



## Milieurisicobeoordeling behorend bij de aanvraag GGO IM-MV 18-009

*Datum: 12 oktober 2018*

De milieurisicobeoordeling is onder verantwoordelijkheid van het Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat uitgevoerd overeenkomstig bijlage II van de Richtlijn 2001/18/EG inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu en het richtsnoer 2002/623/EG ter aanvulling van deze bijlage II. Daarbij is rekening gehouden met de uitwerking op het milieu van de geïntroduceerde organismen en het milieu waarin wordt geïntroduceerd.

De milieurisicobeoordeling neemt zowel directe als indirecte, de onmiddellijk en de vertraagd optredende risico's voor de menselijke gezondheid en het milieu in beschouwing, die de doelbewuste introductie met zich mee kan brengen. Bij de milieurisicobeoordeling moeten de potentiële schadelijke effecten van geïdentificeerde kenmerken van het ggo worden vergeleken met die van het ongemodificeerde organisme waaruit het ggo is afgeleid. Daarbij worden de omstandigheden van het voorgenomen gebruik in aanmerking genomen. De beoordeling moet per geval worden uitgevoerd, wat betekent dat de vereiste informatie kan verschillen afhankelijk van het betrokken ggo en het voorgenomen gebruik daarvan.

Opgemerkt moet worden dat voor studies met mensen niet primair het risico voor de patiënt wordt getoetst. Deze toets wordt sinds het in werking treden van de Wet medisch wetenschappelijk onderzoek met mensen beoordeeld door de Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek (CCMO).

De milieurisicobeoordeling van de aangevraagde werkzaamheden bestaat uit de volgende delen.

**Deel 1** bevat een samenvatting van de gegevens zoals die zijn aangeleverd door de aanvrager. Deze gegevens dienen als basis van de milieurisicobeoordeling van het dossier zoals deze volgt uit de kenmerken van de ggo's en de voorgestelde wijze van introductie.

**Deel 2** geeft de milieurisicobeoordeling voor de introductie in het milieu van het ggo. Hierbij wordt per sequentie bepaald hoe de nieuwe kenmerken van het ggo eventueel schadelijke effecten kunnen hebben voor het milieu.

De milieurisicobeoordeling wordt uitgevoerd conform de Europese Richtlijn 2001/18/EG, volgens de methodologie beschreven in bijlage II van deze Richtlijn. De Richtlijn geeft een overzicht van de kenmerken die beoordeeld moeten worden om de schadelijke gevolgen voor het milieu in kaart te brengen.

De Richtlijn is algemeen gericht op de introductie in het milieu, en niet specifiek bedoeld voor klinisch onderzoek met ggo's bij mens of dier. De Richtlijn bevat daardoor beoordelingskenmerken die voor een ggo voor klinische toepassing niet of minder relevant zijn.

Voordat invulling wordt gegeven aan de milieurisicobeoordeling van een ggo dat toegepast wordt in een klinische studie bij mens of dier wordt een overzicht gegeven van kenmerken uit bijlage II van de Richtlijn die hiervoor relevant worden geacht.

In onderdeel C2 van bijlage II van de Richtlijn wordt een aantal mogelijke schadelijke effecten opgesomd.



Hieronder wordt een kort overzicht gegeven van de in de Richtlijn genoemde aspecten. Hierbij wordt in algemene bewoordingen beschreven of het genoemde kenmerk al dan niet van belang is bij de beoordeling van de werkzaamheden.

In dit document volgt een nadere toelichting op de beoordelingsaspecten waarbij de Richtlijn en de bijbehorende toelichting fungeren als startpunt.

- I. Ziekten bij de mens, met inbegrip van allergische en toxische effecten.  
*Het is van belang na te gaan in hoeverre de toepassing van het ggo kan leiden tot het ontstaan van ziekten. Hierbij moeten de ziekteverwekkende eigenschappen van het ggo worden vergeleken met die van het uitgangsgo. Van de meeste ziekteverwekkende organismen is de pathogeniteit bekend. De pathogeniteit van het uitgangsgo is een belangrijk uitgangspunt. Omdat de ziekteverwekkende eigenschappen van een ggo niet enkel worden bepaald door de pathogeniteit van het uitgangsgo worden ook de genetische modificatie en de toepassing in beschouwing genomen. In de Richtlijn worden diverse beoordelingsaspecten genoemd welke de ziekteverwekkende eigenschappen van een ggo kunnen beïnvloeden. Deze beoordelingsaspecten worden later in deze notitie nader toegelicht.*
- II. Ziekten bij dieren en planten, met inbegrip van allergische en toxische effecten.  
*Omdat in klinische studies toegepaste ggo's veelal zijn afgeleid van uitgangsgo's die niet in staat zijn een plantaardige gastheer te infecteren wordt verondersteld dat deze ggo's bij planten geen ziekten kunnen veroorzaken. Mochten er in een voorkomend geval toch overwegingen zijn bij de combinatie gastheer/gekloneerde genen die betrekking hebben op de plantpathogeniteit, dan worden deze alsnog in beschouwing genomen. Voor ziekten bij dieren geldt een overeenkomstige argumentatie als verwoord onder het kopje ziekten bij de mens. In de notitie worden ziekten bij de mens en ziekten bij dieren gezamenlijk behandeld.*
- III. Effecten op de populatiedynamiek van soorten binnen het milieu en effecten op de genetische diversiteit van elk van die populaties.  
*Effecten op patiënten of proefdieren welke optreden ten gevolge van de toediening van een ggo behoren niet tot het wettelijke kader waarbinnen de milieurisicobeoordeling wordt uitgevoerd. Effecten op patiënten of proefdieren vallen onder de medische verantwoordelijkheid van de behandelend (dieren)arts en worden in het geval van klinische studies bij mensen beoordeeld door de CCMO. Echter, effecten op mens en dier in de omgeving van patiënt of proefdier (niet-doelpopulaties) kunnen afgeleid worden uit de effecten die mogelijk kunnen optreden bij de patiënt / proefdier. Daarom worden effecten op de doelpopulatie in de overwegingen betrokken waarbij in vervolgens nagegaan moet worden in hoeverre derden met het ggo in contact komen en als dit het geval is wat de kans is dat effecten optreden.*
- IV. Gewijzigde gevoeligheid voor ziekteverwekkers, waardoor de verspreiding van besmettelijke ziekten wordt vergemakkelijkt en/of nieuwe reservoirs of vectoren worden gecreëerd.  
*Gevoeligheid voor ziekteverwekkers is van groot belang bij de beoordeling van genetisch gemodificeerde planten en andere hogere organismen. De gevoeligheid voor ziekteverwekkers van micro-organismen is niet van toepassing bij de beoordeling van genetisch gemodificeerde virussen, virale vectoren en bacteriën.*
- V. Het in gevaar brengen van preventieve of therapeutische medische en veterinaire behandelingen.  
*Als voorbeeld noemt de Richtlijn hierbij het in gevaar brengen van preventieve of therapeutische medische, veterinaire of plantenbeschermingsbehandelingen, door het ontstaan van antibioticumresistentie door genoverdracht. Ten aanzien van de genoemde plantbeschermingsbehandelingen gelden dezelfde overwegingen als die werden genoemd in het kader van ziekten bij planten, in paragraaf II. Om deze reden worden effecten op plantenbeschermingsbehandelingen niet in de milieurisicobeoordeling opgenomen. Het in gevaar brengen van medische en veterinaire behandelingen wordt later uitgewerkt voor specifieke aspecten behorend bij de betreffende studie.*
- VI. Effecten op biogeochemische cycli.  
*Met betrekking tot de effecten op biogeochemische cycli moet met name ingegaan worden op recycling van koolstof en stikstof uit organisch materiaal in de bodem. Van een ggo dat in een klinische studie bij mens of dier wordt toegepast kan over het algemeen uitgesloten worden dat zij gedurende langere tijd buiten een gastheer overleven in het*



*milieu. Alleen indien overleving gedurende langere tijd mogelijk is en er een interactie kan plaatsvinden met organismen in de bodem die een rol spelen in deze processen zou dit aspect in de beoordeling van belang moeten zijn. Organismen die toegepast worden in klinische studies die langere tijd overleven buiten een gastheer en een interactie hebben met organismen in de bodem zijn niet eerder toegepast in klinische studies. Bij de beoordeling van de risico's voor mens en milieu van ggo's zal dit beoordelingsaspect over het algemeen niet uitgewerkt worden.*

In de bovenstaande onderdelen I tot en met VI wordt een overzicht gegeven van de beoordelingsaspecten zoals deze uit Richtlijn 2001/18/EG zijn afgeleid. Niet alle beschreven onderdelen zijn van belang bij de beoordeling van klinische studies met mensen of dieren. De relevante onderdelen worden hieronder nader uitgewerkt en vertaald naar de beoordelingspraktijk van klinisch onderzoek. Hiertoe zijn sommige onderdelen samengevoegd en wordt toegelicht welke nadere invulling bij de beoordeling aan deze onderdelen gegeven wordt.

### **Ziekten bij mens en dier**

(toelichting op onderdeel I, II en IV)

*De onderstaande uitwerking gaat in op de aspecten die van belang zijn voor de beoordeling van de mogelijke schadelijke effecten van een ggo op mens en milieu, waarbij de nadruk ligt op ziekten bij mens en dier.*

*Uitgangspunt is dat ziekten bij patiënt of proefdier die ten gevolge van toepassing van het ggo kunnen ontstaan in beginsel geen deel uit maken van de beoordeling. Bij de beoordeling wordt wel ingegaan op schadelijke effecten die op kunnen treden bij de patiënt of het proefdier (de 'doelpopulatie'), maar dan alleen omdat de effecten die in de doelpopulatie worden waargenomen indicatief zijn voor effecten die buiten de doelpopulatie kunnen optreden als verspreiding van het ggo in het milieu plaatsvindt. Het is niet vanzelfsprekend dat effecten op de doelpopulatie ook in het milieu kunnen optreden. In dit kader zijn verspreiding in het milieu en blootstelling van derden van belang. Als verspreiding in het milieu en dus blootstelling niet kan plaatsvinden is het zeer onwaarschijnlijk dat de toepassing een gezondheidsrisico vormt voor mens en milieu. In zo'n situatie worden de ziekteverwekkende eigenschappen die eventueel waargenomen worden in de studiepopulatie minder zwaarwegend. Als verspreiding in het milieu en blootstelling kan plaatsvinden dan moet beoordeeld worden welke effecten ten gevolge hiervan kunnen optreden. In zo'n situatie is een effect op de studiepopulatie indicatief.*

*In het geval dat verspreiding in het milieu en blootstelling niet uitgesloten kan worden, worden verschillende aan de levenscyclus van het ggo verbonden kenmerken in beschouwing genomen. Het betreft de volgende kenmerken: pathogeniteit en virulentie, infectiviteit, gastheerbereik en tropisme, replicatie en transmissie en toxigeniteit en allergeniteit.*

*Pathogeniteit en virulentie (onderdeel A in Tabel 2)*

*Pathogeniteit van de uitgangsorganismen vormt een uitgangspunt voor de beoordeling van het pathogene potentieel van een ggo. Pathogenese omvat de mechanismen waarmee organismen zoals bijvoorbeeld virussen of bacteriën bepaalde celpopulaties in een specifieke gastheer en een bepaald weefsel kunnen beschadigen waardoor ziekteverschijnselen in deze gastheer kunnen ontstaan. Het vermogen van een pathogeen organisme om een ziekte te veroorzaken in een gastheer noemt men virulentie. Pathogenese en virulentie zijn twee nauw samenhangende begrippen die bij een beoordeling uitgesplitst worden in verschillende factoren die pathogeniteit en virulentie beïnvloeden. In principe kan alle nieuwe genetische informatie een effect hebben op de pathogeniteit en de virulentie. Om deze reden wordt van een ggo elke toegevoegde dan wel gedeleteerde sequentie bij de beoordeling betrokken.*

*Infectiviteit (onderdeel A in Tabel 2)*

*Infectiviteit neemt in de milieurisicobeoordeling van een ggo een belangrijke plaats in. Bij de beoordeling van de mogelijke schadelijke effecten die op kunnen treden in het milieu wordt eerst beoordeeld in hoeverre het ggo eigenschappen bezit die mogelijk een effect hebben in een geïnfecteerde gastheer. Als deze effecten niet geïdentificeerd kunnen worden is de beoordeling van de infectiviteit minder van belang. Als schadelijke effecten op kunnen treden in de patiënt of het proefdier en verspreiding van het ggo in het milieu kan niet uitgesloten worden, dan is beoordeling van de infectiviteit van belang.*



#### *Gastheerbereik en tropisme (onderdeel A in Tabel 2)*

*Wanneer een donorsequentie wordt ingebracht, kan een eiwit tot expressie komen dat een effect heeft op het tropisme en het gastheerbereik van het ggo in vergelijking met gastheerbereik en tropisme van het uitgangsgenoom. Dit kan tot gevolg hebben dat het tropisme en het gastheerbereik van het uitgangsgenoom veranderen. In gevallen dat een dergelijk scenario niet uitgesloten kan worden, dan moet in de risicobeoordeling rekening gehouden worden met een additioneel risico. Vervolgens moet nagegaan worden of een eiwit dat tot expressie komt ook daadwerkelijk functioneel is in de (virale) vector. Indien niet uitgesloten kan worden dat er een verandering optreedt in het gastheerbereik en tropisme van de vector, zal dit niet automatisch betekenen dat er ook sprake is van een gewijzigde pathogeniteit. Wel moet het risico in beschouwing genomen worden dat mogelijk andere cellen, weefsels, organen of zelfs gastheren geïnfecteerd kunnen worden en hierdoor schadelijke effecten ondervinden die normaal gesproken niet mogelijk zou zijn geweest zonder de toepassing van genetische modificatie.*

#### *Replicatie en transmissie (onderdeel A in Tabel 2)*

*Onder replicatie en transmissie verstaat men respectievelijk vermeerdering en verspreiding. Bij de beoordeling van de risico's voor mens en milieu moet nagegaan worden of het ggo dat aan patiënt of proefdier wordt toegediend kan repliceren. In eerste instantie moet beoordeeld worden of de vector autonoom kan repliceren. De meeste vectoren die worden toegepast in klinische studies zijn replicatiedeficiënt. Replicatiedeficiëntie berust veelal op de afwezigheid van een essentieel genproduct waarvan de sequentie in de vector ontbreekt of niet (functioneel) tot expressie komt. Nagegaan moet worden of de replicatiedeficiëntie kan worden hersteld bijvoorbeeld door homologe recombinatie met in de patiënt aanwezige organismen.*

*Als replicatie kan optreden moet nagegaan worden of de vector zich kan verspreiden. In dit kader zijn gegevens over biodistributie van belang. Tot slot moet beoordeeld worden via welke transmissieroutes verspreiding in het milieu kan plaatsvinden en in welke mate dit kan plaatsvinden. Verspreiding in het milieu is een noodzakelijke stap op weg naar blootstelling van derden en het milieu. Als schadelijke effecten op kunnen treden in de patiënt of het proefdier en verspreiding van het ggo in het milieu kan niet uitgesloten worden, dan is beoordeling van de replicatie en transmissie van belang.*

#### *Toxigeniteit en allergeniteit (onderdeel D in Tabel 2)*

*Indien verspreiding van het ggo in het milieu kan optreden is het van belang te evalueren welke schadelijke effecten kunnen optreden. Hierbij moet nagegaan worden in hoeverre het ggo schadelijke sequenties bezit en tot expressie kan brengen. Belangrijke ijkpunten hierbij zijn toxiciteit en allergeniteit van het genproduct.*

#### *Genoverdracht naar andere organismen (onderdeel C in Tabel 2)*

*Erfelijke informatie van een ggo kan overgedragen worden op andere in het milieu aanwezige organismen die direct of indirect in contact komen met het ggo. Bij de beoordeling wordt nagegaan in hoeverre erfelijke informatie van het ggo overgedragen kan worden op andere micro-organismen (bijvoorbeeld een aan de vector verwant organisme). Zo'n proces kan plaatsvinden middels homologe recombinatie. Daarnaast moet beoordeeld worden in hoeverre erfelijke informatie van het ggo via de kiembaan overgedragen kan worden op het nageslacht. Overdracht van erfelijke informatie op zichzelf hoeft niet altijd te leiden tot een gevaar voor mens en milieu. Als overdracht kan optreden maar er geen negatieve effecten geïdentificeerd kunnen worden is er geen sprake van een milieurisico.*

*De overheid heeft besloten dat overdracht via de kiembaan op het nageslacht in alle gevallen voorkomen moet worden, onafhankelijk van de vraag of er daarbij schadelijke effecten kunnen optreden.*

### **Veranderingen van populatiedynamiek in natuurlijke milieu's**

#### **(toelichting op onderdeel III)**

*Genetisch gemodificeerde organismen die in klinische studies toegepast worden kunnen ook een effect hebben op het voorkomen van andere (hogere) organismen en zodoende een effect hebben op de populatiedynamiek. Een illustratief voorbeeld betreft een doelbewuste introductie in het milieu van een virulent myxomavirus in de gevoelige populatie van Europese konijnen in Australië. Aanvankelijk waren de gevolgen desastreus voor de konijnenpopulatie. Maar uiteindelijk ontstonden er virusvarianten met een verminderde virulentie maar ook konijnen met een verhoogde resistentie tegen het virus. Dit voorbeeld illustreert dat een verandering van in de natuur aanwezige micro-organismen ook een effect kan hebben op de gastheer (konijn). Ook een veranderde eigenschap van het gastheerorganisme ten gevolge van genetische modificatie zou een dergelijk effect kunnen veroorzaken. Op deze aspecten wordt, indien het voor de specifieke beoordeling relevant is, ingegaan in onderdeel G van Tabel 2.*



## Het in gevaar brengen van preventieve of therapeutische behandelmethoden

(toelichting op onderdeel V)

*Veranderde eigenschappen van een organisme ten gevolge van genetische modificatie kan mogelijk tot gevolg hebben dat dit organisme ziekte kan veroorzaken. Als hierdoor de op dat moment geldende medische praktijk direct of indirect niet meer toegepast kan worden voor behandeling van deze ziekten, of wanneer preventieve behandeling niet meer werkt is er sprake van een negatief effect voor het milieu. Daarom moet, als vastgesteld wordt dat een ggo mogelijk ziekteverwekkende eigenschappen bezit, in beschouwing genomen worden welke therapeutische behandelmethoden beschikbaar zijn om de ziekte te bestrijden of te voorkomen. Indien de genetische modificatie de therapeutische behandeling van de ziekte bemoeilijkt of zelfs in gevaar brengt, moet dit in de risicobeoordeling meegewogen worden.*

*Er kan tijdens de beoordeling ook vastgesteld worden dat het ontstaan van ziekte onwaarschijnlijk is, in dat geval kan mogelijk afgezien worden van een beoordeling van de mogelijke effecten op preventieve en therapeutische behandelmethoden. Op deze aspecten wordt ingegaan in onderdeel H van Tabel 2.*

In de Richtlijn 2001/18/EG wordt, na de vaststelling van de beoordelingsaspecten, een methodologie voor de risicoanalyse ontwikkeld. Deze methodologie wordt gevolgd in de tabellen in deel 2. De mogelijk schadelijke effecten die samen kunnen hangen met de nieuw ingebrachte sequenties worden toegelicht. Daarbij worden de verschillende stappen in de “oorzaak-gevolg” relaties tussen de genetische modificatie en het eventuele schadelijke effect verduidelijkt. Zo wordt bepaald welke effecten eventueel toe te schrijven zijn aan de genetische modificatie.

Vervolgens volgt de evaluatie van de eventuele omvang en de waarschijnlijkheid van de schadelijke gevolgen. Redenen voor het niet verder in de milieurisicobeoordeling beschouwen van mogelijke schadelijke effecten worden verduidelijkt.

In **Deel 3** vindt tenslotte de bepaling van het algehele risico van het ggo plaats.

Deze bepaling wordt gedaan op basis van de risico's die in Deel 2 zijn geïdentificeerd, waarbij rekening wordt gehouden met de mogelijkheid dat er stapeling van risico's plaatsvindt, in het bijzonder als de risico's niet onafhankelijk van elkaar zijn.



## Milieurisicobeoordeling behorend bij aanvraag GGO IM-MV 18-009

**Titel aanvraag:** Clinical testing of KITE-585, an autologous cellular immunotherapy composed of T cells genetically modified ex vivo to express a chimeric antigen receptor (CAR) that, upon reinfusion into the patient, recognize and kill B-cell maturation antigen (BCMA)-expressing tumor cells.

### DEEL 1. KENMERKEN VAN DE IN DEZE AANVRAAG GEBRUIKTE GGO'S EN HUN INTRODUCTIE

Samenvatting van de gegevens zoals die zijn aangeleverd door de aanvrager. Deze gegevens dienen als basis voor de milieurisicobeoordeling van de aangevraagde werkzaamheden en bestaan uit de relevante technische en wetenschappelijke details van de ggo's en de voorgestelde wijze van introductie. Hierbij wordt rekening gehouden met de informatievereisten zoals genoemd in bijlage III en in het bijzonder bijlage IIIA van Richtlijn 2001/18/EC. De vindplaats van de informatie in het dossier is tussen haakjes aangegeven. Informatie van bureau GGO is met een asterisk (\*) aangegeven.

#### A. Het ouderorganisme, i.c. de gebruikte virale vector

1. De te gebruiken virale vector is afgeleid van *Human Immunodeficiency Virus 1* (HIV-1) (A2.1, A2.2)
2. HIV-1 behoort tot de familie *Retroviridae* en het genus *Lentivirus*\*
3. 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) (A2.2)\*
4. Het gastheerbereik van HIV-1 is beperkt tot mensen en chimpansees (A2.3)
5. HIV-1 infecteert vooral lymfocyten (T-cellen), maar kan ook macrofagen en microglia (macrofaag cellen in de hersenen) infecteren (A2.3, A2.15)
6. Infectie met HIV-1 kan resulteren in AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*) (A2.5)
7. Een HIV-1 infectie wordt doorgaans onder controle gehouden met behulp van antiretrovirale medicatie. Deze behandeling is in grote delen van de wereld zo succesvol dat een HIV-1 infectie een chronische ziekte is geworden waarbij progressie naar AIDS zeldzaam is (A2.5)\*
8. HIV-1 wordt verspreid via seksueel contact, bloedtransfusie, besmette injectiespuiten en van moeder naar kind gedurende de zwangerschap, bevalling en via borstvoeding (A2.6)\*
9. De stabiliteit van HIV-1 partikels is afhankelijk van de vloeistof waarin het zich bevindt, de concentratie, temperatuur, zuurgraad, zonlicht en luchtvochtigheid. In bloed kan HIV-1 tot 42 dagen infectieus blijven bij kamertemperatuur. Onder experimentele condities kan celvrij HIV-1, gedroogd op een dekglasje in 10% serum, voor meer dan 7 dagen infectieus blijven. In bloed en cerebrospinale vloeistof verkregen via autopsie 11 dagen na overlijden kunnen nog infectieuze HIV-1 partikels aanwezig zijn (A2.7)\*



## B. De genetische modificatie

10. De virale vector welke gebruikt wordt voor transductie van de T-cellen is een niet-replicerende, recombinante lentivirale vector gebaseerd op HIV-1. Het betreft hier een zogeheten derde generatie SIN lentiviraal vectorsysteem (A2.1)\*
11. 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 genen *tat*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *env* en *nef* zijn verwijderd. Verder is er gebruik gemaakt van een heteroloog envelop eiwit. Bovendien is de virale vector zelf-inactiverend (SIN) (A2.2, A2.8, A2.9)
12. Uit SIN vectoren is een deel van de 3' LTR, het zogenaamde U3 domein, verwijderd. Tijdens reverse transcriptie naar het provirale genoom wordt deze deletie overgenomen in de 5' LTR waardoor deze vector geen functionele LTR's meer bezit. Dit reduceert de kans op mobilisatie van de vector uit het genoom van de gastheer aanzienlijk. In het geval van een superinfectie van de getransduceerde cel met een wildtype lentivirus kan de transfervector in principe niet meer worden gemobiliseerd uit het genoom van de gastheer cel. In het U3 domein van de LTR bevinden zich zogenaamde promotor en enhancer sequenties. Indien een lentivirale vector in het genoom van de gastheer integreert in de buurt van een proto-oncogen kan dit 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. Naast de reductie op mobilisatie van de vector is hierdoor tevens de mogelijke activering van naburige proto-oncogenen door het U3 domein teniet gedaan (A2.8)(CGM/090331-03)\*
13. De pLV-K585 vector (transfervector) welke het transgen, een chimere antigen receptor (CAR) die B cell maturation antigen (BCMA) herkent, tot expressie brengt is gebaseerd op HIV-1. In de pLV-K585 vector is het merendeel van de HIV-1 sequenties verwijderd om een replicatiedeficiënte lentivirale vector te produceren. De benodigde structurele en functionele virale eiwitten benodigd voor het inpakken van het virale vectorgenoom, reverse transcriptie en integratie worden tot expressie gebracht vanaf drie aparte packaging vectoren; een vector brengt HIV-1 gag en pol tot expressie, een vector brengt een heteroloog viraal envelop eiwit tot expressie en een vector brengt HIV-1 rev tot expressie (A2.8, A2.9, A2.11)
14. De pLV-K585 vector bevat het virale vectorgenoom, welke ingepakt wordt in de virale partikels in de vorm van enkelstrengs RNA. Het virale vectorgenoom bevat cis-acterende HIV-1 sequenties ( $\psi$ , een gedeelte van de gag sequentie, RRE en cPPT) welke nodig zijn voor het inpakken van het virale vectorgenoom, reverse transcriptie en integratie van het vectorgenoom in het genoom van de gastheer cel. Verder bevat de vector een hybride promotor gebaseerd op de humane *Cytomegalovirus* (CMV) promotor en een getrunceerde HIV-1 5' LTR, een *murine stem cell virus* (MSCV) promotor, het anti-BCMA-CAR transgen, een *Woodchuck hepatitis virus post-transcriptioneel regulator* element (WPRE), een c-frag sequentie, een *Simian virus 40* (SV40) polyadenylatiesignaal en een SIN HIV-1 3' LTR (waarin een gedeelte van de HIV-*nef* sequentie aanwezig is zonder startcodon). Een aantal van deze elementen zijn gekoppeld door niet-coderende linker regio's zonder functie. Daarnaast bevat de backbone van de vector een kanamycine resistentiegen, een bacteriële origin of replication (*ori*), en een bovine groeihormoon polyadenylatiesignaal, deze sequenties zijn echter geen onderdeel van het lentivirale vectorgenoom en worden niet geïntegreerd in het gastheergenoom (A2.8, A2.11, aanvullende informatie 28 augustus 2018)
15. De CMV promotor zorgt voor transcriptie van het vectorgenoom gedurende de productie van de lentivirale vector. De CMV promotor is echter geen onderdeel van het enkelstrengs RNA lentivirale genoom dat wordt getranscribeerd van de transfervector en dat wordt ingepakt in de lentivirale partikels. Bovendien wordt tijdens het proces van reverse transcriptie en integratie van het provirus de 3' SIN LTR gekopieerd naar de 5' LTR, waardoor de integrerende vector aan beide kanten geflankeerd wordt door een kopie van de 3' SIN LTR.



Mocht er een klein gedeelte van de CMV promoter aanwezig zijn aan het 5' uiteinde van het lentivirale vectorgenoom in de viruspartikels, dan zal dit niet integreren in de T-cellen na transductie\*

16. Het anti-BCMA-CAR transgen is opgebouwd uiteen signaalpeptide van humaan CD8 $\alpha$ , het receptor-bindende domein van humaan anti-humaan BCMA, een CD28 linker en een transmembraan domein (beide van humane herkomst) verbonden met de intracellulaire domeinen van humaan CD28 en humaan CD3 $\zeta$ . Deze anti-BCMA-CAR target het BCMA antigen (A2.11)
17. De vector bevat ook een marker, c-frag. De c-frag sequentie is een unieke markersequentie die niet van nature in de mens voorkomt en niet codeert voor een genproduct. Deze wordt gebruikt om getransduceerde cellen te detecteren (A2.8, A2.11, aanvullende informatie 28 augustus 2018)
18. WPRE vergroot expressie van de transgene cassette (A2.8, A2.11, aanvullende informatie 28-08-2018)
19. De pCMV-gag/pol vector brengt de HIV-1 genen *gag* en *pol* tot expressie middels een humane CMV promoter. Het Gag poly-eiwit bevat de structurele matrix, capside en nucleocapside eiwitten. Het Pol poly-eiwit bevat de protease, reverse transcriptase en integrase enzymen (A2.8, aanvullende informatie 28 augustus 2018)
20. De pCMV-VSVg vector brengt het *Vesicular Stomatitis Virus* glycoproteïne (VSV-G) eiwit tot expressie middels een humane CMV promoter. Dit envelopeiwit zorgt voor de binnenkomst van de lentivirale partikels in de gastheercel (A2.8, aanvullende informatie 28-08-2018)
21. De pCMV-Rev vector brengt het HIV-1 gen *rev* tot expressie middels een humane CMV promoter. Het Rev eiwit is betrokken bij RNA export naar het cytoplasma (A2.8, aanvullende informatie 28-08-2018)
22. Er is een deel van de HIV-gag sequentie aanwezig op de transfervector wat onderdeel uitmaakt van het packaging signaal. Deze gedeeltelijke gag sequentie bevat een GC insertie die zorgt voor een frameshift en een stopcodon, zodat eiwitexpressie van deze sequentie geminimaliseerd wordt (A2.8, aanvullende informatie 2 oktober 2018)\*
23. Het complete provirus is geanalyseerd middels sequencing en de provirale sequentie is 100% identiek aan de referentiestandaard. De referentiestandaard is gebaseerd op de KITE-585 transferplasmide (pLV-K585) sequentie. Ook de identiteit van de helper plasmiden (pCMV-gag/pol, pCMV-VSVg, pCMV-Rev) is geverifieerd middels sequencing (A2.12, aanvullende informatie 28 augustus 2018)
24. De transfervector pLV-K585 wordt transiënt getransfecteerd in 293FT cellen (humane embryonale niercellijn) samen met de packaging vectoren coderend voor gag/pol, VSV-G en rev. De 293FT cellen zijn vrij van onder andere HTLV-1, HTLV-2, HIV-1 en HIV-2, waardoor recombinatie met en complementatie van de virale vector niet mogelijk is (A2.10, A2.13)
25. In de HEK293FT cellijn is SV40 largeT aanwezig, afkomstig van het plasmide pCMVSPORT6Tag.neo. Er kan echter geen full-length SV40 gevormd worden, aangezien niet de volledige SV40 sequentie aanwezig is in het productiesysteem (A2.13, aanvullende informatie 28 augustus 2018)





Tabel 1. vaststelling van de bij de genetische modificatie ingebrachte of verwijderde sequenties

<b>Relevante sequenties gebruikt voor genetische modificatie</b>	<b>Herkomst</b>	<b>Plaats in de vector</b>	<b>Aanwezigheid en effect in patiënt</b>
CMVp-5' LTR hybride promoter	<i>Cytomegalovirus/HIV-1</i>	Voor Packaging signaal	Regulatie van virale integratie en transcriptie
Packaging signaal	HIV-1	Tussen CMVp-5' LTR hybride promoter en splice donor site	Nodig voor inpakken virale genoom in virusdeeltjes
gedeelte van de gag sequentie	HIV-1	Tussen splice donor site en RRE	Nodig voor inpakken virale genoom in virusdeeltjes
RRE	HIV-1	Tussen gedeelte van de gag sequentie en cPPT	RNA export naar het cytoplasma
cPPT	HIV-1	Tussen RRE en cPPT site	DNA import naar de kern
MSCV promoter	<i>Murine stem cell virus</i>	Tussen cPPT site en CAR	Zorgt voor expressie van anti-BCMA CAR
anti-BCMA CAR (CD8 signaal peptide, anti-BCMA herkenningsdomein, CD28 linker, transmembraan en intracellair signaleringsdomein, CD3 $\zeta$ activatiedomein)	humaan	Tussen MSCV promoter en WPRE	Target het BCMA antigen
WPRE	<i>Woodchuck hepatitis virus</i>	Tussen CAR en c-frag	Verhoogt expressie van transgen
c-frag	synthetisch	Tussen WPRE en SV40 pA	Maakt identificatie van getransduceerde cellen mogelijk
SV40 polyadenylatiesignaal (pA)	<i>Simian Virus 40</i>	Tussen c-frag en gedeelte van HIV-nef	Terminatie van transcriptie en stabilisatie van het transcript
Gedeelte van nef sequentie	HIV-1	Tussen SV40 pA en SIN 3' LTR	Niet functioneel onderdeel dat doorloop in SIN 3' LTR
SIN 3' LTR	HIV-1	Na gedeeltelijke nef sequentie	Regulatie van virale integratie en transcriptie

### C. Het GGO



26. Het ggo, KITE-585, bestaat uit *ex vivo* lentiviraal getransduceerde, autologe T-cellen welke een transmembrane, chimere anti-BCMA receptor (anti-BCMA CAR) tot expressie brengen (A1.3, A2.11)
27. BCMA is een celoppervlakte eiwit dat betrokken bij regulatie van B-cel ontwikkeling en overleving. BCMA komt tot expressie op B-cellen gedurende de differentiatie in plasmacellen, bepaalde B-cel subsets en plasmacytoïde dendritische cellen (pDCs). Expressie van BCMA is ook aangetoond in multiple myelomacellen en andere B-cel maligniteiten. De beperkte expressie van BCMA op plasmacellen, bepaalde B-cel subsets en pDCs maakt BCMA tot een relatief veilige target voor therapeutische interventie van B-cel tumoren (A1.3)\*
28. De replicatiedeficiënte lentivirale vector kan slechts éénmalig een cel infecteren. Na infectie integreert de virale vector als provirus in het genoom van de gastheercel. De gag/pol, envelop en rev sequenties zijn afwezig in deze gastheercellen waardoor er geen nieuwe virale partikels gevormd kunnen worden en er dus geen verdere spreiding naar andere gastheercellen kan plaatsvinden (A2.17)
29. Lentivirale vectoren kunnen behalve delende cellen ook niet delende cellen, waaronder T-cellen, infecteren (A2.15)
30. Door het gebruik van het 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 (A2.15)\*
31. Tijdens de productie van de virale vector is er een theoretische kans aanwezig op het ontstaan van RCL. Voor de generatie van RCL zijn minimaal 3 aparte recombinatie gebeurtenissen nodig. Na eventuele recombinatie zijn de ORFs coderend voor de genen *tat*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *env* en *nef* nog steeds afwezig, omdat deze niet aanwezig zijn in de transfervector en de packaging vectoren. Zodoende zal er, zelfs na eventuele recombinatie, geen volvirulent HIV-1 gevormd kunnen worden (A2.9, A2.13 A5.3)\*
32. Er zijn geen aanwijzingen in de literatuur voor het ontstaan van RCL met derde generatie SIN lentivirale vectorsystemen (A2.9, A5.1 CGM/090331-03)
33. In theorie is er ook een mogelijkheid tot het ontstaan van RCL door recombinatie van de virale vector met humane endogene retrovirale sequenties (HERVs). 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, waardoor recombinatie onwaarschijnlijk is. Bovendien is de sequentiehomologie tussen de vector en HERVs beperkt (A2.13)
34. Theoretisch is het mogelijk dat door recombinatie van de MSCV of SV40 sequentie met respectievelijk wildtype MSCV of wildtype SV40 een recombinant virus ontstaat. Homologe recombinatie tussen het ggo en wildtype MSCV of wildtype SV40 zal alleen resulteren in reciproke uitwisseling. Aan een dergelijke recombinatie zijn geen gevolgen verbonden omdat de eigenschappen van MSCV of SV40 niet zullen veranderen door recombinatie met de MSCV of SV40 sequentie uit het ggo. Daarnaast is er beperkte homologie tussen muizen en humane retrovirussen, wat de kans op recombinatie met MSCV verkleint (aanvullende informatie 2 oktober 2018)\*
35. Theoretisch is het mogelijk dat door recombinatie van de WPRE sequentie met het wildtype Woodchuck hepatitis virus er een recombinant virus ontstaat. De WPRE sequentie is afkomstig van het dierpathogene *Woodchuck hepatitis virus*, welke behoort tot de familie *Hepadnaviridae* en het genus *Orthohepadnavirus*. Hiertoe behoort ook het verwante, humane *Hepatitis B virus*. De sequentiehomologie tussen de post-transcriptionele sequenties van WHV en HBV zijn beperkt. Daarnaast wordt als exclusie criterium gehanteerd dat de patiënten vrij zijn van onder andere Hepatitis B virus infecties. Het risico van recombinatie van de WPRE sequentie met verwante virussen is daarom verwaarloosbaar klein (A2.13, A5.6, aanvullende informatie 28 augustus 2018)\*



36. Voorafgaand aan vrijgifte van de getransduceerde T-cellen worden ze getest op de aanwezigheid van RCL via een qPCR test. Deze RCL test is gebaseerd op een VSV-G-specifieke en *gag-pol*-specifieke PCR. De detectielimiet/kwantificeringslimiet is 10 kopieën / 200 ng genomisch DNA. De maximale hoeveelheid getransduceerde cellen die per infusie zal worden toegediend aan een patiënt is  $2 \times 10^9$ , wat correspondeert met maximaal  $\sim 0,7 \times 10^6$  kopieën VSV-G of *gag-pol* per toegediende batch KITE-585, uitgaande van 7 picogram DNA per humane cel (A3.2, A3.3, A4.4)\*
37. Het is onwaarschijnlijk dat in de getransduceerde T-cellen recombinitie 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\*
38. De CMV promoter is geen onderdeel van het lentivirale genoom dat wordt getranscribeerd van de transfervector en dat wordt ingepakt in de lentivirale partikels. Bovendien wordt tijdens het proces van reverse transcriptie en integratie van het provirus de 3' SIN LTR gekopieerd naar de 5' LTR, waardoor de integrerende vector aan beide kanten geflankeerd wordt door een kopie van de 3' SIN LTR. Mocht er een klein gedeelte van de CMV promoter aanwezig zijn aan het 5' uiteinde van het lentivirale vectorgenoom in de virus partikels, dan zal dit niet integreren in de T-cellen na transductie. Het risico van recombinitie van de CMV promoter met cytomegalovirussen in de patiënt is daarom verwaarloosbaar klein\*
39. 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 kans dat insertionele mutagenese van de lentivirale vector direct carcinogeen is, is beperkt doordat insertie van retrovirale vectoren bijna altijd mono-allelisch is, geninserties de overlevingskans van de cel beïnvloeden en, voor zover bekend, een enkele insertionele mutatie niet voldoende is voor het ontwikkelen van een kwaadaardig fenotype. Bovendien is het U3 domein uit de 3' LTR verwijderd, waardoor de mogelijke activering van naburige proto-oncogenen door het U3 domein teniet gedaan wordt. Er zijn geen aanwijzingen in de literatuur voor kwaadaardige transformatie van volwassen T-cellen welke CARs tot expressie brengen (A2.16, CGM/090331-03)\*
40. De T-cellen van de patiënt worden getransduceerd met maximaal  $2,5 \times 10^9$  lentivirale partikels (A2.10)
41. De *ex vivo* getransduceerde T-cellen worden pas na een kweekperiode van minimaal 7 dagen na de retrovirale transductie bij 37°C en 5 wasstappen aan de patiënt toegediend (A2.10, aanvullende informatie 28 augustus 2018)
42. De halfwaardetijd voor VSV-G gepseudotyperde lentivirale partikels wordt op basis van literatuurgegevens gesteld op 10 uur (A2.10)
43. Het COGEM advies CGM/090331-03 bevat een formule om de reductieratio te bepalen voor lentivirale vectoren. Aangenomen dat de halfwaardetijd van het virus 10 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  $3,7 \times 10^{11}$  ten opzichte van het oorspronkelijke virale inoculum bij een kweektijd van 7 dagen en 5 wasstappen (reductiefactor =  $20^5 \times 2^{2,4 \times 7}$ ). De reductieratio bedraagt in dit geval  $146 (20^5 \times 2^{2,4 \times 7}) / (2,5 \times 10^9)$ . Dit betekent dat op het moment van infusie van de getransduceerde T-cellen de kans verwaarloosbaar klein is dat er nog een vrij infectieus virusdeeltje aanwezig is van de oorspronkelijke hoeveelheid van  $2,5 \times 10^9$  toegepaste infectieuze virusdeeltjes (A2.16, aanvullende informatie 28 augustus 2018)
44. In de patiënt zal vervolgens het aantal vrije replicatiedeficiënte virusdeeltjes iedere dag met een factor  $2^{2,4}$  (reductiefactor =  $2^{2,4}$ ) afnemen, uitgaande van een halfwaardetijd van 10 uur. 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\*



45. Indien er infectieuze lentivirale partikels in het KITE-585 cel product 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 (A2.17, A5.2)
46. De kans op kiembaantransmissie is verwaarloosbaar klein aangezien volwassen T-cellen zullen worden getransduceerd met de lentivirale vector (A5.6)\*
47. Er zijn geen HTLV sequenties aanwezig in de lentivirale vector. Er is zeer beperkte homologie tussen de gebruikte lentivirale vector en HTLV, wat de kans op recombinatie minimaliseert. De prevalentie van HTLV in Europa (met uitzondering van Roemenië) is laag (< 0,4 per 10.000), derhalve is de kans klein dat een patiënt met HTLV-besmet is (A2.13, aanvullende informatie 2 oktober 2018)

#### **D. Milieugerelateerde gegevens afkomstig uit eerdere experimenten**

48. Getransduceerde T-cellen kunnen gedurende lange tijd in patiënten aanwezig blijven als memory T-cellen. Minstens 6 maanden na infusie van getransduceerde T-cellen kunnen lage niveaus van deze cellen aangetoond worden in op de behandeling reagerende patiënten en deze T-cellen blijven detecteerbaar in patiënten met een aanhoudende remissie\*
49. In andere klinische en niet-klinische studies waarin anti-BCMA CAR T-cellen zijn toegepast zijn geen aanwijzingen gevonden voor shedding, recombinatie of mens-op-mens transmissie (A5.1)
50. Uit een recente review waarin 26 klinische studies zijn beschreven met meer dan 460 lentiviraal getransduceerde cel-producten die aan meer dan 375 proefpersonen zijn toegediend, blijkt dat in géén van de cel producten RCL is aangetoond (A5.1)
51. Uit de literatuur blijkt dat shedding van lentivirale vectoren, wanneer *ex vivo* getransduceerde cellen die geproduceerd zijn met 'clinical grade' lentivirale vectoren, niet optreedt (A5.1)

#### **E. Patiëntgebonden aspecten**

52. Het doel van de klinische studies is om de veiligheid en werkzaamheid van KITE-585 te beoordelen om zodoende een therapie tegen maligniteiten die BCMA tot expressie brengen te ontwikkelen (A1.2)
53. BCMA komt tot expressie op diverse maligniteiten, waaronder multiple myelomen (MM). BCMA expressie is ook geïmpliceerd voor diffuus grootcellige B-cel lymfomen (DLBCL), Hodgkin-lymfomen (HL), plasmablastische lymfomen, Burkitt's lymfomen (A1.3)
54. De patiënten krijgen een enkele infusie met het ggo welke maximaal  $1,0 \times 10^9$  getransduceerde cellen bevat. De dosis kan verhoogd worden, of patiënten kunnen mogelijk een tweede infusie krijgen, maar de cumulatieve dosis KITE-585 per patiënt zal maximaal  $2,0 \times 10^9$  anti-BCMA CAR T-cellen bedragen (A4.4)
55. De T-cellen van de patiënt worden getransduceerd met maximaal  $2,5 \times 10^9$  virale partikels (A2.10)
56. De getransduceerde T-cellen welke anti-BCMA CAR tot expressie brengen binden het BCMA antigeen dat aanwezig is op onder andere plasmacellen. De variabele regio's van een BCMA specifiek antilichaam zijn gekoppeld aan de intracellulaire zeta-chain van een CD3 molecuul en een co-stimulerend molecuul, waardoor het afweersysteem specifiek BCMA-expresserende cellen herkent en vernietigt op een MHC/HLA onafhankelijke manier (A1.3, A2.11)\*
57. De getransduceerde T-cellen welke anti-BCMA CAR tot expressie brengen kunnen in de patiënt een afweerreactie opwekken tegen BCMA-expresserende maligniteiten (A1.3)



58. 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 (A2.17)
59. Het KITE-585 cel product kan verspreid worden naar derden via accidentele injectie of contact met een open wond of het slijmvlies van de ogen, neus en mond. Het KITE-585 cel product kan niet aerogeen verspreid worden (A2.17)\*
60. De kans op nadelige effecten van getransduceerde T-cellen in het milieu is zeer klein omdat T-cellen buiten het lichaam niet kunnen overleven en snel geïnactiveerd worden door desinfectie (A2.17, A5.2, A5.3)
61. 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 (A2.17, A5.2)
62. Indien de getransduceerde T-cellen in een immuungecompromitteerd persoon terechtkomen dan bestaat er een theoretische kans dat de KITE-585 cellen in deze persoon kunnen persisteren. In dit geval kunnen dezelfde effecten optreden als in de patiënt, of kan een graft-versus-host respons optreden. Doordat de hoeveelheid getransduceerde T-cellen in derden vele malen kleiner zal zijn dan in patiënten, is het risico op negatieve effecten verkleind ten opzichte van de situatie in patiënten (A5.2, A5.3, A5.4)\*

#### **F. Informatie over plannen voor beheersing, controle, follow-up en afvalbehandeling**

63. Het aantal te behandelen patiënten is maximaal 400 (A4.1)
64. De einddatum voor de klinische studies is 1 januari 2049 (A1.5)
65. Als exclusie criterium wordt gehanteerd dat de patiënten vrij zijn van HIV, Hepatitis B en Hepatitis C virus infecties. Ook patiënten waarvan bekend is dat ze HTLV-positief zijn worden uitgesloten. Er wordt echter niet actief gescreend op aanwezigheid van HTLV. Patiënten die een actieve (virale) infectie doormaken worden pas geïncludeerd wanneer deze infectie is geklaard. Daarnaast worden patiënten die behandeld zijn geïnstrueerd om af te zien van het doneren van bloed, organen, cellen en weefsels voor transplantatie (A5.1, A5.5, A5.6, aanvullende informatie 28 augustus 2018, aanvullende informatie 2 oktober 2018)
66. In borstvoeding kunnen mogelijk (getransduceerde) T-cellen aanwezig zijn. Zwangere vrouwen en vrouwen die borstvoeding geven worden uitgesloten van deelname aan de klinische studie (A5.6, aanvullende informatie 28 augustus 2018)
67. Er is sprake van hospitalisatie van de patiënten vanwege medische redenen, niet uit oogpunt ter voorkoming van verspreiding van het ggo naar het milieu (A5.7, A5.8)
68. Het ggo wordt ingevroren opgeslagen in een ruimte met beperkte toegang (Cel Therapie Faciliteit), en wordt binnen het ziekenhuis vervoerd in een dubbele verpakking (A1.4, A4.2, aanvullende informatie 2 oktober 2018)
69. Het ggo wordt op de patiëntenkamer ontdooid en direct aan de patiënt toegediend via intraveneuze infusie (A1.4, A4.2)
70. De infusiezak wordt voor het ontdooiden uit de vervoercontainer gehaald en in een tweede verpakking geplaatst, zodat het CAR T-cel product nog steeds ingeperkt is indien lekkage van de infusiezak optreedt (A4.2, aanvullende informatie 28 augustus 2018)
71. Medisch personeel zal het ggo intraveneus toedienen waarbij universele voorzorgsmaatregelen voor werkzaamheden met lichaamsvloeistoffen en de standaard procedures voor cel therapie worden gehanteerd. Het personeel zal een beschermende jas en handschoenen dragen. Intraveneuze toediening kan al dan niet worden uitgevoerd met behulp van een intraveneuze pomp met een flow-regulator. De infusiezak wordt middels een gesloten systeem gekoppeld aan de infuuslang (A4.2, A4.3, aanvullende informatie 28 augustus 2018)



72. Monsternamen van bloed, beenmerg, urine, cerebrospinale vloeistof en tumorweefsel zal plaatsvinden voor studie doeleinden. In deze monsters kunnen getransduceerde T-cellen aanwezig zijn. Afnames van monsters wordt uitgevoerd door ervaren laboratoriumpersoneel en verplegend personeel. Monsterafname vindt plaats middels een gesloten systeem, of onder aseptische omstandigheden en gebruikte materialen worden afgevoerd als specifiek ziekenhuisafval. Analyse, verwerking en opslag van de monsters in het ziekenhuis zullen plaatsvinden in een standaard diagnostiek laboratorium, aangezien de monsters geen vrije lentivirale partikels bevatten en de getransduceerde T-cellen geen specifiek veiligheidsrisico vormen. De monsters worden gehanteerd zoals reguliere ziekenhuismonsters. Personeel betrokken bij monsterafname en verwerking van de monsters zal handschoenen en een beschermende jas dragen (A4.6, A4.7, aanvullende informatie 28 augustus 2018)
73. Afgenomen monsters worden direct geanalyseerd, opgeslagen voor toekomstig gebruik of vervoerd naar externe laboratoria (A4.7)
74. Op meerdere momenten na toediening zullen monsters worden afgenomen bij de patiënt, en het aantal getransduceerde CAR T-cellen wordt via een “droplet-PCR test” gekwantificeerd. Gedurende 15 jaar na toediening van KITE-585 zal onder andere worden getest op de aanwezigheid van RCL (A4.8, A5.5)
75. Lokale analyse, bewerking en opslag zal plaatsvinden in een standaard diagnostisch laboratorium (A4.7)
76. Gebruikte oppervlakken zullen regelmatig worden gedesinfecteerd met 70% ethanol. In geval van morsen wordt een in 70% ethanol gedrenkte tissues gebruikt voor opruimen en zal het oppervlak worden nabehandeld met 70% ethanol. Alle gebruikte materialen worden afgevoerd als specifiek ziekenhuisafval (A4.7, A5.9, aanvullende informatie 28 augustus 2018)
77. Na verwerking en toediening van het ggo aan de patiënt zal het ggo, de ampullen en alle materialen die in aanraking zijn geweest met het ggo worden afgevoerd als specifiek ziekenhuisafval (A1.4, A4.9, A5.9, aanvullende informatie 28 augustus 2018, aanvullende informatie 2 oktober 2018)
78. Afval van monsternamen zal afgevoerd worden als specifiek ziekenhuisafval (A4.9, aanvullende informatie 28 augustus 2018)
79. Betreffende schoonmaak en desinfectie van de patiëntenkamer zullen geen additionele maatregelen worden getroffen, deze worden schoongemaakt met bijvoorbeeld 70% ethanol (A4.9)

### **G. Productie en Batch**

80. De productie van de lentivirale vector en de lentivirale transductie van de autologe T-cellen vindt buiten Nederland plaats, en maakt geen onderdeel uit van deze vergunningaanvraag (A1.4, A3.1)
81. Transductie van de T-cellen vindt plaats onder *Good Manufacturing Practices* (GMP) condities (A1.4)
82. De virusbatch wordt gecontroleerd op identiteit, steriliteit, virale verontreinigingen en endotoxines en moet vrij zijn van mycoplasma en RCL (A3.2)
83. De getransduceerde T-cellen worden voorafgaand aan vrijgifte getest op de aanwezigheid van RCL middels een qPCR specifiek voor VSV-G of *gag-pol*. De *ex vivo* getransduceerde T-cellen worden pas vrijgegeven voor infusie in de patiënt indien er geen RCL gedetecteerd is (A3.2, A3.3)
84. De identiteit van de getransduceerde T-cellen wordt gecontroleerd middels een qPCR assay, waarbij het transgen wordt geamplificeerd. Een 100% sequentie-identiteit is hierbij niet noodzakelijk (A3.2, aanvullende informatie 28 augustus 2018)
85. De getransduceerde T-cellen worden onder andere ook getest op steriliteit en afwezigheid van mycoplasma en endotoxines (A3.2, A3.3)



86. De aanwezigheid van macrofagen en dendritische cellen wordt gedurende het productieproces van de getransduceerde T-cellen sterk gereduceerd, aangezien de kweekcondities niet optimaal zijn voor die cellen. Het CAR T-cel product bestaat veelal uit meer dan 99% T-cellen, maar er kan ook een klein percentage autologe natural killer cellen aanwezig zijn. Uit flowcytometrie analyse blijkt dat cellen die qua grootte en dichtheid gelijkenis vertonen met macrofagen en dendritische cellen niet gedetecteerd zijn in KITE-585 CAR T-cellen. Er wordt echter niet gemonitord op aanwezigheid van macrofagen en dendritische cellen (A5.3)



## DEEL 2. MILIEURISICOANALYSE VAN DE AANGEVRAAGDE WERKZAAMHEDEN

Per sequentie wordt geïnventariseerd welke nieuwe eigenschappen en effecten mogelijk het gevolg zijn van de nieuw ingebrachte sequenties. De “oorzaak-gevolg” relaties tussen de genetische modificatie en het eventuele schadelijke effect worden verduidelijkt. Daarna volgt de evaluatie van de eventuele gevolgen en de waarschijnlijkheid. De milieurisicobeoordeling van de aangevraagde werkzaamheden wordt afgesloten met een deelrisicoschatting per eigenschap en sequentie.

### Tabel 2.1 milieurisicobeoordeling van de regulerende sequenties (CMVp-5' LTR, packaging signaal, gedeelte van de gag sequentie, RRE, cPPT, MSCV promoter, WPRE, c-frag, gedeelte van de nef sequentie en SIN 3' LTR):

Zoals uit de tabel blijkt gaat het hier om indirecte effecten. Daarom wordt voor deze tabel niet de gebruikelijke indeling gevolgd in de beoordelingsaspecten A – H, die wel relevant is in Tabel 2.2, Tabel 2.3 en Tabel 2.4.

<b>Bepaling van eigenschappen die schadelijke effecten kunnen hebben</b> <i>(Identificatie en toelichting “oorzaak-gevolg” relaties)</i>	<b>Evaluatie van de mogelijke gevolgen van elk schadelijk effect, indien dit optreedt, en evaluatie van de waarschijnlijkheid van het optreden</b> <i>(rekening houdend met de wijze van introductie en het introductie milieu)</i>	<b>Schatting van het risico dat aan de betreffende eigenschap van het GGO verbonden is</b>
<p>De promoter heeft een functie bij de regulatie van de genexpressie. Een promoter is een specifieke DNA sequentie waaraan RNA polymerase kan binden om vervolgens stroomafwaarts gelegen coderende sequenties af te lezen. Een promoter op zichzelf kan geen schadelijk effect veroorzaken. Echter, de mate waarin een promoter actief is, is van invloed op de mate van expressie van genen die door de promoter worden gereguleerd. De mate van activiteit van een promoter kan afhankelijk zijn van de omstandigheden. Een constitutieve promoter heeft een vaste mate van activiteit, die niet of nauwelijks wordt veranderd door de omstandigheden. Bij een induceerbare promoter wordt de activiteit bepaald door de aan- of afwezigheid van signaalstoffen in de cel. De activiteit van een promoter kan ook afhankelijk zijn van het cel- of weefseltype waarin de promoter zich bevindt.</p> <p>De expressie van de chimere antigen receptor (anti-BCMA CAR) en wordt gereguleerd door de MSCV promoter. Of de mate van expressie en het expressiepatroon van een promoter een schadelijk effect heeft wordt niet direct door een promoter</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijk gevolgen, indien ze optreden</b>  De schadelijke effecten die op kunnen treden als gevolg van de aanwezigheid van de regulerende sequenties kunnen alleen worden geëvalueerd in relatie tot de schadelijke effecten van het genproduct (anti-BCMA CAR). De mate van expressie en het expressiepatroon van anti-BCMA CAR wordt gereguleerd door deze regulerende sequenties.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b>  Eventuele geïdentificeerde schadelijke effecten zullen constitutief op kunnen treden in de getransduceerde T-cellen en in de target cellen van deze T-cellen.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b>  De mogelijke gevolgen zijn afhankelijk van de uitkomst van de risicoanalyse van anti-BCMA CAR, rekening houdende met het verwachte expressiepatroon.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b>  Eventuele geïdentificeerde schadelijke effecten zullen constitutief op kunnen treden in de getransduceerde T-cellen en in de target cellen van deze T-cellen.</p> <p><b>III. Het risico:</b>  Het risico wordt bepaald door de uitkomst van de risicoanalyse van anti-BCMA CAR (tabel 2.3).</p>





<p>veroorzaakt, maar alleen door het genproduct dat door de promoter tot expressie komt.</p> <p>Naast de promoter bevat de vector de volgende regulerende sequenties: CMVp-5' LTR, packaging signaal (<math>\psi</math>), gedeelte van de gag sequentie, RRE, cPPT, WPRE, c-frag, SV40 pA, gedeelte van de nef sequentie en SIN 3' LTR.</p> <p>De LTRs spelen een rol bij reverse transcriptie, integratie van het provirus in het genoom van de gastheer en regulatie van de synthese van het lentivirale RNA. In SIN vectoren is het U3 domein uit de 3' LTR verwijderd. Tijdens reverse transcriptie naar het provirale genoom wordt deze deletie overgenomen in de 5' LTR waardoor deze vector geen functionele LTR's meer bezit. Naast de reductie op mobilisatie van de vector is hierdoor tevens de mogelijke activering van naburige proto-oncogenen door het U3 domein teniet gedaan.</p> <p>De cis-acterende HIV-1 sequenties <math>\psi</math>, gedeelte van de gag sequentie, RRE, cPPT, zijn nodig voor het inpakken van het virale vectorgenoom, reverse transcriptie en integratie van het vectorgenoom in het genoom van de gastheercel en betrokken bij splitsing van vector RNA. De gedeeltelijke nef sequentie loopt door in de SIN 3'LTR. Deze bevat geen startcodon en er wordt dus geen nef eiwit geproduceerd.</p> <p>De WPRE sequentie is afkomstig van <i>Woodchuck hepatitis virus</i> en vergroot expressie van de transgene cassette. De SV40 polyadenylatiesequentie zorgt voor terminatie van transcriptie en stabilisatie van het transcript.</p> <p>De c-frag markersequentie is een niet-coderend element dat geïncubeerd is om identificatie van getransduceerde cellen mogelijk te maken.</p>		
--	--	--



**Tabel 2.2 milieurisicobeoordeling van het genetisch gemodificeerde Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1):**

<b>Bepaling van eigenschappen die schadelijke effecten kunnen hebben</b> <i>(Identificatie en toelichting "oorzaak-gevolg" relaties)</i>	<b>Evaluatie van de mogelijke gevolgen van elk schadelijk effect, indien dit optreedt, en evaluatie van de waarschijnlijkheid van het optreden</b> <i>(rekening houdend met de wijze van introductie en het introductie milieu)</i>	<b>Schatting van het risico dat aan de betreffende eigenschap van het GGO verbonden is</b>
<b>A. Persistentie en invasiviteit</b>		
<p>Bij de bepaling van het milieurisico van veranderde persistentie en invasiviteit van een ggo toegepast in medisch en veterinair onderzoek gaat het om de bepaling van mogelijke effecten van de genetische modificatie op het gastheerbereik, de infectiviteit en de pathogeniteit en virulentie voor potentiële gastheren (mensen en dieren) in het milieu.</p> <p>Van een hogere persistentie en invasiviteit van een virale vector (i.e. het ggo) ten opzichte van het natuurlijk voorkomende wildtype virus waarvan het is afgeleid, kan sprake zijn indien het ggo na toediening aan een patiënt langer dan het wildtype virus in een actieve vorm aanwezig kan blijven en er vervolgens shedding kan plaatsvinden van infectieuze deeltjes. Deze shedding kan leiden tot infectie van andere organismen.</p> <p>Daarbij moet in beschouwing genomen worden dat het ggo door de genetische modificatie veranderd kan zijn in zijn weefsel-tropisme, gastheerbereik en in de mate van infectiviteit en virulentie. Hierbij spelen onder andere de mogelijkheden voor replicatie en transmissie een rol.</p> <p>Deze veranderingen kunnen leiden tot een gewijzigd ziektebeeld in gastheren die vatbaar zijn voor infectie door het wildtype virus of tot uitbreiding van de ziekte naar nieuwe gastheren.</p> <p>De virale vector welke gebruikt wordt voor transductie van de T-cellen is een niet-replicerende, recombinante lentivirale vector gebaseerd op HIV-1. Het betreft hier een zogeheten derde generatie 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</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b>  HIV-1 behoort tot de familie <i>Retroviridae</i> en het genus <i>Lentivirus</i>. 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. Infectie met HIV-1 kan resulteren in AIDS (<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>). Een HIV-1 infectie wordt doorgaans onder controle gehouden met behulp van antiretrovirale medicatie. Deze behandeling is in grote delen van de wereld zo succesvol dat een HIV-1 infectie een chronische ziekte is geworden waarbij progressie naar AIDS zeldzaam is. HIV-1 wordt verspreid via seksueel contact, bloedtransfusie, besmette injectiespuiten en van moeder naar kind gedurende de zwangerschap, bevalling en via borstvoeding.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b>  De pLV-K585 vector (transfervector) welke een chimere anti-BCMA receptor (anti-BCMA CAR) tot expressie brengt is gebaseerd op HIV-1. In de pLV-K585 vector is het merendeel van de HIV-1 sequenties verwijderd om een replicatiedeficiënte lentivirale vector te produceren. De benodigde structurele en functionele virale eiwitten benodigd voor het inpakken van het virale vectorgenoom, reverse transcriptie en integratie worden tot expressie gebracht vanaf drie aparte packaging vectoren; een vector brengt HIV-1 gag en pol tot expressie, een vector brengt een heteroloog viraal envelop eiwit tot expressie en een vector brengt HIV-1 rev tot expressie.</p> <p>HIV-1 wordt verspreid via seksueel contact, bloedtransfusie, besmette injectiespuiten en van moeder naar kind gedurende</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b>  De gevolgen van een eventueel verhoogde persistentie of invasiviteit van het ggo kunnen groot zijn, zoals het ontstaan van AIDS, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheerbereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b>  De lentivirale vector heeft een VSV-G envelop waardoor het tropisme is uitgebreid. De virale vector is vanwege de genetische modificaties echter niet in staat om te repliceren. Het virusdeeltje kan slechts éénmaal een cel infecteren. De waarschijnlijkheid dat het leidt tot verhoogde persistentie of invasiviteit is te verwaarlozen.</p> <p><b>III. Het risico:</b>  Het risico van verhoging van de persistentie of de invasiviteit bij toepassing van de uitgangsvector is verwaarloosbaar klein.</p>



<p>plasmiden. De ORFs coderend voor de genen <i>tat</i>, <i>vif</i>, <i>vpr</i>, <i>vpu</i>, <i>env</i> en <i>nef</i> zijn verwijderd. Verder is er gebruik gemaakt van een heteroloog envelop eiwit. Bovendien is de virale vector zelf-inactiverend (SIN).</p> <p>Hierbij is het de vraag of de genetische modificaties in het genoom leiden tot een verandering in persistentie en/of invasiviteit in vergelijking tot het wildtype HIV-1.</p>	<p>de zwangerschap, bevalling en via borstvoeding. De replicatiedeficiënte lentivirale vector kan slechts éénmalig een cel infecteren. Na infectie integreert de virale vector als provirus in het genoom van de gastheercel. De gag/pol, envelop en rev sequenties zijn afwezig in deze gastheercellen waardoor er geen nieuwe virale partikels gevormd kunnen worden en er dus geen verdere spreiding naar andere gastheercellen kan plaatsvinden. Hierdoor is de kans op verspreiding naar en infectie van derden gereduceerd.</p> <p>De stabiliteit van HIV-1 partikels is afhankelijk van de vloeistof waarin het zich bevindt, de concentratie, temperatuur, zuurgraad, zonlicht en luchtvochtigheid. In bloed kan HIV-1 tot 42 dagen infectieus blijven bij kamertemperatuur. Onder experimentele condities kan celvrij HIV-1, gedroogd op een dekglasje in 10% serum, voor meer dan 7 dagen infectieus blijven. In bloed en cerebrospinale vloeistof verkregen via autopsie 11 dagen na overlijden kunnen nog infectieuze HIV-1 partikels aanwezig zijn. Voor VSV-G gepseudotyperde lentivirale partikels wordt een halfwaardetijd van 10 uur aangehouden bij 37 graden Celsius.</p> <p>Door het gebruik van het 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.</p> <p><b>Productie virusbatch en ontstaan RCL</b> Tijdens de productie van de virale vector is er een theoretische kans aanwezig op het ontstaan van RCL. Voor de generatie van RCL zijn minimaal 3 aparte recombinatie gebeurtenissen nodig. Na eventuele recombinatie zijn de ORFs coderend voor de genen <i>tat</i>, <i>vif</i>, <i>vpr</i>, <i>vpu</i>, <i>env</i> en <i>nef</i> nog steeds afwezig, omdat deze niet aanwezig zijn in de transfervector en de packaging vectoren. Er zijn geen aanwijzingen in de literatuur voor het ontstaan van RCL met derde generatie SIN lentivirale vectorsystemen.</p> <p>De getransduceerde KITE-585 CAR T-cellen worden voorafgaand aan vrijgifte getest op de aanwezigheid van RCL.</p> <p>In theorie is er ook een mogelijkheid tot het ontstaan van RCL door recombinatie van de virale vector met humane endogene retrovirale sequenties (HERVs). 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</p>	
---	--	--



	<p>HERVs is de aanwezigheid van sequentie homologie noodzakelijk. De virale vector bevat slechts een gedeelte van het lentivirale genoom, en de homologie met HERVs is beperkt waardoor recombinatie onwaarschijnlijk is.</p> <p>De kans dat er daadwerkelijk een infectieus RCL aanwezig is in de virusbatch is op grond van de bovenstaande overwegingen verwaarloosbaar klein.</p> <p><b>Ontstaan RCL in getransduceerde T-cellen</b> Het is 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, Hepatitis B en Hepatitis C virus infecties. De vector bevat geen HTLV sequenties. Er is zeer beperkte homologie tussen de gebruikte lentivirale vector en HTLV, wat de kans op recombinatie minimaliseert. De prevalentie van HTLV in Europa (met uitzondering van Roemenië) is laag (&lt; 0,4 per 10.000), derhalve is de kans klein dat een patiënt met HTLV-besmet is.</p> <p>De verloren functies van de lentivirale vector kunnen in theorie gecompenseerd worden indien een retrovirus in dezelfde cel aanwezig is als de vector. De expressieproducten van het wildtype virus kunnen in dat geval gebruikt worden door de vector, wat de vector de mogelijkheid biedt te repliceren. Hierdoor is er een theoretische kans op verdere verspreiding. De waarschijnlijkheid dat een dergelijke gebeurtenis zich voordoet is echter verwaarloosbaar klein. Voorafgaand aan vrijgifte van de getransduceerde T-cellen worden ze getest op de aanwezigheid van RCL.</p> <p>Voorafgaand aan vrijgifte van de getransduceerde T-cellen worden ze getest op de aanwezigheid van RCL via een qPCR test voor gag-pol en VSV-G DNA. Deze RCL test is gebaseerd op een gag-pol-specifieke en VSV-G-specifieke PCR. De detectielimiet/kwantificeringslimiet is 10 kopieën / 200 ng genomisch DNA.</p> <p>De kans dat er daadwerkelijk een infectieus RCL aanwezig is in de getransduceerde T-cellen is op grond van de bovenstaande overwegingen verwaarloosbaar klein.</p> <p><b>Recombinatie in de patiënt</b> De patiënten zijn vrij van HIV, Hepatitis B en Hepatitis C virus infecties. Hierdoor is complementatie en/of recombinatie van</p>	
--	--	--



	<p>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. De vector bevat geen HTLV sequenties. Er is zeer beperkte homologie tussen de gebruikte lentivirale vector en HTLV, wat de kans op recombinatie minimaliseert. De prevalentie van HTLV in Europa (met uitzondering van Roemenië) is laag (&lt; 0,4 per 10.000), derhalve is de kans klein dat een patiënt met HTLV-besmet is</p> <p>De kans dat er daadwerkelijk een infectieus RCL ontstaat in de patiënt is op grond van de bovenstaande overwegingen verwaarloosbaar klein.</p> <p>De waarschijnlijkheid dat de genetische modificaties leiden tot verhoogde persistentie of invasiviteit van de lentivirale vector ten opzichte van het wildtype HIV-1 is verwaarloosbaar klein.</p>	
<p><b>B. Selectieve voordelen</b></p>		
<p>Voor de milieurisicobeoordeling van een ggo toegepast in medisch of veterinair onderzoek zijn die selectieve voordelen relevant die leiden tot verhoogde persistentie en invasiviteit. De oorzaak-gevolg relaties die hierbij een rol spelen zijn behandeld onder A.</p> <p>Hierbij is het de vraag of de genetische modificaties in het genoom leiden tot een selectief voordeel dat een verandering geeft in weefseltropisme, gastheerbereik en de mate van infectiviteit en virulentie van de vector in vergelijking tot het wildtype HIV-1.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b>  Evenals onder A van deze tabel geldt dat indien verhoogde persistentie of invasiviteit of een uitbreiding van het gastheerbereik van de vector aanleiding zou geven tot ziektebeelden dan zouden de gevolgen groot kunnen zijn, maar alleen indien het ziektebeeld gepaard gaat met significante hinder of klachten.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b>  De virale vector welke gebruikt wordt voor transductie van de T-cellen is een niet-replicerende, recombinante lentivirale vector gebaseerd op HIV-1. Het betreft hier een zogeheten derde generatie 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 genen <i>tat</i>, <i>vif</i>, <i>vpr</i>, <i>vpu</i>, <i>env</i> en <i>nef</i> zijn verwijderd. Hierdoor is de virale vector replicatiedeficiënt en kan het virusdeeltje slechts éénmaal een cel infecteren. De kans op het ontstaan van RCL of dat de verloren functies gecompenseerd worden is zoals besproken onder A van deze tabel verwaarloosbaar klein.</p> <p>Zoals reeds is aangegeven onder onderdeel A van deze tabel, is het gastheerbereik door het gebruik van de VSV-G envelop verbreed. VSV-G gepseudotypeerde lentivirale vectoren</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b>  De gevolgen van selectieve voordelen kunnen groot zijn, zoals het ontstaan van AIDS, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheerbereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b>  De lentivirale vector is gepseudotypeerd met een VSV-G envelop waardoor het tropisme is uitgebreid. De virale vector is vanwege de genetische modificaties echter niet in staat om te repliceren. Het virusdeeltje kan slechts éénmaal een cel infecteren. De waarschijnlijkheid dat de genetische modificaties leiden tot selectieve voordelen is te verwaarlozen.</p> <p><b>III. Het risico:</b>  Het risico van selectieve voordelen bij toepassing van de lentivirale vector is verwaarloosbaar klein.</p>



	hebben een breed gastheerbereik en kunnen de meeste zoogdiercellen, en ook niet-zoogdiercellen, infecteren. Het is echter onwaarschijnlijk dat de genetische modificaties in het genoom van de lentivirale vector een positief effect hebben op de virusbiologie van de vector. Een toegenomen virulentie en het optreden van een mogelijk schadelijk effect is dan ook zeer onwaarschijnlijk.	
<b>C. Kans op genoverdracht op andere soorten en de kans dat hierdoor selectieve voor- of nadelen op deze soorten worden overgedragen</b>		
<p>Van genoverdracht op andere soorten kan alleen sprake zijn indien (homologe) recombinatie heeft plaatsgevonden. Op de eerste plaats wordt in beschouwing genomen of er overdracht plaats kan vinden van het ggo naar andere virussen. Die kans is op de eerste plaats afhankelijk van de aanwezigheid van een verwant virus (dat homologieën vertoont met de vector) binnen hetzelfde celcompartiment waarin het ggo zich bevindt. Vervolgens zijn de kans op recombinatie en de eigenschappen van het gevormde product afhankelijk van de genetische opbouw van het ggo. Van een mogelijk gevormde recombinant moet vervolgens worden nagegaan in hoeverre hieruit selectieve voor- of nadelen voortvloeien.</p> <p>De vraag is of de genetische modificaties geheel of gedeeltelijk kunnen worden overgedragen naar nadere virussen en of dit vervolgens voor deze virussen kan leiden tot een selectief voor- of nadeel. Selectieve voor- of nadelen kunnen alleen optreden als de genetische modificaties op een of andere manier een interactie hebben met de virale levenscyclus.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b> Recombinatie tussen de lentivirale vector en wildtype lentivirussen kan resulteren in het ontstaan van RCLs. Evenals onder A geldt dat indien dergelijke RCLs aanleiding zouden geven tot ziektebeelden dan zouden de gevolgen groot kunnen zijn, maar alleen indien het ziektebeeld gepaard gaat met significante hinder of klachten.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> De virale vector is ontworpen om het ontstaan van 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 genen <i>tat</i>, <i>vif</i>, <i>vpr</i>, <i>vpu</i>, <i>env</i> en <i>nef</i> zijn verwijderd. Verder is er gebruik gemaakt van een heteroloog envelop eiwit. Bovendien is de virale vector zelf-inactiverend (SIN). Uit SIN vectoren is een deel van de 3' LTR, het zogenaamde U3 domein, verwijderd. Tijdens reverse transcriptie naar het provirale genoom wordt deze deletie overgenomen in de 5' LTR waardoor deze vector geen functionele LTR's meer bezit. Dit reduceert de kans op mobilisatie van de vector uit het genoom van de gastheer aanzienlijk. In het geval van een superinfectie van de getransduceerde cel met een wildtype lentivirus kan de transfervector in principe niet meer worden gemobiliseerd uit het genoom van de gastheercel.</p> <p>Zoals beschreven onder A van deze tabel is de kans dat er RCL ontstaat verwaarloosbaar klein.</p> <p>De CMV promoter is geen onderdeel van het lentivirale genoom dat wordt getranscribeerd van de transfervector en dat wordt ingepakt in de lentivirale partikels. Bovendien wordt tijdens het proces van reverse transcriptie en integratie van het provirus de 3' SIN LTR gekopieerd naar de 5' LTR, waardoor de integrerende vector aan beide kanten geflankeerd wordt door een kopie van de 3' SIN LTR. Mocht er een klein gedeelte</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> De gevolgen van genoverdracht kunnen groot zijn, zoals het ontstaan van AIDS, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheer bereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b> De waarschijnlijkheid dat de genetische modificaties kunnen worden overgedragen naar andere virussen en dat dit vervolgens voor deze virussen kan leiden tot een selectief voor- of nadeel is verwaarloosbaar klein.</p> <p><b>III. Het risico:</b> Het risico is verwaarloosbaar klein.</p>



	<p>van de CMV promoter aanwezig zijn aan het 5' uiteinde van het lentivirale vectorgenoom in de virus partikels, dan zal dit niet integreren in de T-cellen na transductie. Het risico van recombinitie van de CMV promoter met cytomegalovirussen in de patiënt is daarom verwaarloosbaar klein.</p> <p>Theoretisch is het mogelijk dat door recombinitie van de MSCV of SV40 sequentie met respectievelijk wildtype MSCV of wildtype SV40 een recombinant virus ontstaat. Homologe recombinitie tussen het ggo en wildtype MSCV of wildtype SV40 zal alleen resulteren in reciproke uitwisseling. Aan een dergelijke recombinitie zijn geen gevolgen verbonden omdat de eigenschappen van MSCV of SV40 niet zullen veranderen door recombinitie met de MSCV of SV40 sequentie uit het ggo. Daarnaast is er beperkte homologie tussen muizen en humane retrovirussen, wat de kans op recombinitie met MSCV verkleint. Het risico van recombinitie van de MSCV promoter of SV40 polyadenylatie sequentie met respectievelijk MSCV of SV40 in de patiënt is verwaarloosbaar klein.</p> <p>De WPRE sequentie is afkomstig van het dierpathogene <i>Woodchuck hepatitis virus</i>, welke behoort tot de familie <i>Hepadnaviridae</i> en het genus <i>Orthohepadnavirus</i>. Hiertoe behoort ook het verwante, humane <i>Hepatitis B virus</i>. Als exclusiecriteria wordt gehanteerd dat de patiënten vrij zijn van onder andere <i>Hepatitis B virus</i> infecties. Het risico van recombinitie van de WPRE sequentie met verwante virussen is daarom verwaarloosbaar klein.</p> <p>De waarschijnlijkheid dat de genetische modificaties kunnen worden overgedragen naar andere virussen en dat dit vervolgens voor deze virussen kan leiden tot een selectief voor- of nadeel is verwaarloosbaar klein.</p>	
--	---	--



<b>D. Effecten op doel en niet-doel populaties</b>		
<p>Effecten op de patiënten die aan de studie deelnemen (doelpopulatie) vallen niet onder het toetsingskader van de milieuregelgeving en worden om die reden hier niet direct in beschouwing genomen. De effecten op de patiënt vallen onder de medische verantwoordelijkheid van de behandelende arts. Effecten op niet-doelpopulaties zullen alleen op kunnen treden indien er sprake is van verspreiding van de vector in de omgeving van de patiënt. Een aantal aspecten betreffende pathogene effecten is al in beschouwing genomen onder A. In dit onderdeel worden de eventuele effecten van het ggo beoordeeld op mensen en dieren in de omgeving van de patiënt. Bij de beoordeling moet rekening worden gehouden met de te verwachten blootstellingsweg en mate van blootstelling.</p> <p>De vraag is welke effecten de genetische modificaties kunnen hebben op de niet-doelpopulatie. Met effecten worden schadelijke en niet-schadelijke effecten bedoeld, zoals eventuele toxische en allergene effecten.</p> <p>Specifieke gezondheidseffecten voor de mens worden onder onderdeel E besproken. Hiervoor moet worden nagegaan wat er bekend is over de effecten die de genetische modificaties kunnen hebben op de mens.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b> HIV-1 behoort tot de familie <i>Retroviridae</i> en het genus <i>Lentivirus</i>. 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. Infectie met HIV-1 kan resulteren in AIDS (<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>). Een HIV-1 infectie wordt doorgaans onder controle gehouden met behulp van antiretrovirale medicatie. Deze behandeling is in grote delen van de wereld zo succesvol dat een HIV-1 infectie een chronische ziekte is geworden waarbij progressie naar AIDS zeldzaam is. HIV-1 wordt verspreid via seksueel contact, bloedtransfusie, besmette injectiespuiten en van moeder naar kind gedurende de zwangerschap, bevalling en via borstvoeding.</p> <p>Indien de lentivirale partikels in derden terechtkomen dan zal na infectie van een cel de virale vector op een willekeurige plek in het gastheer genoom integreren. Hierdoor bestaat de kans op ontregeling van genen betrokken bij proliferatie waardoor tumoren kunnen ontstaan. 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 kwaadaardig fenotype.</p> <p>Bovendien is de virale vector zelf-inactiverend (SIN). Uit SIN vectoren is een deel van de 3' LTR, het zogenaamde U3 domein, verwijderd. Tijdens reverse transcriptie naar het provirale genoom wordt deze deletie overgenomen in de 5' LTR waardoor deze vector geen functionele LTR's meer bezit. In het U3 domein van de LTR bevinden zich zogenaamde promotor en enhancer sequenties. Indien een lentivirale vector in het genoom van de gastheer integreert in de buurt van een proto-oncogen kan dit 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. Naast de reductie op mobilisatie van de vector is hierdoor tevens de mogelijke activering van naburige proto-oncogenen door het U3 domein teniet gedaan.</p> <p>Er zijn geen aanwijzingen in de literatuur voor kwaadaardige transformatie van volwassen T-cellen welke CARs tot expressie brengen.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> De genetische modificaties in de lentivirale vector kunnen leiden tot het optreden van (schadelijke) effecten.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b> De waarschijnlijkheid dat de genetische modificaties in de lentivirale vector leiden tot het optreden van (schadelijke) effecten op doel en niet-doel populaties is verwaarloosbaar klein.</p> <p><b>III. Het risico:</b> De kans op het optreden van (schadelijke) effecten en de mogelijke gevolgen voor het milieu zijn verwaarloosbaar klein.</p>





	<p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b></p> <p>De virale vector is ontworpen om het ontstaan van 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 genen <i>tat</i>, <i>vif</i>, <i>vpr</i>, <i>vpu</i>, <i>env</i> en <i>nef</i> zijn verwijderd. Het gastheerbereik van de lentivirale vector is door het gebruik van de VSV-G envelop verbreed. VSV-G gepseudotyperde lentivirale vectoren hebben een breed gastheerbereik en kunnen de meeste zoogdiercellen, en ook niet-zoogdiercellen, infecteren.</p> <p>De lentivirale vector of gerelateerde RCLs kunnen vanuit de patiënt alleen via bloed-bloed contact worden overgedragen naar derden. Zoals beschreven onder A van deze tabel is de kans echter verwaarloosbaar klein dat RCLs in de virusbatch aanwezig zijn. Na infectie van de T-cellen zal de lentivirale vector stabiel in het genoom van de gastheercel opgenomen worden. Niet alle aanwezige virusdeeltjes zullen echter leiden tot infectie van de T-cellen. De <i>ex vivo</i> getransduceerde T-cellen worden echter pas na een kweekperiode van 7 dagen en 5 wasstappen aan de patiënt toegediend.</p> <p>Aangenomen dat de halfwaardetijd van het virus 10 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 <math>3,7 \times 10^{11}</math> ten opzichte van het oorspronkelijke virale inoculum (reductiefactor = <math>20^5 \times 2^{2,4 \times 7}</math>). De reductieratio bedraagt in dit geval <math>146 (20^5 \times 2^{2,4 \times 7}) / (2,5 \times 10^9)</math>. Dit betekent dat op het moment van infusie van de getransduceerde T-cellen de kans verwaarloosbaar klein is dat er nog een vrij infectieus virusdeeltje aanwezig is van de oorspronkelijke hoeveelheid van <math>2,5 \times 10^9</math> toegepaste infectieuze virusdeeltjes.</p> <p>In de patiënt zal vervolgens het aantal vrije replicatiedeficiënte virusdeeltjes iedere dag met een factor <math>2^{2,4}</math> (reductiefactor = <math>2^{2,4}</math>) afnemen, uitgaande van een halfwaardetijd van 10 uur. Vanuit de patiënt kunnen er dus geen vrije virusdeeltjes terecht komen in het milieu. Mocht dit toch gebeuren, dan kunnen de virusdeeltjes alleen overleven als ze via direct bloed-bloed contact worden overgedragen. Bovendien zullen, indien er infectieuze lentivirale partikels in het KITE-585 cel product aanwezig zijn, deze na toediening aan de patiënt of bij accidentele toediening aan derden geïnactiveerd worden door het complement systeem in humaan serum.</p> <p>De verloren functies van de lentivirale vector kunnen in theorie gecompenseerd worden indien een retrovirus in dezelfde</p>	
--	---	--



	<p>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. Hierdoor is er een theoretische kans op verdere verspreiding. De waarschijnlijkheid dat een dergelijke gebeurtenis zich voordoet is echter verwaarloosbaar klein zoals aangegeven onder A van deze tabel.</p> <p>De kans dat derden geïnfecteerd worden met RCLs of vrije virusdeeltjes en dat hierdoor schadelijke effecten optreden is verwaarloosbaar klein.</p>	
<p><b>E. Mogelijke effecten op menselijke en diergezondheid</b></p>		
<p>Aspecten gerelateerd aan de pathogeniteit van het ggo zijn reeds aan de orde geweest in onderdeel A. Daar werd de vraag gesteld of de genetische modificaties in het genoom van HIV-1 leiden tot verandering in wefelseltropisme, gastheerbereik en in de mate van infectiviteit en virulentie van de virale vector in vergelijking met wildtype HIV-1.</p> <p>Aspecten gerelateerd aan toxiciteit of allergeniteit en andere gezondheidsgerelateerde effecten zijn hier aan de orde. Daarbij worden de eventuele toxische en allergene effecten van het ggo beoordeeld op mensen in de omgeving van de patiënt. Elementen die daarbij in beschouwing genomen moeten worden zijn toxiciteit of andere schadelijke effecten zoals een effect van het ggo op het immuunsysteem en allergeniteit van het genproduct. Bij de beoordeling moet rekening worden gehouden met de te verwachten blootstellingsweg en mate van blootstelling.</p> <p>De vraag is welke effecten de genetische modificaties in het genoom van HIV-1 kunnen hebben op de gezondheid van de niet-doelpopulatie (mens). Gezien het gastheerbereik worden hieronder mensen verstaan, met uitzondering van de behandelde patiënt. Hiervoor moet worden nagegaan wat er bekend is over de effecten die de genetische modificaties kunnen hebben op de mens.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b>          In onderdeel A van deze tabel is geconcludeerd dat infectie met HIV-1 kan resulteren in AIDS. Een HIV-1 infectie wordt doorgaans onder controle gehouden met behulp van antiretrovirale medicatie. Deze behandeling is in grote delen van de wereld zo succesvol dat een HIV-1 infectie een chronische ziekte is geworden waarbij progressie naar AIDS zeldzaam is. HIV-1 wordt verspreid via seksueel contact, bloedtransfusie, besmette injectiespuiten en van moeder naar kind gedurende de zwangerschap, bevalling en via borstvoeding.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b>          Zoals beschreven onder A van deze tabel is de kans verwaarloosbaar klein dat RCLs in de virusbatch aanwezig zijn. Onder D van deze tabel is geconcludeerd dat de kans dat derden geïnfecteerd worden met vrije virusdeeltjes en dat hierdoor schadelijke effecten optreden verwaarloosbaar klein is. De kans op kiembaantransmissie is verwaarloosbaar klein aangezien volwassen T-cellen zullen worden getransduceerd met de lentivirale vector.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b>          De genetische modificaties in de lentivirale vector kunnen leiden tot het optreden van (schadelijke) effecten.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b>          De waarschijnlijkheid dat de genetische modificaties in de lentivirale vector leiden tot het optreden van (schadelijke) effecten op de menselijke en diergezondheid is verwaarloosbaar klein.</p> <p><b>III. Het risico:</b>          De kans op het optreden van (schadelijke) effecten en de mogelijke gevolgen voor het milieu zijn verwaarloosbaar klein.</p>
<p><b>F. Mogelijke effecten op menselijke en diergezondheid ten gevolge van consumptie</b></p>		
<p>Er zal uitsluitend sprake van consumptie zijn indien het een toepassing op dieren betreft en de proefdieren na afloop van het experiment voor menselijke consumptie of als diervoeder worden aangeboden. Alleen in dat geval wordt dat aspect in beschouwing genomen. Daarbij moet worden nagegaan in hoeverre consumptie van de tot expressie gebrachte genproducten kunnen leiden tot gezondheidsschade voor</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b>          Er is geen sprake van consumptie.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b></p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b>          Niet van toepassing.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b>          Niet van toepassing.</p>



mens of dier.	Het is uitgesloten dat er schadelijke effecten optreden.	<b>III. Het risico:</b> Niet van toepassing.
<b>G. Effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu</b>		
<p>In het algemeen wordt hieronder verstaan de negatieve effecten die ggo's kunnen hebben op (micro-)organismen die voorkomen als commensalen of die verantwoordelijk zijn voor kringlopen van nutriënten of afbraak van organisch materiaal. De vraag is hier of de genetische modificaties in het genoom van HIV-1 een effect kunnen hebben op andere microbiële populaties in mens, dier of het milieu.</p> <p>Infectie kan alleen optreden in humane en dierlijke cellen. Virale deeltjes zijn replicatiedeficiënt en kunnen een cel slechts éénmaal infecteren. Effecten in het milieu in het algemeen kunnen daarmee worden uitgesloten.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b> De in deze studie te gebruiken vector kan geen interactie aangaan met microbiële populaties.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> Er zijn geen potentiële effecten geïdentificeerd. De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> Er zijn geen gevolgen te verwachten.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b> De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p> <p><b>III. Het risico:</b> Het risico is verwaarloosbaar klein.</p>
<b>H. Veranderingen in de medische of veterinaire praktijk</b>		
<p>Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde, directe en indirecte milieueffecten van de veranderde medische en veterinaire praktijk ten gevolge van de toepassing van de ggo's.</p> <p>Hieronder wordt verstaan dat de toepassing van het ggo kan leiden tot een verminderd effect en afgenomen toepasbaarheid van geneesmiddelen.</p> <p>De vraag is of de genetische modificaties in het genoom van HIV-1 zullen leiden tot veranderingen in de medische praktijk.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b> Aangezien de vector verminderd virulent is ten opzichte van wildtype HIV-1 zullen er geen gevolgen zijn voor de behandelmethode die beschikbaar zijn in de huidige medische of veterinaire praktijk. Het doel van de studies is om een nieuwe therapie tegen maligniteiten die BCMA tot expressie brengen te ontwikkelen. Hierdoor zal het arsenaal aan mogelijke behandelingen voor kankerpatiënten toenemen. Hier zijn geen nadelige gevolgen voor mens of milieu aan verbonden.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> Er zijn geen potentiële effecten geïdentificeerd. De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> Er zijn geen gevolgen te verwachten.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b> De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p> <p><b>III. Het risico:</b> Het risico is verwaarloosbaar klein.</p>



**Tabel 2.3 milieurisicobeoordeling van de chimere antigen receptor (CAR):**

<b>Bepaling van eigenschappen die schadelijke effecten kunnen hebben</b> <i>(Identificatie en toelichting "oorzaak-gevolg" relaties)</i>	<b>Evaluatie van de mogelijke gevolgen van elk schadelijk effect, indien dit optreedt, en evaluatie van de waarschijnlijkheid van het optreden</b> <i>(rekening houdend met de wijze van introductie en het introductie milieu)</i>	<b>Schatting van het risico dat aan de betreffende eigenschap van het GGO verbonden is</b>
<b>A. Persistentie en invasiviteit</b>		
<p>Bij de bepaling van het milieurisico van veranderde persistentie en invasiviteit van een ggo toegepast in medisch onderzoek gaat het om de bepaling van mogelijke effecten van de genetische modificatie op het gastheerbereik, de infectiviteit en de pathogeniteit en virulentie voor potentiële gastheren (mensen en dieren) in het milieu.</p> <p>Van een hogere persistentie en invasiviteit kan sprake zijn indien het ggo na toediening aan een patiënt, langer dan het ouderorganisme in een actieve vorm aanwezig kan blijven en vervolgens kan verspreiden in het milieu. In dat geval moet beoordeeld worden of verspreiding vervolgens kan leiden tot een infectie van andere organismen.</p> <p>Eenzijds is de vraag of de CAR sequentie een effect kan hebben op de persistentie en invasiviteit van de toegepaste virale vector. Hierbij moet in beschouwing genomen worden dat voor de productie van de virale vector welke gebruikt wordt voor transductie van de T-cellen een zogeheten derde generatie SIN lentiviraal vectorsysteem gebruikt is. 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 genen <i>tat</i>, <i>vif</i>, <i>vpr</i>, <i>vpu</i>, <i>env</i> en <i>nef</i> zijn verwijderd. Bovendien is de virale vector zelf-inactiverend (SIN). Hierdoor is de virale vector replicatiedeficiënt en kan het virusdeeltje slechts éénmaal een cel infecteren. Om een rol te kunnen spelen in de virusbiologie van de vector zou de CAR sequentie op de een of andere manier een activiteit moeten hebben die de afwezige virale genproducten en regulatoire sequenties zou kunnen complementeren.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b>            In theoretische omstandigheden dat er mogelijk virusdeeltjes gevormd worden (zoals beschreven in Tabel 2.2) is er geen reden om aan te nemen dat de CAR sequentie invloed zal hebben op de virusbiologie van de vector.</p> <p>De getransduceerde T-cellen welke de CAR sequentie tot expressie brengen binden het BCMA antigen dat aanwezig is op BCMA-expresserende maligniteiten. De variabele regio's van een BCMA-specifiek antilichaam zijn gekoppeld aan de intracellulaire zeta-chain van een CD3 molecuul en een co-stimulerend molecuul, waardoor het afweersysteem specifiek BCMA-expresserende cellen herkent en vernietigt op een MHC/HLA onafhankelijke manier. De getransduceerde T-cellen welke anti-BCMA CAR tot expressie brengen kunnen zodoende een afweerreactie opwekken tegen diverse tumoren.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b>            Van anti-BCMA CAR 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. Expressie van anti-BCMA CAR door de vector zal daarom op zichzelf niet leiden tot vorming van virusdeeltjes die de virale vector bevatten.</p> <p>Getransduceerde T-cellen kunnen gedurende lange tijd in patiënten aanwezig blijven als memory T-cellen. Minstens 6 maanden na infusie van getransduceerde T-cellen kunnen lage niveaus van deze 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</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b>            De gevolgen van een verhoogde persistentie en invasiviteit kunnen groot zijn, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheer bereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b>            De waarschijnlijkheid dat de insertie van de CAR sequentie leidt tot een verhoogde persistentie of invasiviteit is verwaarloosbaar klein.</p> <p><b>III. Het risico:</b>            Het risico van verhoogde persistentie en invasiviteit is verwaarloosbaar klein.</p>



<p>Anderzijds is de vraag of de CAR sequentie de persistentie en invasiviteit van de toegepaste cellen kan verhogen.</p>	<p>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 immuungecompromitteerd persoon terechtkomen dan bestaat er een theoretische kans dat de KITE-585 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 het risico op negatieve effecten verkleind ten opzichte van de situatie in patiënten. Het risico op verdere verspreiding van de getransduceerde T-cellen naar derden is verwaarloosbaar klein. Patiënten die behandeld zijn met de getransduceerde T-cellen worden geïnstrueerd na toediening van de getransduceerde T-cellen af te zien van het doneren van bloed, organen, weefsels en cellen voor transplantatie, zodat introductie van de getransduceerde T-cellen in het milieu voorkomen wordt. Zwangere vrouwen en vrouwen die borstvoeding geven worden uitgesloten van deelname aan de onderhavige studies. De kans dat derden geïnfecteerd raken met de getransduceerde cellen en dat daardoor een schadelijk effect kan optreden is verwaarloosbaar klein.</p> <p>De waarschijnlijkheid dat KITE-585 leidt tot een verhoogde persistentie of invasiviteit is verwaarloosbaar klein.</p>	
<p><b>B. Selectieve voordelen</b></p>		
<p>Voor de milieurisicobeoordeling van een ggo toegepast in medisch of veterinair onderzoek zijn die selectieve voordelen relevant die leiden tot verhoogde persistentie en invasiviteit. De oorzaak-gevolg relaties die hierbij een rol spelen zijn behandeld onder A.</p> <p>Het is onder dit onderdeel de vraag of expressie van de CAR sequentie leidt tot selectieve voordelen die een verandering in weefsel tropisme, gastheerbereik en in de mate van infectiviteit en virulentie van de virale vector in vergelijking met wildtype HIV-1 teweeg brengt.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b></p> <p>In theoretische omstandigheden dat er mogelijk virusdeeltjes gevormd worden (zoals beschreven in Tabel 2.2) is er geen reden om aan te nemen dat de CAR sequentie invloed zal hebben op de virusbiologie van de vector.</p> <p>Evenals onder A geldt dat de getransduceerde T-cellen welke anti-BCMA CAR tot expressie brengen het BCMA antigeen dat aanwezig is op BCMA-expresserende maligniteiten, en kunnen zodoende een afweerreactie opwekken tegen diverse tumoren.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b></p> <p>De gevolgen van een verhoogde persistentie en invasiviteit kunnen groot zijn, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheer bereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b></p> <p>De waarschijnlijkheid dat de insertie van de CAR sequentie leidt tot selectieve voordelen is verwaarloosbaar klein.</p> <p><b>III. Het risico:</b></p>



<p>Hierbij moet in beschouwing genomen worden dat voor de productie van de virale vector welke gebruikt wordt voor transductie van de T-cellen een zogeheten derde generatie SIN lentiviraal vectorsysteem gebruikt is. 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 genen <i>tat</i>, <i>vif</i>, <i>vpr</i>, <i>vpu</i>, <i>env</i> en <i>nef</i> zijn verwijderd. Bovendien is de virale vector zelf-inactiverend (SIN). Hierdoor is de virale vector replicatiedeficiënt en kan het virusdeeltje slechts éénmaal een cel infecteren. Om een rol te kunnen spelen in de virusbiologie van de vector zou de CAR sequentie op de een of andere manier een activiteit moeten hebben die de afwezige virale genproducten en regulatorie sequenties zou kunnen complementeren.</p> <p>Anderzijds is de vraag of de CAR sequentie leidt tot een verhoging van de selectieve voordelen van de toegepaste cellen.</p>	<p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> Zoals beschreven in onderdeel A van deze tabel is de waarschijnlijkheid dat er als gevolg van selectieve voordelen een mogelijk schadelijk effect ontstaat verwaarloosbaar klein.</p>	<p>Het risico van selectieve voordelen is verwaarloosbaar klein.</p>
<p><b>C. Kans op genoverdracht op andere soorten en de kans dat hierdoor selectieve voor- of nadelen op deze soorten worden overgedragen</b></p>		
<p>Genoverdracht op andere soorten kan plaatsvinden door (homologe) recombinatie. Op de eerste plaats wordt in beschouwing genomen of er overdracht plaats kan vinden van de vector naar andere virussen. Die kans is op de eerste plaats afhankelijk van de aanwezigheid van een verwant virus binnen het zelfde celcompartiment waarin de vector zich bevindt. Vervolgens zijn de kans op recombinatie en de eigenschappen van het gevormde product afhankelijk van de genetische opbouw van het ggo. Van een mogelijk gevormde recombinant moet vervolgens worden nagegaan in hoeverre hieruit selectieve voor- of nadelen voortvloeien.</p> <p>Onder dit onderdeel wordt de vraag gesteld of de CAR sequentie kan worden overgedragen van de getransduceerde T-cellen naar andere virussen en of dit vervolgens voor deze virussen kan leiden tot een selectief voor- of nadeel. Selectieve voor- of nadelen kunnen alleen optreden als de expressie van de CAR sequentie vervolgens een interactie heeft met de virale levenscyclus.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b> In theoretische omstandigheden dat er mogelijk virusdeeltjes gevormd worden (zoals beschreven in Tabel 2.2) is er geen reden om aan te nemen dat de CAR sequentie invloed zal hebben op de virusbiologie van de vector.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> In onderdeel C van Tabel 2.2 is geconcludeerd dat de waarschijnlijkheid dat de lentivirale sequenties kunnen worden overgedragen naar andere virussen en dat dit vervolgens voor deze virussen kan leiden tot een selectief voor- of nadeel verwaarloosbaar klein is. Zoals beschreven in onderdeel C van Tabel 2.2 is de kans op schadelijke gevolgen door recombinatie met MSCV, SV40, CMV of Hepatitis B verwaarloosbaar klein.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> De gevolgen van genoverdracht kunnen groot zijn, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheer bereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen:</b> De waarschijnlijkheid dat overdracht van de CAR sequentie op andere soorten kan plaatsvinden is verwaarloosbaar klein.</p> <p><b>III. Het risico:</b> Het risico van genoverdracht is verwaarloosbaar klein.</p>



<b>D. Effecten op doel en niet-doel populaties</b>		
<p>Effecten op de patiënten die aan de studie deelnemen (doelpopulatie) vallen niet onder het toetsingskader van de milieuregelgeving en worden om die reden hier niet direct in beschouwing genomen. De effecten op de patiënt vallen onder de medische verantwoordelijkheid van de behandelende arts.</p> <p>Effecten op niet-doelpopulaties zullen alleen op kunnen treden indien er sprake is van verspreiding van het ggo in de omgeving van de patiënt. Een aantal aspecten betreffende pathogene effecten is al in beschouwing genomen onder A.</p> <p>In dit onderdeel worden de eventuele effecten van het ggo beoordeeld op mensen in de omgeving van de patiënt. Bij de beoordeling moet rekening worden gehouden met de te verwachten blootstellingsweg en mate van blootstelling.</p> <p>De vraag is welke effecten de CAR sequentie kan hebben in de niet-doelpopulaties. Met effecten worden alle mogelijke (schadelijke en niet-schadelijke, zoals onder andere toxische en allergene) effecten bedoeld met uitzondering van gezondheidseffecten. Gezondheidseffecten worden onder onderdeel E besproken.</p> <p>Hiervoor moet worden nagegaan wat er bekend is over de effecten die de CAR sequentie kan hebben op de mens.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b> De mogelijke schadelijke effecten zijn reeds beschreven in onderdeel A van deze tabel.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> In onderdeel A van deze tabel is beschreven dat de kans dat derden geïnfecteerd raken met de getransduceerde T-cellen en dat daardoor een schadelijk effect kan optreden verwaarloosbaar klein is.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> De gevolgen op doel en niet-doel populaties kunnen groot zijn, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheer bereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b> De waarschijnlijkheid dat expressie van de CAR sequentie leidt tot het optreden van (schadelijke) effecten op doel en niet-doel populaties is verwaarloosbaar klein.</p> <p><b>III. Het risico:</b> De kans op het optreden van (schadelijke) effecten en de mogelijke gevolgen voor het milieu zijn verwaarloosbaar klein.</p>
<b>E. Mogelijke effecten op menselijke en diergezondheid</b>		
<p>Aspecten gerelateerd aan de pathogeniteit van het ggo zijn reeds aan de orde geweest in onderdeel A. Daar werd de vraag gesteld of expressie van de CAR sequentie door het ggo leidt tot verandering in weefseltropisme, gastheerbereik en in de mate van infectiviteit en virulentie van de virale vector in vergelijking met wildtype HIV-1.</p> <p>Aspecten gerelateerd aan toxiciteit of allergeniteit en andere gezondheidsgerelateerde effecten zijn onder D behandeld. Daarbij worden de eventuele toxische en allergene effecten van het ggo beoordeeld op mensen in de omgeving van de patiënt. Elementen die daarbij in beschouwing genomen moeten worden zijn toxiciteit of andere schadelijke effecten zoals een effect van het ggo op het immuunsysteem en allergeniteit van het genproduct. Bij de beoordeling moet rekening worden gehouden met de te verwachten blootstellingsweg en mate van blootstelling.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b> De mogelijke schadelijke effecten zijn reeds beschreven in onderdeel A van deze tabel.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> In onderdeel A van deze tabel is beschreven dat de kans dat derden geïnfecteerd raken met de getransduceerde T-cellen en dat daardoor een schadelijk effect kan optreden verwaarloosbaar klein is.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> De gevolgen op doel en niet-doel populaties kunnen groot zijn, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheer bereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b> De waarschijnlijkheid dat de CAR sequentie leidt tot het optreden van (schadelijke) effecten op menselijke en diergezondheid is verwaarloosbaar klein.</p> <p><b>III. Het risico:</b> De kans op het optreden van (schadelijke) effecten en de mogelijke gevolgen voor het milieu zijn verwaarloosbaar klein.</p>



<p>De vraag is welke effecten de CAR sequentie kan hebben op de gezondheid van de mens. De mogelijke effecten anders dan op de menselijke gezondheid zijn reeds geïdentificeerd onder onderdeel D van deze tabel.</p> <p>Hiervoor moet worden nagegaan wat er bekend is over de effecten die de CAR sequentie kan hebben op de mens.</p>		
<p><b>F. Mogelijke effecten op menselijke en diergezondheid ten gevolge van consumptie</b></p>		
<p>Er zal uitsluitend sprake van consumptie zijn indien het een toepassing op dieren betreft en de proefdieren na afloop van het experiment voor menselijke consumptie of als diervoeder worden aangeboden. Alleen in dat geval wordt dat aspect in beschouwing genomen. Daarbij moet worden nagegaan in hoeverre consumptie van de tot expressie gebrachte genen kunnen leiden tot gezondheidsschade voor mens of dier.</p> <p>In onderhavige aanvraag is geen sprake van consumptie.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden</b> Er is geen sprake van consumptie, gevolgen ten gevolge van consumptie worden daarom buiten beschouwing gelaten.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> Het is uitgesloten dat er schadelijke effecten optreden.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> Niet van toepassing.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b> Niet van toepassing.</p> <p><b>III. Het risico:</b> Niet van toepassing.</p>
<p><b>G. Effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu</b></p>		
<p>In het algemeen wordt hieronder verstaan de negatieve effecten die ggo's kunnen hebben op (micro-)organismen die voorkomen als commensalen of die verantwoordelijk zijn voor kringlopen van nutriënten of afbraak van organisch materiaal.</p> <p>De vraag is of de expressie van de CAR sequentie een effect heeft op andere microbiële populaties in mens, dier of het milieu.</p> <p>Expressie van de sequentie kan alleen plaatsvinden in levende cellen van de gastheer. Effecten in het milieu in het algemeen kunnen daarmee worden uitgesloten.</p> <p>Er is geen directe causale relatie te maken tussen expressie van de gastheer en micro-organismen die in of op de mens voorkomen.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b> De getransduceerde T-cellen kunnen buiten het lichaam niet overleven. Daarom is de conclusie dat er geen effecten kunnen optreden op microbiële populaties in mens, dier of milieu.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> Er zijn geen potentiële effecten geïdentificeerd. De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> Er zijn geen gevolgen te verwachten.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b> De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p> <p><b>III. Het risico:</b> Het risico is verwaarloosbaar klein.</p>
<p><b>H. Veranderingen in de medische of veterinaire praktijk</b></p>		
<p>Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde, directe en indirecte milieu-effecten van de veranderde medische en veterinaire praktijk ten gevolge van de toepassing van de ggo's.</p> <p>Hieronder wordt verstaan dat de toepassing van het ggo kan leiden tot een verminderd effect en afgenomen toepasbaarheid van geneesmiddelen.</p> <p>De vraag is of de expressie van de CAR sequentie zal leiden tot veranderingen in de medische praktijk.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b> In onderdeel A van deze tabel is beschreven dat de kans dat derden geïnfecteerd raken met de getransduceerde T-cellen en dat daardoor een schadelijk effect kan optreden verwaarloosbaar klein is. Buiten het lichaam kunnen de getransduceerde T-cellen niet overleven. Expressie van de CAR sequentie zoals dit in de aanvraag wordt beschreven zal niet leiden tot een negatief effect dat gevolgen heeft voor behandelmethoden die beschikbaar zijn in de huidige medische en veterinaire praktijk. Het doel van de studies is om een nieuwe therapie tegen maligniteiten die BCMA tot</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> Er zijn geen gevolgen te verwachten.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b> De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p> <p><b>III. Het risico:</b> Het risico is verwaarloosbaar klein.</p>





	<p>expressie brengen te ontwikkelen. Hierdoor zal het arsenaal aan mogelijke behandelingen voor kankerpatiënten toenemen. Hier zijn geen nadelige gevolgen voor mens of milieu aan verbonden.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b></p> <p>Er zijn geen potentiële (schadelijke) effecten geïdentificeerd op de medische of veterinaire praktijk. De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p>	
--	---	--



**Tabel 2.4 milieurisicobeoordeling van de getransduceerde T-cellen (T-cellen):**

<b>Bepaling van eigenschappen die schadelijke effecten kunnen hebben</b> <i>(Identificatie en toelichting "oorzaak-gevolg" relaties)</i>	<b>Evaluatie van de mogelijke gevolgen van elk schadelijk effect, indien dit optreedt, en evaluatie van de waarschijnlijkheid van het optreden</b> <i>(rekening houdend met de wijze van introductie en het introductie milieu)</i>	<b>Schatting van het risico dat aan de betreffende eigenschap van het GGO verbonden is</b>
<b>A. Persistentie en invasiviteit</b>		
<p>Bij de bepaling van het milieurisico van veranderde persistentie en invasiviteit van een ggo toegepast in medisch en veterinair onderzoek gaat het om de bepaling van mogelijke effecten van de genetische modificatie op het gastheerbereik, de infectiviteit en de pathogeniteit en virulentie voor potentiële gastheren (mensen en dieren) in het milieu.</p> <p>Van een hogere persistentie en invasiviteit van de genetisch gemodificeerde T-cellen ten opzichte van de niet genetisch gemodificeerde T-cellen kan sprake zijn indien het ggo langer in een actieve vorm aanwezig kan blijven.</p> <p>Lentivirale vectordeeltjes (beschreven in Tabel 2.2) zijn gebruikt voor de <i>ex vivo</i> transductie van autologe humane T-cellen. Voorafgaand aan vrijgifte worden de getransduceerde T-cellen getest op de aanwezigheid van replicatiecompetent lentivirus (RCL) dat tijdens de productie theoretisch zou kunnen ontstaan. Zoals beschreven in Tabel 2.2 is de kans dat er een RCL aanwezig is in de getransduceerde T-cellen verwaarloosbaar klein. Ook is geconcludeerd dat de kans dat derden geïnfecteerd worden met vrije virusdeeltjes en dat hierdoor schadelijke effecten optreden verwaarloosbaar klein is.</p> <p>De vraag is of de genetische modificatie van de T-cellen leidt tot een verandering van persistentie en/of invasiviteit van de T-cellen.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b></p> <p>De lentivirale vector (beschreven in Tabel 2.2) wordt gebruikt voor de <i>ex vivo</i> transductie (genetische modificatie) van autologe humane T-cellen. De getransduceerde T-cellen welke anti-BCMA CAR tot expressie brengen binden het BCMA antigen dat aanwezig is op BCMA-expresserende maligniteiten. De variabele regio's van een BCMA-specifiek antilichaam zijn gekoppeld aan de intracellulaire zeta-chain van een CD3 molecuul en een co-stimulerend molecuul, waardoor het afweersysteem specifiek BCMA-expresserende cellen herkent en vernietigt op een MHC/HLA onafhankelijke manier. De getransduceerde T-cellen welke anti-BCMA CAR tot expressie brengen kunnen zodoende een afweerreactie opwekken tegen diverse tumoren.</p> <p>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 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 kwaadaardig fenotype. Bovendien is de virale vector zelf-inactiverend (SIN). Uit SIN vectoren is een deel van de 3' LTR, het zogenaamde U3 domein, verwijderd. Tijdens reverse transcriptie naar het provirale genoom wordt deze deletie overgenomen in de 5' LTR waardoor deze vector geen functionele LTR's meer bezit. In het U3 domein van de LTR bevinden zich zogenaamde promotor en enhancer sequenties. Indien een lentivirale vector</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b></p> <p>De gevolgen van een verhoogde persistentie en invasiviteit kunnen groot zijn, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheerbereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b></p> <p>De waarschijnlijkheid dat de getransduceerde T-cellen derden infecteren, zich daar handhaven en een schadelijk effect kunnen veroorzaken waarbij sprake is van verhoogde persistentie en invasiviteit is verwaarloosbaar klein.</p> <p><b>III. Het risico:</b></p> <p>Het risico van verhoogde persistentie en invasiviteit is verwaarloosbaar klein.</p>



	<p>in het genoom van de gastheer integreert in de buurt van een proto-oncogen kan dit 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. Naast de reductie op mobilisatie van de vector is hierdoor tevens de mogelijke activering van naburige proto-oncogenen door het U3 domein teniet gedaan.</p> <p>Er zijn geen aanwijzingen in de literatuur voor kwaadaardige transformatie van volwassen T-cellen welke CARs tot expressie brengen.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b></p> <p>Na infectie van de T-cel zal de lentivirale vector stabiel in het genoom opgenomen worden. De in het celgenoom opgenomen lentivirale sequenties zullen niet bijdragen aan een verhoogde persistentie en invasiviteit van de T-cellen. Getransduceerde T-cellen kunnen gedurende lange tijd in patiënten aanwezig blijven als memory T-cellen. Minstens 6 maanden na infusie van getransduceerde T-cellen kunnen lage niveaus van deze 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 en snel geïnactiveerd worden door desinfectie. 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 KITE-585 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 het risico op negatieve effecten verkleind ten opzichte van de situatie in patiënten. Het risico op verdere verspreiding van de getransduceerde T-cellen naar derden is verwaarloosbaar klein. Patiënten die behandeld zijn met de getransduceerde T-cellen worden geïnstrueerd na toediening van de</p>	
--	---	--



	<p>getransduceerde T-cellen af te zien van het doneren van bloed, organen, weefsels en cellen voor transplantatie, zodat introductie van de getransduceerde T-cellen in het milieu voorkomen wordt. Zwangere vrouwen en vrouwen die borstvoeding geven worden uitgesloten van deelname aan de onderhavige studies. De kans dat derden geïnfecteerd raken met de getransduceerde cellen en dat daardoor een schadelijk effect kan optreden is verwaarloosbaar klein.</p> <p>De waarschijnlijkheid dat de getransduceerde T-cellen een verhoogde persistentie of invasiviteit hebben ten opzichte van de uitgangscellen is verwaarloosbaar klein.</p>	
<b>B. Selectieve voordelen</b>		
<p>Voor de milieurisicobeoordeling van een ggo toegepast in medisch of veterinair onderzoek zijn die selectieve voordelen relevant die leiden tot verhoogde persistentie en invasiviteit. De oorzaak-gevolg relaties die hierbij een rol spelen zijn behandeld onder A.</p> <p>Van een selectief voordeel van een genetisch gemodificeerde cel (i.e. het ggo) ten opzichte van de niet genetisch gemodificeerde cel waarvan het is afgeleid, kan sprake zijn indien de genetisch gemodificeerde cel na toediening aan een patiënt of proefdier langer dan de oorspronkelijke cellen in een actieve vorm aanwezig blijft.</p> <p>De vraag is of genetische modificatie van de T-cellen leidt tot een selectief voordeel in vergelijking tot niet getransduceerde T-cellen.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b> De mogelijke schadelijke effecten zijn reeds beschreven in onderdeel A van deze tabel.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> In onderdeel A van deze tabel is beschreven dat de kans verwaarloosbaar klein is dat getransduceerde T-cellen in derden terechtkomen en dat daardoor een schadelijk effect kan optreden.</p> <p>Geconcludeerd kan worden dat de genetische modificatie van de T-cellen geen selectief voor- of nadeel zal opleveren voor de betreffende cellen.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> De gevolgen van selectieve voordelen kunnen groot zijn, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheerbereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b> De waarschijnlijkheid dat de getransduceerde T-cellen derden infecteren, zich daar handhaven en een schadelijk effect kunnen veroorzaken waarbij sprake is van een selectief voordeel is verwaarloosbaar klein.</p> <p><b>III. Het risico:</b> Het risico van verhoogde selectiviteit is verwaarloosbaar klein.</p>
<b>C. Kans op geverdracht op andere soorten en de kans dat hierdoor selectieve voor- of nadelen op deze soorten worden overgedragen</b>		
<p>Genoverdracht op andere soorten kan plaatsvinden door (homologe) recombinatie. Op de eerste plaats wordt in beschouwing genomen of er overdracht plaats kan vinden van het ggo naar andere virussen. Die kans is op de eerste plaats afhankelijk van de aanwezigheid van een verwant virus binnen hetzelfde celcompartiment waarin het ggo zich bevindt. Vervolgens zijn de kans op recombinatie en de eigenschappen van het gevormde product afhankelijk van de genetische opbouw van het ggo. Van een mogelijk gevormde recombinant moet vervolgens worden nagegaan in hoeverre hieruit selectieve voor- of nadelen voortvloeien.</p> <p>De genetisch gemodificeerde T-cellen bevatten in hun genoom lentivirale sequenties van de HIV-1 vector, de WPRE sequentie van <i>woodchuck hepatitis virus</i>, sequenties van MSCV en SV40</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden</b> Recombinatie tussen de lentivirale vector in de getransduceerde T-cellen en wildtype lentivirussen kan resulteren in het ontstaan van RCLs. Evenals onder A beschreven in Tabel 2.2 geldt dat indien dergelijke RCLs aanleiding zouden geven tot ziektebeelden dan zouden de gevolgen groot kunnen zijn, maar alleen indien het ziektebeeld gepaard gaat met significante hinder of klachten.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> In onderdeel A van deze tabel is beschreven dat de kans verwaarloosbaar klein is dat getransduceerde T-cellen in derden terechtkomen en dat daardoor een schadelijk effect kan optreden. Buiten het lichaam kunnen de getransduceerde</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> De gevolgen van selectieve voordelen kunnen groot zijn, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheerbereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen:</b> De waarschijnlijkheid dat genoverdracht op andere soorten kan plaatsvinden is verwaarloosbaar klein.</p> <p><b>III. Het risico:</b> Het risico van genoverdracht is verwaarloosbaar klein.</p>



<p>en de anti-BCMA CAR. De vraag is op welke wijze genoverdracht op andere soorten kan plaatsvinden. Indien dit mogelijk is moet tevens de vraag beantwoord worden of hierdoor ook selectieve voordelen op andere soorten kunnen worden overgedragen.</p>	<p>T-cellen niet overleven. De kans dat de virale vector buiten de patiënt uit de getransduceerde T-cellen vrij kan komen is daarom verwaarloosbaar klein.</p> <p>In onderdeel C van Tabel 2.2 is geconcludeerd dat de waarschijnlijkheid dat de genetische modificaties in de getransduceerde T-cellen kunnen worden overgedragen naar andere virussen en dat dit vervolgens voor deze virussen kan leiden tot een selectief voor- of nadeel verwaarloosbaar klein is.</p>	
<p><b>D. Effecten op doel en niet-doel populaties</b></p>		
<p>Effecten op de patiënten die aan de studie deelnemen (doelpopulatie) vallen niet onder het toetsingskader van de milieuregelgeving en worden om die reden hier niet direct in beschouwing genomen. De effecten op de patiënt vallen onder de medische verantwoordelijkheid van de behandelende arts. Voor toediening van ggo's aan dieren gelden vergelijkbare overwegingen.</p> <p>Effecten op niet-doelpopulaties zullen alleen op kunnen treden indien er sprake is van verspreiding van het ggo in de omgeving van de patiënt.</p> <p>In dit onderdeel worden de eventuele toxische en allergene effecten van het ggo beoordeeld op mensen en dieren in de omgeving van de patiënt. Elementen die daarbij in beschouwing genomen moeten worden zijn toxiciteit of andere schadelijke effecten zoals een effect van het ggo op het immuunsysteem en allergeniteit van het genproduct. Bij de beoordeling moet rekening worden gehouden met de te verwachten blootstellingsweg en mate van blootstelling.</p> <p>De vraag is welke effecten de getransduceerde T-cellen kunnen hebben op de niet-doelpopulatie. Gezien de oorsprong van deze cellen worden hieronder mensen verstaan, met uitzondering van de behandelde patiënt.</p> <p>Met effecten worden alle mogelijke (schadelijke en niet-schadelijke) effecten bedoeld zoals eventuele toxische en allergene effecten. Gezondheidseffecten worden onder onderdeel E besproken.</p> <p>De genetisch gemodificeerde T-cellen zijn getransduceerd met een lentivirale vector. De effecten van deze virale vector op doel en niet-doel populaties zijn beschreven in Tabel 2.2. De vraag is of en op welke wijze de getransduceerde T-cellen een effect kunnen hebben op doel en niet-doel populaties.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b> De mogelijke schadelijke effecten zijn reeds beschreven in onderdeel A van deze tabel.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> In onderdeel A van deze tabel is beschreven dat de kans verwaarloosbaar klein is dat getransduceerde T-cellen in derden terechtkomen en dat daardoor een schadelijk effect kan optreden. Buiten het lichaam kunnen de getransduceerde T-cellen niet overleven.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> De gevolgen op doel en niet-doel populaties kunnen groot zijn, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheerbereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b> De waarschijnlijkheid dat de getransduceerde T-cellen leiden tot het optreden van (schadelijke) effecten op doel en niet-doel populaties is verwaarloosbaar klein.</p> <p><b>III. Het risico:</b> De kans op het optreden van (schadelijke) effecten en de mogelijke gevolgen voor het milieu zijn verwaarloosbaar klein.</p>
<p><b>E. Mogelijke effecten op menselijke en diergezondheid</b></p>		
<p>Aspecten gerelateerd aan de pathogeniteit van de</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke</b></p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b></p>



<p>getransduceerde T-cellen waarbij de genetisch gemodificeerde lentivirale vector is geïntegreerd in het celgenoom zijn aan de orde geweest in onderdeel A.</p> <p>Aspecten gerelateerd aan toxiciteit of allergeniteit en andere gezondheidsgerelateerde effecten zijn aan de orde geweest in onderdeel D.</p> <p>De genetisch gemodificeerde T-cellen zijn getransduceerd met een lentivirale vector. De effecten van deze virale vector op doel en niet-doel populaties zijn beschreven in Tabel 2.2. De vraag is of en op welke wijze de getransduceerde T-cellen een effect kunnen hebben op menselijke en diergezondheid.</p>	<p><b>effect, indien het optreedt</b> De mogelijke schadelijke effecten zijn reeds beschreven in onderdeel A van deze tabel.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> In onderdeel A van deze tabel is beschreven dat de kans dat derden geïnfecteerd raken met de getransduceerde T-cellen en dat daardoor een schadelijk effect kan optreden verwaarloosbaar klein is. Buiten het lichaam kunnen de getransduceerde T-cellen niet overleven.</p>	<p>De gevolgen op doel en niet-doel populaties kunnen groot zijn, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheerbereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b> De waarschijnlijkheid dat de getransduceerde T-cellen leiden tot het optreden van (schadelijke) effecten op menselijke en diergezondheid is verwaarloosbaar klein.</p> <p><b>III. Het risico:</b> De kans op het optreden van (schadelijke) effecten en de mogelijke gevolgen voor het milieu zijn verwaarloosbaar klein.</p>
<p><b>F. Mogelijke effecten op menselijke en diergezondheid ten gevolge van consumptie</b></p>		
<p>Er zal uitsluitend sprake van consumptie zijn indien het een toepassing op dieren betreft en de proefdieren na afloop van het experiment voor menselijke consumptie of als diervoeder worden aangeboden. Alleen in dat geval wordt dat aspect in beschouwing genomen. Daarbij moet worden nagegaan in hoeverre consumptie van de tot expressie gebrachte genproducten kunnen leiden tot gezondheidsschade voor mens of dier.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden</b> Er is geen sprake van consumptie, gevolgen ten gevolge van consumptie worden daarom buiten beschouwing gelaten.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> Het is uitgesloten dat er schadelijke effecten optreden.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> Niet van toepassing.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen:</b> Niet van toepassing.</p> <p><b>III. Het risico:</b> Niet van toepassing.</p>
<p><b>G. Effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu</b></p>		
<p>In het algemeen wordt hieronder verstaan de negatieve effecten die ggo's kunnen hebben op (micro-)organismen die voorkomen als commensalen of die verantwoordelijk zijn voor kringlopen van nutriënten of afbraak van organisch materiaal.</p> <p>De genetisch gemodificeerde T-cellen zijn getransduceerd met een lentivirale vector. De effecten van deze virale vector op doel en niet-doel populaties zijn beschreven in Tabel 2.2. De vraag is of en op welke wijze de getransduceerde T-cellen een effect kunnen hebben op microbiële populaties in mens, dier of milieu.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b> De getransduceerde T-cellen kunnen buiten het lichaam niet overleven. Daarom is de conclusie dat er geen effecten kunnen optreden op microbiële populaties in mens, dier of milieu.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> Er zijn geen potentiële effecten geïdentificeerd. De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> Er zijn geen gevolgen te verwachten.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b> De waarschijnlijkheid is verwaarloosbaar klein.</p> <p><b>III. Het risico:</b> Het risico is verwaarloosbaar klein.</p>



<b>H. Veranderingen in de medische of veterinaire praktijk</b>		
<p>Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde, directe en indirecte milieueffecten van de veranderde medische en veterinaire praktijk ten gevolge van de toepassing van de ggo's.</p> <p>Hieronder wordt verstaan dat de toepassing van het ggo kan leiden tot een verminderd effect en afgenomen toepasbaarheid van geneesmiddelen.</p> <p>De vraag is of het toedienen van de getransduceerde T-cellen zal leiden tot veranderingen in de medische praktijk.</p>	<p><b>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</b> In onderdeel A van deze tabel is beschreven dat de kans dat derden geïnfecteerd raken met de getransduceerde T-cellen en dat daardoor een schadelijk effect kan optreden verwaarloosbaar klein is. Buiten het lichaam kunnen de getransduceerde T-cellen niet overleven. Het doel van de studie is om een nieuwe therapie tegen maligniteiten die BCMA tot expressie brengen te ontwikkelen. Hierdoor zal het arsenaal aan mogelijke behandelingen voor kankerpatiënten toenemen. Hier zijn geen nadelige gevolgen voor mens of milieu aan verbonden.</p> <p><b>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</b> Er zijn geen potentiële effecten geïdentificeerd. De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p>	<p><b>I. Mogelijke gevolgen:</b> Er zijn geen gevolgen te verwachten.</p> <p><b>II. De waarschijnlijkheid:</b> De vraag naar waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p> <p><b>III. Het risico:</b> Het risico is verwaarloosbaar klein.</p>



### DEEL 3. BEPALING VAN HET ALGEHELE RISICO VAN HET GGO

Hieronder wordt de milieurisicobeoordeling uitgevoerd van de voorgestelde *ex vivo* lentiviraal getransduceerde humane T-cellen welke een chimere anti-BCMA receptor tot expressie brengen. Potentieel significante risico's zijn die risico's waarvan niet is vastgesteld dat deze risico's geen significante effecten hebben.

<b>Schatting van het risico dat aan de toepassing van alle ingebrachte sequenties is verbonden</b>	<b>Strategieën voor risicobeheer bij de doelbewuste introductie van de GGO's</b> <i>(Eventuele aanvulling op strategieën die reeds zijn opgenomen in de aanvraag)</i>	<b>Bepaling van het algehele risico van het GGO</b>
Zowel voor de gebruikte lentivirale vector als voor de hierin gekloneerde anti-BCMA CAR sequentie is geconcludeerd dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn. De met deze lentivirale vector getransduceerde T-cellen kunnen in derden terechtkomen. De kans hierop en op het ontstaan van schadelijke effecten zijn echter ook dan verwaarloosbaar klein.	Aangezien er geen risico's zijn geconstateerd die groter worden geschat dan verwaarloosbaar klein, is risicomanagement uit het oogpunt van milieuviligheid niet noodzakelijk.	Verwaarloosbaar klein.