimere anti-CD19 receptor (CAR-19). CAR-19 bestaat uit een humane GM-CSF signaal sequentie, een muizen anti-CD19 antigen bindend domein, een linker, de transmembraan en intracellulaire domeinen afkomstig van humaan CD28 en het CD3 $\zeta$  (T-cel receptor  $\zeta$ ) intracellulaire activatiedomein. CAR-19 is gericht tegen het CD19 antigen, 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.

##### **4.3. Het ggo**

###### *Constructie*

Voor de constructie van het ggo is een niet-replicerende, recombinante retrovirale vector gebruikt welke gebaseerd is op MoMLV. De virale vector is ontworpen om het ontstaan van replicatiecompetent retrovirus (RCR) te voorkomen, doordat enkel het transgen en cis-acterende sequenties benodigd voor packaging (i.e.  $\psi$ ) en integratie (i.e. de LTRs) op het plasmide voorkomen. De virale genen coderend voor de eiwitten benodigd voor packaging, reverse transcriptie en integratie zijn aanwezig in de packaging cellijnen. De sequentie coderend voor de MoMLV *env* is verwijderd. Er is gebruik gemaakt van een heteroloog envelop eiwit afkomstig van GALV. Met de

virusdeeltjes zijn autologe T-cellen getransduceerd waarna het retrovirale vectorgenoom stabiel geïntegreerd is in het genomisch DNA van de T-cel.

#### *Virulentie en stabiliteit*

Het ggo bestaat uit *ex vivo* retroviraal 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. Dit kan zich voordoen bij afname van bloed of bij verwondingen waarbij een open wond ontstaat. Echter, de T-cellen kunnen buiten het lichaam niet overleven.

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

**Ons kenmerk**  
IM-MV 16-006\_000.ob.1

#### **4.4. Beschrijving van het onderzoek**

Het onderzoek zal plaatsvinden in het Prinses Máxima Centrum in de gemeente Utrecht. In totaal zullen maximaal 205 patiënten worden geïncludeerd. Verschillende klinische studies met het ggo voor verschillende soorten B-cel maligniteiten zullen worden uitgevoerd onder deze vergunningaanvraag.

In deze studies worden *ex vivo* retroviraal getransduceerde, autologe T-cellen (KTE-C19) toegediend aan patiënten. De T-cellen van de patiënt worden getransduceerd met maximaal  $1.4 \times 10^9$  transducerende eenheden. De patiënten krijgen maximaal  $200 \times 10^6$  getransduceerde T-cellen 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. Toediening vindt plaats conform de WIP richtlijn gentherapie en de gehele procedure van ontdooien tot en met toediening van het KTE-C19 product zal maximaal 1 uur duren. 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 de kledingvoorschriften volgens de richtlijn voor celtherapie hanteren. De patiënten krijgen in eerste instantie een enkele infusie met het ggo. Indien de therapie aanslaat, maar de patiënt later een terugval ervaart, kan een patiënt een tweede dosis KTE-C19 toegediend krijgen.

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

De retrovirale transfervector wordt getransfecteerd in Phoenix Eco cellen (humane 293T/17 embryonale niercellijn), waarin de genen coderend voor de gag-pol eiwitten en voor een ecotroop envelop eiwit aanwezig zijn. Na transfectie worden door deze cellen ecotrope retrovirale partikels geproduceerd die het transgen, de packaging sequentie en de LTRs bevatten. De Phoenix Eco cellen zijn vrij van helpervirus, waardoor recombinatie met en complementatie van de virale vector niet mogelijk is. De ecotrope retrovirale partikels worden vervolgens gebruikt om PG13 cellen (muizen fibroblasten cellijn) te transduceren. In de PG13 cellen zijn de genen coderend voor de structurele en functionele virale eiwitten (gag-pol) benodigd voor het inpakken van het virale vectorgenoom, reverse transcriptie en integratie, alsmede het gen coderend voor het heterologe envelop eiwit van GALV stabiel aanwezig. De getransduceerde PG13

cellen zullen vervolgens GALV-gepseudotypeerde retrovirale partikels produceren die het transgen, de packaging sequentie en de LTRs bevatten. Deze partikels zullen gebruikt worden om de T-cellen van patiënten te transduceren. Zowel de cellen gebruikt voor virusproductie als de virusbatch, worden voorafgaand aan vrijgifte getest op de aanwezigheid van RCR 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.

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

T-cellen geïsoleerd uit de patiënt worden getransduceerd met de retrovirale vector en worden pas vrijgegeven voor infusie in de patiënt indien er geen RCR gedetecteerd is en de identiteit bevestigd is. Het ggo wordt geanalyseerd op de aanwezigheid van andere celpopulaties naast de T-cellen. Er kunnen maximaal 10% andere celtypen, zoals natural killer (NK) en NKT-cellen voorkomen in het KTE-C19 eindproduct. De getransduceerde T-cellen worden daarnaast ook getest op onder andere viabiliteit, identiteit, steriliteit en afwezigheid van mycoplasma en endotoxines.

**Ons kenmerk**  
IM-MV 16-006\_000.ob.1

#### *Vervoer*

De getransduceerde T-cellen worden vanuit de productiefaciliteit naar het betreffende ziekenhuis vervoerd. Dit maakt geen deel uit van de onderhavige vergunning. Vervolgens worden de cellen naar de patiëntenafdeling van het ziekenhuis vervoerd conform Bijlage 1 van de Regeling GGO 2013.

#### *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 retrovirale partikels bevatten en de getransduceerde T-cellen geen specifiek veiligheidsrisico vormen. De monsters worden gehanteerd als reguliere ziekenhuismonsters en worden beschouwd als potentieel infectieus humaan diagnostisch/studiemateriaal gedurende alle fasen van monsterafname, opslag en transport. Afnames van bloed- en beenmergmonsters wordt uitgevoerd volgens lokale ziekenhuisprocedures. Bloedafname zal plaatsvinden met een gesloten buizensysteem. De monsters zullen onder andere worden getest op de aanwezigheid van RCR via een qPCR test voor GALV envelop DNA en de aanwezigheid, hoeveelheid en het fenotype van de getransduceerde T-cellen.

#### *Afval en besmet materiaal*

Na verwerking en toediening van de getransduceerde T-cellen aan de patiënt zal het achtergebleven ggo in de cryobag en alle materialen die in aanraking zijn geweest met het ggo, zoals handschoenen en infusen, worden afgevoerd conform de Regeling GGO 2013 en ter verbranding worden aangeboden. De patiëntenkamer zal worden schoongemaakt volgens standaard ziekenhuisprocedures met een door het ziekenhuis goedgekeurd desinfectans. Materialen gebruikt voor monsterafname worden afgevoerd als ziekenhuisafval.

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

De getransduceerde T-cellen kunnen buiten de gastheer (de patiënt) niet overleven. In de getransduceerde T-cellen is de retrovirale vector stabiel geïntegreerd.

## **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.

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

**Ons kenmerk**  
IM-MV 16-006\_000.ob.1

## **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 blootgesteld worden aan het ggo.

## **5.2. Het ggo**

### *Persistentie, invasiviteit en selectieve voordelen*

In de genetisch gemodificeerde retrovirale vector is het merendeel van de MoMLV sequenties verwijderd. Als gevolg van de deletie van deze sequenties is de retrovirale 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 GALV envelop eiwit is het tropisme van de vector verbreed. GALV gepseudotyperde retrovirale vectoren hebben een breed gastheerbereik en kunnen cellen van onder andere rat, hamster, rund, kat, hond, aap en mens infecteren.

### *Replicatiecompetent retrovirus (RCR)*

Tijdens de productie van de virale vector is er een theoretische kans aanwezig op het ontstaan van RCR. Voor de generatie van RCR zijn minimaal 2 aparte recombinatie gebeurtenissen nodig. Er zijn geen aanwijzingen in de literatuur voor het ontstaan van RCR met vergelijkbare retrovirale vectorsystemen.

Het is bovendien onwaarschijnlijk dat in de getransduceerde T-cellen recombinatie optreedt tussen de retrovirale vector en humane retrovirussen die mogelijk in de T-cellen aanwezig kunnen zijn, aangezien de mate van homologie tussen deze virussen beperkt is. Bovendien zijn de patiënten vrij van HIV, HTLV, Hepatitis B en Hepatitis C virus infecties.

In theorie is er ook een mogelijkheid tot het ontstaan van RCR 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 betaretrovirussen, maar ook sequenties gerelateerd aan gammaretrovirussen 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 retrovirale genoom (de LTR's en het packaging signaal), en dit heeft een lage sequentie homologie met HERVs waardoor recombinatie onwaarschijnlijk is.

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

De kans dat er daadwerkelijk een infectieus RCR 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 echter pas na een kweekperiode van

minimaal 4 dagen na de retrovirale transductie bij 37°C en 4 wasstappen aan de patiënt toegediend. Aangenomen dat de halfwaardetijd van het virus ongeveer 4 uur bedraagt bij 37°C 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  $2,68 \times 10^{12}$  ten opzichte van het oorspronkelijke virale inoculum van  $1.4 \times 10^9$ . Dit betekent dat op het moment van infusie van de getransduceerde T-cellen aan de patiënt de kans verwaarloosbaar klein is dat er nog vrije virusdeeltjes aanwezig zijn (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 retrovirale 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.

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

Ons kenmerk  
IM-MV 16-006\_000.ob.1

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 retrovirale 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 MoMLV. Er is ook geen scenario denkbaar waarlangs een dergelijk effect zou kunnen optreden. De insertie zal dan ook geen invloed hebben op bijvoorbeeld het weefsel tropisme 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 bestaat de kans op ontregeling van genen betrokken bij proliferatie waardoor T-cel tumoren kunnen ontstaan.

De verloren functies van de retrovirale 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.

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

Er zijn geen aanwijzingen in de literatuur voor kwaadaardige transformatie van gammaretroviraal gemodificeerde volwassen T-cellen welke CARs tot expressie brengen.

De getransduceerde T-cellen kunnen gedurende lange tijd in patiënten aanwezig blijven als memory T-cellen. De getransduceerde T-cellen zullen zich niet anders gedragen dan andere T-cellen die een antigeen op hun celoppervlak presenteren. De getransduceerde T-cellen kunnen vanuit de patiënt in het milieu terechtkomen via bloed. 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. 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 immuungecompromitteerd 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.

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

**Ons kenmerk**  
IM-MV 16-006\_000.ob.1

De waarschijnlijkheid dat de verloren functies van de retrovirale vector gecompenseerd worden, indien een retrovirus in dezelfde cel aanwezig is als de retrovirale vector, is verwaarloosbaar klein. Ten eerste worden de retrovirale vector en de getransduceerde T-cellen vooraf getest op de aanwezigheid van RCR. 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 retrovirale 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.

#### **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.

## **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 retrovirale vector is stabiel geïntegreerd in



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

**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.

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

Ons kenmerk  
IM-MV 16-006\_000.ob.1

## **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.

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

## **7. ADVIES**

De COGEM zal gelijktijdig met de publicatie van de onderhavige ontwerpbeschikking om advies worden gevraagd.

**Ons kenmerk**  
IM-MV 16-006\_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 retrovirale vector, afgeleid van MoMLV, waarin een transmembrane, chimere anti-CD19 receptor gekloneerd is. De virale vector is door verwijdering van 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 retrovirale deeltjes of RCR aanwezig zijn is verwaarloosbaar klein. Tevens is de kans verwaarloosbaar klein dat de verloren functies van de geïnserteerde retrovirale 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 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 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 16-006\_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 Milieu;
  - 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. MoMLV: *Moloney murine leukemia virus*;
  - h. LTR: *Long Terminal Repeat*;
  - i. PBS: *primer binding site*;
  - j.  $\psi$ : *packaging signaal*;
  - k. PPT: *polypurine tract*;
  - l. GALV: *Gibbon ape Leukemia Virus*;
  - m. RCR: replicatiecompetent retrovirus;
  - n. HIV: humaan immunodeficiëntievirus;
  - o. HTLV: humaan T-cel-lymfotroop virus;
  - p. GMP: Good Manufacturing Practices;
  - q. 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.

#### **Artikel 3. Bijzondere voorschriften**

1. Zowel de cellen gebruikt voor virusproductie als de virusbatch worden voorafgaand aan vrijgifte getest op de aanwezigheid van RCR via een op celweek 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 4 dagen na de retrovirale transductie bij 37°C en 4 wasstappen aan de patiënt toegediend.
4. De patiënten die behandeld zijn worden uitgesloten van het doneren van bloed, organen, weefsels en cellen voor transplantatie.

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

**Ons kenmerk**  
IM-MV 16-006\_000.ob.1

#### **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 Staatssecretaris gemeld te worden.
4. Iedere onvoorziene omstandigheid die de werkzaamheden betreft zoals beschreven onder II moet onverwijld telefonisch en schriftelijk aan de Staatssecretaris worden gemeld.
5. Bij een melding, als bedoeld in het derde en vierde lid, moeten aan de Staatssecretaris onverwijld de gegevens zoals gevraagd in het meldingsformulier "onvoorziene omstandigheden en afwijkingen introductie in het milieu" worden doorgegeven. Dit formulier is beschikbaar via de website <http://www.ggo-vergunningverlening.nl>.

**Artikel 6. Inwerkingtreding**

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

**Op het tijdstip van afgifte van deze vergunning zijn de adresgegevens als volgt:**

De Staatssecretaris:

De Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu, p.a. Directie Veiligheid en Risico's,  
Postbus 20901, 2500 EX, Den Haag.

Voor een melding:

Bij een schriftelijke melding kan contact opgenomen worden met het RIVM/VSP/Bureau GGO, RIVM/VSP/Bureau GGO, Antonie van Leeuwenhoeklaan 9, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven of via (030) 274 4401.

Bij een telefonische melding kan 24 uur per dag contact opgenomen worden met het Ministerie, 0800-3518700 (vanuit buitenland: 00 31 70 4568625). Tijdens kantooruren kan ook contact opgenomen worden met het RIVM/VSP/Bureau GGO, telefoonnummer (030) 274 2793.

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

**Ons kenmerk**  
IM-MV 16-006\_000.ob.1

NIET VERWIJDEREN BEGIN BLADWIJZER

Hier komt de officiële ondertekening van dit document

EINDE BLADWIJZER NIET VERWIJDEREN