

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
dhr. J.J. Atsma
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 31 augustus 2011
KENMERK CGM/110831-01
ONDERWERP Advies: Klinische studie met retroviraal getransduceerde humane T-lymfocyten

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM 11-001 met de titel 'Ex vivo retrovirale transductie van humane T-lymfocyten met melanoomspecifieke T cel receptorgenen' van het Nederlands Kanker Instituut te Amsterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

De COGEM is verzocht te adviseren over een behandelmethode waarbij genetisch gemodificeerde afweercellen worden gebruikt om huidkankercellen te vernietigen. De gegevens uit deze studie zullen worden gebruikt om de haalbaarheid, veiligheid en immunologische effecten van deze behandelmethode te bepalen.

Risico's die bij deze studie op kunnen treden hebben betrekking op (1) de eventuele vorming en de verspreiding van replicatiecompetent retrovirus (RCR) of recombinant virus, (2) de aanwezigheid van vrije virusdeeltjes en (3) de effecten van de mogelijke verspreiding van de getransduceerde T-cellen in het milieu

De COGEM acht de risico's op het ontstaan van RCR of recombinant virus na toediening in de patiënt, mede vanwege de afwezigheid van retrovirussen die de verloren functies van de retrovirale vector zouden kunnen aanvullen, verwaarloosbaar klein. De virale vector wordt in Duitsland geproduceerd en gecontroleerd. Hoewel de COGEM van mening is dat de kans zeer klein is dat de vectorbatch RCR's zullen bevatten, toont de aanvrager geen gegevens waaruit blijkt dat de vereiste gevoeligheid wordt bereikt. Tevens ontbreken de resultaten van deze testen. Hierdoor ontbreekt de onderbouwing en kan de COGEM niet verifiëren dat de vectorbatch vrij is van RCR.

De aanvrager heeft de mogelijke aanwezigheid van vrije infectieuze virusdeeltjes berekend. De uitkomst van deze berekening blijkt lager dan de minimum veiligheidsmarge die de COGEM hanteert. De COGEM acht daarom enkele kleine aanpassingen in de kweek noodzakelijk om deze veiligheidsmarge alsnog te behalen.

Indien de getransduceerde T-cellen uit de patiënt vrijkomen zijn de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein, omdat de cellen buiten het lichaam niet kunnen overleven en direct afgestoten zullen worden wanneer zij in een ander lichaam terechtkomen.

Op grond van bovenstaande gegevens reden kan de COGEM op dit moment niet positief adviseren over de voorgenomen klinische studie fase I.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop followed by a horizontal stroke and a small dash.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Klinische studie met retroviraal getransduceerde humane T-lymfocyten

COGEM advies CGM/110831-01

Inleiding

De aanvrager is voornemens een behandelmethode te testen waarbij genetisch gemodificeerde T-cellen worden gebruikt die melanoomcellen kunnen herkennen en vernietigen. In deze studie worden autologe T-cellen van melanoompatiënten *ex vivo* getransduceerd met een retrovirale vector coderend voor een melanoomspecifieke T-cel receptor. Deze getransduceerde T-cellen worden aan patiënten met een stadium IV melanoom toegediend met als doel melanoomspecifieke T-cel immuniteit te induceren. De gegevens uit deze studie zullen worden gebruikt om de haalbaarheid, veiligheid en immunologische effecten van TCR getransduceerde T-cellen te bepalen.

Melanoom

Het melanoom van de huid is een agressieve vorm van kanker met een sterke kans op metastasering, waardoor het een levensbedreigende aandoening is.¹ In 2007 overleden in Nederland 661 personen met een melanoom als primaire doodsoorzaak.² De prognose en behandeling van de ziekte is mede afhankelijk van het klinische stadium van de tumor, waarbij vier stadia worden onderscheiden. Het eerste stadium bestaat uit een primair melanoom dat relatief gemakkelijk operatief verwijderd kan worden. In het laatste stadium (stadium IV) zijn de behandelingsmogelijkheden vanwege uitzaaiingen op afstand beperkt en is de prognose voor patiënten slecht.³

De retrovirale vector

De aanvrager maakt voor de studie gebruik van de retrovirale vector MP71. Deze vector is afgeleid van de dl587 mutant van *Molony murine leukemia virus* (MoMLV). MP71 is replicatiedeficiënt door het ontbreken van de *gag*, *pol* en *env* genen. De *gag* eiwitten vormen de matrix- en kapsleiwitten en de nucleoproteïnen van het virus. *Pol* codeert voor enzymen die nodig zijn voor replicatie en integratie van het virale genoom in het DNA van de gastheer. Het gen *env* codeert voor het oppervlakte-eiwit dat nodig is voor herkenning van cellen en daarmee voor de infectie. Deze onderdelen zijn essentieel voor replicatie en virulentie

Daarnaast bevat de vector *Long Terminal Repeat* (LTR) sequenties afkomstig van zowel *Myeloproliferative sarcoma virus* (MPSV) en *Spleen focusing-forming virus* (SFFV). Deze LTRs zijn essentieel voor de replicatie van het virus. Verder bevat MP71 een leadersequentie afkomstig van *Murine embryonic stem cell virus* (MESV). Deze leadersequentie is belangrijk voor hoge expressie in de getransduceerde cel.

Al deze virussen behoren tot het *Gammaretrovirus* genus van de familie *Retroviridae*.⁴ De COGEM is niet bekend met publicaties waaruit blijkt dat de genoemde virussen pathogeen zijn voor de mens.

Molony murine leukemia virus

MoMLV is een ecotroop muizenvirus dat T-cel lymfomen kan veroorzaken bij knaagdieren.⁵ Het virus is echter alleen pathogeen wanneer de infectie optreedt in pasgeboren knaagdieren en er sprake is van meerdere integraties en persisterende viremie.⁶ Een replicatiecompetent MoMLV gepseudotypeerd met een amphotrope receptor bleek ook lymfomen te veroorzaken in niet-humane primaten met een onderdrukt immuunsysteem.⁷ Er is volgens de aanvrager geen indicatie dat replicatiedeficiënt MoMLV schadelijk is in gezonde niet-humane primaten en mensen. De aanvrager baseert zich onder andere op recente Amerikaanse studies waarbij melanoom patiënten zijn behandeld met T-cellen die getransduceerd zijn met retrovirale vectoren gebaseerd op het nauw verwante *Murine stem cell virus* (MSCV). Tijdens deze studies zijn er geen problemen signaleerd als gevolg van de virale integratie.^{8,9}

Myeloproliferative sarcoma virus

Het MPSV is een replicatiedeficiënt tumorvirus bij de muis. Het virus induceert efficiënte fibroblasttransformatie *in vitro* en veroorzaakt sarcoma's na intramusculaire injectie van volwassen muizen. Daarnaast veroorzaakt het virus proliferatie van erythroïde voorlopercellen en hematopoïetische stamcellen.¹⁰

Spleen focusing-forming virus

Het SFFV is een replicatiedeficiënt virus dat afkomstig is van een recombinatie tussen het *Friend murine leukemia virus* (F-MuLV) en endogene mantelsequenties in de muis. Het virus is betrokken bij de ontwikkeling van acute erythroleukemie in muizen.¹¹ De ontwikkeling van dit ziektebeeld door het virus wordt gebruikt als model voor het bestuderen van de moleculaire basis van bepaalde vormen van bloedkanker in mensen.¹¹

Murine embryonic stem cell virus

MESV is een retrovirale vector die is afgeleid van een mutant van het *Myeloproliferative sarcoma virus* genaamd PCC4-cell-passaged myeloproliferative sarcoma virus (PCMV).¹² Dit virus komt tot expressie in embryonale carcinoma's, maar niet in embryonale stamcellen. Doordat bepaalde sequenties in de 5' untranslated regions vervangen zijn met sequenties afkomstig van de dl587 mutant van MoMLV, is MESV zowel actief in embryonale carcinoma's als in embryonale stamcellen van de muis.¹²

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens een behandelmethode te testen waarbij genetisch gemodificeerde T-cellen worden gebruikt die melanoomcellen kunnen herkennen en vernietigen. In deze studie worden autologe T-cellen van stadium IV melanoompatiënten *ex vivo* getransduceerd met de retrovirale vector MP71 coderend voor een melanoomspecifieke TCR. De transductie van humane T-cellen vindt plaats in een biologische veiligheidskabinet in een ML-II ruimte met separate luchtbehandeling en onderdruk. De getransduceerde T-cellen worden na een kweekperiode van minimaal 8 dagen en minimaal 3 wasstappen aan de patiënt via intraveneuze infusie teruggegeven.

Op het moment van toediening zijn er volgens de aanvrager geen vrije virusdeeltjes meer aanwezig. De toediening van cellen vindt plaats op een eenpersoonspatiëntenkamer, 7 dagen na voorbehandeling van de patiënten met chemotherapie. Alle patiënten krijgen een eenmalige toediening van maximaal $2,5 \times 10^{10}$ getransduceerde T- cellen.

Op meerdere momenten na toediening van de cellen (bijvoorbeeld 1, 2, 3, 6 en 12 maanden zal 50 ml bloed worden afgenomen bij de proefpersonen. Deze monsters worden getest op TCR expressie, T-cel fenotype en antigen herkenning/functionaliteit. Daarnaast kunnen er enkele tumorbipten genomen worden voor immunologische analyse. Ook worden bloed en urine monsters opgeslagen voor eventuele retrospectieve bepalingen voor replicatiecompetente retrovirussen (RCRs).

Elementen van MP71

De aanvrager maakt voor de studie gebruik van de retrovirale vector MP71 die wordt geproduceerd en gecontroleerd door het bedrijf Eufets AG in Duitsland. De virale vector bevat een transgen dat codeert voor een melanoomspecifieke T-cel receptor. Deze receptor komt na transductie in de autologe T-cel tot expressie. De TCR is reactief tegen melanocyt-differentiatie antigeen hetgeen leidt tot vernietiging van de cel. Tevens komen deze antigenen in gewone melanocyten tot expressie waardoor de T-celreactiviteit kan leiden tot bijwerkingen zoals pigmentafwijkingen, inwendige oog-ontsteking en gehoorverlies of duizeligheid. Echter, deze bijwerkingen zijn relatief mild en indien nodig effectief te behandelen met lokale toediening van corticosteroiden.

De vector is replicatiedeficiënt door het ontbreken van de *gag*, *pol* en *env* genen. In de vector zijn de Long Terminal Repeats (LTRs) vervangen door LTRs gebaseerd op het *Myeloproliferative* MPSV en het SFFV. De 3' LTR is gebaseerd op MPSV terwijl alleen de U3 regio van de 5' LTR gebaseerd is op MPSV. De overige sequenties van de 5' LTR zijn afkomstig van SFFV. Deze LTRs zijn functioneel waardoor de vector niet-zelfinactiverend (niet-SIN) is. Het verschil met een zelfinactiverende (SIN) vector is dat deze laatste het U3 domein met promotor en enhancer sequenties mist wat de kans op mobilisatie van de vector uit het genoom van de gastheer aanzienlijk verminderd. Door de aanwezigheid van functionele LTRs in de onderhavige vector is mogelijke mobilisatie van de vector uit het genoom van de gastheer niet uitgesloten.

Verder bevat MP71 een leader sequentie afkomstig van MESV. In de leader sequentie zijn alle afwijkende startcodons verwijderd die mogelijk zouden kunnen leiden tot translatie van ongewenste eiwitten. Tevens zijn uit MP71 virale sequenties verwijderd waarvan bekend is dat zij makkelijk tot recombinatie leiden.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in 2007 een advies uitgebracht over de omlaagschaling van handelingen met retroviraal getransduceerde cellen met een op MoMLV gebaseerde vector.¹³ De COGEM concludeerde dat handelingen met getransduceerde cellen konden plaatsvinden op ML-I niveau mits aan een aantal aanvullende voorschriften wordt voldaan. Zo moeten de cellen getest worden

op afwezigheid van RCR. Tevens zijn er aanvullende voorschriften opgesteld om te voorkomen dat tijdens de kweekprocedure op ML-II niveau RCR gevormd wordt door insleep van virussen.

Overweging

In de onderhavige aanvraag worden retroviraal getransduceerde T-cellen met genen coderend voor een TCR specifiek voor melanoomgeassocieerde antigenen aan stadium IV melanoompatiënten toegediend. Risico's die hierbij kunnen optreden hebben betrekking op (1) de eventuele vorming en de verspreiding van replicatiecompetent retrovirus of recombinant virus, (2) de aanwezigheid van vrije virusdeeltjes en (3) de effecten van de mogelijke verspreiding van de getransduceerde T-cellen in het milieu. Door deze verspreiding zouden andere personen dan de deelnemende patiënten geïnfecteerd kunnen raken met het ggo of met een recombinant virus.

1. De eventuele vorming en de verspreiding van replicatiecompetent retrovirus of recombinant virus

Vorming van RCRs tijdens productieproces

Een risico bij de productie van retrovirale vectorpartikels is het ontstaan van RCR. De vectorproductie vindt plaats door zogenoemde 293T cellen (humane embryonale niercellen) te transfecteren met een transfervector, een construct coderend voor gag/pol (de packaging vector) en een construct coderend voor het oppervlakte-eiwit afkomstig van *Vesicular stomatitis virus* (de pseudotyping vector). Vervolgens worden de hiermee geproduceerde viruspartikels getransduceerd in PG13 cellen (murine embryo fibroblast cellen) die een construct coderend voor gag/pol en een construct coderend voor het *Gibbon ape leukemia virus* oppervlakte-eiwit (GaLV) stabiel tot expressie brengen. Zowel in de primaire (293T) als de secundaire (PG13) packaging cellen bevinden de virale helper elementen zich dus op twee afzonderlijke plasmiden.

Om potentieel RCR te vormen moeten zowel het *gag-pol* construct als het *env* construct recombineren met de transfervector. Hoewel er regio's van homologie zijn tussen de transfervector en beide packaging en pseudotyping vectoren, acht de COGEM de kans op het ontstaan van RCR tijdens het productieproces zeer klein.

Test op afwezigheid van RCR in aangeleverde vectorbatch

Tijdens het productieproces wordt er op drie verschillende momenten getest op de mogelijke aanwezigheid van RCRs. De detectiegrens van deze test is volgens de aanvrager 1 RCR. De test wordt uitgevoerd op 5% van het virale supernatant of 1% van het totale aantal cellen. Dit betekent volgens de aanvrager dat tijdens transductie minder dan 0.2 RCR aanwezig kan zijn (er wordt 50 ml virus gebruikt per proefpersoon). Echter, de aanvrager toont geen gegevens waaruit blijkt dat de gevoeligheid van 1 RCR wordt bereikt. Tevens ontbreken de resultaten van deze testen. Hierdoor ontbreekt de onderbouwing en kan de COGEM niet verifiëren dat de vectorbatch vrij is van RCR.

Vorming van RCR in patiënt

Een mogelijk risico bij het uitvoeren van de studie zou het ontstaan en de verspreiding van replicatiecompetent retrovirus of recombinant virus kunnen zijn. De verloren functies van de MP71 retrovirale vector zouden gecompenseerd kunnen worden door aanwezigheid van een retrovirus in dezelfde cel als de vector. Echter, de patiënten worden voorafgaand aan de isolatie van T-cellen getest op de aanwezigheid van de retrovirussen HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, waardoor de kans dat een getransduceerde T-cel geïnfecteerd wordt met een dergelijk virus zeer klein is. Daarnaast vertonen de retrovirale vector sequenties geen homologie met humane retrovirussen.

De door aanvrager gebruikte vector is niet-SIN. Echter, door de zeer beperkte replicatie van MoMLV-achtige virussen in humane T-cellen in kweek, leidt de aanwezigheid van intacte LTRs in de vector niet tot een grotere kans op mobilisatie.

Op grond van bovenstaande gegevens acht de COGEM de risico's op het ontstaan van replicatiecompetent retrovirus of recombinant virus verwaarloosbaar klein.

2. Aanwezigheid van vrije virusdeeltjes

Replicatiedeficiënte vrije vectordeeltjes kunnen in het kweekmedium aanwezig zijn als gevolg van achtergebleven inoculum. In geval van een incident kunnen deze deeltjes in het milieu terecht komen. Laboratoriummedewerkers kunnen bijvoorbeeld besmet raken door prikincidenten. Aangezien de deeltjes replicatiedeficiënt zijn, zullen deze slechts eenmalig een cel infecteren. Geïnfecteerde cellen kunnen geen nieuwe replicatiecompetente virusdeeltjes meer maken, zodat de infectie beperkt blijft tot de plaats van besmetting. Afhankelijk van de insertie in het genoom bestaat er een theoretische kans op het ontstaan van tumoren bij besmette laboratoriummedewerkers.

Reductie van de vectordeeltjes wordt bewerkstelligd door de kweek- en wasprocedure. De COGEM heeft in 2005 geadviseerd over de risico's van handelingen met lentiviraal getransduceerde zoogdiercellen bij ingeperkt gebruik. In dit advies wordt een formule gegeven voor de reductie van de vectordeeltjes in de kweken die wordt bewerkstelligd door kweek- en wasprocedures.¹⁴ Het betreft de volgende formule:

$$(20^W * 200^I * 2^{2,4T}) / V \geq 100$$

Hierbij is V de titer van het oorspronkelijke inoculum, W het aantal wasstappen en T de kweektijd in dagen. Met I wordt het aantal inactiverende wasstappen bedoeld met trypsine of humaan serum. Indien geen wasstappen (W of I) worden toegepast kan de betreffende parameter achterwege gelaten worden. Volgens deze formule dient de reductiefactor van het aantal vrije infectieuze vectordeeltjes uiteindelijk 100 maal hoger te zijn dan de oorspronkelijke inoculum dosis. De formule is destijds opgesteld voor lentivirale vectoren. Echter, de COGEM is van mening dat deze formule ook toegepast kan worden op de onderhavige retrovirale vector.

De getransduceerde T-cellen worden na een kweekperiode van minimaal 8 dagen (T) en minimaal 3 wasstappen (W) aan de patiënt gegeven. De inoculum dosis (V) is volgens de aanvrager 1×10^8 . Uit de aangeleverde gegevens blijkt dat er een reductiefactor van vijftig wordt bereikt. Op het moment van toediening zijn er volgens de aanvrager maximaal 0.02 deeltjes in het T-cel preparaat aanwezig. Omdat de COGEM een veiligheidsmarge van minimaal 100 hanteert, acht zij enkele kleine aanpassingen in de kweek, zoals een langere kweekduur of een extra wasstap, noodzakelijk om deze veiligheidsmarge te behalen.

3. Effecten van de mogelijke verspreiding van de getransduceerde T-cellen in het milieu

Tijdens de toediening en bij de afname van monsters is de kans aanwezig dat het ggo vrijkomt en zich verspreidt in het milieu. Tijdens de toediening van de getransduceerde cellen wordt gebruik gemaakt van spuiten met een koppelsysteem zodat er weinig risico is op het losschieten van naalden. Indien het medische personeel toch besmet raakt met de getransduceerde cellen, bijvoorbeeld als gevolg van prikaccidenten, zullen deze cellen direct worden herkend en afgestoten door de afweercellen van de ontvanger. De cellen kunnen alleen overleven wanneer de HLA (Humaan Leukocyten Antigen) moleculen volledig gelijk zijn aan die van de patiënt. De kans dat twee niet verwante individuen volledig HLA-identiek zijn is bijzonder klein, omdat er theoretisch gezien meer dan één miljoen verschillende haplotypen zijn. Bovendien heeft ieder individu twee HLA-haplotypen. In het onwaarschijnlijke geval dat de HLA moleculen volledig gelijk zijn, kan T-celreactiviteit kan mogelijk leiden tot gezondheidsklachten als pigmentafwijkingen, inwendige oog-ontsteking en gehoorverlies of duizeligheid. Echter, deze bijwerkingen zijn relatief mild en indien nodig effectief te behandelen met lokale toediening van corticosteroïden.

Uit eerder onderzoek is gebleken dat getransduceerde T-cellen na toediening enkele maanden aanwezig blijven in patiënten.¹⁵ Vanuit de proefpersonen zouden de getransduceerde T-cellen via bloed of lymfe terecht kunnen komen in het milieu, bijvoorbeeld als gevolg van een verwonding waarbij een open wond ontstaat. Echter, de cellen zijn buiten het lichaam niet levensvatbaar en worden direct afgebroken indien zij in het bloed van een ander persoon terechtkomen.

Conclusie

De aanvrager is voornemens een klinische studie fase I uit te voeren waarbij humane T-lymfocyten retroviraal getransduceerd worden met genen coderend voor een T-cel receptor (TCR) specifiek voor melanoomgeassocieerde antigenen.

Risico's die hierbij kunnen optreden hebben betrekking op (1) de eventuele vorming en de verspreiding van replicatiecompetent retrovirus of recombinant virus, (2) de aanwezigheid van vrije virusdeeltjes en (3) de effecten van de mogelijke verspreiding van de getransduceerde T-cellen in het milieu

De COGEM acht de risico's op het ontstaan van replicatiecompetent retrovirus of recombinant virus na toediening in de patiënt, mede vanwege de afwezigheid van retrovirussen virussen die de

verloren functies van de retrovirale vector zouden complementeren, verwaarloosbaar klein. Daarnaast acht de COGEM de risico's op verspreiding van het ggo verwaarloosbaar klein.

Uit de aangeleverde gegevens blijkt dat er bij de berekening van het aantal vrije virusdeeltjes die na transductie nog aanwezig kunnen zijn, een reductiefactor wordt bereikt die lager is dan de veiligheidsmarge die de COGEM hanteert. De COGEM acht daarom enkele kleine aanpassingen in de kweek, zoals een langere kweekduur of een extra wasstap, noodzakelijk om deze veiligheidsmarge alsnog te behalen.

De virale vector wordt in Duitsland geproduceerd en gecontroleerd door bedrijf Eufets AG. De aanvrager geeft aan dat de detectiegrens van de test 1 RCR is. Hoewel de COGEM van mening is dat de kans zeer klein is dat de vectorbatch replicatiecompetent retrovirus zal bevatten, toont de aanvrager geen gegevens waaruit blijkt dat de gevoeligheid van 1 RCR wordt bereikt. Tevens ontbreken de resultaten van deze testen. Hierdoor ontbreekt de onderbouwing en kan de COGEM niet verifiëren dat de vectorbatch vrij is van RCR.

Indien de getransduceerde T-cellen uit de patiënt vrijkomen zijn de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein, omdat de cellen buiten het lichaam niet kunnen overleven en direct afgestoten zullen worden wanneer zij in een ander lichaam terechtkomen.

Op basis van bovenstaande gegevens kan de COGEM op dit moment niet positief adviseren over de voorgenomen klinische studie fase I.

Referenties

1. EBRO richtlijn melanoom van de huid (2005). www.melanoom.nfk.nl/mmbase/attachments/250084/EBRO_richtlijn_Melanoom_van_de_huid_-_2005
2. Nationaal Kompas Volksgezondheid (2010) <http://www.nationaalkompas.nl/gezondheid-en-ziekte/ziekten-en-aandoeningen/kanker/huidkanker/cijfers-huidkanker-prevalentie-incidentie-en-sterfte-uit-de-vtv-2010/>
3. Stichting Melanoom: www.melanoom.nfk.nl/huidkanker/melanoom
4. Goff SP (2007) Retroviridae: The retroviruses and their replication. In: Fields virology, volume two, fourth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp1401-1441
5. Molony murine leukemia virus safety data sheet. <http://www.pediatrics.ucsd.edu/Research/Labs/Atsushi%20Miyano%20PhD%20Vecto/Safety%20Information/Moloney%20Moloney%20urine%20Leukemia%20virus/Pages/default.aspx> (16-8-2011)
6. Molony murine leukemia virus safety data sheet. <http://www.pediatrics.ucsd.edu/Research/Labs/Atsushi%20Miyano%20PhD%20Vecto/Safety%20Information/Moloney%20Moloney%20urine%20Leukemia%20virus/Pages/default.aspx> (16-8-2011)
7. Donahue RE *et al.* (1992). Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer. *J Exp Med* 176: 1125-35
8. Morgan RA *et al.* (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314:126-9
9. Johnson LA *et al.* (2009). Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer

- regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*. 114:535-46
10. Stocking C *et al.* (1985). Long terminal repeat sequences impart hematopoietic transformation properties to the myeloproliferative sarcoma virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:5746-5750
 11. Cmarik J & Ruscetti S (2010). Friend Spleen Focus-Forming Virus Activates the Tyrosine Kinase sf-Stk and the Transcription Factor PU.1 to Cause a Multi-Stage Erythroleukemia in Mice. *Viruses* 2010 2: 2235-2257
 12. Grez M *et al.* (1990) Embryonic stem cell virus, a recombinant murine retrovirus with expression in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:9202-9206
 13. COGEM 2007. Omlaagschaling van handelingen met retroviraal getransduceerde cellen. Advies CGM/070405-02
 14. COGEM 2005. Advies Handelingen met lentivirale vectoren getransduceerde zoogdiercellen. Advies CGM/051215-01
 15. Morgan RA *et al.* (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314:126-9