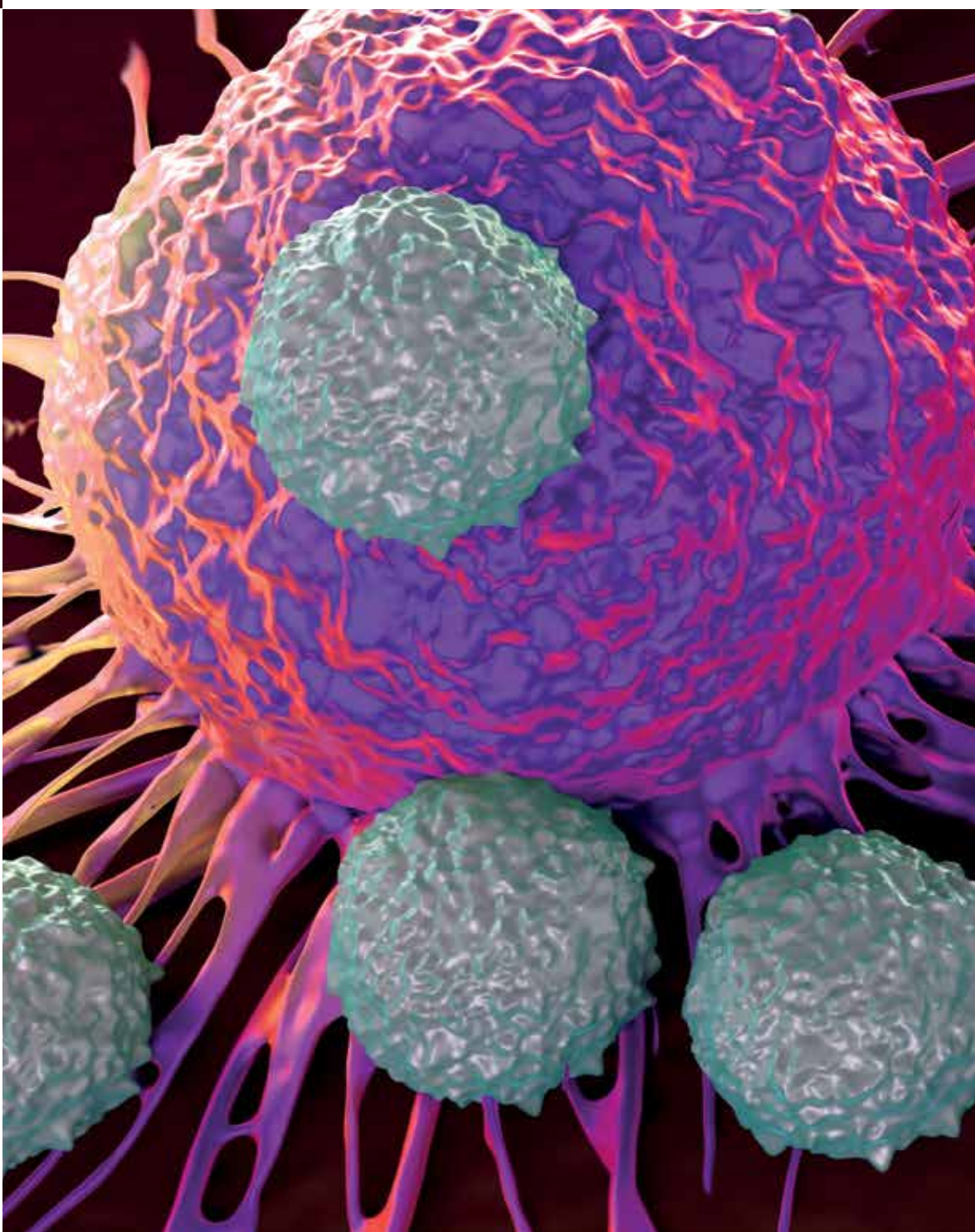
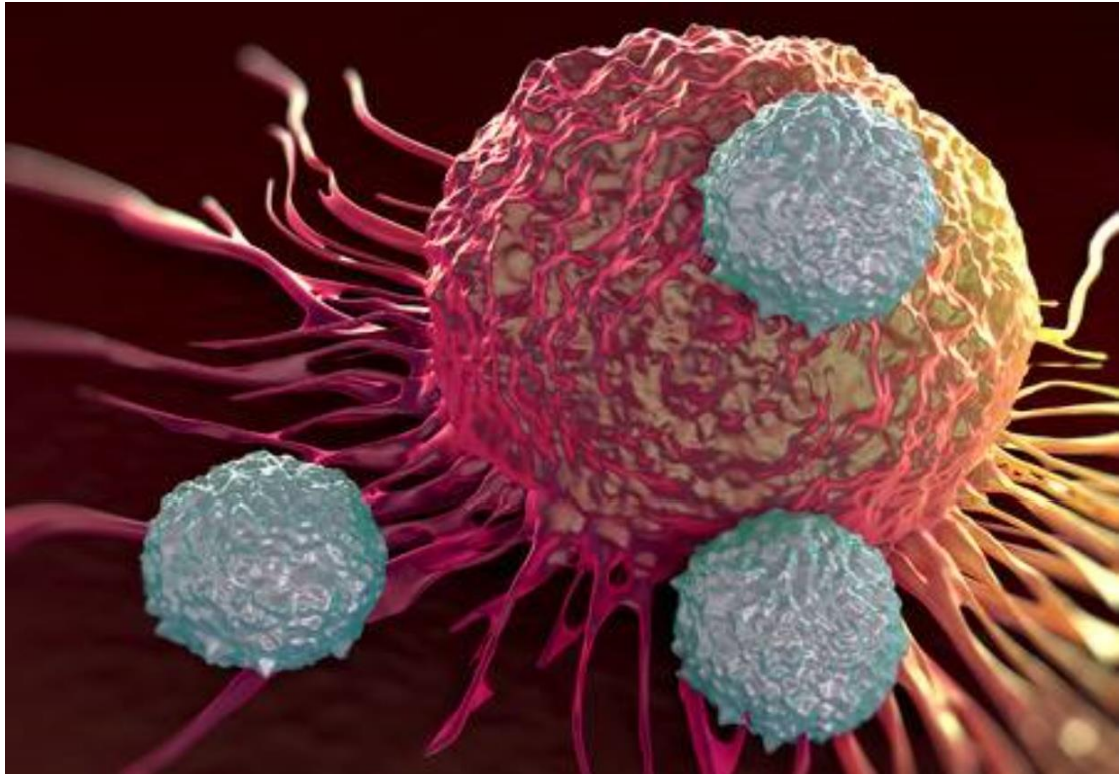


Milieurisicoanalyse van klinische toepassingen van genetisch gemodificeerde T-cellen



CGM 2018-05

ONDERZOEKSRAAPPORT



Milieurisicoanalyse van klinische toepassingen van genetisch gemodificeerde T-cellen

9 november 2018

Kerngegevens	
Titel:	Milieurisicoanalyse van klinische toepassingen van genetisch gemodificeerde T-cellen
Opdrachtgever:	Commissie Genetische Modificatie (COGEM) Postbus 578 3720 AN Bilthoven Tel. 030-2742777 Contactpersoon: Dr. R. van Gent COGEM secretariaat rogier.van.gent@cogem.net 
Uitvoerders:	Ameco Adviesgroep Milieubeleid (Ameco) Koningslaan 60 3583 GN Utrecht Tel. 030-2545840 Contactpersoon: Drs. H.A.W. Kleinjans r.kleinjans@ameco-ut.nl  in samenwerking met: Nederlands Kanker Instituut Plesmanlaan 121 1066 CX Amsterdam Tel. 020-5122053 Contactpersoon: Dr. J.H. van den Berg jh.vd.berg@nki.nl 
Auteurs:	Dhr. Dr. H. Bergmans, Hans (Ameco) Dhr. Dr. J.H. van den Berg, Joost (NKI) Dhr. Drs. R. Kleinjans, Rik (Ameco)
Begeleidings-commissie:	Mevr. Dr. M.C.W. Feltkamp, Mariet (Voorzitter, Lid COGEM Subcie MV, LUMC) Dhr. Prof. dr. J.P.M. van Putten, Jos (Lid COGEM Subcie MV, UU) Dhr. Dr. R. van Gent, Rogier (COGEM secretariaat)
Datum rapport:	16 november 2018
Illustratie titelpagina:	T-cellen vallen een tumorcel aan
	- Dit rapport is samengesteld in opdracht van de COGEM. De mening die in het rapport wordt weergegeven is die van de auteur(s) en weerspiegelt niet noodzakelijkerwijs de mening van de COGEM. - This report was commissioned by COGEM. The content of this publication is the sole responsibility of the author(s) and does not necessarily reflect the views of COGEM.

Voorwoord

Immuuntherapie speelt een steeds belangrijkere rol in de behandeling van kanker. Momenteel betreft dit vooral de toediening van gezuiverde antistoffen met een grote specificiteit voor een bepaald tumo-
rantigeen of celreceptor. Naast deze 'humorale' aanpak, wordt ook getracht de cellulaire immuniteit van een kankerpatiënt in te zetten tegen zijn tumor. Tot voor kort richtte deze manier van immuun-
therapie zich vooral op het *in* of *ex vivo* stimuleren en verrijken van T-cellen met een natuurlijke anti-
geenspecificiteit voor de betreffende tumor. Recent onderzoek heeft aangetoond dat ook T-cellen met
een artificiële antigeenspecificiteit gegenereerd kunnen worden die een sterke cytotoxische anti-tu-
mor werking hebben. Het stimuleren en transduceren van autologe T-cellen met een recombinant chi-
mere antigeenreceptor (CAR), en het vervolgens toedienen van dit preparaat aan een patiënt blijkt
een krachtige manier te zijn om tumorcellen te vernietigen waardoor de patiënt kan overleven.

Aangezien het bij CAR T-celtherapie gaat om introductie van een genetisch-gemodificeerd organisme (ggo), heeft de COGEM in haar adviezen al een aantal keer stil gestaan bij het eventuele risico op ver-
spreiding daarvan naar derden en naar het milieu. Hierbij lag de focus nogal eens op inschatting van
de kans op het ontstaan van een replicerend recombinant virus uit de virale vector die gebruikt werd
bij het inbrengen van het CAR-coderende DNA in de T-cellen. De kans op overleving van de CAR T-cel-
len zelf, in het milieu of in een accidentele (immuuncompetente) ontvanger bijvoorbeeld na een prik-
accident, werd verwaarloosbaar klein geacht. Over het potentiële risico van overdracht van CAR T-cel-
len van moeder naar kind, zoals die kan plaatsvinden via de placenta en via moedermelk, was onvol-
doende kennis beschikbaar om hier een uitspraak over te doen. Gezien de toegenomen kans op over-
leving van (jonge, vrouwelijke) kankerpatiënten en de daaraan gekoppelde mogelijke kinderwens,
dient in het kader van T-celtherapie weldegelijk over deze mogelijke ggo-transmissie te worden nage-
dacht, ten einde over de risico's ervan te kunnen adviseren. Eenzelfde redenering kan gevolgd worden
als het gaat om overdracht van T-cellen via orgaantransplantatie, bloedtransfusie en seksueel contact.

De relatieve onbekendheid met T-cel fysiologie, waaronder T-cel ontwikkeling, overleving en functio-
naliteit, heeft de COGEM ertoe gebracht om een onderzoek te laten uitvoeren naar deze aspecten. De
resultaten van dit onderzoek beschreven in dit rapport leveren een aantal belangrijke conclusies en
aanbevelingen op, bijvoorbeeld ten aanzien van de (lange) levensduur van sommige T-cel subsets, hun
(blijvend) vermogen tot expansie, en de immunotolerantie voor (maternale) T-cellen in een nakome-
ling of een afweeronderdrukte transplantatie-ontvanger. Over de functionaliteit van gg(-CAR)-T-cellen
van maternale of donor oorsprong en eventuele complicaties daarvan, bijvoorbeeld een verstoorde
rijping van het foetale immuunsysteem, kon minder gezegd worden door gebrek aan gegevens.

De auteurs concluderen dat de kans op overdracht van gg-T-cellen, met name in het kader van zwan-
gerschap en borstvoeding reëel is, en dat met dit feit rekening moet worden gehouden in de advise-
ring ten aanzien van het gebruik van gg-T-cellen. Om de uiteindelijke impact van overgedragen gg-T-
cellen te beoordelen is nog meer onderzoek nodig naar de functionaliteit en schadelijke effecten van
gg-T-cellen op termijn, zowel in behandelde patiënten en hun nakomelingen als in (proefdier)model-
len. In zijn totaliteit is de Begeleidingscommissie van mening dat dit rapport een schat aan informatie
biedt over dit onderwerp en een belangrijke bijdrage zal leveren aan de milieurisico-analyse ten aan-
zien van het toenemend gebruik van gg(-CAR)-T-cellen.

Mariet Feltkamp, voorzitter Begeleidingscommissie namens de COGEM

Inhoud

Voorwoord	3
Inhoud	4
Samenvatting	6
Executive Summary	10
1 Inleiding	14
1.1 Aanleiding van het onderzoek	14
1.2 Doel van het onderzoek	15
1.3 De MRA van klinische studies	15
1.4 Eerdere COGEM adviezen betreffende toepassing gg-T-cellen	17
2 Overdracht van niet-gemodificeerde T-cellen	19
2.1 Eigenschappen van T-cellen	19
2.2 Overdracht van T-cellen	21
2.2.1 Overdracht van maternale T-cellen naar de foetus, via de placenta	21
2.2.2 Overdracht van maternale T-cellen naar het kind, via borstvoeding	22
2.2.3 Overdracht van T-cellen, via donatie van weefsel/organen en bloed	24
2.2.4 Overdracht van T-cellen, via seksueel contact / semen	25
2.2.5 De kans op overdracht van gg-T-cellen: overwegingen voor de MRA	25
3 Therapeutisch gebruik van gg-T-cellen	27
3.1 ACT met niet-gg-T-cellen	27
3.2 Genetische modificatie van de TCR van T-cellen	28
3.2.1 Modificatie van T-cellen met natuurlijke TCRs	28
3.2.2 Modificatie van T-cellen met artificiële receptoren: CARs	29
3.2.3 Op weg naar een 'universele' T-cel	30
3.3 De mogelijke effecten van gg-T-cellen met (gg-)TCRs en CARs	31
3.3.1 Oorzaak van de schadelijke effecten van een T-cel	31
3.4 Het lot van T-cellen in ACT	35
3.4.1 Levensduur van toegediende T-cellen	35
3.4.2 Het aantonen van gg-T-cellen in bloed	36
3.5 Conclusies over de schadelijke werking van T-cellen t.b.v. de MRA	38
4 Conclusies, beschouwingen en aanbevelingen	40
4.1 De MRA van overdracht van T-cellen	40
4.1.1 Overdrachtswijzen en blootstelling	40
4.1.2 Kans op overdracht hangt af van de levensduur van gg-T-cellen in de patiënt	42
4.1.3 Aard en omvang van de schadelijke effecten van gg-T-cellen	43
4.1.4 Uitvoering van de MRA van overdracht van gg-T-cellen	43
4.2 Toepassing van het voorzorgbeginsel; juridische implicaties	45
4.3 Aanbevelingen	47
Referenties	49
Bijlage 1	56

Afkortingen

APC	antigeen presenterende cel
ACT	adoptive cell transfer
CAR	chimere antigeenreceptor
CCMO	Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek
CD	cluster of differentiation
CEA	carcinoembryonic antigen
CMV	cytomegalovirus
COGEM	Commissie Genetische Modificatie
CRISPR-Cas	clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated genes
CTA	cancer-testis antigen
DTH	delayed type hypersensitivity
EBV	Epstein-Barr virus
ErbB	human epidermal growth factor receptor
gg	genetisch gemodificeerd
ggo	genetisch gemodificeerd organisme
gp100	glycoprotein 100
FIV	Feline immune deficiency virus
GVHD	graft versus host disease
GVT	graft versus tumor
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	human leukocyte antigen
HSCT	hematopoietische stamceltransplantatie
IenW	(Ministerie van) Infrastructuur en Waterstaat
MAGE	melanoma-associated antigen
MART	melanoma-associated antigen recognized by T cells
MELOE	melanoma-overexpressed antigen
MHC	major histocompatibility complex
MMc	maternale microchimere
MRA	milieurisicoanalyse
NIMA	non-inherited maternal antigen
NTS	Nederlandse Transplantatie Stichting
NY-ESO	New York esophageal squamous cell carcinoma
PBL	perifere lymfocyten (peripheral blood lymphocytes)
RCL	replicatie competent lentivirus
RCR	replicatie competent retrovirus
SAE	serious adverse event
SIV	Simian immunodeficiency virus
SOT	solide orgaan transplantatie
T _{CM}	central memory T-cel
TCR	T-cel receptor
T _{EM}	effector memory T-cel
TIL	tumor infiltrating lymphocyte
T _{REG}	regulatoire T-cel
T _{SCM}	stem cell memory T-cellen
VWS	(Ministerie van) Volksgezondheid, Welzijn en Sport

Samenvatting

Er wordt steeds meer onderzoek gedaan naar de inzet van genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) bij de behandeling van patiënten die aan kanker leiden. In de afgelopen jaren zijn er in klinische studies hoopvolle resultaten geboekt bij kankerbestrijding met genetisch gemodificeerde (gg-)T-cellen die worden toegediend aan patiënten met het doel om tumorcellen te doden. De goede resultaten zullen naar verwachting leiden tot een toename van het aantal klinische studies met gg-T-cellen, voor behandeling van tumoren en ook voor andere toepassingen, bijvoorbeeld bestrijding van virale infecties.

Bij deze klinische studies gaat het om introductie in het milieu van ggo's, waarvoor een vergunning nodig is. In de procedure voor de vergunningverlening voor deze klinische studies wordt een milieurisico-analyse (MRA) uitgevoerd. Milieurisico's kunnen zich voordoen als derden in contact komen met de aan de patiënt toegediende ggo's. Overdracht van gg-T-cellen kan plaatsvinden bij weefsel- en orgaantransplantatie en bloedtransfusie, waarbij een met gg-T-cellen behandelde patiënt als donor optreedt. Ook kan overdracht van gg-T-cellen plaatsvinden van een behandelde moeder naar haar (ongeboren) kind, via de placenta of door het geven van borstvoeding. De Commissie Genetische Modificatie (COGEM) wil met dit rapport inzicht krijgen in de eventuele risico's die verbonden zijn aan overdracht van gg-T-cellen langs deze wegen. Deze inzichten kunnen mogelijk worden meegenomen in de MRA en de basis vormen van COGEM adviezen over introductie van ggo's in het milieu.

Hoofdstuk 1 geeft achtergronden van de MRA die wordt uitgevoerd in het kader van de ggo-vergunningverlening. De omvang van een risico wordt bepaald aan de hand van 1) de kans dat er blootstelling aan het ggo plaatsvindt en 2) de schadelijke effecten in aard en omvang die het gevolg kunnen zijn van de blootstelling. Hoofdstuk 1 biedt tevens een overzicht van adviezen die de COGEM tot op heden over de MRA van klinische studies met gg-T-cellen heeft uitgebracht. In de adviezen wordt gewezen op de mogelijkheid van overdracht van gg-T-cellen bij transplantatie en bloedtransfusie, en door overdracht van moeder naar kind, maar er wordt nog geen uitgebreide analyse gegeven of hier risico's aan verbonden zijn.

Hoofdstuk 2 presenteert de huidige kennis van de biologie van T-cellen en hun T-cel receptor (TCR), waarmee zij een specifiek antigeen op hun doelwitcel herkennen. In dit rapport ligt de nadruk op de werking van cytotoxische T-cellen, die bijvoorbeeld een antigeen op tumorcellen kunnen herkennen waarna zij de cel doden. Zij kunnen ook andere cellen aanvallen als die het antigeen dragen dat door de T-cel worden herkend. Ook andere T-cellen worden beschreven, bijvoorbeeld regulatoire T-cellen die de cytotoxische activiteit van T-cellen kunnen onderdrukken (tolerantie). Een belangrijke eigenschap van T-cellen is dat zij, na stimulering door het antigeen dat door hun TCR wordt herkend, worden aangezet tot expansie: celdeling, waarbij grote aantallen T-cellen worden gevormd.

Vervolgens gaat dit hoofdstuk in op wat er bekend is over de mogelijkheden van overdracht van T-cellen van het ene naar het andere individu.

Tijdens een zwangerschap vindt er via de placenta uitwisseling plaats van lymfocyten, o.a. T-cellen, tussen de zwangere vrouw en de foetus. Deze uitwisseling leidt tot de aanwezigheid van maternale microchimere (MMc) cellen in de foetus, die zeer lang, soms levenslang, aanwezig blijven in de nakoeling. Overgedragen MMc cellen veroorzaken immunologische effecten, zoals tolerantie van de nakoeling voor *non inherited maternal antigens* (NIMAs) van de moeder. Overdracht van T-cellen via

borstvoeding is met name aangetoond in een aantal dierstudies. Ook deze overdracht leidt tot micro-chimerie, en tot immunologische effecten. Als de moeder gg-T-cellen draagt is er dus een kans dat deze worden overgedragen naar het kind, zowel via de placenta als via borstvoeding.

Bij transplantatie wordt onderscheid gemaakt tussen hematopoietische stamcel transplantatie (HSCT) en transplantatie van solide organen (solide orgaan transplantatie, SOT). Bij HSCT worden, naast de stamcellen, ook gedifferentieerde T-cellen overgedragen. Dat blijkt, bijvoorbeeld, uit het optreden van *graft versus host disease* (GVHD) als complicatie. Ook bij SOT kunnen T-cellen worden overgedragen. Op basis van deze gegevens kan geconcludeerd worden dat als de donor gg-T-cellen draagt, er een kans is dat deze met het transplantaat worden overgedragen naar een ontvanger. Hetzelfde geldt voor overdracht van (gg-)T-cellen tijdens bloedtransfusie. Weliswaar worden er routinematig lymfocyten verwijderd uit de erythrocytenfractie van het bloed, maar er blijven doorgaans T-cellen achter, die onder bepaalde omstandigheden schadelijke effecten kunnen veroorzaken na transfusie, bijvoorbeeld in gevallen dat de kans op eliminatie van de ontvangen (gg-)T-cellen door het immuunsysteem van de ontvanger gering is. Aldus kan overdracht van gg-T-cellen voor geen van bovenstaande wijzen van overdracht worden uitgesloten.

Tenslotte beschrijft dit hoofdstuk de mogelijkheid van overdracht van T-cellen via semen, bij seksueel contact. Die mogelijkheid bestaat maar de kans op overleving van eventueel overgedragen T-cellen, en het daarmee optreden van schadelijke effecten in de ontvanger, lijkt verwaarloosbaar. Het risico van overdracht van gg-T-cellen via semen is daarmee eveneens verwaarloosbaar.

Hoofdstuk 3 beschrijft het therapeutisch gebruik van T-cellen en de mogelijk nadelige effecten die daaraan verbonden zijn, en het belang daarvan voor de MRA van gg-T-cellen.

Een 'proof of principle' dat cytotoxische T-cellen bruikbaar zijn in tumortherapieën werd geleverd door de succesvolle *adoptive cell transfer* (ACT) van tumor infiltrating lymphocytes (TILs). Hierbij worden T-cellen uit de patiënt *ex vivo* opgekweekt en teruggebracht in de patiënt. De anti-tumor werking van de TILs berust op de aanwezigheid van cytotoxische T-cellen die specifiek zijn voor de tumorcellen. Als de patiënt dergelijke T-cellen niet zelf al draagt dan kunnen deze beschikbaar worden gemaakt door de genen die coderen voor de gewenste TCR via genetische modificatie *ex vivo* in te brengen in T-cellen van de patiënt en de getransduceerde cellen in de patiënt te brengen. De TCR genen kunnen bijvoorbeeld worden geïsoleerd uit cytotoxische T-cellen van een andere patiënt, die de gewenste specificiteit bezitten.

Een belangrijke ontwikkeling om het scala aan antigenen dat wordt herkend door T-cellen te verruimen is de ontwikkeling van de chimere antigeenreceptor (CAR). Een CAR lijkt in opbouw op een TCR: er is een trans-membraan domein gekoppeld aan intracellulaire domeinen die zorgen voor de activering van de T-cel. Het antigeen-herkend domein van de CAR buiten de cel kan bijvoorbeeld het variabele deel zijn van een (monoclonaal) antilichaam gericht tegen een antigeen van de tumorcel. In principe kan er voor ieder oppervlakteantigeen van een tumorcel een CAR worden geconstrueerd.

ACT is vooral succesvol als daarbij autologe T-cellen worden gebruikt. Heterologe T-cellen zullen vaak worden geëlimineerd door het afweersysteem van de ontvanger; zij kunnen ook GVHD veroorzaken in de ontvanger. Toch zou het, uit oogpunt van beschikbaarheid van de therapie, gunstig zijn om 'univer-

sele' T-cellen te ontwikkelen die antigenen herkennen die veel voorkomen op bepaalde typen tumoren, en die inzetbaar zijn in heterologe ACT doordat de reacties die voor eliminatie en GVHD zorgen, zijn uitgeschakeld. Dergelijke 'universele' T-cellen zijn momenteel in ontwikkeling.

De gewenste reactie bij klinische toepassing van cytotoxische gg-T-cellen is het doden van de doelwitcellen. Zij kunnen echter ook schadelijke bijwerkingen hebben, doordat het door de TCR of CAR herkende antigeen ook op andere, gezonde cellen voorkomt die dan ook worden herkend en gedood, het '*on-target off-tumor effect*'. Deze effecten zullen minder ernstig zijn of zelfs niet voorkomen als het herkende antigeen uitsluitend op de tumorcellen en niet op andere cellen voorkomt. Voor behandeling van melanomen wordt bijvoorbeeld gekozen voor antigenen van eiwitten die specifiek op melanocyten voorkomen, of voor antigenen van eiwitten die een rol spelen tijdens embryogenese en daarna worden uitgeschakeld, maar in tumoren soms weer worden aangeschakeld. In de MRA van de overdracht van gg-T-cellen moet er rekening mee worden gehouden dat de expressie van deze eiwitten anders kan zijn in de ontvanger dan in de patiënt. Eiwitten uit de embryogenese kunnen bijvoorbeeld wél tot expressie komen in een foetus. Verder kan de TCR of CAR van de T-cel in een kruisreactie een ander antigeen herkennen op een gezonde cel, wat kan leiden tot een schadelijk '*off-target off-tumor effect*'. De kans van optreden van een *off-tumor effect* is het kleinst als de T-cel een antigeen herkent dat specifiek is voor de tumorcel, bijvoorbeeld een gemuteerd eiwit, een 'neo-antigeen', dat uitsluitend zal voorkomen in de (tumor)cel die de mutatie draagt.

On-target en *off-target off-tumor* effecten kunnen slechts tot op zekere hoogte worden voorspeld. Er is daarom gezocht naar mogelijkheden om T-cellen na ACT 'terug te kunnen roepen' in het geval er ernstige schadelijke effecten in de patiënt optreden. Dat kan bijvoorbeeld doormiddel van het inbrengen van '*suicide switches*' in de gg-T-cel.

De kans dat na ACT van gg-T-cellen schadelijke effecten optreden wanneer de gg-T-cellen worden overgedragen naar een derde, is onder meer afhankelijk van de overleving van de overgedragen gg-T-cellen. Die is afhankelijk van de mogelijkheid dat er afstoting plaatsvindt van de T-cellen. Bij overdracht via transplantatie bijvoorbeeld, zullen, afhankelijk van de vorm van transplantatie, afstotingsreacties worden onderdrukt. Daarnaast speelt het type overgedragen T-cellen, effector cellen of *central memory* cellen, een rol, en de kans dat overgedragen T-cellen worden aangezet tot deling door activering door het antigeen dat zij herkennen.

Een eerste voorwaarde voor overdracht van gg-T-cellen naar derden is de aanwezigheid van gg-T-cellen in de patiënt. In verschillende studies worden gegevens verschaft over de duur van de aanwezigheid van toegediende (gg-)T-cellen in een patiënt. T-cellen worden teruggevonden op tijdstippen wisselend van minder dan een jaar tot meer dan 16 jaar (wat in dat geval de halfwaardetijd is). Het is methodologisch onmogelijk om de afwezigheid van gg-T-cellen te bewijzen. Er moet daarom rekening worden gehouden dat er na toediening van gg-T-cellen aan een patiënt overdracht naar derden kan optreden. Wel kan er meer zekerheid worden verkregen dat de gg-T-cellen zijn verdwenen als er een mechanisme is waarmee de gg-T-cellen actief kunnen worden geïnactiveerd, zoals de verschillende vormen van '*suicide switches*' die in hoofdstuk 3 worden behandeld, en als dat mechanisme is geactiveerd.

Hoofdstuk 4 geeft een overzicht van de MRA van mogelijke overdracht en effecten van gg-T-cellen van een patiënt naar derden, op basis van de gegevens uit de hoofdstukken 2 en 3. De MRA bevat een groot aantal onzekerheden: 1) de kans op overdracht verschilt per overdrachtsweg, maar is niet uit te sluiten; 2) de overlevingskansen van overgedragen gg-T-cellen verschillen per situatie; 3) de mogelijke schadelijke effecten van overgedragen gg-T-cellen verschillen afhankelijk van de gebruikte TCR of CAR. De uiterste risicobeheersingsmaatregel: het verbieden van de behandeling zodat overdracht naar een derde *de facto* niet mogelijk is, zou buiten proporties zijn. De risico's zullen per geval geanalyseerd moeten worden. Daartoe wordt in hoofdstuk 4 een overzicht gegeven van de informatie die daarbij door de vergunningaanvrager aangeleverd kan worden.

Bij de conclusies wordt een aantal opmerkingen geplaatst over juridische aspecten van de vergunningverlening, aangaande de aanwezigheid van ggo's bij transplantatie en bloedtransfusie en bij zwangerschap en het geven van borstvoeding. De zienswijze wordt verdedigd dat het bij de risico's van overdracht van ggo's bij transplantatie en bloedtransfusie gaat om risico's van medisch handelen. In de milieuvergunning kunnen hierover een aantal voorschriften worden opgenomen die echter kunnen worden opgevat als adviezen aan de verantwoordelijke instantie (de Nederlandse Transplantatie Stichting (NTS), en Sanquin, de Nederlandse bloedbank faciliteit), en een behandelend arts. Ook ten aanzien van de risico's van zwangerschap en het geven van borstvoeding wordt ervoor gepleit voorschriften hieromtrent als adviezen te formuleren.

Tenslotte wordt een aantal aanbevelingen gedaan naar aanleiding van de bevindingen in het rapport.

Executive Summary

The use of genetic modification and genetically modified organisms in the research and treatment of cancer is growing. Over the past years cancer therapies using genetically modified (GM) T cells have yielded positive results. The GM T cells are administered to patients with the aim of killing specific tumor cells. It is expected that these hopeful results will lead to an increase in the number of clinical trials with GM T cells.

Clinical trials with GM T cells may lead to the exposure of third parties, i.e., individuals other than the treated patient, to the GM T cells. Exposure may occur through tissue and organ transplantation, and blood transfusion, using organs or blood from a patient who has been treated with GM T cells. Another potential route of transmission of GM T cells is from a treated mother to her unborn child, through the placenta, or to her newborn child through breastfeeding.

The Dutch Advisory Committee on Genetic Modification (COGEM) has commissioned this report in order to get insight into potential risks attached to transfer of GM T cells along these routes of transmission. These considerations can be taken into account in the environmental risk assessments (ERAs) on which the advices of COGEM are based.

Chapter 1 presents an overview of the Dutch legislation regarding genetically modified organisms (GMOs). In this legislation, the exposure of third parties to GMOs, including GM T cells, is seen as deliberate release of GMOs into the environment. The ERA of deliberate release assesses the potential risks of a release on basis of 1.) the chance of exposure to the GMO and 2.) the magnitude of the adverse effect that is the consequence of the exposure. In previous advices COGEM has already pointed out the possibility that GM T cells may be transferred by organ transplantation and blood transfusion, as well as from mother to child.

Chapter 2 of this report presents an overview of the biology of T cells, and the way that T cells recognize their specific target cells through their T cell receptor (TCR). The emphasis of this report is on cytotoxic (CD8⁺) T cells that kill, for instance, tumor cells, but that may also attack normal cells. The cytotoxic activity of CD8⁺ T cells is under the control of regulatory T cells, leading to tolerance. Upon antigen recognition, T cells undergo extensive cell division, resulting in large numbers of antigen-specific T cells.

Chapter 2 then provides an overview of what is known about the possibilities of transfer of T cells from person to person. During pregnancy exchange of lymphocytes, including T cells, occurs between the expecting mother and her unborn child across the placenta. This results in the presence of maternal microchimeric (MMc) cells in the fetus. These MMc cells survive over long periods, even lifelong, in the offspring. MMc cells cause immunological effects in the offspring, e.g., tolerance to non-inherited maternal antigens (NIMAs). Transfer of T cells through breastfeeding has been shown to occur in various animal models. This transfer also leads to the presence of MMc cells in the child, which causes immunological effects. Therefore, if the mother carries GM T cells during pregnancy or lactation, these GM cells may be transferred to the fetus or newborn child, across the placenta or through breastfeeding.

For organ transplantation a distinction can be made between haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) and solid organ transplantation (SOT). In HSCT, primarily stem cells are transferred to the

recipient, but differentiated T cells may also be transferred during treatment, often resulting in the occurrence of graft versus host disease (GVHD). SOT may also lead to the transfer of T cells, which occasionally leads to GVHD. Therefore, if the donor carries GM T cells, there is a possibility that these may also be transferred to the recipient together with the transplant. Survival of the transferred cells will depend on the chance of elimination by the immune system of the recipient, which depends on the type of transplantation, human leukocyte antigen (HLA) matching between donor and competence of the recipient's will have occurred, or the immune system. For blood transfusion a similar situation exists. Although lymphocytes are removed from the erythrocyte fraction ('packed cells') of the blood, that is used for transfusion, some T cells remain. This is apparent from the fact that blood transfusion is known to lead to GVHD in cases where (complete) elimination of donor T cells by the recipient's immune system is unlikely to occur. If the donor carries GM T cells, transfer of these T cells by transfusion with the donated blood cannot be excluded but the chance is small.

The possibility of sexual transfer of T cells is also taken into consideration. Semen may contain T cells, therefore semen of males that have been treated with GM T cells may contain these T cells. The chances of survival of the GM T cells after transfer to another person are considered to be minimal, because after transfer the T cells are likely to be eliminated by the immune system of the recipient. The possibility of sexual transfer of T cells is therefore considered negligible.

Chapter 3 describes the therapeutic use of GM T cells. Proof of principle of the efficacy of cytotoxic T cells in tumor therapies was obtained by the successful adoptive cell transfer (ACT) of tumor infiltrating lymphocytes (TILs). This therapy involves *ex vivo* culturing of TILs isolated from tumor biopsies of the patient, followed by the expansion and infusion of these T cells into the patient. The anti-tumor activity of TILs is based on cytotoxic T cells that recognize and kill tumor cells. If such T cells are not available in the immune repertoire of the patient, T cells carrying the required TCR can be constructed by transducing T cells with a gene construct coding for the polypeptides that make up the TCR. The TCR genes can be isolated from cytotoxic T cells that have proven to be effective against the tumor type.

The range of antigens that are recognized by cytotoxic T cells can be extended by the development of chimeric antigen receptors (CARs). Like a TCR, a CAR contains a transmembrane domain linked to intracellular domains that are functional in activating the T cell. The antigen recognizing domain of the CAR that extends from the cell surface, can be, for instance, the variable domain of a monoclonal antibody that recognizes an antigen on the tumor cell. This offers the possibility to construct a CAR with specificity for, in principle, any antigen located on the surface of a tumor cell.

ACT treatment is successful when autologous T cells of the patient are used, but heterologous T cells will often be eliminated by the immune system of the recipient. They may also cause GVHD in the recipient. Still, the development of a 'universal' heterologous T cell, that can be used 'off the shelf', in various patients, is attractive from the point of view of availability of a cost effective therapy. A successful universal T cell should not be sensitive to elimination by the recipient's immune system, e.g., by inactivating the HLA expression of the T cell, and not cause GVHD, which can be accomplished by inactivating its endogenous TCRs.

Next to the intended effect of killing the target tumor cells, cytotoxic T cells can also cause adverse side effects. If the antigen recognized by the TCR or CAR of the T cell is also expressed on other, normal cells, these cells may be killed as well by the T cell: an 'on-target off-tumor effect'. Depending on the type of healthy cells that are recognized and killed, the off-tumor effect may cause a serious or even lethal serious adverse event (SAE). No SAEs are expected if the antigen recognized by the T cell is exclusively expressed on the tumor cells. This is illustrated by the various types of antigens that may be chosen for treatment of melanomas: differentiation proteins that are specific for melanocytes; proteins that are overexpressed in melanomas; proteins like cancer/testis proteins that have a function in embryogenesis, and that are downregulated later in life but may be expressed again in tumor cells; and so-called neo-antigens, gene products of a gene that carries a mutation that only occurs in the particular tumor.

Differentiation proteins and overexpressed proteins are also present (at least to some extent) in normal melanocytes. Cytotoxic T cells recognizing these antigens may also attack these normal cells, with potential adverse effects. Proteins expressed in embryogenesis are not expected to be present in healthy tissues, but may be expressed in a fetus or young child. T cells recognizing these antigens may cause adverse effects if they are transferred to them. Neo-antigens can be expected to be fully specific for the tumor in which they are expressed, and T cells recognizing these antigens are not expected to cause adverse off-tumor effects. The TCR or CAR may also be crossreactive with another antigen on a healthy cell causing an 'off-target off-tumor effects'. One such effect has already led to a severe SAE.

The possibilities to predict on- and off-target off-tumor effects are limited. Therefore strategies have been developed to inactivate T cells if they show adverse effects after administration to a patient. 'Suicide switches' have been devised that can be installed into a T cell, and can be activated so as to cause instantaneous cell death, should elimination of the GM T cells be necessary because of SAEs.

The likelihood that GM T cells will have adverse effects also depends on their survival after transfer. Survival depends on the likelihood of elimination of the T cells by the immune system of the recipient. In transfer via organ transplantation, for instance, the treatment may involve, dependent on the type of transplantation, suppression of immune reactions in the recipients. In other cases, elimination through the immune system is less likely, because of HLA matching between donor and recipient. Other factors are the phenotype of the transferred T cells, i.e., effector cells or memory cells, and the chance that transferred T cells encounter their cognate antigen in the recipient, followed by expansion of the T cells.

Measurements of survival of (GM) T cells after transfer to a patient show variation from less than a year to a half life of over 16 years. However, no definite proof can be obtained regarding the complete disappearance of GM T cells in blood, only an indication that the number of T cells is below the limit of detection. Therefore, an ERA should take into account that there is a chance of transfer of GM T cells from a patient who has been treated with the GM T cells to a recipient, by (organ) transplantation, blood transfusion, pregnancy or breastfeeding.

Chapter 4 presents an overview of the ERA of the potential transfer of GM T cells from a patient to a third party. The ERA is based on the arguments discussed in chapters 2 and 3. There will be major scientific uncertainty about the arguments underpinning the ERA, therefore the precautionary principle applies. The ultimate risk management measure would be to prohibit the use of GM T cells in clinical

trials, but such a measure would be disproportionate, given the importance of the development of this type of medical treatment.

The risks will have to be assessed on a case-by-case basis. The chance of transfer of GM T cells should be considered low but not unrealistic for pregnancy, breast feeding and organ transplantation, and only minimal to negligible for blood transfusion. The magnitude of the potential adverse effects can be assessed on the basis of information elements that an applicant can supply:

- Which antigen is recognized by the T cell, and in that context, can an estimate be made of the chance of on- and off-target off-tumor effects?
- Have additional modifications been introduced in the T cell to increase the safety, e.g., suicide switches; can these switches be applied in all potential recipients, e.g., also in a young child?
- Have additional modifications been introduced in the T cell, such as a knock-out of an endogenous TCR or the endogenous HLA?
- Have specific safety studies been conducted on the TCR/CAR and what were the results?
- What is the expected duration of survival of the GM T cells after transfer to the patient?

If it cannot be excluded that adverse effects may occur in a recipient of the GM T cells, an estimate should be made of the potential survival of transferred GM T cells in the recipient:

- Is the recipient immune tolerant for the transferred GM T cells?
- What is the likelihood that the transferred GM T cells will be stimulated by their cognate antigen in the recipient?

In a discussion of the legal aspects of licensing of clinical trials with GM T cells, it is argued that the liability for the potential effects of organ transplantation and blood transfusion is with the Dutch Transplant Foundation and with the blood bank facility Sanquin. These organizations should be responsible for performing the ERA described in this report.

The decision to become pregnant and to breastfeed is a primary concern of a woman who has been treated with GM T cells. She should be informed by the ERA, and she should be counseled by her medical advisors regarding the potential risks.

The chapter ends with a summary of recommendations.

1 Inleiding

Dit hoofdstuk presenteert de door de Commissie Genetische Modificatie (COGEM) geformuleerde aanleiding en het doel van het voorliggende onderzoek, dat gericht is op de milieurisico-analyse (MRA) van de klinische toepassing van gg-T-cellen. Vervolgens wordt in paragraaf 1.3 de juridische achtergrond van de vergunningverleningsprocedure toegelicht waarbinnen de MRA wordt uitgevoerd, gevolgd door uitleg over de methodologie van de MRA. Dit hoofdstuk wordt afgesloten met een kort overzicht van eerdere adviezen van de COGEM over klinische toepassingen van gg-T-cellen en van de MRAs die aan die adviezen ten grondslag liggen. Daarbij wordt verwezen naar een bijlage waarin de COGEM adviezen worden samengevat.

1.1 Aanleiding van het onderzoek

De COGEM heeft de aanleiding voor het onderzoek als volgt geformuleerd:

“In de afgelopen jaren zijn er in (vooralsnog kleine) klinische studies hoopvolle resultaten geboekt met gg-T-cellen om verschillende vormen van kanker te bestrijden. De gg-T-cellen worden aan patiënten¹ gegeven met als doel om een effectieve afweerreactie tegen tumoren te genereren. Voor verschillende typen tumoren is aangetoond dat deze benadering kan werken en het aantal wereldwijd uitgevoerde klinische proeven met gg-T-cellen neemt dan ook toe.

Ook in Nederland worden klinische studies met gg-T-cellen uitgevoerd. In deze experimenten worden T-cellen van patiënten of van gezonde donoren ex vivo (buiten het lichaam) genetisch gemodificeerd zodat de gg-T-cellen een receptor op hun oppervlak tot expressie brengen die specifieke antigenen op tumorcellen kan herkennen. Nadat de gg-T-cellen weer zijn ingebracht in de patiënt kunnen tumorcellen door de gg-T-cellen herkend en vernietigd worden.

Bij het gebruik van lichaamsvreemde donor T-cellen, bijvoorbeeld omdat de patiënt zelf niet voldoende T-cellen aanmaakt, kan het noodzakelijk zijn om de T-cellen ook dusdanig genetisch te modificeren dat ze niet als lichaamsvreemd herkend en vernietigd worden. Een andere modificatie die aangebracht kan worden in het geval van o.a. leukemiepatiënten, is er op gericht dat de T-cellen niet herkend en vernietigd worden door antilichamen die als onderdeel van de behandeling aan patiënten worden toegediend. Aangezien het hier gentherapie betreft, d.w.z. toepassing van ggo's bij mensen, vallen deze klinische studies onder de ggo-regelgeving en moet een MRA worden uitgevoerd. Deze MRA richt zich hoofdzakelijk op de werkzaamheden met, en het eventuele verspreidingsrisico van de virale vector gebruikt om de gemodificeerde antigeenreceptor te introduceren.

Hoewel de behandeling voor de betrokken patiënten risico's met zich mee kan brengen, lijken de risico's voor derden² (c.q. het milieu) beperkt tot afwezig. De gg-T-cellen kunnen zich niet handhaven buiten het lichaam en kunnen zich zodoende niet verspreiden naar derden. Een uitzondering hierop vormen bloed-, weefsel- en orgaandonaties, waarbij ook T-cellen kunnen worden overgedragen. Om te voorkomen dat gg-T-cellen zich op een dergelijke wijze verspreiden naar derden, worden behandelde

¹ Het gaat in dit rapport om de MRA van klinische studies met gg-T-cellen. De deelnemers aan deze studies zijn patiënten die in gespecialiseerde ziekenhuizen een behandeling ondergaan. In het kader van deze studie zouden zij ook kunnen worden gezien als 'proefpersonen'. Gekozen is echter voor de term 'patiënten'; waar in de tekst de term 'patiënt' wordt gebruikt kan dus ook de term 'proefpersoon' worden gelezen.

² 'Derden' zijn de 'niet-patiënten', dus alle personen die niet de klinische behandeling ondergaan.

proefpersonen levenslang uitgesloten van donatie. Levenslang, omdat (bepaalde subsets van) T-cellen een jarenlange levensduur hebben en aangenomen wordt dat gg-T-cellen eenzelfde levensduur kennen. Deze opgelegde beperking roept een aantal additionele vragen op, aangezien T-cellen ook kunnen worden overgedragen van moeder naar (ongeboren) kind, zowel via de placenta als via moedermelk. Zo is het onduidelijk in welke mate gg-T-cellen worden overgedragen op het ongeboren kind tijdens een zwangerschap van een behandelde patiënt, en of het noodzakelijk is dat patiënten behandeld met gg-T-cellen uitgesloten worden van het geven van borstvoeding. Daarnaast is het onduidelijk of overdracht van gg-T-cellen daadwerkelijk risico's met zich meebrengt voor het (ongeboren) kind. Specifieke vragen die hierbij onder meer spelen zijn:

- *hoe lang overleven (al dan niet) ex vivo geëxpandeerde (gg-)T-cellen eigenlijk in het lichaam van de behandelde patiënt?*
- *hoeveel T-cellen en welke typen T-cellen worden overgedragen tijdens de zwangerschap, via moedermelk en via bloed-, weefsel- en orgaandonatie?*
- *hoe lang overleven de 'gedoneerde' T-cellen vervolgens in hun nieuwe gastheer, en wat zijn de mogelijke effecten in het blootgestelde kind, en de ontvangers van donororganen, -weefsels en bloed?*

Bij bovengenoemde vragen spelen mogelijk de exacte modificaties in de gg-T-cel een rol, maar ook de rijpheid of conditie van het immuunsysteem van de ontvanger."

1.2 Doel van het onderzoek

De COGEM heeft het doel van het onderzoek als volgt geformuleerd:

"De COGEM wil graag:

- 1) *inzicht verkrijgen in eventuele risico's voor kinderen die voor, tijdens of na hun geboorte zijn blootgesteld aan gg-T-cellen afkomstig van moeders die eerder behandeld zijn met gg-T-cellen, waarbij een mogelijk nadelig effect op het rijpend immuunsysteem ook aandacht verdient. Dit is van belang voor de MRA bij klinische gentherapiestudies met T-cellen en het voorschrijven van eventuele maatregelen. Daarnaast geven de resultaten de betrokken patiënten ook inzicht in de aan- of afwezigheid van risico's voor hun kinderen.*
- 2) *inzicht verkrijgen in de risico's verbonden aan bloed-, weefsel- en orgaandonaties door personen die eerder behandeld zijn met gg-T-cellen en de eventuele tijdstermijnen verbonden aan het opleggen van maatregelen. Bij het in kaart brengen van deze risico's dient oog te zijn voor het type transplantatie of transfusie (solide orgaan, beenmerg of bloedcomponent), en voor de conditie van het immuunsysteem van de ontvanger, d.w.z. onderdrukt (bijv. bij een niertransplantatie) of gedepleteerd (bij allogene beenmergtransplantatie)."*

1.3 De MRA van klinische studies

Het Besluit genetisch gemodificeerde organismen (verder 'het Besluit ggo') bepaalt dat doelbewuste introductie van ggo's in het milieu alleen plaats mag vinden als uit een vooraf uitgevoerde MRA³ blijkt

³ Voor meer uitleg over de MRA voor ggo toepassingen in het algemeen zie het COGEM rapport 'Analyse van de Europese wet- en regelgeving over genetisch gemodificeerde organismen' ([CGM 2016-05](#)). In de vergunningverleningsprocedure van het Besluit ggo wordt op basis van de MRA de beslissing genomen of een vergunning verleend kan worden.

dat er bij de introductie geen onaanvaardbare risico's optreden voor 'de gezondheid van de mens en het milieu'. Een vergunning onder het Besluit ggo voor een klinische studie met gg-T-cellen wordt afgegeven als uit de MRA blijkt dat de risico's voor mens en milieu aanvaardbaar zijn⁴.

In Nederland worden klinische studies waarbij ggo's worden gebruikt gezien als introductie in het milieu van ggo's, omdat een patiënt die een behandeling met ggo's ondergaat of heeft ondergaan zich na behandeling weer 'in het milieu' kan begeven, ook als hij nog drager is van ggo's. De patiënt wordt vanzelfsprekend niet in juridische zin in zijn of haar vrijheid beperkt; het staat de patiënt op ieder moment vrij⁵ om zich in het milieu te begeven. Daarbij bestaat echter wel de mogelijkheid dat de bij de patiënt behandeling toegepaste ggo's zich in het milieu gaan verspreiden en daarmee wordt rekening gehouden in de MRA.

De MRA

De MRA wordt uitgevoerd als onderdeel van een vergunningverleningsprocedure van het Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat (IenW), krachtens het Besluit ggo. Met betrekking tot de gezondheid gaat het Besluit ggo over de veiligheid van de menselijke gezondheid in algemene zin. Het is niet gericht op de gezondheid van een patiënt die in het kader van een medische handeling wordt blootgesteld aan een ggo. Die veiligheid valt onder wet- en regelgeving waarvoor het Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport (VWS) verantwoordelijkheid draagt. Ethische aspecten van medisch onderzoek bij de mens worden getoetst door de Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek (CCMO). Het [Loket Gentherapie](#) coördineert de procedures die bij de verschillende instanties moeten worden doorlopen, met het doel om deze te stroomlijnen en voor de onderzoekers inzichtelijker te laten verlopen.

De mogelijke milieurisico's van een klinische toepassing van een ggo worden bepaald in een MRA, aan de hand van:

- 1) de eigenschappen van het uitgangsorganisme waaruit het ggo is vervaardigd;
- 2) de nieuwe (en eventueel ook de door de genetische modificatie veranderde oude) eigenschappen die het ggo heeft gekregen door de genetische modificatie, en
- 3) de omstandigheden waaronder het ggo wordt toegepast, die onder meer bepalend zijn voor de blootstelling van mens en milieu aan het ggo.

De MRA volgt een vast stramien dat is vastgelegd in de Europese ggo regelgeving (zie de Richtlijn [2001/18/EG](#); zie ook de uitleg over de MRA van de Europese Commissie in [2002/623/EG](#)). De verandering die door de genetische modificatie is aangebracht in de eigenschappen van het ggo, bijvoorbeeld de toevoeging van een nieuw gen, wijziging van de eigenschappen of de expressie van een bestaand gen of het uitschakelen van de werking van een gen, bepalen, in combinatie met de eigenschappen van het uitgangsorganisme, de door de genetische modificatie veroorzaakte mogelijke schadelijke effecten die kunnen optreden bij de toepassing van het ggo. De omstandigheden van de toepassing bepalen de kans dat een mogelijk schadelijk effect ook daadwerkelijk op kan treden.

De risico's van de toepassing van een ggo worden vastgesteld aan de hand van overwegingen over de ernst van het schadelijke effect en de kans dat dit schadelijke effect optreedt. Afhankelijk van deze

⁵ In vergunningen voor gentherapie wordt gesproken van 'aanvaardbare' risico's, als de risico's verwaarloosbaar zijn. Voor vergunningen voor gentherapie zie de [GGO Vergunningendatabase](#); kies bij 'procedure': 'IM-MV', en bij 'status': 'vergunning onherroepelijk'.

⁶ In een vergunning onder het Besluit ggo kunnen alleen voorschriften worden opgenomen ten aanzien van de behandeling, geen voorschriften die bindend zijn voor een persoon die de behandeling ondergaat.

overwegingen worden de risico's ingeschat van hoog tot verwaarloosbaar (zie ook het COGEM rapport 'Methodology for environmental risk assessments in medical and veterinary biotechnology', [CGM 2012-04](#)). Als uit de MRA blijkt dat de risico's van de handeling met een ggo niet verwaarloosbaar zijn, wordt vervolgens vastgesteld of en hoe de risico's door middel van risicobeheersingsmaatregelen kunnen worden ingeperkt tot verwaarloosbaar. De vergunning wordt in zo'n geval afgegeven met het voorschrift dat de betreffende risicobeheersingsmaatregelen moeten worden uitgevoerd.

De milieurisicobeoordeling van effecten van ggo's kan worden gekenmerkt door een hoge mate van onzekerheid, bijvoorbeeld door ontbrekende kennis. Als een dergelijke onzekerheid bestaat dan moet deze in de risicoanalyse worden beschreven. De onzekerheid zal bij het nemen van een beslissing over het verlenen van een vergunning door de vergunningverlener verder worden geanalyseerd conform het voorzorgbeginsel (zie paragraaf 4.2).

De aanvraagformulieren van Loket Gentherapie, bijvoorbeeld het [Aanvraagformulier Beoordeling van klinisch onderzoek met gentherapeutica - Virale vectoren](#), geven meer uitleg over de MRA zoals die moet worden uitgevoerd voor klinisch gentherapieonderzoek.

1.4 Eerdere COGEM adviezen betreffende toepassing gg-T-cellen

De COGEM heeft in de loop van de tijd diverse adviezen uitgebracht over klinische experimenten met gg-T-cellen. In Bijlage 1 wordt een overzicht van deze adviezen gegeven (met internet links naar de adviezen).

In de adviezen gaat de COGEM in op de volgende twee risico's:

1) de eventuele vorming en de verspreiding van replicatiecompetent (recombinant) virus.

De gg-T-cellen die worden gebruikt zijn vervaardigd met behulp van virale vectoren. Het gebruik van virale vectorsystemen brengt het risico met zich mee dat er in de preparaten infectieus replicatiecompetent virus aanwezig is, dat de T-cellen tijdens het transductieproces kan infecteren.

Dit risico valt buiten het kader van de vragen voor de MRA die in dit rapport wordt behandeld.

2) de effecten van de mogelijke verspreiding van de gg-T-cellen in het milieu.

In de klinische studies waarover de COGEM heeft geadviseerd worden gg-T-cellen intraveneus toegediend aan een patiënt. Er is aangetoond dat (niet-gemodificeerde) T-cellen na intraveneuze toediening minstens 6 maanden tot een jaar aanwezig blijven (Morgan et al., 2006; Kalos et al., 2011; Porter et al., 2011). Daarbij bestaat de kans dat gg-T-cellen buiten het lichaam komen en dus vrijkomen in het milieu, bijvoorbeeld bij handelingen tijdens de toediening en bij monsternamen na de toediening, of bij verwonding van de patiënt. Op een dergelijke manier vrijgekomen gg-T-cellen kunnen niet overleven in het milieu en zullen op die wijze niet worden overgedragen aan derden. Onbedoelde overdracht van gg-T-cellen naar derden kan wel plaatsvinden als een medewerker slachtoffer is van een prikaccident. Echter, de kans is groot dat overgedragen gg-T-cellen hierbij herkend en geëlimineerd worden door het afweersysteem van de, immuun-competente, medewerker.

Overdracht van gg-T-cellen kan ook plaatsvinden bij donatie van bloed en weefsels en organen. In haar analyses van de risico's gaat de COGEM hier niet uitgebreid op in, maar er wordt (bijvoorbeeld in CGM/171013-02) ingestemd met het voornemen van de aanvrager om erop toe te zien dat patiënten afzien van het doneren van bloed(producten) en organen.

In CGM/171013-02 en CGM/180103-02 wordt erop gewezen dat het niet is uitgesloten dat T-cellen via borstvoeding worden overgedragen van moeder op kind. Of overdracht van gg-T-cellen via borstvoeding plaatsvindt, hoe lang (geactiveerde) gg-T-cellen in het kind kunnen persisteren en of hier risico's aan verbonden zijn is niet bekend. Het advies is daarom om patiënten aan wie gg-T-cellen worden toegediend af te laten zien van het geven van borstvoeding. Er wordt aangegeven dat de COGEM, na nader onderzoek, in een later stadium terugkomt op de levensduur van gg-T-cellen, de mogelijke overdracht van gg-T-cellen van moeder op kind, en eventuele risico's van gg-T-cellen voor het kind. Juist de risico's die in deze alinea zijn genoemd vormen de aanleiding voor het onderzoek waarvan voorliggend rapport het resultaat is.

2 Overdracht van niet-gemodificeerde T-cellen

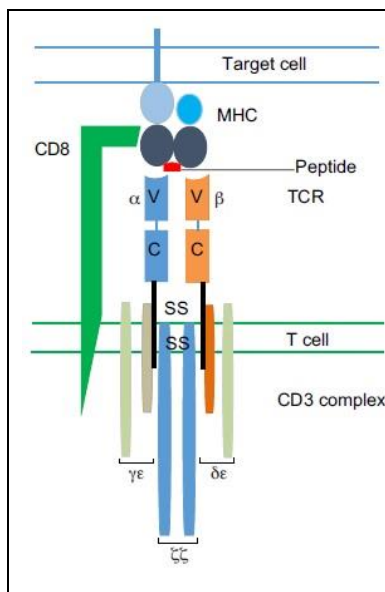
Dit hoofdstuk biedt een algemeen overzicht van de eigenschappen van T-cellen, toegespitst op de functies die in dit rapport aan de orde zijn. Vervolgens wordt ingegaan op de mogelijkheden van overdracht van T-cellen van een behandelde patiënt naar een andere persoon, bij zwangerschap, borstvoeding, geslachtsgemeenschap, weefsel- en orgaandonatie en bloedtransfusie. Deze gegevens vormen de achtergrond voor de MRA van de overdracht van gg-T-cellen, die in Hoofdstuk 3 wordt behandeld.

2.1 Eigenschappen van T-cellen

T-cellen zijn gespecialiseerde cellen binnen het immuunsysteem die over een zeer brede antigeen-herkenning beschikken en een rol spelen bij het herkennen en doden van lichaamsvreemde cellen, cellen met lichaamsvreemde elementen, zoals virus geïnfecteerde cellen, of afwijkende cellen zoals tumorcellen. Dit proces wordt sterk gereguleerd, om te voorkomen dat goed functionerende lichaamseigen cellen worden gedood. Tijdens een zwangerschap zorgt deze regulatie er ook voor dat cellen van de foetus niet worden gedood door T-cellen van de moeder.

T-cellen ontstaan in het beenmerg uit hematopoietische stamcellen. Onder invloed van cytokines ontstaan er pro-T-cellen die in een rijpingsproces in de thymus uitgroeien tot verschillende typen T-cellen. Na het rijpingsproces komen de T-cellen terecht in de perifere bloedcirculatie, in de lymfe en in de (lymfoïde) organen.

T-cellen herkennen antigenen gepresenteerd op andere cellen met behulp van een T-cel receptor (TCR). Figuur 1 geeft de opbouw weer van een TCR. Een TCR bestaat uit 2 ketens, een α en een β keten voor $\alpha\beta$ TCRs. Daarnaast zijn er TCRs met een γ en een δ keten: $\gamma\delta$ TCRs.



Figuur 1 De $\alpha\beta$ TCR (Sharpe en Mount, 2015)

De $\alpha\beta$ TCR, zoals die zich bevindt op het oppervlak van CD8⁺ cytotoxische T-cellen (CD: *cluster of differentiation*), is verantwoordelijk voor de antigeenherkenning. Een TCR bestaat uit twee ketens: de α en β keten. Beide ketens hebben een constant deel (c) en een variabel deel (v). Het variabele deel bepaalt de antigeenspecificiteit. De TCR is geassocieerd met het CD3 complex, dat bestaat uit drie transmembraan signaalmoleculen (CD3 $\zeta\zeta$, CD3 $\delta\delta$ en CD3 $\gamma\gamma$). Een TCR kan een interactie aangaan met een antigeen op een doelwitcel wanneer het doelpeptide wordt gepresenteerd door het juiste MHC (MHC-I voor CD8⁺ cytotoxische T-cellen). Efficiënte activering van de T-cel vereist ook gelijktijdige binding van de T-cel co-receptor (CD8 voor cytotoxische T-cellen). (ss: disulfide brug)

Voor het herkennen van het grote aantal verschillende (peptide) antigenen dat voor kan komen is een grote verscheidenheid aan TCRs nodig. Die verscheidenheid ontstaat door een specifiek recombinatieproces tussen de V(D)J DNA segmenten die de genetische informatie bevatten voor de vorming van de α - en β - (dan wel de γ - en δ -) ketens. Door dit recombinatieproces kan een groot aantal, in de orde van 10^7 , verschillende TCRs worden gevormd. De diversiteit van de ontstane TCRs is random; er ontstaan daarbij TCRs die zowel vreemde als lichaamseigen antigenen herkennen.

Een $\alpha\beta$ TCR herkent een antigeen op een andere cel als het wordt gepresenteerd op een specifiek *major histocompatibility complex* (MHC) van die cel. De TCR is dan 'gerestricteerd' tot dat MHC. In de thymus vindt een positieve selectie plaats van T-cellen die een TCR dragen die, in combinatie met een CD4 of CD8 co-receptor, gerestricteerd zijn tot een lichaamseigen MHC van de juiste klasse: MHC-I voor CD8⁺ T-cellen, MHC-II voor CD4⁺ T-cellen. MHC-I en MHC-II worden bij de mens aangeduid als respectievelijk human leukocyte antigen (HLA) klasse I en II. Zich ontwikkelende T-cellen met $\alpha\beta$ TCRs die niet in staat zijn om MHC te herkennen, worden tijdens de positieve selectie geëlimineerd. Sommige $\gamma\delta$ TCRs zijn eveneens gerestricteerd tot herkenning van MHC-gepresenteerde antigenen, maar er zijn ook $\gamma\delta$ TCRs die andere moleculen op het celoppervlak herkennen.

T-cellen hebben de belangrijke functie dat zij niet-lichaamseigen antigenen herkennen. Herkenning van een antigeen door een CD8⁺ T-cel leidt tot celdood. Een T-cel die antigenen van lichaamseigen cellen herkent zal dus die cellen kunnen doden; herkenning van eigen antigenen moet dus worden voorkomen. Daarom wordt er vroeg in de ontwikkeling van het immuunsysteem tolerantie opgebouwd tegen de herkenning van lichaamseigen antigenen. T-cellen die eigen antigenen met sterke affiniteit herkennen ondervinden negatieve selectie en sterven in de thymus. Een deel van de CD4⁺ T-cellen die eigen antigenen herkennen gaat niet dood en deze T-cellen ontwikkelen zich tot regulatoire T-cellen (T_{REG} cellen), die vanuit de thymus in de periferie terecht komen en daar immunoreacties onderdrukken. T-cellen die in de thymus met lage affiniteit binden aan een eigen antigeen, of die buiten de thymus pas binden aan een eigen antigeen dat niet in de thymus voorkomt, gaan dood in de lymfeklieren, of hun activiteit wordt onderdrukt door CD4⁺ T_{REG} cellen die hetzelfde antigeen herkennen.

De T-cellen die een TCR dragen dat een niet-lichaamseigen antigeen herkent verlaten de thymus als 'naïeve' T-cellen (er heeft nog geen perifere antigeen herkenning plaatsgehad) en circuleren daarna in het lichaam in een rustende staat. Zij kunnen worden geactiveerd door interactie met hun antigeen, als dat op het juiste MHC worden gepresenteerd door een antigeen presenterende cel (APC). De T-cel groeit dan uit tot een kloon van T-cellen die allemaal dezelfde TCR dragen. Bij de uitgroei ontstaan dochtercellen die differentiëren in de richting van memory cellen en effector cellen. Bij CD8⁺ T-cellen worden daarbij verschillende stadia onderscheiden: *stem cell memory T cells* (T_{SCM}), *central memory T cells* (T_{CM}), *effector memory T cells* (T_{EM}) en *effector T cells* (T_{EFF}). De differentiatie wordt geregeerd door een groot aantal factoren die de expressie van (groepen van) genen reguleren (Best et al., 2013). Nadat een infectie is bedwongen en het antigeen niet meer aanwezig is, verdwijnen de T-cellen met een effector fenotype en blijven de T-cellen met een memory fenotype over. Ook CD4⁺ T-cellen kennen T_{CM}, T_{EM} en T_{EFF} stadia.

CD8⁺ T_{EFF} cellen hebben cytotoxische activiteit: zij doden cellen die een antigeen presenteren dat door de CD8⁺ T_{EFF} cel wordt herkend. CD4⁺ T-cellen hebben een helper functie. Een naïeve CD4⁺ T-cel kan onder invloed van verschillende cytokines differentiëren tot een aantal typen T helper (Th) cellen,

waarvan met name Th1, Th2 en Th17 cellen van belang zijn. De verschillende helpercellen onderscheiden zich door de typen cytokines die zij aanmaken, waardoor verschillende cellen van het immuunsysteem worden gestimuleerd, zoals CD8⁺ T-cellen, macrofagen, eosinofiele en neutrofiële granulocyten. T_{REG} cellen onderdrukken de proliferatie en de effectoractiviteit van T-cellen.

T-cellen kunnen ook 'kunstmatig' worden geactiveerd door binding van een antilichaam aan het CD3 deel van het TCR complex (zie figuur 1), wat een vergelijkbaar effect heeft als de binding van het antigeen aan de TCR. Hiervan wordt gebruik gemaakt bij *adoptive cell transfer* (ACT, paragraaf 3.1).

De activering van een T-cel die aanzet tot proliferatie en tot cytotoxische activiteit vindt ook plaats wanneer een chimere antigeenreceptor (CAR) een interactie heeft met het antigeen dat door de CAR wordt herkend (paragraaf 3.2.2).

2.2 Overdracht van T-cellen

Het risico dat derden lopen door overdracht van gg-T-cellen van een met T-cellen behandelde patiënt wordt mede bepaald door de kans dat deze overdracht daadwerkelijk plaatsvindt (zie paragraaf 1.3). Omdat dierlijke cellen niet kunnen overleven in het milieu kan overdracht van (gg-)T-cellen van een patiënt naar een andere persoon alleen plaatsvinden als de cellen daarbij niet aan het milieu worden blootgesteld. Zo'n directe (gg-)T-cel overdracht kan slechts op een beperkt aantal manieren plaatsvinden:

- van moeder naar ongeboren kind, via de placenta (paragraaf 2.2.1);
- van moeder naar geboren kind, via moedermelk (paragraaf 2.2.2);
- van donor naar ontvanger, via transplantatie en transfusie van organen, weefsels of bloed (paragraaf 2.2.3);
- van man naar sexpartner, via seksueel contact (paragraaf 2.2.4).

Er zijn geen experimentele gegevens bekend over de overdracht van gg-T-cellen langs deze wegen van een patiënt naar andere personen, maar er zijn wel gegevens beschikbaar over de overdracht van niet-gg-T-cellen. Informatie daarover wordt in de volgende paragrafen gepresenteerd.

2.2.1 Overdracht van maternale T-cellen naar de foetus, via de placenta

De placenta is een plaats waar cellen van de moeder en de foetus in nauw contact komen met elkaar. Via de placenta vindt er uitwisseling plaats van maternale cellen naar de foetus en omgekeerd, van de foetus naar de moeder, wat leidt tot microchimerie in zowel de moeder als het kind (Kinder et al., 2017). Microchimerie is het resultaat van bidirectionele overdracht van cellen, die 'microchimere cellen' worden genoemd, tussen een moeder en een foetus. De rol die de maternale microchimere (MMc) cellen spelen in het kind is, evenals de rol van foetale microchimere cellen in de moeder, voor een groot deel nog onbekend. MMc cellen blijven langdurig aanwezig en worden na overdracht vanuit de moeder nog gevonden in volwassen nakomelingen. Bij MMc betrokken T-cellen maken een gering deel uit van het totale aantal T-cellen (1 in 5000, het totale aantal overgedragen maternale cellen is in de orde van 10⁶; Loubière et al., 2006; Molès et al., 2017). Kanaan et al. (2017) hebben gekeken naar aantallen MMc cellen in navelstrengbloed. Zij laten zien dat MMc memory T-cellen en naïeve T-cellen overgerepresenteerd zijn in navelstrengbloed.

MMc T-cellen kunnen levenslang aanwezig blijven in het kind. Ondanks hun geringe aantal hebben ze aanwijsbare effecten op het immuunsysteem; zo induceren zij tolerantie tegen non-inherited maternal antigens (NIMAs), waardoor bijvoorbeeld de kans op afstotingsreacties en *graft versus host disease* (GVHD) wordt verlaagd bij weefsel- en orgaandonatie van moeder aan kind (Kinder et al., 2017).

Immuunreacties in de placenta worden sterk gereguleerd om te voorkomen dat er afstotingsreacties en abortus optreden. Tilburgs en Strominger (2012) suggereren dat de activiteit van cytotoxische CD8⁺ T-cellen, ongeacht specificiteit, in de placenta wordt onderdrukt. Dit berust op een balans van een groot aantal immunologische factoren op het foetaal-maternale grensvlak. Die balans kan verstoord worden door bijvoorbeeld virale infecties, die daardoor kunnen leiden tot een (lichte) verhoging van het aantal spontane abortussen. De auteurs van het artikel suggereren dat dit veroorzaakt zou kunnen worden door een verandering van de immunologische balans en vermindering van de onderdrukking van de activiteit van CD8⁺ T-cellen. Memory T-cellen van de moeder gericht tegen paternale antigenen in de foetus, waaronder CD8⁺ memory T-cellen die direct binden aan paternale MHC moleculen, worden niet geactiveerd in de placenta (Tilburgs en Strominger, 2013).

2.2.2 Overdracht van maternale T-cellen naar het kind, via borstvoeding

Moedermelk bevat levende cellen, onder andere leukocyten, waaronder T-cellen. Hassiotou et al. (2013) hebben cel aantallen in moedermelk bij de mens gekwantificeerd, en daarbij het percentage leukocyten bepaald. Colostrum (melk geproduceerd gedurende de eerste vier dagen post partum) bevat tot 2×10^6 cellen/ml, waarvan 13 - 70% leukocyten. Het totaal aantal cellen daalt in de twee weken daarna naar rond 10^5 /ml. Het percentage leukocyten daalt naar waarden van 0 tot 2%. Molès et al. (2018) noemen een aantal van $>10^5$ lymfocyten/ml in moedermelk in de eerste week *post partum*, daalend naar 6×10^3 in week vier, waarna het aantal daalt naar rond 10^3 /ml in week acht. De lymfocyten in moedermelk bestaan voornamelijk uit perifere CD4⁺ en CD8⁺ memory T-cellen (Molès et al., 2017). Met bovenstaande gegevens kan berekend worden hoeveel T-cellen aan het kind via moedermelk worden overgedragen. Er vanuit gaande dat een baby van 2 weken 150 ml melk per dag drinkt, zouden daarin 10^7 T-lymfocyten aanwezig kunnen zijn. Als de moeder meer dan 1 per 10^7 gg-T-cellen draagt dan zouden er iedere dag één of meerdere gg-T-cellen beschikbaar zijn voor overdracht; die cellen moeten dan nog wel het darmepitheel passeren. Molès et al. (2018) wijzen erop dat het darmepitheel van een pasgeborene nog vrij doorlaatbaar is voor laagmoleculaire stoffen en geven als hypothese dat het darmepitheel in deze periode vrij doorlaatbaar is voor (immuun)cellen. De hoge doorlaatbaarheid duurt bij de mens slechts enkele dagen, maar het duurt meer dan een jaar voordat er een volledige 'gut closure' is. Ook na gut closure kunnen cellen nog steeds het darmepitheel passeren door transcytose.

Gegevens over de overleving van leukocyten in gekolfde moedermelk zijn niet consistent (Weiss, 2005), maar laten zien dat de cellen gedurende tenminste 24 uur na afname actief blijven. Er moet daarom in principe vanuit worden gegaan dat gekolfde moedermelk actieve T-cellen bevat, in dezelfde mate als moedermelk die het kind direct van de moeder ontvangt.

Gegevens over overdracht, lot en functionaliteit van de in moedermelk aanwezige T-cellen van moeder naar kind zijn afkomstig uit experimenten in diermodellen (muis, rat, schaap, baviaan, varken; zie tabel 1 in Molès et al., 2018). Hieronder volgt een opsomming:

- Jain et al. (1989) laten bij apen zien dat leukocyten van de moeder zich na borstvoeding begeven naar het darmepitheel, en dat zij ook worden opgenomen in de bloedstroom van het kind.
- Kumar et al. (1989) maken aannemelijk dat antigeen specifieke T-cellen uit moedermelk bij ratten een functionele immunologische bescherming kunnen bieden aan een nakomeling.
- Tuboly et al. (1995) tonen aan dat lammeren lymfocyten via de dunne darm in de circulatie opnemen en dat lymfocyten van geïmmuniseerde moeders daarbij cellulaire immuniteit doorgeven aan de ontvangers.
- Ma et al. (2008) laten zien dat de meeste cellen die zich over het darmepitheel verplaatsen T-cel markers dragen en accumuleren in de milt en de thymus. Als, in een muizenmodel, de moeder wordt gesensitiseerd met een antigeen dat een *delayed type hypersensitive* (DTH) response oproept, dan leidt overdracht van T-cellen via moedermelk tot een modulatie van deze response in de pups. Dit suggereert dat de overgedragen T-cellen functioneel zijn en immunologische reacties kunnen oproepen.
- Cabinian et al. (2016) tonen in een muizenmodel aan dat lymfocyten uit moedermelk terecht komen in de Peyer's patches (PP) van de pup, ook als de MHCs niet gematched zijn. De meeste lymfocyten zijn cytotoxische CD8⁺ T-cellen, met een sterke cytolytische activiteit. De aantallen lymfocyten die zij aantonen in de PP zijn in de orde van 0.5% van het totale aantal lymfocyten. Sabbaj et al. (2005) lieten al eerder zien dat er bij de mens relatief veel CD8⁺ T-cellen voorkomen in moedermelk.
- Ghosh et al. (2016) volgden in een muizenmodel de overdracht van lymfocyten van de moeder door het darmepitheel van de pup. Zij keken speciaal naar CD4⁺ T-cellen; deze accumuleren gedurende de zoogperiode in de milt en thymus. De aanwezigheid van deze CD4⁺ T-cellen leidt tot de vorming van CD8⁺ T-cellen door de pup. Dit proces noemen zij het ontstaan van een 'maternal educational memory'.

Bij de mens hebben Jansen et al. (2015) waargenomen dat een langere periode van borstvoeding samenvalt met een hoger aantal CD8⁺ T memory cellen in de eerste 6 levensmaanden. Zij trekken daaruit de conclusie dat er een gerede mogelijkheid is dat borstvoeding leidt tot opname van CD8⁺ T-cellen van de moeder uit de moedermelk en dat deze maternale T-cellen een rol spelen bij de immunologische bescherming van het kind. Een andere verklaring is dat cellen of componenten uit de moedermelk bijdragen aan de rijping van het infantiele immuunsysteem, c.q. de T-cel immuniteit.

Er zijn aanwijzingen (Johnson et al., 2002) dat foetale microchimere T-cellen die zijn overgedragen naar de moeder kunnen expanderen na activering door een viraal antigeen. Er zijn ook, minder duidelijke, aanwijzingen dat MMc T-cellen in de nakomeling kunnen expanderen (Sakkas et al., 2002). De mogelijkheid bestaat daarom dat cytotoxische T-cellen na overdracht naar het kind door expansie sterk in aantal kunnen toenemen, als zij worden geactiveerd door het herkende antigeen. Dat kan eventuele schadelijke effecten verhogen.

2.2.3 Overdracht van T-cellen, via donatie van weefsel/organen en bloed

Bij transplantatie wordt onderscheid gemaakt tussen hematopoietische stamceltransplantatie (HSCT), waarvan beenmergtransplantatie de bekendste is, en solide orgaan transplantatie (SOT), bijvoorbeeld nier-, lever- en harttransplantatie.

Als de ontvangen cellen en organen van de donor als lichaamsvreemd worden herkend door het immuunsysteem van de ontvanger, zal er een afstotingsreactie plaatsvinden. Deze herkenning berust in de eerste plaats op verschillen tussen de HLAs van donor en ontvanger. De kans van slagen van de transplantatie is daarom sterk afhankelijk van de matching tussen de HLAs, zodat de afstoting wordt voorkomen. Daarnaast wordt afstoting tegengegaan door de ontvanger een immuunsuppressieve behandeling te geven. Per type van transplantatie en per geval wordt er gezocht naar het protocol dat de beste balans geeft tussen de twee lijnen van aanpak. In de aanbevelingen van de 'Clinical practice guideline for the care of kidney transplants recipients' (KDIGO, 2009) wordt bijvoorbeeld het aantal HLA mismatches tussen donor en ontvanger genoemd als een zeer belangrijke voorspeller voor het falen van een transplantatie; daarnaast wordt een afgewogen regiem van medicatie aanbevolen om afstotingsreacties tegen te gaan.

Cytotoxische T-cellen die met het transplantaat worden overgedragen zijn de oorzaak van GVHD, een ernstige complicatie die op kan treden bij transplantatie (Shlomchik, 2007). De *graft-versus-tumor* (GVT) activiteit die bij HSCT wordt gevonden berust eveneens op activiteit van cytotoxische T-cellen. Het optreden van GVHD bij HSCT en SOT geeft enige indicatie over de (mogelijke) activiteit van met het transplantaat mee overgedragen T-cellen. Bij HSCT, bijvoorbeeld, bevat het transplantaat, naast hematopoietische stamcellen, ook rijpe T-cellen van de donor. Een deel van deze T-cellen zal, bij allo-gene HSCT, antigenen herkennen die wel in de ontvanger maar niet in de donor voorkomen. Cellen die deze antigenen presenteren zullen door cytotoxische donor T-cellen worden gedood. Deze graft-versus-host reactie als gevolg van herkenning van het HLA van de ontvanger door cytotoxische donor T-cellen kan worden voorkomen door de HLAs van donor en ontvanger te matchen, maar ook dan zijn er nog *minor histocompatibility antigens*⁶ in de ontvanger die door donor T-cellen kunnen worden herkend en die leiden tot cytotoxische effecten. De kans op GVHD kan worden geminimaliseerd door T-cellen uit het transplantaat te verwijderen (Saad en Lamb, 2017), maar dat kan als nadeel hebben dat de gewenste GVT-reactie sterk verminderd is.

Ook bij SOT kan GVHD optreden (Smith, 2010). De kans op het ontstaan van GVHD wordt primair bepaald door het aantal lymfocyten dat in het transplantaat aanwezig is. Dat kunnen er veel zijn, bij levertransplantatie bijvoorbeeld 10^9 - 10^{10} (Kohler et al., 2008), wat vergelijkbaar is met het aantal bij HSCT. Toch komt GVHD slechts in 1% van de levertransplantaties voor (of wordt weinig als zodanig herkend) in verband met de immuuntolerogene eigenschappen van dit orgaan.

Overigens zal de uitgebreide perfusie van donororganen die plaatsvindt na de uitname, het aantal T-cellen dat bij SOT kan worden overgedragen aanzienlijk beperken.

Bij bloedtransfusie kunnen mogelijk ook T-cellen van de donor worden overgedragen naar de ontvanger. Bloed dat wordt afgenomen voor bloedtransfusie en voor het maken van bloedproducten, wordt

⁶ Minor histocompatibility antigens: antigenen van polymorfe eiwitten die worden gepresenteerd door een HLA. Ook als het HLA is gematched worden deze als 'vreemd' herkend door overgedragen T-cellen.

na de afname gescheiden in verschillende fracties: erythrocyten, plasma en de 'buffy coat'. Deze buffy coat bevat de witte bloedcellen, waaronder de T-cellen, en de bloedplaatjes. Een deel van de T-cellen kan echter achterblijven in de erythrocytenfractie. Daardoor vindt er bij bloedtransfusie met de erythrocytenfractie incidenteel GVHD plaats (Kopolovic et al., 2015), wat wordt geweten aan het gebruik van erythrocytenfracties waaruit T-lymfocyten onvoldoende waren verwijderd. Sanquin, de Nederlandse bloedbank faciliteit, hanteert bij de kwaliteitscontrole de regel dat de erythrocytenfractie <100 leukocyten per ml bevat. Sanquin geeft aan dat in bijzondere gevallen, bijvoorbeeld als er een matching heeft plaatsgevonden van de HLAs tussen donor en ontvanger, de erythrocyten dienen te worden bestraald om GVHD te voorkomen ([Bloedwijzer Sanquin](#)).

2.2.4 Overdracht van T-cellen, via sexueel contact / semen

Semen bevat ongeveer 10^6 leukocyten per ml (Conte et al., 1995) waarvan 2-5% T-cellen (Wolff, 1995). Er bestaat twijfel omtrent de mogelijkheid dat deze leukocyten bij seksuele activiteit via de mucosa worden overgedragen. Studies in verschillende diersystemen tonen echter aan dat de mogelijkheid van Human immunodeficiency virus (HIV) (en Simian immunodeficiency virus (SIV), Feline immunodeficiency virus (FIV)) besmetting door cel geassocieerd HIV bestaat (met name geassocieerd met macrofagen), via de vaginale, rectale en orale route (Moench, 2014).

Uit deze studies kan voorzichtig worden geconcludeerd dat het semen van patiënten die behandeld zijn met gg-T-cellen deze T-cellen mogelijk kan bevatten. Deze T-cellen zouden door seksuele activiteit kunnen worden overgedragen, niet alleen via de mucosa maar ook via laesies. Er zijn geen gegevens bekend in hoeverre (gg-)T-cellen na overdracht immunologisch actief zijn. Echter, aangezien er bij deze manieren van overdracht geen matching plaatsvindt van de HLAs van de betrokkenen en de hoeveelheid overgedragen (gg-)T-cellen zeer beperkt zal zijn, zullen eventuele overgedragen gg-T-cellen zeer waarschijnlijk snel worden geëlimineerd door het immuunsysteem van de ontvanger.

2.2.5 De kans op overdracht van gg-T-cellen: overwegingen voor de MRA

De gegevens in paragraaf 2.2.1-3 over de overdracht van T-cellen bij zwangerschap via de placenta, door het geven van borstvoeding, bij transplantatie en bij bloedtransfusie, zijn belangrijk voor de MRA, voor het bepalen van de kans dat overdracht van gg-T-cellen plaatsvindt via deze wegen van een patiënt naar een ontvanger.

De gegevens in paragraaf 2.2.1 laten zien dat er overdracht van maternale immuuncellen, waaronder T-cellen, plaatsvindt via de placenta naar de foetus. (Een aantal van) deze cellen overleeft ook na de rijping van het immuunsysteem van het kind. Het totale aantal MMc T-cellen dat langdurig (tot in de volwassenheid) aanwezig blijft is in de orde van 10^6 (1 in 5000 T-cellen). MMc cellen zijn relatief veel vertegenwoordigd onder naïeve en memory T-cellen.

Overdracht van maternale T-cellen naar een kind vindt ook plaats via borstvoeding (paragraaf 2.2.2). Op basis van de beschikbare gegevens kan niet uitgesloten worden dat er overdracht plaatsvindt van gg-T-cellen van een patiënt naar een nakomeling via de placenta en via borstvoeding. De kans dat dit daadwerkelijk gebeurt, is afhankelijk van het aantal gg-T-cellen dat in de moeder aanwezig is en waarschijnlijk ook het fenotype van de T-cellen. Voor een goed onderbouwde kwantificering van de kans is onderzoek nodig naar de daadwerkelijke overdracht van gg-T-cellen die in de moeder geïnfecteerd zijn.

Paragraaf 2.2.3 behandelt de kans van overdracht van T-cellen bij weefsel- en orgaan transplantatie en bloedtransfusie. Die kans wordt bepaald door de voorzorgen die zijn genomen om (levensvatbare) T-cellen te verwijderen uit het transplantaat of de celfractie (packed cells) die voor transfusie worden gebruikt. In de MRA moet er, als *worst case*, vanuit worden gegaan dat gg-T-cellen die in een patiënt aanwezig zijn ook kunnen worden overgedragen naar een ontvanger bij weefsel- en orgaantransplantatie. Bij bloedtransfusie bestaat die kans in principe ook, maar de mogelijke effecten worden geminimaliseerd doordat er geen matching plaatsvindt van de HLAs van donor en ontvanger.

Concluderend kan niet worden uitgesloten dat overdracht van gg-T-cellen naar een derde via de placenta, door borstvoeding, bij transplantatie en bij bloedtransfusie plaatsvindt. Voor de MRA is het daarom van belang of deze overdracht kan leiden tot schadelijke effecten in de ontvanger. Dat komt aan de orde in het volgende hoofdstuk.

3 Therapeutisch gebruik van gg-T-cellen

Dit hoofdstuk presenteert de ervaringen met ACT van T-cellen, als achtergrond voor de daaropvolgende informatie over ACT met gg-T-cellen. Vervolgens wordt beschreven hoe de antigeen receptor van T-cellen genetisch wordt gemodificeerd. Het doel van de modificatie is steeds om van een cytotoxische T-cel een specifiek instrument te maken dat een schadelijke doelwitcel kan vernietigen, waarbij geen schadelijke bijeffecten mogen optreden. Ook wordt de overleving van gg-T-cellen die gebruikt worden bij ACT in beschouwing genomen. Overleving is een belangrijk element dat de kans bepaalt dat de schadelijke effecten van de gg-T-cellen daadwerkelijk optreden, naast de elementen die al zijn behandeld in het voorgaande hoofdstuk. Dit hoofdstuk wordt afgesloten met een korte samenvatting van de conclusies die aan de hand van de voorafgaande paragrafen getrokken kunnen worden voor de MRA.

3.1 ACT met niet-gg-T-cellen

Het onderzoek naar gebruik van gg-T cellen bouwt voort op de goede ervaringen die zijn opgedaan met ACT van niet-gemodificeerde T-cellen.

De meeste ervaring met ACT van niet-gg-T-cellen is opgedaan, met tumor infiltrating lymphocytes (TILs), die uit een tumor kunnen worden geïsoleerd, opgekweekt, en vervolgens geïnfundeerd in dezelfde patiënt. De toegediende T-cellen kunnen dan weer infiltreren in de tumor en de tumorcellen doden. Deze therapie is succesvol gebleken, vooral bij het bestrijden van melanomen. De TILs die worden opgekweekt uit melanomen zijn mengsels van CD4⁺ en cytotoxische CD8⁺ T-cellen. De studies met TILs laten zien dat het mogelijk is om de cytotoxische T-cellen te gebruiken voor het doden van tumorcellen. Als TILs direct worden toegediend aan patiënten zijn zij slechts enkele dagen aantoonbaar in de bloedcirculatie. Na niet-myeloablatieve chemotherapie, waarbij perifere T-cellen in de patiënt worden verwijderd (lymfodepletie) maar het beenmerg onaantast blijft, overleven de ingebrachte TILs veel langer, in de orde van maanden of zelfs jaren (data NKI-AVL). Maus et al. (2014) geven een samenvatting van de belangrijkste lessen die geleerd zijn uit ACT met TILs over de omstandigheden die nodig zijn voor een optimale werking van de therapie: 1) voorbehandeling van de ontvanger door lymfodepletie, 2) *ex vivo* expansie van de T-cellen, gestimuleerd door cytokines, zoals IL-2, of antilichamen, en 3) het optimaliseren van de fysiologische toestand van T-cellen die worden toegediend, door de omstandigheden van de expansie zo te kiezen dat de T-cellen tijdens de expansie niet te ver gedifferentieerd zijn.

De TIL behandeling kan leiden tot schadelijke effecten, die vooral optreden door de chemotherapie die wordt toegepast voor lymfodepletie en de behandeling met IL-2. Er zijn geen ernstige schadelijke effecten van de TILs zelf gerapporteerd (Rohaas et al., 2018).

Naast ACT van TILs is er ervaring opgedaan met ACT van virus-specifieke T-cellen, bijvoorbeeld bij HSCT (Rooney en Lee, 2012; Maus et al., 2014), waar infecties van Epstein-Barr virus (EBV), cytomegalovirus (CMV) en adenovirussen een voornaam oorzaak van mortaliteit zijn. Virus-specifieke T-cellen kunnen worden geëxpandeerd door *ex vivo* stimulering van perifere lymfocyten met APCs die een viiraal antigeen presenteren. De expansie levert in de orde van 10⁸ virus-specifieke T-cellen op, die ook

zonder voorafgaande lymfodepletie aan een patiënt kunnen worden toegediend voor een succesvolle behandeling.

3.2 Genetische modificatie van de TCR van T-cellen

Een belangrijke barrière voor een succesvolle ACT therapie is de beschikbaarheid van T-cellen die specifiek zijn voor een antigeen van de doelwitcel. Het is voor een effectieve en veilige therapie nodig dat de TCR van de T-cel een antigeen herkent dat specifiek is voor die doelwitcel en, zo mogelijk niet voorkomt op andere cellen. Als er in het immuunrepertoire van de patiënt geen T-cellen voorkomen met deze specificiteit, dan zal een behandeling met (autologe) T-cellen nooit succesvol kunnen zijn. In het algemeen bestaat ook de wens om goed bruikbare TCRs tussen T-cellen te kunnen uitwisselen, en om de eigenschappen van een TCR te kunnen modificeren. In paragraaf 3.2.1 wordt ingegaan op de mogelijkheden om de eigenschappen van TCRs met behulp van genetische modificatie te wijzigen, in paragraaf 3.2.2 wordt ingegaan op de constructie van artificiële receptoren zoals CARs.

3.2.1 Modificatie van T-cellen met natuurlijke TCRs

Op dit moment staan vooral therapieën met gg-T-cellen in de belangstelling die gericht zijn tegen tumoren. CD8⁺ T-cellen die een specifiek tumorceltype doden (en CD4⁺ T-cellen die daarbij optreden als helper of regulerende T-cel) herkennen hun doelwit door de specifieke TCR op hun celoppervlak. Deze specificiteit kan worden overgedragen door de genen die coderen voor de α en β ketens van de TCR in een andere T-cel te introduceren. Deze genen worden daartoe gezamenlijk gekloneerd, bijvoorbeeld in een retrovirale vector. Op dit moment worden voor de therapie vooral geactiveerde T-cellen van de patiënt zelf gebruikt. In de literatuur wordt daar niet steeds op gewezen, maar veelal worden perifere lymfocyten (*peripheral blood lymphocytes*, PBL) getransduceerd, een mengsel van CD8⁺ en CD4⁺ T-cellen; de samenstelling van T-cellen, de verhouding van CD8⁺ en CD4⁺ T-cellen en de verdeling over fenotypes, memory en effector T-cellen, kan daarom voor iedere behandeling verschillend zijn.

Tumor-specifieke TCRs kunnen worden geïsoleerd uit de populatie van TILs uit een tumor van een patiënt zelf, of uit het perifere bloed van een andere patiënt die bijvoorbeeld een goede tumor remissie liet zien na een andere vorm van immunotherapie. Ze kunnen ook worden verkregen door immunisatie van 'gehumaniseerde' muizen (bijv. muizen die een gehumaniseerd TCR repertoire dragen, Li et al., 2010) met antigenen die specifiek zijn voor een bepaald tumor type, bijvoorbeeld melanomen. De verkregen T-cellen kunnen worden gescreend voor reactiviteit tegen tumor-specifieke epitopen; de TCR genen kunnen vervolgens worden overgedragen naar nieuw geïsoleerde donor T-cellen of PBL (Stanislawski et al., 2001; Johnson et al., 2006). Dit maakt het mogelijk om HLA-gerestricteerde tumor-specifieke TCRs te verkrijgen die werkzaam zijn in de mens en die zouden kunnen worden toegepast op meerdere patiënten met hetzelfde HLA molecuul. Daarnaast bestaat de wens om een 'universele' T-cel te ontwikkelen die kan worden toegepast op alle patiënten ongeacht de mate van matching van hun HLAs (zie paragraaf 3.1.3).

In gekloneerde TCR genen kunnen ook mutaties worden aangebracht om de eigenschappen van een TCR te optimaliseren, bijvoorbeeld door aminozuursubstituties in de *complementarity-determining region*, waardoor bijvoorbeeld de affiniteit van de TCR voor het MHC peptide complex op de doelwitcel

kan worden verhoogd (Robbins et al., 2008). Daarnaast worden er vaak genetische optimalisaties aan gebracht om de zogenaamde 'pairing' tussen de geïntroduceerde α en β ketens te vergroten (Jorritsma et al., 2007).

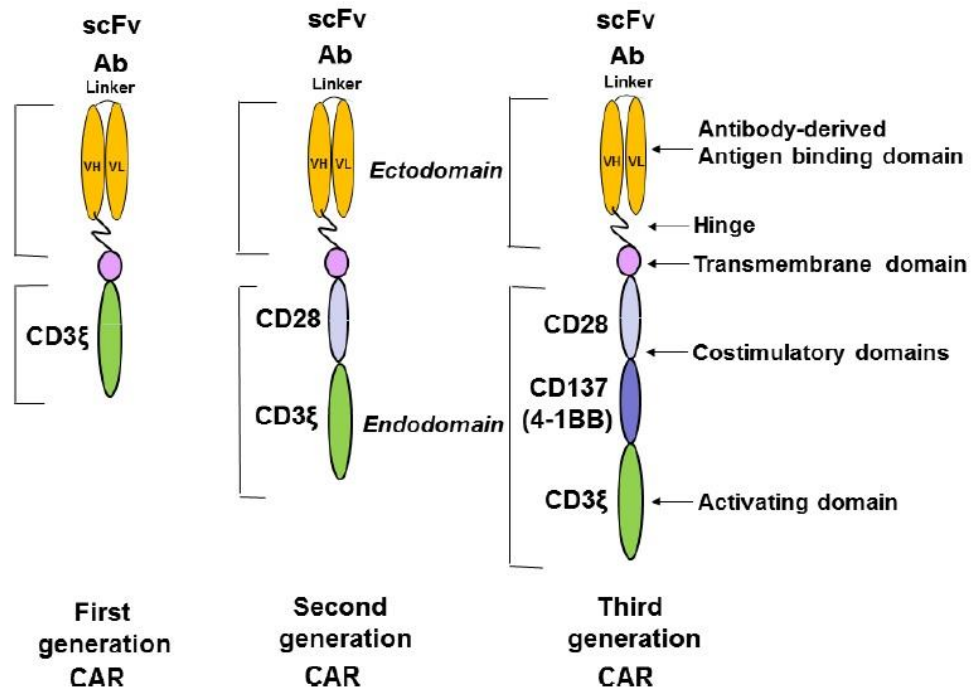
In dit rapport ligt de nadruk op de toepassing van $\alpha\beta$ TCRs. Daarnaast zijn er $\gamma\delta$ TCRs die een rol spelen bij de screening van cellen met afwijkende antigenen. Ze komen sterk in de belangstelling te staan voor toepassing in anti-tumortherapieën (Fowler en Bodman-Smith, 2014; Scheper et al., 2016; Zou et al., 2017). De antigeen herkenning door $\gamma\delta$ TCRs gebeurt niet in alle gevallen in de context van een HLA complex. $\gamma\delta$ T-cellen spelen een rol bij de herkenning cellen met een bacteriële infectie, op basis van niet-peptide antigenen, en van tumorcellen; de precieze werking van anti-tumor $\gamma\delta$ T-cellen wordt nog volop onderzocht (Scheper et al., 2016). Dat maakt de risicoanalyse van anti-tumor $\gamma\delta$ T-cellen en van T-cellen die gemodificeerd zijn met een $\gamma\delta$ TCR lastiger. De conclusies die in dit rapport worden getrokken voor $\alpha\beta$ T-cellen zullen echter wel in grote lijnen ook van toepassing zijn op $\gamma\delta$ T-cellen.

3.2.2 Modificatie van T-cellen met artificiële receptoren: CARs

In een CAR (figuur 2, first generation CAR) wordt een polypeptide dat het gewenste antigeen herkent, bijvoorbeeld de variabele regio's van een monoclaal antilichaam (gecombineerd tot één keten, het single chain variable fragment scFv), gekoppeld aan een transmembraaneiwit en het intracellulaire domein van de CD3 ζ eenheid van een TCR. De genetische informatie coderend voor een CAR kan, net als die van een TCR (zie paragraaf 3.2.1), worden getransduceerd in een T-cel en daar tot expressie worden gebracht. Voor de herkenning van een antigeen door een CAR is het nodig dat het antigeen tot expressie komt op het oppervlak van de doelwitcel, maar zonder de noodzaak van HLA restrictie. De interactie tussen een CAR en het herkende antigeen lijkt meer op die van een antilichaam en zijn antigeen. In principe kan er daarom voor ieder eiwit dat op het oppervlak van een doelwitcel tot expressie komt een CAR worden geconstrueerd. Doordat een CAR zijn antigeen herkent onafhankelijk van een interactie met een HLA, vindt er geen co-stimulatie plaats door een APC zoals die optreedt bij een interactie van een TCR met het HLA op een APC. Dit wordt in CARs van de tweede en derde generatie ondervangen door één of twee domeinen in te bouwen van constitutief co-stimulerende factoren (figuur 2, second/third generation CAR) (Firor et al., 2015).

Maus et al. (2014) wijzen erop dat CAR T-cellen klinische activiteit hebben zowel tegen hematologische tumoren alsook tegen solide tumoren. Ook voor CAR T-cellen geldt dat de CD8⁺ T-cellen cytotoxische activiteit hebben, waarbij zij worden ondersteund door CD4⁺ helper T-cellen. Er zijn studies gedaan naar de optimale samenstelling van het mengsel van fenotypes van CD8⁺ en CD4⁺ CAR T-cellen (voor een overzicht zie Golubovskaya en Wu, 2016). Bij introductie van een CAR in een populatie van T-cellen, zoals dat gebeurt bij PBL van een patiënt, is de samenstelling van CD8⁺ en CD4⁺ T-cellen niet gedefinieerd (zie paragraaf 3.1.1). De samenstelling zou geoptimaliseerd kunnen worden door de T-cellen op basis van hun fenotypische markers met behulp van *cell sorting* te scheiden en daarna in de gewenste samenstelling samen te voegen.

Figuur 2 Structuur van de CAR (Golubovskaya en Wu, 2016)



Deze figuur toont de eerste, tweede en derde generaties van CAR constructen. De eerste generatie heeft alleen een activeringsdomein, de tweede generatie heeft naast een activeringsdomein ook een co-stimuleringsdomein, en de derde generatie heeft een activeringsdomein en twee co-stimuleringsdomeinen. Het ectodomein bestaat uit een eenheid die het antigeen herkent op de doelwitcel, in dit geval de VH en VL ketens van het scFv (single chain variable fragment) van een (monocloonaal) antilichaam, aan elkaar gekoppeld met een linker. Een scharnier (hinge) element koppelt de ScFv met het transmembraan domein. Het endodomein bestaat uit de co-stimuleringsdomeinen (CD137 (4-1BB); CD28) en het activeringsdomein: CD3ξ.

3.2.3 Op weg naar een 'universele' T-cel

Het onderzoek met gg-T-cellen heeft geleid tot opmerkelijke successen. Op dit moment wordt het merendeel van de klinische tests uitgevoerd met autologe gg-T-cellen, die voor iedere patiënt afzonderlijk moeten worden gemaakt. De kosten voor deze behandeling zijn (nog) prohibitief hoog, in de orde van enkele honderdduizenden euro's voor een commercieel product zoals een CD19 CAR T-cel. De kosten zouden aanzienlijk lager kunnen zijn als er 'off-the-shelf' gg-T-cellen beschikbaar zouden zijn die specifieke antigenen zouden herkennen die algemeen op tumorcellen voorkomen. Toediening van deze allogene T-cellen aan patiënten moet dan zonder bezwaar kunnen plaatsvinden: het optreden van GVHD moet worden voorkomen, en de T-cellen mogen niet worden afgestoten. GVHD kan worden voorkomen door te zorgen dat er geen T-cellen zijn die alloreactieve endogene TCRs dragen. Afstoting van een universele T-cel kan worden voorkomen door het HLA van deze T-cellen uit te schakelen. Torikai en Cooper (2016) geven een overzicht van de mogelijkheden voor het uitschakelen van TCRs en HLAs. Het beschikbaar komen van gene editing technieken zoals *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR Associated Genes 9* (CRISPR-Cas9), heeft het mogelijk gemaakt om de endogene TCR geheel uit te schakelen door deletie. Het HLA kan 'geherprogrammeerd' worden met

een CRISPR-Cas9 *knock-in* van een HLA cassette (Kelton et al., 2017), of kan door deletie worden uitgeschakeld, waardoor T-cellen aan afweerreacties zouden kunnen ontsnappen.

De toepassing van dergelijke universele T-cellen is niet zonder risico's. Bijvoorbeeld: als een (gg-)T-cel geen HLA meer aanmaakt dan zal deze ontsnappen aan afstotingsreacties, en zal geen antigenen presenteren die duiden op eventuele maligne onttaarding. Deze gg-T-cel zal zelf dus kunnen ontsnappen aan de screening voor kankercellen die in het lichaam plaatsvindt. Dit zijn risico's die vooral worden bestudeerd vanuit de positie van de patiënt, maar die ook in beschouwing moeten worden genomen voor derden die kunnen worden blootgesteld aan deze T-cellen.

3.3 De mogelijke effecten van gg-T-cellen met (gg-)TCRs en CARs

In de literatuur is voor zover bekend niets gerapporteerd over schadelijke effecten bij derden, na overdracht van gg-T-cellen vanuit een behandelde patiënt. De uitspraken in dit rapport over mogelijke schadelijke effecten bij derden berusten op effecten die zijn gezien in klinische studies van ACT met T-cellen bij de behandelde patiënt zelf. De schadelijke effecten betreffen de gevallen waarin cytotoxische (CD8⁺) gg-T-cellen een acute schadelijke werking hebben op andere cellen dan de doelwitcellen. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen 'on-target off-tumor' en 'off-target off-tumor' effecten. De beschreven gevallen betreffen $\alpha\beta$ T-cellen, en voor dit type T-cellen kunnen in risicoanalyses redelijke voorspellingen worden gedaan over mogelijke schadelijke effecten. Voor $\gamma\delta$ T-cellen is dat op dit moment nog lastig door gebrek aan klinische ervaring, maar ook daar moet een aanvrager informatie kunnen geven aan de hand waarvan een afweging kan worden gemaakt over mogelijke schadelijke bijwerkingen van de gebruikte cytotoxische T-cellen.

CD4⁺ gg-T-cellen kunnen de cytotoxische werking van CD8⁺ T-cellen ondersteunen (als Th cel) of negatief beïnvloeden (als T_{REG}). Er worden in de literatuur over het algemeen geen schadelijke effecten van gg-CD4⁺ Th of T_{REG} cellen beschreven. In één geval wordt vermeld dat CD4⁺ CAR T-cellen cytotoxische effecten bewerkstelligen. Deze CD4⁺ T-cellen zouden, net als CD8⁺ cytotoxische T-cellen, schadelijke effecten kunnen hebben. Na stimulering van de TCR overleven deze CD4⁺ T-cellen langer dan CD8⁺ CAR T-cellen (Yang et al., 2017).

De schadelijke effecten van gg-T-cellen die in de literatuur worden beschreven en die in de volgende paragrafen worden behandeld, betreffen effecten van gg-T-cellen gericht tegen tumorcellen. Vergelijkbare effecten zouden kunnen optreden met gg-T-cellen die gericht zijn tegen bijvoorbeeld virus-geïnficeerde cellen. Voor de schadelijke effecten van deze gg-T-cellen gelden in principe dezelfde overwegingen.

3.3.1 Oorzaak van de schadelijke effecten van een T-cel

De potentiële schadelijke effecten van een T-cel worden op de eerste plaats bepaald door het antigeen dat door de antigeen receptor van de T-cel wordt herkend. Deze antigeen receptor (al dan niet gg-TCR of CAR) kan gericht zijn tegen epitopen van verschillende typen eiwitten. Voorbeelden van antigenen die tot expressie komen op melanomen zijn:

- 1) Differentiatie eiwitten die specifiek zijn voor een melanocyt, bijvoorbeeld *glycoprotein 100* (gp100), tyrosinase en *melanoma-associated antigen recognized by T cells 1* (MART-1)/melan-A.
- 2) Eiwitten die tot overexpressie komen in een melanoom, bijv. *melanoma-overexpressed antigen 1* (MELOE-1) en Survivin.
- 3) Cancer/testis eiwitten, zoals *New York esophageal squamous cell carcinoma 1* (NY-ESO-1), die een rol spelen tijdens embryogenese, maar daarna worden uitgeschakeld. In tumoren wordt hun expressie soms weer aangeschakeld.
- 4) Genproducten van gemuteerde genen, zogenaamde neo-antigenen (Heemskerk et al., 2013). Ook virale eiwitten van tumor-inducerende virussen horen bij deze groep.

Deze typologie geldt ook voor antigenen die worden herkend door andere CAR T-cellen, gebruikt in therapieën gericht tegen andere doelwitcellen.

De typen 1 en 2 antigenen komen niet alleen op tumorcellen voor maar ook op gezond weefsel van de persoon die aan de T-cellen wordt blootgesteld; dit kan leiden tot schadelijke effecten op gezond weefsel. Type 3 antigenen komen ook voor op gezond weefsel, maar (in principe) alleen in een vroeg stadium van ontwikkeling, bij een foetus of een jong kind. Als zij gg-T-cellen overgedragen krijgen die gericht zijn tegen dit type antigenen, dan kunnen deze weefsels schadelijke effecten ondergaan van de T-cellen. Neo-antigenen (type 4) zijn epitopen van genen die random mutaties dragen, die hebben plaatsgevonden gedurende de oncogene transformatie. Neo-antigenen zijn dus specifiek voor één patiënt, in tegenstelling tot de eiwitten van type 1-3. Virale epitopen, bijvoorbeeld afkomstig uit het humaan papillomavirus (HPV), zijn ook tumor specifiek.

Van nature voorkomende TILs die worden gebruikt voor ACT zijn een mengsel van uit een tumor geïsoleerde T-cellen. Het kan niet worden uitgesloten dat zich hieronder T-cellen bevinden die gericht zijn tegen een antigeen van type 1, 2 en eventueel ook type 3. In de praktijk wordt daarvan geen schadelijke werking waargenomen, in zoverre dat bij behandeling met TILs geen (ernstige en blijvende) bijwerkingen worden gezien (Rohaas et al., 2018).

Schadelijke effecten kunnen wel worden verwacht als er veel T-cellen met één bepaalde TCR worden toegediend. Een voorbeeld betreft een studie T-cellen die TCRs dragen gericht tegen MART-1 of gp100 (Johnson et al., 2009). In deze studie werden de genen die coderen voor deze TCR gekloneerd uit T-cellen (humaan of uit muizen) met deze specificiteit en vervolgens in PBL van patiënten getransduceerd. Omdat MART-1 en gp100 ook voorkomen op normale melanocyten trad er bij 50-80% van de patiënten, naast een effect op melanoomcellen, ook destructie van melanocyten op waar deze van nature voorkomen: in de huid, in het oog en in het oor. In de volgende paragraaf wordt nader ingegaan op dergelijk *on-target off-tumor* effecten.

3.3.1.1 *On-target off-tumor* effecten

On-target off-tumor reacties komen veelvuldig voor daar waar TCRs of CARs worden gebruikt die niet volledig tumor-specifiek zijn. Ze komen echter niet voor in alle patiënten, en niet bij alle patiënten in gelijke mate. Als een patiënt geen schadelijke effecten ondervindt van een T-cel met een bepaalde antigeen receptor dan betekent dat dus niet noodzakelijkerwijs dat derden die aan die T-cel worden blootgesteld er ook geen schadelijke effecten van zullen ondervinden. Voor andere voorbeelden van *on-target off-tumor* effectoren, zie tabel 1.

Tabel 1 Voorbeelden van <i>on-target off-tumor</i> effecten in TCR en CAR therapieën (Kunert et al., 2013; Bedoya et al., 2017)			
Target Antigen	Disease	<i>On-Target, Off-Tumor</i> Toxicity	Reference
TCRs			
MART-1	Metastatic melanoma	Severe melanocyte destruction in skin, eye, and ear (in some cases leading to uveitis and hearing loss)	Johnson et al. (2009)
MART-1	Metastatic melanoma	Lethal cardiac toxicity in one patient	Haanen (2013)
CEA	Metastatic colorectal carcinoma	Severe inflammation of colon	Parkhurst et al. (2011)
MAGE- A3	Metastatic melanoma	Changes in mental status, two patients fell into coma and subsequently died, one patient recovered	Morgan et al. (2013)
MAGE- A3	Metastatic melanoma and multiple myeloma	Lethal cardiac toxicity in two patients	Linette et al. (2013)
CARs			
CD19	B cell malignancies	B cell aplasia	Maude et al. (2014a) Porter et al. (2015)
HER2/ErbB2	colon cancer	lethal pulmonary failure	Morgan et al. (2010)
Carbonic anhydrase-IX (CA-IX)	renal cancer	bile duct epithelium infiltration (cholestasis)	Lamers et al. (2013)
CD30	Hodgkin's lymphoma	lymph node, tonsils, thymus infiltration	Wang et al. (2016)
CD123	acute myeloid leukemia	elimination of hematopoietic stem cell and myeloid compartments	Mardiros et al. (2013) Gill et al. (2014)
Kappa light chain	non-Hodgkin's lymphoma/multiple myeloma	elimination of kappa-expressing B and plasma cells	Ramos et al. (2016)

Een mogelijkheid om *on-target off-tumor* effecten te voorkomen is het gebruik van receptoren die antigenen herkennen die uitsluitend in een tumor voorkomen, zoals *carcinoembryonic antigen* (CEA) en *cancer-testis antigens* (CTAs) (Simpson et al., 2005). Van T-cellen gericht tegen neo-antigenen, die immers het product zijn van random mutaties die hebben plaatsgehad in een bepaalde tumorcel, mag worden verwacht dat deze geen schadelijke effecten buiten de tumor hebben. Ditzelfde geldt voor T cellen gericht tegen viraal geïnduceerde tumoren. Uit studies aan TILs uit melanomen is duidelijk geworden dat veel TILs neo-antigeen-reactief zijn. De mogelijkheden om neo-antigeen-specifieke TILs te identificeren door tumor-specifieke mutaties vast te stellen en effectieve epitopen te voorspellen worden beschreven door Schumacher en Schreiber (2015).

De conclusie is dat (gg-)T-cellen die gericht zijn tegen zeer specifieke tumor-antigenen met grotere kans veilig kunnen worden toegepast, omdat de kans op *on-target off-tumor* effecten zeer beperkt is. Als het gaat om zeer specifiek antigeen zoals een neo-antigeen, dan is de kans in ieder geval groot dat het antigeen alleen voorkomt bij de patiënt en niet toegepast kan worden in een algemene therapie tegen een bepaald tumortype.

Een bijzonder geval, maar misschien wel het bekendste voorbeeld, van een *on-target off-tumor* effect is dat van T-cellen die een CAR dragen die CD19 herkent, een eiwit dat voorkomt op gezonde B-cellen en B-cel lymfomen. Er is veel ervaring opgedaan met vorm van CAR T-cel therapie. Veelal heeft de therapie als bijeffect tot de dood van de gezonde B-cellen wat leidt tot B-cel aplasie en het verlies van antilichamen waardoor de patiënt immuungecompromitteerd raakt. De oplossing is om de patiënt immuunglobulinen toe te dienen. Opmerkelijk is dat deze maatregel nodig blijft ook nadat het aantal CD19 herkende CAR T-cellen in bloed onder de detectielimiet is gedaald. Dit suggereert dat ook een zeer lage hoeveelheid CAR T-cellen nog effectief is om cellen die het antigeen dragen te doden (Maude et al., 2014b).

Het schadelijke effect van anti-CD19 CAR T-cellen zou ook kunnen optreden als deze CAR T-cellen worden overgedragen van moeder naar foetus tijdens de zwangerschap. In de foetus vindt al ontwikkeling plaats van CD19⁺ B-cellen in het beenmerg, en het is bekend dat CD8⁺ T-cellen migreren uit de perifere bloedsomloop naar het beenmerg (Di Rosa en Fabst, 2005). Overgedragen CAR T-cellen zouden in een foetus dus schade kunnen aanrichten aan het ontwikkelende humorale immuunsysteem.

3.3.1.2 *Off-target off-tumor* effecten

Ook bij het gebruik van hoog-specifieke receptoren, waarbij de affiniteit van de TCR in het laboratorium verder is verhoogd, kunnen er nog '*off-target off-tumor*' effecten voorkomen, door onverwachte kruisreactie met een antigeen elders in het lichaam. Een voorbeeld is een studie gericht tegen *melanoma-associated antigen A3* (MAGE-A3), een antigeen dat specifiek is voor melanomen en andere tumoren van epitheelcellen. Twee patiënten, die behandeld zijn met gg-T-cellen met een TCR gericht tegen MAGE-A3, kregen een cardiogene shock waaraan zij overleden (Linette et al., 2013). Het bleek dat de TCR naast MAGE-A3 ook een epitoom van het spiereiwit titine herkent, en dat behandeling met T-cellen met deze TCR resulteert in afbraak van spierweefsel. Deze *off-target off-tumor* activiteit was niet opgemerkt bij pre-klinisch onderzoek ([Recombinant DNA Advisory Committee: Minutes of Meeting on June 19, 2012](#)). Het HLA-gepresenteerde peptide van titine dat de kruisreactie met de TCR veroorzaakt is achteraf geïdentificeerd (Cameron et al., 2013). Uit dit voorbeeld blijkt dat het adequaat voorspellen van *off-target* effecten veroorzaakt door een kruisreactie zeer moeilijk is (Bedoya, 2017). Het is andersom wel mogelijk om voorspellingen te doen over de beste targets op een celoppervlak voor CAR therapie (Perna et al., 2017).

Off-target effecten berusten op de intrinsieke flexibiliteit in de herkenning van een antigeen door een TCR. De specificiteit van de antilichaam-antigeen herkenning is veel groter, en *off-target off-tumor* effecten zijn daarom minder snel te verwachten bij het gebruik van CARs, waarin een antigeen herkenkend deel van een antilichaam wordt gebruikt (Bedoya et al., 2017). Maar voorzichtigheid blijft geboden. De structuur van het antigeen herkende deel van de CAR is niet volledig identiek aan het herkende deel van het antilichaam zelf. De interactie van een CAR met zijn epitoom kan daardoor anders zijn dan die van het antilichaam waarvan de CAR is afgeleid (Bonifant et al., 2016).

Uit het voorafgaande kan worden geconcludeerd dat *off-tumor* cytotoxiciteit van T-cellen wel kan worden verklaard, maar dat het lastig is om de omvang van deze cytotoxische effecten te voorspellen. Er is daarom gezocht naar mogelijkheden om T-cellen na ACT 'terug te kunnen roepen' in het geval er ernstige schadelijke effecten in de patiënt optreden. Voor dat doel kunnen 'suicide switches' worden ingebouwd in de T-cellen. Marin et al. (2012) hebben de werking van een aantal *suicide switches* in EBV-specifieke cytotoxische T-cellen *in vitro* bestudeerd: Herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-TK), dat de T-cellen gevoelig maakt voor gancyclovir; human inducible caspase 9 (iCasp9), dat apoptose initieert; en CD20, dat de cellen gevoelig maakt voor het monoclonale antilichaam rituximab. De werking van deze drie *suicide switches* leidt tot effectieve vernietiging van de EBV-specifieke cytotoxische T-cellen. Maar het duurt wel een paar dagen voordat de werking van HSV-TK effectief is, terwijl het cytotoxische effect van T-cellen dramatisch snel kan werken. iCasp9 en CD20 werken daarentegen momentaan nadat de *suicide switch* is 'aangezet'.

Overwegingen over *on-* en *off-target* effecten die hier zijn behandeld en de manieren waarop deze in de hand gehouden kunnen worden, gelden voor de patiënt die de behandeling met T-cellen krijgt. Deze overwegingen gelden op vergelijkbare wijze voor derden, die worden blootgesteld aan T-cellen via weefsel- en orgaandonatie en via bloedtransfusie. De overwegingen liggen anders voor de mogelijk bij zwangerschap of via borstvoeding overgedragen T-cellen. Hierboven (paragraaf 3.3.1.1) is al gewezen op de mogelijke schadelijke gevolgen in de foetus of in een pasgeborene, van de overdracht cytotoxische T-cellen die CD19 herkennen. Er kan pas vanuit worden gegaan dat deze T-cellen niet meer bij de moeder aanwezig zijn als er bij de moeder geen B-cel aplasie meer wordt waargenomen. Overdracht van T-cellen die gericht zijn tegen antigenen van eiwitten die tot expressie komen tijdens de embryogenese, zoals NY-ESO, kan tot schadelijke effecten leiden bij overdracht via de placenta of via borstvoeding, zolang deze antigenen in de foetus of in het jonge kind nog aanwezig zijn.

3.4 Het lot van T-cellen in ACT

3.4.1 Levensduur van toegediende T-cellen

Uit ervaringen met ACT met TILs is bekend dat T-cellen na toediening een differentiatieproces doormaken. Het is van belang gebleken (Huang et al., 2005; Rosenberg et al., 2011) dat de toegediende TILs een 'jong' fenotype hebben, ook al toonden Powell et al. (2005) aan dat T-cellen die in een laat stadium zijn, na ACT veranderen in fenotypisch 'jongere' tumor-reactieve effector memory cellen. Graef et al. (2014) laten zien, in een muizenstudie, dat er slechts één T_{CM} cel hoeft te worden overgedragen om zich na stimulering door zijn antigeen te kunnen ontwikkelen tot zowel memory als effector T-cellen. Dit proces van overdracht van één T_{CM} cel kan in meerdere rondes worden herhaald. In lijn hiermee blijken klonen van $CD8^+$ T-cellen die zijn opgekweekt uit T_{CM} cellen langer te overleven in ACT dan klonen afkomstig van T_{EFF} cellen (Berger et al., 2008).

Het potentieel van de toegediende T-cellen om zich verder te differentiëren ('stemness', Graef et al., 2014) is belangrijk voor een goed resultaat van de ACT en dat pleit voor een korte initiële groeifase van de T-cellen. Deze 'jonge' cellen zullen ook een langere overlevingsduur hebben, maar het micro-environment van cytokines waarin de cellen terecht komen in de patiënt zal ook een belangrijke rol

spelen bij de overleving van de T-cellen. Het cytokine IL-2 kan ook worden toegediend na ACT ter ondersteuning van de groei en anti-tumor activiteit van CD8⁺ T-cellen (Rohaan et al., 2018).

In de COGEM adviezen (Bijlage 1) wordt aangegeven dat (niet-gemodificeerde) T-cellen na toediening minstens 6 maanden tot een jaar aanwezig blijven. In de literatuur worden verschillende waarden gevonden voor de periode waarin gg-T-cellen konden worden aangetoond na ACT (Tabel 2). Een reden voor de verschillende uitkomsten kan zijn dat de samenstelling van de T-celpreparaten voor iedere behandeling anders is (zie paragraaf 3.2.1).

Voor de meeste studies variëren de genoemde perioden van enkele weken tot een jaar. Dit zijn geen maximale tijden, de metingen zijn niet doorgezet totdat er geen cellen meer aantoonbaar waren. In de praktijk kunnen sommige T-celklonen minstens drie jaar na de een TIL behandeling nog steeds in de circulatie van een patiënt worden aangetoond (Van den Berg, manuscript in voorbereiding). In de tabel is ook te zien dat er een langere overlevingsduur van gg-T-cellen wordt gevonden voor T-cellen die gericht zijn tegen virus geïnfecteerde cellen. Scholler et al. (2012) vonden een zeer lange overleving, met een geschatte halfwaardetijd van meer dan 16 jaar, van gg-T-cellen in een situatie die wel afwijkt van de CARs die het variabele deel van een antilichaam dragen. Zij werkten met een CAR die CD4 draagt aan een CD3ζ signaaldomein. Deze T-cellen overleven langdurig na infusie in een patiënt die geen lymfodepletie heeft ondergaan. De T-cellen worden geactiveerd door HIV geïnfecteerde cellen die het HIV gp120 envelopeiwit dragen dat aan CD4 bindt. De auteurs noemen de regelmatige stimulatie van de T-cellen, iedere keer als zij een HIV geïnfecteerde cel tegenkomen, als een mogelijke oorzaak van de lange halfwaardetijd. Heslop et al. (2010) hebben laten zien dat EBV-specifieke cytotoxische T-cellen (afkomstig uit de donor) die waren toegediend na HSCT om EBV-geïnduceerde lymfomen te bestrijden, gedurende minstens 9 jaar na toediening actief blijven. Ook zij suggereren herhaalde stimulatie door het antigeen als één mogelijkheid voor de langdurige overleving.

3.4.2 Het aantonen van gg-T-cellen in bloed

Voor het aantonen van de aanwezigheid van gg-T-cellen wordt gebruik gemaakt van detectie van de cellen via *flow cytometrie*, of van detectie van het construct dat gebruikt is voor de transductie van de T-cel via (q)PCR (tabel 2). Naast elkaar gebruikt geven beide methoden consistente resultaten (O'Rourke et al., 2017), hoewel flow cytometrie in enkele gevallen gedurende een kortere tijd positieve resultaten geeft, wat door de auteurs wordt toegeschreven aan de hogere gevoeligheid van de PCR detectie. PCR heeft de voordelen van hoge gevoeligheid en specificiteit, maar flow cytometry geeft de mogelijkheid om fenotypische expressie te zien. In één geval in tabel 2 wordt transcriptie van de CAR receptor aangetoond met behulp van RT PCR.

Voor de interpretatie van resultaten van experimenten in de literatuur waarbij de aanwezigheid van gg-T-cellen wordt aangetoond, is het belangrijk dat de auteurs een beschouwing geven over de detectielimiet van de gebruikte methode. Wanneer namelijk geen gg-T-cellen worden gemeten, kan dat ook betekenen dat ze nog wel aanwezig zijn, maar in aantallen onder de detectielimiet.

Het is opvallend dat artikelen over klinisch gebruik van gg-T-cellen over het algemeen geen gedetailleerde beschrijving geven van de procedure waarmee de aanwezigheid van gg-T-cellen wordt aangetoond en een beschrijving van de detectielimiet veeel ontbreekt. Mitsuyasu et al. (2000) beschrijft hoe PCR wordt uitgevoerd op PBL of op gezuiverde T-cellen, op basis van primers die specifiek zijn voor het

Tabel 2. Overlevingsduur van gg-T-cellen na ACT

Study	Disease	T cell product	Duration cell in circulation	Detection method	Ref
Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias	CLL	CD19 CAR cells (second generation)	>30 days	Q-PCR	Brentjens et al., 2011
CAR T cells for sustained remissions in leukemia	ALL	CD19 CAR directed cells	>12 months	Q-PCR	Maude et al., 2014b
CAR T Cells against CD19 for Multiple Myeloma	Multiple Myeloma	CD19 CAR directed cells	>47 days	Flow cytometry and Q-PCR	Garfall et al., 2015
Treatment of melanoma patients with MART-1 TCR modified T cells	Melanoma	MART-1 TCR modified T cells	>6 months	Flow cytometry	NKI study
ACT of MART-1 T-cell receptor transgenic lymphocytes and dendritic cell vaccination in patients with metastatic melanoma	Melanoma	MART-1 TCR modified T cells + DC vaccine	>6 months	Flow cytometry	Chodon et al., 2014
NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma	Myeloma	NY-ESO modified T cells	>1 year	Q-PCR	Rapoport et al., 2015
Gene-modified memory T cells after haploidentical HSCT	haploidentical HSCT	thymidine kinase (TK) modified T cells	>2-14 years	Flow cytometry	Oliveira et al., 2015
ACT of CD4ζ gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects	HIV	CD4ζ-modified HIV specific CD4 and CD8 T-cells	>1 year	Q-PCR	Mitsuyasu et al., 2000
Transfer of receptor-modified syngeneic T cells in patients with human immunodeficiency virus infection	HIV	CAR gene modified CD8 T cells	> 1 year	Q-PCR	Walker et al., 2000
Transfer of T cells modified with a CAR comprised of CD4 linked to the CD3-ζ signaling chain	HIV	CAR gene modified CD4 and CD8 T cells	t½ > 16 years	RT PCR for transcriptional activity	Scholler et al., 2012

CLL: chemotherapy-refractory chronic lymphocytic leukemia

ALL: acute lymphoblastic leukemia

CAR gen. Bij flow cytometrie wordt expressie van de CAR gemeten door, eventueel gezuiverde, T-cellen te 'kleuren' met het herkende antigeen waaraan een fluorochroom gekoppeld is.

In alle gevallen moet worden geverifieerd dat de gebruikte methode is gevalideerd, voor alle punten waar er veronderstellingen worden gemaakt, zoals de zuiverheid van de geïsoleerde T-cellen, en de kans dat er T-cellen ontsnappen bijvoorbeeld doordat zij de marker waarop wordt geselecteerd niet (meer) tot expressie brengen.

De validatie moet ook leiden tot de vaststelling van de detectielimiet: de minimale concentratie gg-T-cellen die nog gedetecteerd kan worden.

Naast de detectielimiet is er een andere, fundamentele, reden waarom het aantonen van gg-T-cellen kan leiden tot vals negatieve resultaten. Evenals T-cellen in het algemeen kunnen ook gg-T-cellen zich ook ophouden op andere locaties in het lichaam dan de bloedbaan, bijvoorbeeld in de primaire lymfoïde organen (beenmerg en thymus) en secundaire lymfoïde organen (zoals lymfeklieren, mucosa, PPs, en in de lymfe), en ook in andere organen, bijvoorbeeld de lever. Waar T-cellen die via ACT zijn toegediend zich bevinden zal afhankelijk zijn van 'homing markers' op de T-cellen. De T-cel populatie in het bloed is niet (per se) een afspiegeling van de T-cel populatie elders in het lichaam.

De gemeten levensduur van overgedragen T-cellen geeft dus slechts een minimale indicatie voor de periode waarin de T-cellen kunnen worden aangetoond. In de MRA kan er bij een negatief resultaat van de aantoning niet vanuit worden gegaan dat de T-cellen zijn verdwenen.

Transiënte expressie van de TCR of CAR zou een grotere zekerheid kunnen geven voor de (beperkte) levensduur van de gemodificeerde T-cellen. Er is aangetoond dat expressie van een TCR of CAR vanaf mRNA dat in de cellen is gebracht, kortdurend is. Birkholz et al. (2009) hebben bijvoorbeeld in *in vitro* studies mRNA constructen, coderend voor CARs gericht tegen twee tumor-geassocieerde antigenen (*human epidermal growth factor receptor B* (ErbB) en CEA), door electroporatie in T-cellen gebracht. De CAR expressie die daarop volgde, *ex vivo*, was transiënt, met een halfwaardetijd van twee dagen. Negen dagen na electroporatie was de CAR expressie verdwenen. Inmiddels is ook in een *in vivo* toepassing de effectiviteit aangetoond van T-cellen waarin via mRNA electroporatie een CAR tot expressie werd gebracht (Tchou et al., 2017). Er zijn meer gegevens nodig over de effectiviteit en de levensduur van T-cellen die zijn gemodificeerd met mRNA, maar als de levensduur inderdaad beperkt is, dan beperkt dat ook de eventuele risico's van overdracht van deze T-cellen.

3.5 Conclusies over de schadelijke werking van T-cellen t.b.v. de MRA

De conclusie voor de MRA, volgend uit paragrafen 3.3, en 3.4., is dat herkenning van een antigeen door een TCR of CAR op andere cellen dan de doelwitcel die vernietigd moet worden, incidenteel plaatsvindt. Er zijn mogelijkheden om het optreden van deze schadelijke effecten te voorspellen, maar de verklaring van met name een *off-target off-tumor* effect wordt meestal pas gevonden nadat het effect is waargenomen, en men dus 'weet waar men moet zoeken'. In principe kunnen *off-tumor* effecten al optreden bij de behandeling van de patiënt, en als ze dan optreden is dat natuurlijk een indicatie dat het effect kan optreden na overdracht van de T-cellen naar derden. Een *off-tumor* effect in een patiënt zal in alle gevallen als een *serious adverse event* (SAE) worden gemeld, en zal dan leiden tot aanscherping van de MRA voor derden. Maar het feit dat er geen SAEs bekend is, is niet zonder meer een aanwijzing dat zij niet op *kunnen* treden. *Off-tumor* effecten worden immers niet gezien bij alle patiënten die een behandeling met T-cellen met dezelfde TCR of CAR ondergaan. Voor iedere TCR of CAR zal daarom per geval een theoretisch gefundeerde risicoanalyse moeten worden uitgevoerd zodat de mogelijke risico's van het optreden van een *off-tumor* effect in derden wordt ingeschat.

Als een T-cel een antigeen herkent dat uitsluitend voorkomt op de tumorcellen van de patiënt, zoals een neo-antigeen, dan zal het risico voor derden die de T-cel ontvangen verwaarloosbaar zijn. Van meer algemeen voorkomende antigenen zoals antigenen van embryonale eiwitten zal per geval bekeken moeten worden wat de kans is dat zij op gezonde cellen van derden voorkomen. Bij het beoordelen van de risico's die foeten en pasgeborenen zouden kunnen lopen, zouden deze overwegingen zeker meegenomen moeten worden in de risicoanalyse.

Het is moeilijk om op basis van de beschikbare gegevens absolute uitspraken te doen over de levensduur van bij ACT toegediende cytotoxische T-cellen. Zolang het antigeen aanwezig is zal regelmatige stimulering van T-cellen leiden tot verdere proliferatie van de T-cellen. Voor tumor-specifieke T-cellen kan worden verwacht dat het stimulerende antigeen na enige tijd is verdwenen, als de therapie slaagt. De effector T-cellen zullen dan ook verdwijnen, maar (eventuele) T_{CM} cellen kunnen aanwezig blijven en, als de muizenstudie waarin dit werd aangetoond maatgevend is, dan is overdracht van slechts één zo'n T_{CM} cel voldoende om te leiden tot proliferatie na activering door zijn antigeen. Tegen deze achtergrond kan niet worden uitgesloten dat overdracht van gg-T-cellen levenslang kan plaatsvinden, en kan leiden tot proliferatie van de gg-T-cellen in de ontvanger.

Transiënte expressie van de TCR of CAR in een gg-T-cel, bijvoorbeeld vanaf mRNA dat via electroporatie in de cellen is ingebracht, zou een grotere zekerheid kunnen geven over de beperkte duur van de expressie van TCR of CAR, en het mogelijke risico voor een derde na overdracht.

4 Conclusies, beschouwingen en aanbevelingen

In dit hoofdstuk wordt een aantal conclusies getrokken op basis van de in dit rapport gepresenteerde MRA van de overdracht van gg-T-cellen van een patiënt naar een ontvanger. In aanvulling daarop volgt een aanzet voor vragen die kunnen worden gesteld om de omvang van potentiële schadelijke effecten van gg-T-cellen te bepalen. Paragraaf 4.2 geeft vervolgens een beschouwing over de toepassing van het voorzorgbeginsel op deze MRA, en gaat in op juridische aspecten van de vergunningverlening voor klinische studies met gg-T-cellen. Dit hoofdstuk wordt afgesloten met een aantal aanbevelingen van de auteurs omtrent de MRA van klinische toepassingen van gg-T-cellen.

4.1 De MRA van overdracht van T-cellen

De aanname die ten grondslag ligt aan de MRA die in dit rapport wordt behandeld is dat gg-T-cellen die bij ACT aan een patiënt worden toegediend onder bepaalde omstandigheden kunnen worden overgedragen naar een andere persoon (de 'ontvanger') en vervolgens in de ontvanger kunnen leiden tot schadelijke effecten.

Bij het inschatten van het risico dat schadelijke effecten in de ontvanger optreden, worden twee factoren in beschouwing genomen: 1) de overdrachtsmogelijkheden en de mate van blootstelling aan de gg-T-cellen (bepalend voor de kans), en 2) de aard en omvang van de schadelijke effecten van de gg-T-cellen (bepalend voor de omvang van het schadelijk effect).

Deze twee factoren worden hieronder nader behandeld.

4.1.1 Overdrachtswijzen en blootstelling

Blootstelling van een ontvanger aan gg-T-cellen kan, zoals in dit rapport aangegeven, alleen plaatsvinden door directe overdracht van cellen van de patiënt naar het lichaam van de ontvanger. Mogelijke wegen van blootstelling zijn:

- 1) overdracht van moeder naar kind, via de placenta en via borstvoeding,
- 2) overdracht bij transplantatie van weefsels en organen van een patiënt naar een ontvanger,
- 3) overdracht bij transfusie van bloed(componenten) van een patiënt,
- 4) seksuele overdracht, via semen van de patiënt.

In de literatuur zijn geen gevallen beschreven van overdracht van gg-T-cellen van een patiënt naar een ontvanger. Conclusies over de mogelijke blootstelling aan gg-T-cellen berusten daarom op waargenomen overdracht van niet-gg-T-cellen langs de vier genoemde wegen van blootstelling.

4.1.1.1 Overdracht van gg-T-cellen bij zwangerschap en borstvoeding is niet uitgesloten

Zowel bij zwangerschap als bij het geven van borstvoeding verplaatsen T-lymfocyten zich van de moeder naar het kind, respectievelijk via de placenta en het darmepitheel. Dit leidt tot aanwezigheid van maternale lymfocyten in de nakomeling.

Overdracht via de placenta resulteert in de langdurige aanwezigheid van naar schatting 10^6 T-cellen in een nakomeling, waaronder een relatief hoog aantal memory T-cellen. Vanuit de gegevens over aan-

tallen T-cellen in moedermelk kan de schatting worden gemaakt dat een baby iedere dag via borstvoeding aan 10^7 T-cellen wordt blootgesteld. Hoeveel er daarvan het darmepitheel passeren is lastig te zeggen.

Van MMc T-cellen is aangetoond dat zij immunologische effecten hebben. Aangenomen wordt dat overdracht van $CD4^+$ T-cellen leidt tot tolerantie tegen NIMAs. Ook van MMc T-cellen die via borstvoeding worden overgedragen zijn immunologische effecten beschreven, bijvoorbeeld de ontwikkeling van DTH in de nakomeling. Van MMc $CD8^+$ T-cellen wordt verondersteld dat zij immunologisch functioneel zijn en een cytotoxische werking kunnen hebben.

MMc T-cellen kunnen levenslang aanwezig blijven in de nakomeling. Er zijn aanwijzingen dat zij door hun antigeen geactiveerd kunnen worden, wat dan leidt tot expansie.

Er zijn geen experimentele gegevens bekend over overdracht via placenta of borstvoeding van (gg-)T-lymfocyten afkomstig van ACT. Er is echter geen reden om aan te nemen dat deze T-cellen niet worden overgedragen en dat zij niet, afhankelijk van het celtype (bijvoorbeeld memory T-cellen) net als MMc T-cellen een lange levensduur zouden kunnen hebben. Na een eventuele overdracht zouden deze gg-T-cellen geactiveerd kunnen worden en snel kunnen expanderen als het kind cellen draagt die het antigeen presenteren of dragen dat wordt herkend door de gg-TCR of de CAR van de gg-T-cel. Het is bekend uit een muizenmodel dat overdracht van één T_{CM} voldoende is om te expanderen tot memory en effector T-cellen.

Aangenomen wordt dat T-cellen ook kunnen overleven in gedoneerde moedermelk. De kans op overdracht van gg-T-cellen langs die weg naar derden is daarom in principe gelijk aan de kans op overdracht via directe borstvoeding van de moeder op het eigen kind.

Concluderend, op basis van bovenstaande gegevens kan niet uitgesloten worden dat overdracht van gg-T-cellen via de placenta en via borstvoeding plaatsvindt van een patiënt naar een nakomeling. De kans dat er daadwerkelijk overdracht plaatsvindt zal afhankelijk zijn van het aantal gg-T-cellen dat in de moeder aanwezig is. Voor een goed onderbouwde kwantificering van die kans is nader onderzoek nodig om de daadwerkelijke overdrachtsmogelijkheden van gg-T-cellen te bepalen.

4.1.1.2 Overdracht van gg-T-cellen bij orgaan en weefseltransplantatie is niet uitgesloten

Organen die worden gebruikt voor SOT zullen naar verwachting slechts geringe aantallen T-lymfocyten dragen, aangezien zij voor transplantatie worden gespoeld met perfusievloeistof. Dat geldt niet voor de stamcellen die worden gebruikt voor HSCT. Bij HSCT zal het transplantaat ook naïeve of effector T-cellen bevatten, wat kan leiden tot GVHD. GVHD is een frequente complicatie bij HSCT, wat aangeeft dat de transmissie van T-cellen naast de stamcellen, op deze manier efficiënt verloopt. Incidenteel kan ook bij SOT GVHD optreden. De kans op het ontstaan van GVHD wordt onder meer bepaald door het aantal lymfocyten die in het transplantaat aanwezig zijn. Als er naast de gewone T-cellen ook gg-T-cellen aanwezig zijn in het transplantaat dan zullen deze eveneens worden overgedragen.

Het lot van bij transplantatie overgedragen (gg-)T-cellen zal onder meer afhankelijk zijn van de immunologische toestand van de ontvanger, de mate van immuunsuppressie die is aangelegd om afstoting van het transplantaat te voorkomen en de mate van HLA-matching tussen donor en ontvanger. Overgedragen gg-T-cellen kunnen worden geëlimineerd door afstotingsreacties, maar in hoeverre dat gebeurt is afhankelijk van de mate van matching tussen de HLAs van donor en ontvanger. Zowel de mate

van matching als de toepassing van immuunsuppressie verschilt afhankelijk van het type transplantatie.

De conclusie met betrekking tot weefsel- en orgaantransplantatie is dat niet kan worden uitgesloten dat gg-T-cellen die in een patiënt aanwezig zijn, worden overgedragen naar de ontvanger en daar actief blijven.

4.1.1.3 Kans van overdracht van gg-T-cellen bij bloedtransfusie is zeer klein, tot uitgesloten

Bij bloedtransfusie wordt de erythrocytenfractie van het bloed gebruikt, waar leukocyten uit zijn verwijderd. Er worden routinematig kwaliteitscontroles uitgevoerd op de bewerkte erythrocytenfracties, waarbij wordt gekeken naar de aanwezigheid van lymfocyten. Desondanks bevat de erythrocytenfractie doorgaans nog een dusdanig aantal lymfocyten dat het optreden van GVHD mogelijk is indien de HLAs van donor en ontvanger gematched zijn. HLA matching is een van de indicaties waarbij een erythrocytenfractie bestraald wordt met het doel om eventueel aanwezige lymfocyten te doden.

Concluderend worden er bij bloedtransfusie al, afhankelijk van de omstandigheden, voorzorgen genomen tegen de aanwezigheid van potentieel schadelijke T-cellen. Deze voorzorgen zouden voldoende moeten zijn om ook de eventueel aanwezige gg-T-cellen te elimineren. Op grond van deze gegevens mag aangenomen worden dat de kans op het optreden van nadelige effecten van de overdracht van gg-T-cellen d.m.v. bloedtransfusie zeer klein is, en zelfs verwaarloosbaar als de cellen bestraald zijn.

4.1.1.4 Overdracht van gg-T-cellen bij seksuele overdracht wordt uitgesloten geacht

Over de overdracht van gg-T-cellen bij seksuele activiteit via semen bestaan geen consistente gegevens. De kans op overdracht lijkt zeer klein, de kans op schadelijke effecten lijkt verwaarloosbaar.

4.1.2 Kans op overdracht hangt af van de levensduur van gg-T-cellen in de patiënt

Naast de route, wordt de kans op blootstelling ook bepaald door de vraag of er in de patiënt nog gg-T-cellen aanwezig zijn op het moment van overdracht. Die kans wordt bepaald door de levensduur van de toegediende gg-T-cellen in de patiënt. Het is lastig om uitspraken te doen over de grootte van die kans (zie paragraaf 3.5). In de literatuur worden voor de overlevingsduur waarden gevonden van minstens een jaar maar er wordt ook een halfwaardetijd van > 16 jaar beschreven. Het is echter niet goed mogelijk om vast te stellen dat er geen gg-T-cellen meer aanwezig zijn in de bloedbaan, vanwege de detectielimieten die verbonden zijn aan de gehanteerde methodieken. Daarnaast kunnen er gg-T-cellen aanwezig zijn buiten de bloedbaan, in de perifere lymfoïde organen en andere organen, die bij routine sampling van bloed dus niet worden gedetecteerd. Ook als er geen gg-T-cellen in het bloed meer detecteerbaar zijn kunnen er dus nog gg-T-cellen aanwezig zijn die, eventueel na activering en expansie, beschikbaar kunnen komen voor overdracht. Overdracht van een zeer gering aantal cellen kan al effecten hebben: in een muizenmodel is vastgesteld, dat transfer van één T_{CM} cel voldoende is om, na stimulering door hun antigeen, een effectieve immuun respons te ontwikkelen.

Conclusie

Het is niet mogelijk om op basis van de beschikbare gegevens absolute uitspraken te doen over de levensduur van bij ACT toegediende gg-T-cellen, en om op basis van de levensduur voorspellingen te

doen of overdracht van gg-T-cellen geheel uit te sluiten is. In de MRA zal er als *worst case* vanuit worden gegaan dat overdracht plaats kan vinden en dat de overgedragen gg-T-cellen immunologische activiteit kunnen vertonen, inclusief cytotoxische werking en de mogelijkheid van expansie van de cellen als zij worden geactiveerd door hun antigeen.

4.1.3 Aard en omvang van de schadelijke effecten van gg-T-cellen

Cytotoxische gg-T-cellen herkennen hun doelwitcel doordat zij een interactie hebben met een specifiek antigeen dat wordt herkend op de doelwitcel. De cytotoxische gg-T-cellen kunnen bijeffecten hebben in de patiënt. Bij T-cellen die gericht zijn tegen tumoren worden twee bijeffecten onderscheiden: 1) *on-target off-tumor* effecten, die optreden als het herkende antigeen ook voorkomt op gezonde cellen, en

2) *off-target off-tumor* effecten, als de T-cel naast het antigeen op de doelwitcellen ook andere antigenen herkent die op gezonde cellen voorkomen.

De ernst van deze schadelijke effecten hangt af van de functie van de gezonde cellen die worden gedood en van de efficiëntie waarmee dit plaatsvindt. De schadelijke effecten die optreden in de patiënt kunnen in een vergelijkbare mate ook optreden in de ontvanger.

Er zijn mogelijkheden om *off-tumor* effecten te voorspellen, maar een *off-tumor* effect wordt meestal pas achteraf gevonden en verklaard. Wanneer een *off-tumor* effect bij de behandeling van een patiënt wordt waargenomen, geeft dat zekerheid over de mogelijkheid dat het effect kan optreden indien de gg-T-cellen in een derde terecht zouden komen. Voor alle effecten geldt dat afwezigheid van SAEs nog niet betekent dat zij voor *kunnen* komen. Bij de voorspelling van *on-target* effecten kunnen de volgende redeneringen helpen. Als de gg-T-cellen een antigeen herkennen waarvan met voldoende zekerheid kan worden voorspeld dat het uitsluitend op de tumorcel voorkomt, is het risico voor derden die de gg-T-cellen ontvangen in principe verwaarloosbaar. Voorbeeld: neo-antigenen die, omdat zij een unieke mutatie dragen, uitsluitend op tumorcellen van één patiënt zullen voorkomen. Van antigenen van embryonale eiwitten wordt ook verwacht dat zij niet op andere cellen buiten de tumor tot expressie komen; deze kunnen echter wél voorkomen bij foeten en jonggeborenen. Per antigeen zal bekeken moeten worden wat de kans is dat zij op gezonde cellen van derden voorkomen. In het geval van antigenen van embryonale eiwitten zal bij een foetus of een pasgeborene met die kans rekening moeten worden gehouden.

De omvang van de schadelijke effecten kan lastig worden voorspeld. In het uiterste geval leiden ze echter tot de dood van de ontvanger; de omvang kan dus extreem groot zijn.

4.1.4 Uitvoering van de MRA van overdracht van gg-T-cellen

Voor het uitvoeren van een MRA van overdracht van gg-T-cellen zijn gegevens nodig over de blootstelling en de aard en omvang van het mogelijke schadelijke effect.

In het algemeen moet in de MRA rekening gehouden worden met een kans op blootstelling die varieert van 'niet uit te sluiten' tot 'zeer klein', afhankelijk van een groot aantal factoren die per geval beoordeeld moeten worden. De aanvrager zal gegevens kunnen verschaffen over de precieze manier van

toepassing van de gg-T-cellen. Daaruit kunnen per geval conclusies worden getrokken over de blootstelling. De redeneringen die daarbij gelden zijn samengevat in paragraaf 4.1.1.

Over de schadelijke effecten die kunnen optreden kunnen inschattingen worden gemaakt over de mogelijkheden dat een schadelijk effect kan optreden, en over de mogelijke omvang. De aanvrager kan daarbij gegevens verschaffen aan de hand van de volgende vragenlijst:

- Welk epitoom van welk antigeen wordt herkend door de gg-T-cel, en daarmee samenhangend, wat is de kans op *on-target* effecten na overdracht van deze gg-T-cellen naar een derde:
 - Om welk type antigeen gaat het: een differentiatie eiwit van de tumor, een eiwit dat tot overexpressie komt in de tumor maar ook elders wordt gepresenteerd, een eiwit betrokken bij de embryogenese of een neo-antigeen, of gaat het om een ander type antigeen, bijvoorbeeld een viraal eiwit?
 - In relatie tot het type antigeen: wat is de kans dat het antigeen ook elders (*off-tumor*) op (foetale) lichaamscellen wordt gepresenteerd?
 - In hoeverre kan worden aangenomen dat het antigeen specifiek is voor de patiënt die het gemodificeerde T-cel product heeft ontvangen?
 - Zijn er gegevens over de mogelijkheid van *off-target* effecten?
- Zijn er extra modificaties aangebracht in de gg-T-cel die het mogelijk maken om veiligheidsmaatregelen te nemen, zoals *suicide switches*, en is aangetoond dat met de betreffende *switch* snel genoeg kan worden gereageerd om de T-cellen te doden in het geval schadelijke reacties optreden? Zijn de *switches* ook bij derden (bijv. baby's) toepasbaar?
- Zijn er extra modificaties aangebracht in de gg-T-cel, zoals *knock-down/knock-out* van de endogene TCR of het endogene HLA, die het functioneren en de levensduur van de gg-T-cel kunnen beïnvloeden?
- Welke specifieke studies heeft de aanvrager gedaan omtrent de veiligheid van de TCR/CAR en wat zijn de resultaten?
- Wat is de verwachte levensduur van de gg-T-cellen in de behandelde patiënt?

Als, op basis van de gegevens die de aanvrager aanlevert, de kans dat de gg-T-cellen na overdracht schadelijke effecten kunnen hebben niet (voldoende) kan worden uitgesloten, moet in beschouwing worden genomen in hoeverre de overgedragen T-cellen in de ontvanger kunnen overleven.

Vragen die hierbij aan de orde komen zijn:

- In hoeverre is de ontvanger immuuncompetent en tolerant voor de overgedragen gg-T-cellen?
- Heeft er een matching plaatsgehad van de HLAs van donor en ontvanger?
- Heeft de ontvanger lymfodepletie ondergaan?
- Wordt er in de ontvanger herhaalde stimulatie van de gg-T-celpopulatie verwacht door herhaald contact met het antigeen, waardoor langere overleving van gg-T-cellen te verwachten is?

Deze overwegingen zijn aan de orde voor een ontvanger die blootgesteld kan worden aan de gg-T-cellen. Ze worden pas actueel wanneer de situatie van blootstelling zich daadwerkelijk voor kan doen: bij een beslissing over zwangerschap, het geven van borstvoeding, het gebruik van een weefsel of orgaan van de patiënt voor transplantatie of het gebruik van bloed van de patiënt voor bloedtransfusie. De overwegingen moeten op dat moment worden gemaakt door degene die in de situatie verantwoordelijkheid draagt en de risico's moet afwegen.

4.2 Toepassing van het voorzorgbeginsel; juridische implicaties

De MRA van de overdracht van gg-T-cellen naar derden berust op de hypothese dat de overdracht plaats kan vinden en kan leiden tot schadelijke effecten. Bij de uitvoering van de MRA wordt bij gebrek aan directe empirisch vastgestelde gegevens, gebruik gemaakt van een groot aantal veronderstellingen. Dat leidt tot een grote mate van wetenschappelijke onzekerheid. In zo'n geval is het voorzorgbeginsel van toepassing, dat berust op Principle 15 van de [Rio Declaration](#): 'Where there are threats of serious or irreversible damage, lack of full scientific certainty shall not be used as a reason for postponing cost-effective measures to prevent environmental degradation.'

Bij de MRA van klinische toepassingen van ggo's bestaat de 'environmental degradation' uit risico's voor derden die in contact kunnen komen met het ggo. Het voorzorgbeginsel is dus van toepassing als er een risico is op ernstige niet-omkeerbare schadelijke effecten voor derden, en zegt dat als de hypothese waarop het risico berust niet bewezen is, dat geen reden is om niet over te gaan tot het nemen van risicobeheersingsmaatregelen; die maatregelen moeten echter wel kosteneffectief en proportioneel⁷ zijn.

Wat betekent bovenstaande voor de MRA van de overdracht van gg-T-cellen?

De aanduiding 'ernstige onomkeerbare schadelijke effecten' kan hier geïnterpreteerd worden als de mogelijkheid dat de blootstelling leidt tot de dood van de betrokkene. Dergelijke schade is hier aan de orde: er zijn SAEs bekend waaraan patiënten zijn overleden. Zo'n SAE zou ook kunnen optreden na overdracht van gg-T-cellen naar een derde, hoewel er veelal beargumenteerd zal kunnen worden dat de kans op een SAE zeer klein is. Hier ligt een belangrijk beslispunt in de MRA: is de kans zo klein dat men het nemen van risicobeheersingsmaatregelen, zelfs in de context van het voorzorgbeginsel, niet nodig acht, of wil men toch risicobeheersingsmaatregelen adviseren?

In het tweede geval volgt de vraag: welke risicobeheersingsmaatregel is proportioneel? De meest vergaande risicobeheersingsmaatregel zou het weigeren van een vergunning zijn voor de behandeling met gg-T-cellen. Die maatregel lijkt disproportioneel, gezien het grote belang dat een behandeling met gg-T-cellen heeft voor de patiënt, of voor de ontwikkeling van een methode die van groot belang is voor toekomstige patiënten, vergeleken met de geringe kans van overdracht van gg-T-cellen die in bijzondere gevallen kan optreden na de toediening.

De uiterste risicobeheersingsmaatregel die overwogen zou kunnen worden, zou een in de vergunning vastgelegde verplichting voor de patiënt kunnen zijn om niet op te treden als orgaan- of bloeddonor en, voor vrouwen, om niet zwanger te worden, en geen borstvoeding te geven⁸. Zo'n verplichting is niet juridisch afdwingbaar, omdat een persoon grondwettelijk geen onderwerp kan zijn van een vergunning. De verplichting is daarom in feite niet effectief. Dan resteert het opnemen in de vergunning van een advies aan de patiënt om de voorgestelde risicobeheersingsmaatregelen te accepteren. Deze situatie geldt overigens voor de vergunningverlening voor klinische toepassingen van ggo's in het algemeen, en wordt daar ook onderkend.

⁷ De term 'cost effective', waarover het voorzorgbeginsel spreekt, kan dit geval geïnterpreteerd worden als: proportioneel in de context van een risk-benefit afweging.

⁸ Dit laatste ligt eigenlijk al besloten in de verplichting om 'niet zwanger te worden', maar zou volledigheidshalve opgenomen moeten worden omdat het een weg van blootstelling is.

Juridische aspecten van transplantatie en transfusie

Bij gebruik van weefsels en organen van een patiënt die met gg-T-cellen is behandeld voor transplantatie of bloedtransfusie is er sprake van introductie in het milieu als er daadwerkelijk gg-T-cellen aanwezig zijn in het transplantaat. Aangezien het hier feitelijk introductie in het milieu betreft, is deze activiteit vergunning plichtig onder het Besluit ggo. Echter, de transplantatie betreft een medische handeling en de risico's die de patiënt daarbij ondervindt vallen niet onder het beoordelingskader van deze vergunning, maar horen tot de verantwoordelijkheid van de behandelend arts, dit alles onder regelgeving van het ministerie van VWS. Voor bloedtransfusie geldt iets vergelijkbaars: de toepassing zal steeds plaatsvinden in het kader van medisch handelen, en de risico's betreffen steeds een patiënt die het gedoneerde bloed ontvangt.

Bij transplantatie en bloedtransfusie vindt de blootstelling dus plaats in een keten van medisch handelen, van een (succesvol) behandelde patiënt naar een volgende patiënt, en de veiligheid die iedere keer aan de orde is, is uitsluitend die van de patiënt. De milieuvergunning voor het gebruik van gg-T-cellen in een klinische omgeving zou daarom beperkt moeten worden tot het signaleren van risico's die kunnen optreden bij het gebruik van weefsels en organen van een patiënt voor transplantatie en bloedtransfusie. De milieuvergunning zou in die gevallen kunnen vermelden dat de aanvrager gegevens heeft verschaft, aan de hand van de opsomming in de vorige paragraaf, om in deze gevallen een adequate risicoanalyse te kunnen doen. Daarnaast zou vermeld kunnen worden dat de verantwoordelijkheid voor de levering en het gebruik van donororganen en bloed voor transfusies elders berust, namelijk bij de Nederlandse Transplantatie Stichting (NTS), bij Sanquin en bij de behandelend arts. Buiten deze keten van blootstelling is geen sprake van blootstelling van derden in het milieu in algemene zin. Zowel de NTS als Sanquin hanteren overigens al regels die hier relevant zijn. De NTS geeft een [model-protocol postmortale orgaan- en weefseldonatie](#) uit. Een patiënt die een tumorbehandeling heeft ondergaan zal, op basis van de maligniteit waaraan de patiënt lijdt of heeft geleden, vallen onder de algemene relatieve contra-indicatie (een contra-indicatie waarvan vooraf zorgvuldig moet worden afgewogen of het gebruik wel of niet moet worden toegestaan): 'maligniteiten, met uitzondering van enkele primaire, niet-gemetastaseerde hersentumoren en indien de voorgeschiedenis een curatief behandelde maligniteit vermeldt'. Sanquin [hanteert de regel](#) dat iemand geen bloed meer mag geven als er ooit bij haar of hem kanker is vastgesteld, ook niet als deze persoon volledig genezen is. De NTS en Sanquin spreken zich niet uit over de consequenties die een behandeling met gg-T-cellen tegen een virusinfectie heeft voor donatie.

Juridische aspecten van zwangerschap en borstvoeding

Vragen rond zwangerschap van, en het geven van borstvoeding door een (genezen) patiënt die met gg-T-cellen is behandeld, kunnen in de toekomst van groot praktisch belang zijn. De kans is groot dat behandeling met gg-T-cellen juist ook actueel wordt voor vormen van tumoren bij jonge kinderen. Als deze kinderen volledig genezen dan zal er op latere leeftijd (bij vrouwen) zeker sprake kunnen zijn van een kindwens. Het is zeer wenselijk dat er nu reeds wordt nagedacht over de manier waarop er wordt omgegaan met die kindwens. De vraag is aan de orde of de risicobeheersingsmaatregel om zwangerschap en het geven van borstvoeding voor deze vrouwen te verbieden, dan wel in het algemeen af te raden, niet een te zware maatregel is omdat het risico gering is.

Net als bij transplantatie en bloedtransfusie kan het optreden van een zwangerschap bij, en het geven van borstvoeding door een (genezen) patiënt die gg-T-cellen heeft ontvangen worden gezien als intro-

ductie in het milieu van gg-T-cellen, waarvoor een vergunning onder het Besluit ggo nodig zou zijn. Juridisch gezien is de overdracht van gg-T-cellen via zwangerschap en borstvoeding gecompliceerd. Het Besluit ggo is van toepassing op situaties waarin er sprake is van blootstelling van mens en het milieu aan een ggo. Tot de 26^e week van de zwangerschap, dat wil zeggen tot het moment dat het kind buiten de baarmoeder in leven gehouden zou kunnen worden, geldt dat het ongeboren kind nog niet als een zelfstandig individu erkend wordt. Om die reden kan er tot dat moment een abortus worden uitgevoerd. Om die reden kan ook worden gesteld dat er tot dat moment geen sprake is van blootstelling van een zelfstandig persoon aan ggo's, mocht er sprake zijn van overdracht van gg-T-cellen van moeder naar foetus.

Ook na de 26^e week van de zwangerschap is de juridische situatie niet eenduidig. Weliswaar kan er dan sprake zijn van blootstelling van een derde, de foetus, aan gg-T-cellen die via de placenta worden overgedragen, en van het kind via het geven van borstvoeding. Maar het is de vraag in hoeverre de moeder daarvoor als verantwoordelijk kan worden gezien binnen de kaders van een vergunning onder het Besluit ggo.

De beslissing om zwanger te worden en om borstvoeding te geven is een persoonlijke beslissing. Een vergelijkbaar voorbeeld van een situatie waarin de baby schade kan ondervinden van een medische omstandigheid van de moeder is een HIV infectie. In dat geval wordt geadviseerd om in een overleg tussen een behandelend arts en de vrouw over te gaan tot medicatie tijdens de zwangerschap en om af te zien van borstvoeding (RIVM informatie '[HIV en zwangerschap](#)', en [Bijlage 1](#) (Hiv infectie en aids bij kinderen) van de [LCI-richtlijn 'Hivinfectie'](#)). Er is daar dus sprake van overleg, niet van een verbod.

Een oplossing kan zijn om in de vergunning voor de behandeling van een patiënt met gg-T-cellen een advies over de besluitvorming op te nemen voor een vrouw die zwanger wil worden, en voor de begeleiding bij en na een zwangerschap. Het zou goed zijn als de betrokkenen: de vrouw en een medische begeleider van een zwangerschap, bekend zijn met de risico's voor een (ongeboren) kind die voort kunnen vloeien uit een behandeling met gg-T-cellen. De vrouw zou bekend gemaakt moeten worden met deze risico's in de vorm van een algemeen begrijpelijke conclusie van de MRA die haar zou moeten worden gegeven voorafgaand aan de behandeling met de gg-T-cellen. Hierbij zou de vrouw ook gewezen moeten worden op risico's van het gebruik van haar moedermelk door derden. Een verbod op het afstaan van moedermelk voor gebruik door derden ligt juridisch gezien eenvoudiger. Dit kan gezien worden als het (potentieel) in het milieu brengen van gg-T-cellen, dat niet zonder vergunning mag plaatsvinden. Hierop kan in de milieuvergunning voor de behandeling van de patiënt worden gewezen.

4.3 Aanbevelingen

Tenslotte een aantal aanbevelingen door de auteurs van dit rapport: de COGEM kan bij haar overwegingen bij de advisering over klinische toepassingen van gg-T-cellen de volgende aspecten in beschouwing nemen:

- Het verdient aanbeveling om duidelijk kenbaar te maken aan betrokkenen dat het in het algemeen niet uitgesloten kan worden dat bij klinische toepassingen van gg-T-cellen, deze cellen worden overgedragen van de patiënt naar derden. De wegen waarlangs dit kan gaan zijn via weefsel, organen of bloed van de patiënt als deze beschikbaar komen voor donatie, via placenta-contact bij

zwangerschap van de patiënt, of via moedermelk als de patiënt borstvoeding geeft. De kans op overdracht via HSCT, SOT en bloedtransfusie is onzeker, en afhankelijk van de situatie.

- De gevolgen van een eventuele overdracht kunnen zeer ernstig zijn. Onder het voorzorgbeginsel kan per geval in een risicoanalyse worden bepaald in hoeverre er sprake is van een al dan niet verwaarloosbaar risico, op basis van gegevens die de aanvrager kan aanleveren.
- Het verdient aanbeveling om in de milieuvergunning een passage op te nemen over de verantwoordelijkheid voor de levering en het gebruik van donororganen en bloed voor transfusies en over de risicoanalyse die in dat geval zou moeten worden gedaan.
- In een vergunning onder het Besluit ggo zou kunnen worden opgenomen dat het verboden is om moedermelk van een vrouw die een behandeling met gg-T-cellen heeft ondergaan, beschikbaar te stellen aan derden voor gebruik, bijvoorbeeld als babyvoeding.
- In het advies kan erop gewezen worden dat het verstandig, danwel noodzakelijk is, om een met gg-T-cellen behandelde vrouw met een kinderwens van de eventuele risico's van zwangerschap en het geven van borstvoeding op de hoogte te stellen, als de hierboven genoemde risicoanalyse daartoe aanleiding geeft. Hierbij zou kunnen worden benadrukt dat deze risico's nog niet zeker zijn, maar niet uitgesloten mogen worden.
- Het verdient aanbeveling om de voortgang van de wetenschap op dit gebied goed te volgen, en om terstond tot nadere informatievoorziening over te gaan zodra zich ontwikkelingen voordoen die relevant zijn voor de patiënt en de directe omgeving van de patiënt.
- Bij gebrek aan experimentele onderbouwing van de mogelijkheid dat gg-T-cellen na ACT worden overgedragen aan derden verdient het aanbeveling om dit tekort te signaleren / publiceren en studies in die richting te stimuleren, in het bijzonder studies naar het optreden en effect van overdracht van gg-T-cellen tijdens de zwangerschap en het geven van borstvoeding op het blootgestelde kind.

Referenties

Bedoya F, Frigault MJ, Maus MV (2017) The Flipside of the Power of Engineered T Cells: Observed and Potential Toxicities of Genetically Modified T Cells as Therapy. *Mol Ther* 25, 314-320. doi: 10.1016/j.ymthe.2016.11.011

Berger C, Jensen MC, Lansdorp PM et al. (2008) Adoptive transfer of effector CD8⁺ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J. Clin. Investig.* 118, 294–305. doi: 10.1172/JCI32103

Best JA, Blair DA, Knell J et al. (2013) Transcriptional insights into the CD8⁺ T cell response to infection and memory T cell formation. *Nat Immunol.* 14, 404–412. doi: 10.1038/ni.2536

Birkholz K, Hombach A, Krug C et al. (2009) Transfer of mRNA encoding recombinant immunoreceptors reprograms CD4(b) and CD8(b) T cells for use in the adoptive immunotherapy of cancer. *Gene Ther* 16, 596–604. doi: 10.1038/gt.2008.189

Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ et al. (2016) Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Oncolytics* 3, 16011. doi: 10.1038/mto.2016.11

Brentjens RJ, Rivière I, Park JH et al. (2011) Safety and persistence of adoptively transferred autologous CD19-targeted T cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory B-cell leukemias. *Blood* 118, 4817-4828. doi: 10.1182/blood-2011-04-348540

Cabinian A, Sinsimer D, Tang M et al. (2016) Transfer of Maternal Immune Cells by Breastfeeding: Maternal Cytotoxic T Lymphocytes Present in Breast Milk Localize in the Peyer's Patches of the Nursed Infant. *PLoS ONE* 11, e0156762. doi: 10.1371/journal.pone.0156762

Cameron BJ, Gerry AB, Dukes J et al. (2013) Identification of a Titin-derived HLA-A1–presented peptide as a cross-reactive target for engineered MAGE A3–directed T cells. *Sci. Transl. Med.* 5, 197ra103. doi: 10.1126/scitranslmed.3006034

Chodon T, Comin-Anduix B, Chmielowski B et al. (2014) Adoptive transfer of MART-1 T-cell receptor transgenic lymphocytes and dendritic cell vaccination in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 20, 2457-2465. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3017

Conte RA, Luke S, Verma RS (1995) Enumeration of semen leucocytes by fluorescence in situ hybridisation technique. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 48, M319-M321.

Di Rosa F en Pabst R (2005) The bone marrow: a nest for migratory T cells. *Trends in Immunol.* 26, 360-366. doi: 10.1016/j.it.2005.04.011

Firor AE, Jares A, Ma Y (2015) From humble beginnings to success in the clinic: Chimeric antigen receptor-modified T-cells and implications for immunotherapy. *Exp Biol Med* 240, 1087–1098. doi: 10.1177/1535370215584936

Fowler DW en Bodman-Smith MD (2014) Harnessing the power of Vδ2 cells in cancer immunotherapy. *Clin Exp Imm*, 180: 1–10. doi: 10.1111/cei.12564

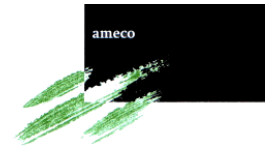
- Garfall AL, Maus MV, Hwang W-T et al. (2015) Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19 for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 373, 1040-1047. doi: 10.1056/NEJMoa1504542
- Ghosh MK, Nguyen V, Muller HK et al. (2016) Maternal Milk T Cells Drive Development of Transgenerational Th1 Immunity in Offspring Thymus. *J Immunol.* 197 2290-2296. doi: 10.4049/jimmunol.1502483
- Gill S, Tasian SK, Ruella M et al. (2014) Preclinical targeting of human acute myeloid leukemia and myeloablation using chimeric antigen receptor-modified T cells. *Blood* 123, 2343-2354. doi:10.1182/blood-2013-09-529537
- Golubovskaya en Wu (2016) Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers* 8, 36. doi:10.3390/cancers8030036
- Graef P, Buchholz VR, Stemmerger C et al. (2014) Serial transfer of single-cell-derived immunocompetence reveals stemness of CD8⁺ central memory T cells. *Immunity* 41, 116-126. doi: 10.1016/j.immuni.2014.05.018
- Haanen J (2013) Cellular Therapy of Cancer Symposium, London, UK
- Hassiotou F, Hepworth AR, Metzger P et al. (2013) Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. *Clinical & Translational Immunology* 2, e3. doi:10.1038/cti.2013.1
- Heemskerk B, Kvistborg P, Schumacher TNM (2013) The cancer antigenome. *EMBO Journal* 32, 194-203. doi: 10.1038/emboj.2012.333
- Heslop HE, Slobod KS, Pule MA et al. (2010) Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood* 115, 925-935. doi: 10.1182/blood-2009-08-239186
- Huang J, Khong HT, Dudley ME et al. (2005) Survival, Persistence, and Progressive Differentiation of Adoptively Transferred Tumor-Reactive T Cells Associated with Tumor Regression. *J Immunother.* 28, 258-267. doi: 10.1097/01.cji.0000158855.92792.7a
- Jain L, Vidyasagar D, Xanthou M et al. (1989) In vivo distribution of human milk leucocytes after ingestion by newborn baboons. *Arch Dis Child.* 64, 930-3. doi: 10.1136/adc.64.7_Spec_No.930
- Jansen MAE, Van den Heuvel D, Van Zelm MC et al. (2015) Decreased Memory B Cells and Increased CD8 Memory T Cells in Blood of Breastfed Children: The Generation R Study. *PLoS ONE* 10(5): e0126019. doi: 10.1371/journal.pone.0126019
- Johnson KL, Samura, O, Nelson JL et al. (2002) Significant Fetal Cell Microchimerism in a Nontransfused Woman With Hepatitis C: Evidence of Long-Term Survival and Expansion. *Hepatology* 36, 1295-1297. doi: 10.1053/jhep.2002.35622
- Johnson LA, Heemskerk B, Powell DJ et al. (2006) Gene transfer of tumor-reactive TCR confers both high-avidity and tumor reactivity to nonreactive peripheral blood mononuclear cells and tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol.* 177, 6548-6559. doi: 10.4049/jimmunol.177.9.6548
- Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME et al. (2009) Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*, 114: 535-546. doi: 10.1182/blood-2009-03-211714

- Jorritsma A, Gomez-Eerland R, Dokter M et al. (2007) Selecting highly affine and well-expressed TCRs for gene therapy of melanoma. *Blood* 110: 3564-3572. doi: 10.1182/blood-2007-02-075010
- Kalos, M, Levine, BL, Porter, DL et al. (2011). T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Anti-tumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia. *Sci Transl Med.* 3: 95ra73. doi: 10.1126/scitranslmed.3002842
- Kanaan SB, Gammill HS, Harrington WE et al. (2017) Maternal microchimerism is prevalent in cord blood in memory T cells and other cell subsets, and persists post-transplant. *Oncol Immunology*, 6, e1311436. doi:10.1080/2162402X.2017.1311436
- KDIGO (2009) KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 9 Suppl 3:S1-155. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02834.x
- Kelton W, Waindok AC, Pesch T et al. (2017) Reprogramming MHC specificity by CRISPR-Cas9-assisted cassette exchange. *Sci. Rep.* 7, 45775. doi: 10.1038/srep45775
- Kinder JM, Stelzer IA, Arck PC et al. (2017) Immunological implications of pregnancy-induced microchimerism. *Nature Reviews Immunology* 17, 483-494. doi: 10.1038/nri.2017.38
- Kohler S, Pascher A, Junge G et al. (2008) Graft versus host disease after liver transplantation – a single center experience and review of literature. *Transpl Int.* 21, 441-451. doi: 10.1111/j.1432-2277.2007.00625.x.
- Kopolovic I, Ostro J, Tsubota H et al. (2015) A systematic review of transfusion-associated graft-versus-host disease. *Blood.* 126, 406-414. doi: 10.1182/blood-2015-01-620872
- Kumar SN, Stewart GL, Steven WM et al. (1989) Maternal to neonatal transmission of T-cell mediated immunity to *Trichinella spiralis* during lactation. *Immunology* 68, 87-92.
- Kunert A, Straetmans T, Govers C et al. (2013) TCR-engineered T cells meet new challenges to treat solid tumors: choice of antigen, T cell fitness, and sensitization of tumor milieu. *Front Immunol* 4, 363. doi: 10.3389/fimmu.2013.00363
- Lamers CH, Sleijfer S, Van Steenbergen S et al. (2013) Treatment of metastatic renal cell carcinoma with CAIX CAR-engineered T cells: clinical evaluation and management of on-target toxicity. *Mol. Ther.* 21, 904–912. doi:10.1038/mt.2013.17
- Li LP, Lampert JC, Chen X et al. (2010) Transgenic mice with a diverse human T cell antigen receptor repertoire. *Nat. Med.* 16, 1029–1034. doi: 10.1038/nm.2197
- Linette GP, Stadtmauer EA, Maus MV et al. (2013) Cardiovascular toxicity and titin cross-reactivity of affinity-enhanced T cells in myeloma and melanoma. *Blood* 122, 863–871. doi: 10.1182/blood-2013-03-490565
- Loubière LS, Lambert NC, Flinn LJ et al. (2006) Maternal microchimerism in healthy adults in lymphocytes, monocyte/macrophages and NK cells. *Lab. Invest.* 86, 1185–1192. doi:10.1038/labinvest.3700471

- Ma LJ, Walter B, DeGuzman A et al. (2008) Trans-Epithelial Immune Cell Transfer during Suckling Modulates Delayed-Type Hypersensitivity in Recipients as a Function of Gender. *PLoS ONE* 3(10): e3562. doi:10.1371/journal.pone.0003562
- Mardiros A, Dos Santos C, McDonald T et al. (2013) T cells expressing CD123-specific chimeric antigen receptors exhibit specific cytolytic effector functions and antitumor effects against human acute myeloid leukemia. *Blood* 122, 3138–3148. doi:10.1182/blood-2012-12-474056
- Marin V, Cribioli E, Philip B et al. (2012) Comparison of different suicide-gene strategies for the safety improvement of genetically manipulated T cells. *Hum Gene Ther Methods* 23, 376–86. doi:10.1089/hgtb.2012.050
- Maude SL, Fitzgerald JC, Fisher BT et al. (2014a) Outcome of pediatric acute myeloid leukemia patients receiving intensive care in the United States. *Pediatr. Crit. Care Med.* 15, 112–120. doi:10.1097/PCC.0000000000000042
- Maude SL, Frey N, Shaw PA et al. (2014b) Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med* 371, 1507–1517. doi: 10.1056/NEJMoa1407222
- Maus MV, Fraietta JA, Levine BK et al. (2014) Adoptive Immunotherapy for Cancer or Viruses. *Annu Rev Immunol.* 32, 189–225. doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120136
- Mitsuyasu RT, Anton PA, Deeks SG et al. (2000) Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Blood* 2000; 96: 785–793.
- Moench TR (2014) Cell-Associated Transmission of HIV Type 1 and other Lentiviruses in Small-Animal Models. *J Infect Dis.* 210 Suppl 3:S654–659. doi: 10.1093/infdis/jiu368
- Molès J-P, Tuaillon E, Kankasa C, et al. (2017) Breastfeeding-related maternal microchimerism. *Nat Rev Immunol.* 17, 729–1. doi: 10.1038/nri.2017
- Molès J-P, Tuaillon E, Kankasa C, et al. (2018) Breastmilk cell trafficking induces microchimerism-mediated immune system maturation in the infant. *Pediatr Allergy Immunol.* 29, 133–143. doi: 10.1111/pai.12841
- Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR et al. (2006) Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314: 126–129. doi: 10.1126/science.1129003
- Morgan RA, Yang JC, Kitano M et al. (2010) Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol. Ther.* 18, 843–851. doi: 10.1038/mt.2010.24
- Morgan RA, Chinnasamy N, Abate-Daga D et al. (2013) Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE- A3 TCR gene therapy. *J Immunother* 36, 133–151. doi: 10.1097/CJI.0b013e3182829903
- Oliveira G, Ruggiero E, Stanghellini MT et al. (2015) Tracking genetically engineered lymphocytes long-term reveals the dynamics of T cell immunological memory. *Sci Transl Med* 7: 317ra198. doi: 10.1126/scitranslmed.aac8265

- O'Rourke DM, Nasrallah MP, Desai A et al. (2017) A single dose of peripherally infused EGFRvIII-directed CAR T cells mediates antigen loss and induces adaptive resistance in patients with recurrent glioblastoma. *Science Translational Medicine* 9, eaaa0984. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa0984
- Parkhurst MR, Yang JC, Langan RC et al. (2011) T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol. Ther.* 19, 620–626. doi: 10.1038/mt.2010.272
- Perna F, Berman SH, Soni RK et al. (2017) Integrating Proteomics and Transcriptomics for Systematic Combinatorial Chimeric Antigen Receptor Therapy of AML. *Cancer Cell.* 32, 506-519.e5. doi: 10.1016/j.ccell.2017.09.004
- Porter DL, Levine BL, Kalos M et al. (2011). Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 365: 725-733. doi: 10.1056/NEJMoa1103849
- Porter DL, Hwang WT, Frey NV et al. (2015) Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia. *Sci. Transl. Med.* 7, 303ra139 doi: 10.1126/scitranslmed.aac5415
- Powell DJ, Dudley ME, Robbins PF et al. (2005) Transition of late-stage effector T cells to CD27⁺ CD28⁺ tumor-reactive effector memory T cells in humans after adoptive cell transfer therapy. *Blood* 105, 241-250. doi: 10.1182/blood-2004-06-2482.
- Ramos CA, Savoldo B, Torrano V et al. (2016) Clinical responses with T lymphocytes targeting malignancy-associated k light chains. *J. Clin. Invest.* 126, 2588–2596. doi: 10.1172/JCI86000
- Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK et al. (2015) NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med* 21, 914-921. doi: 10.1038/nm.3910
- Robbins PF, Li YF, El-Gamil M et al. (2008). Single and dual amino acid substitutions in TCR CDRs can enhance antigen-specific T cell functions. *J. Immunol.* 180, 6116-6131. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.6116
- Rohaam MW, Van den Berg JH, Kvistborg P et al. (2018) Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a viable treatment option. Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a viable treatment option. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 6, 102. doi: 10.1186/s40425-018-0391-1
- Rooney C, Leen A (2012) Moving Successful Virus-specific T-cell Therapy for Hematopoietic Stem Cell Recipients to Late Phase Clinical Trials. *Molecular Therapy–Nucleic Acids* 1, e55. doi: 10.1038/mtna.2012.49
- Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM et al. (2011) Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 17, 4550-4557. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0116
- Saad A en Lamb LS (2017) Ex vivo T-cell depletion in allogeneic hematopoietic stem cell transplant: past, present and future. *Bone Marrow Transplantation* 52, 1241–1248. doi: 10.1038/bmt.2017.22

- Sabbaj S, Ghosh MK, Edwards BH et al. (2005) Breast milk-derived antigen- specific CD8⁺ T cells: an extralymphoid effector memory cell population in humans. *Journal of immunology*. 174, 2951–2956. doi: 10.4049/jimmunol.174.5.2951
- Sakkas LI, Xu B, Artlett CM, et al. (2002) Oligoclonal T Cell Expansion in the Skin of Patients with Systemic Sclerosis. *J Immunol* 168, 3649–3659. doi: 10.4049/jimmunol.168.7.3649
- Scheper W, Sebesteyn Z, Küball J (2016) Cancer immunotherapy using T cells: dealing with diversity. pp 139-145 in: Recent advances in $\gamma\delta$ T cell biology: new ligands, new functions and new translational perspectives. Ed. Kiebelitz D en Déchanet-Merville J. *Frontiers in Immunology*. doi: 10.3389/978-2-88919-784-2
- Scholler J, Brady TL, Binder-Scholl G et al. (2012) Decade-Long Safety and Function of Retroviral-Modified Chimeric Antigen Receptor T Cells. *Sci Transl Med*. 4, 132ra53. doi: 10.1126/scitranslmed.3003761
- Schumacher TN en Schreiber RD (2015) Neoantigens in cancer immunotherapy. 348, 69-74. doi: 10.1126/science.aaa4971
- Sharpe M en Mount N (2015) Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Disease Models & Mechanisms* 8, 337-350. doi:10.1242/dmm.018036
- Shlomchik WD (2007) Graft-versus-host disease. *Nature Reviews Immunology* 7, 340-352 doi:10.1038/nri2000
- Simpson AJG, Caballero OL, Jungbluth A et al. (2005) Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 5, 615-625. doi: 10.1038/nrc1669
- Smith EP (2010) Hematologic Disorders after Solid Organ Transplantation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010, 281-286. doi: 10.1182/asheducation-2010.1.281
- Stanislawski T, Voss RH, Lotz C, Sadovnikova E et al. (2001). Circumventing tolerance to a human MDM2-derived tumor antigen by TCR gene transfer. *Nat. Immunol*. 2, 962-970. doi: 10.1038/ni717
- Tilburgs T en Strominger JL (2013) CD8⁺ Effector T Cells at the Fetal–Maternal Interface, Balancing Fetal Tolerance and Antiviral Immunity. *Am J Reprod Immunol*. 69, 395-407. doi: 10.1111/aji.12094
- Tchou J, Zhao Y, Levine BL et al. (2017) Safety and Efficacy of Intratumoral Injections of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells in Metastatic Breast Cancer. *Cancer Immunol Res*. 5, 1152-1161. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0189
- Torikai H en Cooper LJN (2016) Translational Implications for Off-the-shelf Immune Cells Expressing Chimeric Antigen Receptors. *Mol Ther* 24, 1178–1186. doi:10.1038/mt.2016.106
- Tuboly S, Bernáth S, Glávits R et al. (1995) Intestinal absorption of colostral lymphocytes in newborn lambs and their role in the development of immune status. *Acta Vet. Hung*. 43, 105–115.
- Walker RE, Bechtel CM, Natarajan V et al. (2000) Long-term in vivo survival of receptor-modified syngeneic T cells in patients with human immunodeficiency virus infection. *Blood* 96, 467-474.



Wang C, Wu Z, Wang Y et al. (2016) Autologous T cells expressing CD30 chimeric antigen receptors for relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma: an open-label phase I trial. Clin Cancer Res 23, 1155–1166. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1365.

Weiss, PPW (2005) The Storage of Breast Milk. International Children Medical Research Association, Birmingham, UK https://www.mambaby.com/uploads/tx_ddownload/Abstract6042.pdf

Wolff H (1995) The biologic significance of white blood cells in semen. Fertility and Sterility 63, 1143-1155.

Zou C, Zhao P, Xiao Z et al. (2017) $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy. Oncotarget 8, 8900-8909. doi: 10.18632/oncotarget.13051

Bijlage 1

Adviezen van de COGEM betreffende klinische studies met gg-T-cellen

De adviezen worden gepresenteerd in omgekeerde tijdsvolgorde, van de nieuwste adviezen naar de oudste. De tekst is overgenomen uit de COGEM adviezen.

[CGM/180612-01](#) **Klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen (JCAR017) tegen B-cel maligniteiten.**

Aan patiënten met B-cel maligniteiten worden gg-T-cellen (JCAR017) toegediend. JCAR017 wordt vervaardigd door patiëntspecifieke lichaamseigen T-cellen *ex vivo* te transduceren met een replicatie-deficiënte lentivirale SIN vector. Deze vector bevat sequenties voor een CAR gericht tegen antigenen (CD19) die aanwezig zijn op het celoppervlak van (maligne) B-cellen. De gg-T-cellen worden vervolgens teruggeplaatst in de patiënt om de B-cel maligniteit te behandelen. Het doel van de klinische studie is om de veiligheid en verdraagbaarheid van JCAR017 te onderzoeken. Mogelijke risico's die bij deze klinische studie kunnen optreden, hebben vooral betrekking op de eventuele vorming en verspreiding van replicatiecompetent lentivirus (RCL) en de aanwezigheid van vrije virusdeeltjes in het medisch product.

De aanvrager maakt geen melding over eventuele uitsluiting van zwangere patiënten of patiënten die borstvoeding geven. Het is niet uitgesloten dat gg-T-cellen via borstvoeding of placenta kunnen worden overgedragen van moeder op kind. Het is bij de COGEM niet bekend hoe lang dergelijke T-cellen in het kind kunnen persisteren. Met het oog op het voorzichtigheidsprincipe wil zij daarom de vergunninghouder adviseren om patiënten aan wie JCAR017 wordt toegediend, af te laten zien van het geven van borstvoeding. De COGEM zal, na nader onderzoek, terugkomen op de levensduur van gg-T-cellen, de mogelijke overdracht van gg-T-cellen van moeder op kind, en eventuele risico's van gg-T-cellen voor het kind. Vooralsnog zijn er echter geen aanwijzingen dat er risico's verbonden zijn aan de overdracht van gg-T-cellen van moeder op kind.

[CGM/180103-02](#) **Klinische studie met retroviraal getransduceerde T-cellen tegen hematologische maligniteiten.**

Autologe T-cellen, genetisch gemodificeerd met behulp van verschillende retrovirale vectoren, brengen CARs tot expressie, gericht tegen 'B-cell Maturation Antigen' (BCMA) en 'Transmembrane Activator and calcium-modulator and Cyclophilin ligand Interactor' (TACI), de CD19 en CD22 antigenen aanwezig op B-cellen, of T Cell Receptor Beta Constant 1 (TRBC1) aanwezig op T-cellen.

Mogelijke risico's hebben vooral betrekking op de eventuele vorming en verspreiding van replicatiecompetent retrovirus (RCR) en de aanwezigheid van vrije virusdeeltjes in het medisch product. Het is niet uitgesloten dat gg-T-cellen via borstvoeding of placenta kunnen worden overgedragen van moeder op kind.

Patiënten worden door de onderzoekers gevraagd om geen bloed te doneren, hun huisarts te informeren over deelname aan de studie en een 'emergency safety card' bij zich te dragen.

[CGM/171013-02](#) **Klinische studie met TEG001 – retroviraal getransduceerde T-cellen met een $\gamma\delta$ T-cel receptor.**

Autologe T-cellen, genetisch gemodificeerd met behulp van een retrovirale vector, brengen een $\gamma\delta$ T-cel receptor tot expressie. Mogelijke risico's hebben vooral betrekking op de eventuele vorming en verspreiding van RCR, de aanwezigheid van vrije virusdeeltjes in het medisch product en de eventuele verspreiding van de gg-T-cellen in het milieu. Geadviseerd wordt dat patiënten aan wie de gg-T-cellen worden toegediend, afzien van donatie van organen, bloed of bloedproducten, en van het geven van borstvoeding.

CGM/160229-01 Klinische studie met lentiviraal getransduceerde T-cellen tegen B-cel maligniteiten.

Autologe T-cellen, genetisch gemodificeerd met behulp van een lentivirale vector, brengen een CAR op hun celoppervlak tot expressie die CD19 herkent op B-cellen en ze in staat stelt de B-cellen te vernietigen.

Risico's die bij deze klinische studie kunnen optreden, hebben met name betrekking op de eventuele vorming en verspreiding van RCL, de aanwezigheid van vrije virusdeeltjes in het te testen medische product en de effecten van de mogelijke verspreiding van de gg-T-cellen in het milieu.

CGM/161130-01 Klinische studie met getransduceerde T-cellen tegen B-cel maligniteiten.

Autologe T-cellen, genetisch gemodificeerd met behulp van een retrovirale vector, brengen een CAR op hun celoppervlak tot expressie die CD19 herkent op B-cellen en ze in staat stelt de B-cellen te vernietigen.

Risico's die bij deze klinische studie kunnen optreden hebben vooral betrekking op de eventuele vorming en verspreiding van RCR, de aanwezigheid van vrije virusdeeltjes in het medische product en de eventuele verspreiding van de gg-T-cellen in het milieu.

CGM/110913-01 Klinische studie met retroviraal getransduceerde T-cellen tegen leukemie.

Allogene CMV en EBV specifieke T-cellen worden getransduceerd met een retrovirale vector coderend voor een HA-1 antigeenspecifieke TCR. Het HA-1 antigeen komt selectief tot expressie op hematopoietische cellen, inclusief leukemiecellen. De COGEM acht de kans verwaarloosbaar klein dat er nog infectieuze vrije virusdeeltjes in het preparaat zullen zitten op het moment dat dit aan de patiënt wordt toegediend.

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 terecht zouden komen.

CGM/110831-01 Klinische studie met retroviraal getransduceerde humane T-lymfocyten.

Autologe T-cellen van melanoompatiënten worden *ex vivo* getransduceerd met een retrovirale vector coderend voor een melanoomspecifieke TCR.

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.