

Aan de staatssecretaris van Openbaar Vervoer en Milieu
Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat
drs. Ch.A. Jansen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 10 juli 2024
KENMERK CGM/240710-02
ONDERWERP Advies werkzaamheden met replicatie-deficiënte gammaretrovirale vectordeeltjes

Geachte heer Jansen,

Naar aanleiding van een adviesvraag over het dossier IG 24-042_2.8_000 getiteld 'Gebruik van Muis gammaretrovirale self inactivating vectoren op ML-I', dat is ingediend door Stichting Amsterdam UMC deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de productie van replicatie-deficiënte muizengammaretrovirale vectordeeltjes, en over de transductie van primaire humane cellen met deze vectordeeltjes op ML-I. Voor deze werkzaamheden gelden n.a.v. een generiek COGEM-advies enkele voorwaarden voor omlaagschaling van de werkzaamheden naar ML-I. Zo mag er geen replicatie-competent retrovirus (RCR) aanwezig zijn in de vectorbatch en dienen de cellen gescreend te worden op aanwezigheid van gammaretrovirussen.

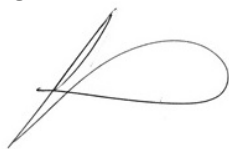
De cellen die de aanvrager voor deze werkzaamheden wil gebruiken, zijn recent aangekocht bij de American Type Culture Collection (ATCC) door een ander laboratorium dan dat van de aanvrager. De COGEM ziet geen onderbouwing om af te wijken van de voorwaarde dat getest moet worden op de afwezigheid van gammaretrovirussen in de betreffende HEK-293T cellen.

De COGEM acht gezien de aard van het productiesysteem de kans op vectormobilisatie en vorming van RCR verwaarloosbaar klein wanneer er geen exogeen retrovirus aanwezig is. Het is daarom niet noodzakelijk om te testen of de vectorbatch vrij is van RCR.

De COGEM stemt in met de inschaling van de productie- en transductiewerkzaamheden op ML-I, met inachtneming van enkele aanvullende voorschriften en voorwaarden.

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

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c.

- Drs. Y. de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's
DG Milieu en Internationaal

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM lid dr. A.T. Das niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Omlaagschaling van werkzaamheden met replicatie-deficiënte gammaretrovirale vectordeeltjes

COGEM advies CGM/240710-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met replicatie-deficiënte zelf-inactiverende (SIN) gammaretrovirale vectordeeltjes gebaseerd op muizengammaretrovirussen. De aanvraag (IG 24-042) is afkomstig van Stichting Amsterdam UMC. De aanvrager is voornemens replicatie-deficiënte zelf-inactiverende muizengammaretrovirale vectordeeltjes te produceren, om hiermee vervolgens primaire humane cellen te transduceren. De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met omlaagschaling van de productie- en transductiewerkzaamheden naar ML-I, met inachtneming van enkele aanvullende voorwaarden en voorschriften.

2. Achtergrondinformatie over (endogene) gammaretrovirussen

De familie van de *Retroviridae* bestaat uit twee subfamilies en elf genera, waaronder het genus *Gammaretrovirus*.^{1,2} Retrovirussen worden gekenmerkt door een enkelstrengs RNA-genoom dat door het virale ‘reverse transcriptase’ wordt omgezet naar dubbelstrengs DNA, dat in het genoom van de gastheer integreert (proviraal genoom). Het enkelstrengs RNA-genoom van retrovirussen is omgeven door capsid-eiwitten (gecodeerd door het *gag*-gen) en een lipidenmembraan waarin zich de envelopeiwitten bevinden die het gastheertropisme van het virus bepalen (gecodeerd door het *env*-gen). De virusdeeltjes bevatten alle eiwitten die nodig zijn om de virale levenscyclus te kunnen opstarten, waaronder de enzymen reverse transcriptase, integrase en protease. Deze eiwitten worden in het virale genoom gecodeerd door het (*pro*)/*pol* gen^a. Voor de binding van het capsid-eiwit met het virale RNA en de uiteindelijke vorming van virusdeeltjes is het ‘packaging’ signaal Ψ in het RNA essentieel.

2.1 Endogene retrovirussen

Het retrovirale provirale genoom dat is geïntegreerd in het genoom van de gastheer, blijft hierin aanwezig zolang de gastheercel blijft bestaan.³ Vanuit het provirale genoom in de gastheercel kunnen nieuwe infectieuze virusdeeltjes gevormd worden die op hun beurt nieuwe cellen infecteren (horizontale transmissie).^{3,4} Wanneer de integratie van het retrovirus plaatsvindt in het genoom van een kiemcel, zoals gameten of een embryo, kan de retrovirale sequentie doorgegeven worden aan het nageslacht (verticale transmissie).^{3,4} Een zodanig geïntegreerde retrovirale sequentie wordt een endogeen retrovirus (ERV) genoemd. Dit in tegenstelling tot verspreidende infectieuze replicatie-competente retrovirussen die als exogeen worden aangemerkt. ERV's zijn onderhevig aan selectiedruk waardoor zij in de loop der tijd kunnen verdwijnen uit de populatie ofwel geïnactiveerd worden door mutaties of epigenetische modificaties.⁵ In het genoom van hedendaagse gewervelde dieren worden ERV's aangetroffen, maar dit betreffen vaak ‘overblijfselen’ van infecties met verschillende retrovirussen gedurende de evolutie die miljoenen jaren geleden plaats hebben gevonden.⁶ De overgrote meerderheid van deze ERV's zijn

a. Bij lentivirussen is het *pro* gen gelegen in het *pol* open leesraam (ORF). Bij sommige retrovirussen kan *pro* een eigen ORF hebben.

geïnactiveerd (door mutaties of epigenetische modificaties) en coderen niet voor functionele eiwitten.^{5,7} Zo zou 8% van het menselijk genoom bestaan uit endogene retrovirale elementen (HERV's).⁴ In sommige diersoorten worden (vrijwel) intacte ERV's aangetroffen, waarin de meeste of zelfs alle retrovirale elementen aanwezig zijn. Of een ERV in staat is om nieuwe infectieuze exogene virussen te vormen lijkt afhankelijk te zijn van verschillende factoren. Intacte of vrijwel intacte ERV's kunnen bijvoorbeeld infectieuze exogene retrovirussen vormen bij blootstelling aan mutagene agentia, langdurige celkweek of na recombinatie met verwante exogene virussen.^{8,9,10,11}

2.2 Vectoren op basis van gammaretrovirussen

Voor de productie van replicatie-deficiënte gammaretrovirale vectordeeltjes wordt gebruik gemaakt van zogenaamde 'split packaging' systemen. Hierbij zijn de verschillende virale genen en sequenties opgesplitst, en worden *in trans* over verschillende vectoren verdeeld.¹² Deze opsplitsing moet de vorming van replicatie-competent gammaretrovirus (RCR) voorkomen. De vectoren moeten gezamenlijk in een gastheercel getransfecteerd worden om virusdeeltjes te produceren. De vectoren zijn:

- de 'transfervector', die het gewenste transgen bevat. Het transgen wordt geflankeerd door de virale 5' en 3' long terminal repeat (LTR) sequenties. Ook bevat het construct het 'packagingsignaal' Ψ, zodat het transgen in de virusdeeltjes wordt ingepakt;
- de 'pseudotyping vector', een expressievector voor een envelopeiwit. Vaak wordt het G-eiwit van Vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV, ook wel VSV genoemd) gebruikt, waardoor de resulterende lentivirale vector een breed spectrum van doelwitcellen kan infecteren;
- het 'packagingconstruct', dat de genen bevat die essentieel zijn voor de productie van het virusdeeltje – de genen *gag* en (*pro*)/*pol*.

Omdat de essentiële genen zich niet in het vectorgenoom bevinden, is de vector niet meer in staat om zelfstandig te repliceren. Om tijdens de vectorproductie een replicatie-competente vector te verkrijgen zijn meerdere recombinaties nodig. Dit vermindert de kans op het ontstaan van replicatie-competent virus, die verder wordt verkleind door de sequentieovereenkomst tussen het vectoren te minimaliseren.

Daarnaast zijn er zelf-inactiverende ('self inactivating'; SIN) transfervectoren ontwikkeld.^{13,14} Hierin ontbreekt het domein van de 3'-LTR dat de promotor en 'enhancer' elementen van de LTR bevat. Tijdens reverse transcriptie naar het provirale genoom wordt deze deletie overgenomen in de 5'-LTR waardoor de in het DNA geïntegreerde vector geen functionele LTR promotor/'enhancer' activiteit meer bezit. Hierdoor wordt de initiatie van transcriptie verhinderd, wat de kans op mobilisatie van de vector uit het genoom van de gastheer aanzienlijk reduceert.¹⁴ Daarnaast wordt verondersteld dat hiermee de mogelijke activering van proto-oncogenen wordt voorkomen. Deze SIN-vectoren hebben een interne promotor ten behoeve van de expressie van het transgen, maar deze is niet afkomstig van een gammaretrovirus en heeft een verminderde transformerende potentie.^{13,15,16}

3. Eerder COGEM advies

In 2021 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over de inschaling van werkzaamheden (productie, transductie, en werkzaamheden met getransduceerde cellen) met lenti- en retrovirale

vectoren.¹⁷ Voor werkzaamheden met gammaretrovirale vectoren was de COGEM van oordeel dat bij de productie niet geheel uitgesloten kan worden dat er RCR kan ontstaan, en adviseert zij de productie van deze vectoren op inperkingsniveau ML-II te laten plaatsvinden. De COGEM merkte in dit advies op dat bij cellen van humane oorsprong – waarin restanten endogene gammaretrovirale sequenties aanwezig zijn (klasse I HERVs) – na transductie met een gammaretrovirale vector nooit vorming van RCR is waargenomen. Een uitzonderlijke situatie doet zich voor in gecontamineerde humane cellijnen waarbij in het verleden insleep van een gammaretrovirus is opgetreden in het (dier)laboratorium.^{18,19,20} Hierdoor kan recombinatie optreden tussen muizengammaretrovirussen met de gammaretrovirale vector of mobilisatie van de geïntegreerde retrovirale vector. De kans om met een dergelijke gecontamineerde humane cellijn te werken is klein. De COGEM achtte het echter wel belangrijk dat onderzoekers de humane cellen testen op aanwezigheid van (replicatie-competente) gammaretrovirussen.

Met betrekking tot werkzaamheden met gammaretroviraal getransduceerde humane cellen was de COGEM van oordeel dat het risico op de vorming van RCR in deze cellen verwaarloosbaar klein is, mits zowel de voor transductie gebruikte vectorbatch vrij is van RCR, en de te gebruiken cellen getest zijn op de afwezigheid van (replicatie-competente) gammaretrovirussen. Onder deze voorwaarden adviseerde de COGEM werkzaamheden met gammaretroviraal getransduceerde humane cellen op inperkingsniveau I uit te voeren. Hierbij zijn de volgende aanvullende voorschriften geadviseerd:

- Er vindt een scheiding plaats tussen de werkzaamheden met gammaretroviraal getransduceerde cellen en cellen die behoren tot een species waarvan bekend is dat ze vaak endogene gammaretrovirussen bevatten (o.a. muizen-, vogel-, varkens-, katten-, en rattencellen), in tijd en ruimte om kruiscontaminatie te voorkomen. Voor de scheiding van werkzaamheden kan gedacht worden aan gescheiden laboratoriumruimtes of het gescheiden gebruik van veiligheidskabinetten;
- Voor de gelijktijdige werkzaamheden met andere cellen, dient aangetoond te zijn dat deze vrij zijn van gammaretrovirussen.

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens om op ML-I replicatie-deficiënte vectordeeltjes te produceren in Human embryonic kidney 293T (HEK-293T) cellen door transfectie met transfer-, packaging- en pseudotypingvectoren, om vervolgens met de geproduceerde vectordeeltjes primaire humane cellen te transduceren.

4.1 Achtergrondinformatie over het te gebruiken vectorsysteem

De transfervector bevat de U3-regio van het alpharetrovirus Rous sarcoma virus (RSV is een virus in het species *Alpharetrovirus avirousar*²¹), interne promotor/'enhancer' sequentie van het gammaretrovirus Spleen focus-forming virus (SFFV), evenals een 5'-LTR sequentie van SFFV.²² Het SFFV is een replicatie-deficiënt virus dat ontstaan is door recombinatie tussen het Friend Murine leukemia virus (FrMLV, een stam van het muizengammaretrovirus Moloney murine leukemia virus (MMLV), species *Gammaretrovirus murleu*²³) en sequenties die coderen voor een *env*-gen dat endogeen in de muis aanwezig is.²⁴ Door een deletie in de LTR-sequentie van SFFV in de transfervector is de

vector zelf-inactiverend (SIN). Hierdoor kan de vector na integratie niet gemobiliseerd worden door wildtype retrovirussen. Als pseudotyperingseiwit wordt VSV-G gebruikt. De *gag/pol* sequenties op de 'packagingvector' zijn afkomstig van MLV.

4.2 Productie van vectordeeltjes

De aanvrager is voornemens HEK-293T cellen te transfecteren met de hierboven beschreven vectoren, om replicatie-deficiënte vectordeeltjes te produceren. De aanvrager heeft aangegeven deze cellen te zullen ontvangen van een ander laboratorium, die deze recentelijk heeft aangeschaft bij de American Type Culture Collection (ATCC). Omdat de cellen recent geleverd zijn door de ATCC, gaat de aanvrager ervan uit dat de cellen geen muizengammaretrovirussen zullen bevatten. De cellen zijn niet getest op afwezigheid van hiervan. In het laboratorium van de aanvrager zullen de HEK-293T cellen fysiek gescheiden worden gehouden van muizencellijnen, om insleep van retrovirussen te voorkomen.

4.3 Infectie van cellen

Met de geproduceerde replicatie-deficiënte vectordeeltjes wil de aanvrager primaire humane cellen transduceren. De primaire cellen zijn niet getest op afwezigheid van endogeen muizenretrovirus. De aanvrager heeft niet aangegeven of de primaire humane cellen en de werkzaamheden daarmee ook gescheiden gehouden worden van muizencellijnen.

4.4 Voorgestelde inschaling van de werkzaamheden

De aanvrager verzoekt om omlaagschaling van de productie- en transductiewerkzaamheden naar ML-I. De aanvrager stelt voor om naast de standaard ML-I werkvoorschriften die gelden voor de werkzaamheden, om het transduceren van cellen en handelingen met hoge concentraties SIN-retrovirale deeltjes uit te voeren in een veiligheidskabinet van klasse II, waarbij ook handschoenen gedragen worden.

Bureau GGO heeft voor de productie- en transductiewerkzaamheden de volgende aanvullende voorwaarde en voorschriften opgesteld:

- De te gebruiken cellijnen zijn van humane oorsprong en zijn bewezen vrij van (replicatie-competente) gammaretrovirussen (aangetoond met een gevalideerde test) teneinde het ontstaan van een recombinant virus, of mobilisatie van het vectorgenoom uit te sluiten;
- De retroviraal getransduceerde cellen worden gehanteerd onder condities zoals beschreven in de aanvraag waardoor insleep van retrovirussen wordt voorkomen;
- Voor de gelijktijdige werkzaamheden met andere cellen, dient aangetoond zijn dat deze negatief zijn voor gammaretrovirussen.

Voor de productie van replicatie-deficiënte vector deeltjes stelt Bureau GGO daarnaast als aanvullende voorwaarde voor dat de voor transductie te gebruiken gammaretrovirale vectorbatch vrij is van RCR.

5. Overweging en advies

De aanvrager is voornemens om op ML-I replicatie-deficiënte vectordeeltjes te produceren met behulp van drie gammaretrovirale vectoren, om vervolgens met de geproduceerde deeltjes primaire humane cellen te transduceren. De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met de productie- en transductiewerkzaamheden op ML-I met inachtneming van enkele aanvullende voorwaarden en voorschriften.

5.1 Ontstaan van RCR tijdens de productie van gammaretroviralevectordeeltjes in HEK-293T cellen

De aanvrager heeft aangegeven HEK-293T/17 cellen te zullen ontvangen van een ander lab, die ze recentelijk heeft aangeschaft bij de ATCC. Deze cellen worden niet getest op aanwezigheid van gammaretrovirussen. Er is geen informatie aangeleverd waarmee uitgesloten kan worden dat de HEK-293T cellen vóór aanvang van de voorgenomen werkzaamheden gecontamineerd zijn geraakt met gammaretrovirussen. Eerder heeft de COGEM gesteld dat een gevalideerde test noodzakelijk is om te sluiten dat cellen waarmee dergelijke experimenten worden uitgevoerd (replicatie-competente) gammaretrovirussen bevatten. Gezien het bovenstaande mist de COGEM onderbouwing om af te wijken van deze voorwaarde.

Voor productie van gammaretroviralevectordeeltjes heeft de COGEM in 2021 geadviseerd dat deze werkzaamheden op inperkingsniveau ML-II dienen plaats te vinden, omdat hierbij niet geheel uitgesloten kan worden dat er RCR kan ontstaan. De vector die de aanvrager voornemens is te gebruiken bevat een SIN-deletie. Bij gebruik van vergelijkbare vectorsystemen zijn in het verleden geen RCR's aangetoond.^{25,26} De aanvrager geeft n.a.v. een uitgevoerde sequentieanalyse aan dat er geen sequentieovereenkomst zou zijn tussen de transfer- en packagingvector. De COGEM acht de kans op vectormobilisatie en vorming van RCR verwaarloosbaar klein wanneer er geen exogeen retrovirus aanwezig is. Zij stemt in met de omlaagschaling van de productiewerkzaamheden naar ML-I, met enkele aanvullende voorschriften.

5.2 Transductie van primaire humane cellen met gammaretrovirale vectordeeltjes

Voor de transductiewerkzaamheden van humane cellen met gammaretrovirale deeltjes op inperkingsniveau I heeft de COGEM in 2021 als voorwaarde gesteld dat bij transductie geen RCR aanwezig is in de vectorbatch en dat de cellijnen vrij zijn van gammaretrovirussen.¹⁷ In humane cellen – zoals primaire humane cellen – is aanwezigheid van (vrijwel) intacte endogene gammaretrovirussen uitgesloten. Ook kunnen exogene gammaretrovirussen geen humane cellen infecteren. De COGEM acht het niet noodzakelijk om de primaire humane cellen vooraf te testen op afwezigheid van (replicatie-competente) gammaretrovirussen. Omdat er tijdens de beschreven productiewerkzaamheden geen RCR kan ontstaan, is het niet noodzakelijk om de geproduceerde vectordeeltjes te testen op RCR. Zij stemt in met de inschaling van de transductiewerkzaamheden op ML-I, met enkele aanvullende voorschriften.

5.3 Conclusie

De COGEM adviseert de productie- en transductiewerkzaamheden uit te voeren op ML-I, met inbegrip van enkele aanvullende voorschriften. Voor zowel de productie als transductiewerkzaamheden dient er

strikte scheiding plaats te vinden in ruimte en tijd tussen werkzaamheden met gammaretroviraal getransduceerde cellen en cellen die behoren tot een species waarvan bekend is dat ze vaak endogene gammaretrovirussen bevatten (o.a. muizen-, vogel-, varkens-, katten-, en rattencellen), om kruiscontaminatie en daarmee mogelijke mobilisatie van de vector te voorkomen. Voor gelijktijdige werkzaamheden met andere cellen dient aangetoond zijn dat deze negatief zijn voor gammaretrovirussen.

De COGEM mist onderbouwing om af te wijken van de voorwaarde dat de te gebruiken cellen getest moeten worden op de afwezigheid van gammaretrovirussen. Derhalve dient voor productiewerkzaamheden middels een gevalideerde test aangetoond te zijn dat de te gebruiken HEK-293T cellen vrij zijn van gammaretrovirussen.

De COGEM is van oordeel dat bij het uitvoeren van de voorgenomen werkzaamheden op deze inperkingsniveaus en onder navolging van de hierboven beschreven aanvullende voorschriften, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

6. Signalerende opmerking

De COGEM signaleert dat vanuit Arbo-overwegingen maatregelen noodzakelijk zijn om blootstelling aan vrije vectordeeltjes en mogelijke infectie te voorkomen.¹⁷ Om het risico voor medewerkers te beperken acht zij het uitvoeren van open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse II (VK-II kabinet) en het dragen van handschoenen noodzakelijk bij werkzaamheden waarbij de kans op blootstelling aan vrije vectordeeltjes hoger is, zoals tijdens de productie van de vectordeeltjes of het inzetten van transducties waarbij met grote hoeveelheden vectordeeltjes gewerkt wordt.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Taxonomy browser <https://ictv.global/taxonomy> (bezoekt op 28 juni 2024)
2. Goff SP (2007). Retroviridae: The retroviruses and their replication. In: Fields virology, volume two, fourth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp1401-1441
3. Gifford RJ *et al.* (2018). Nomenclature for endogenous retrovirus (ERV) loci. Retrovirology 15: 59
4. Mager DL & Stoye JP (2014). Mammalian endogenous retroviruses. Microbiol. Spectr. 3: MDNA3-0009-2014
5. Dewannieux M & Heidmann T (2013). Endogenous retroviruses: acquisition, amplification and taming of genome invaders. Curr. Opin. Virol. 3: 646-656
6. Hayward A *et al.* (2013). Broad-scale phylogenomics provides insights into retrovirus-host evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110: 20146-20151
7. Gifford RJ *et al.* (2018). Nomenclature for endogenous retrovirus (ERV) loci. Retrovirology 15: 59
8. Rasheed S *et al.* (1976). Spontaneous release of endogenous ecotropic type C virus from rat embryo cultures. J. Virol. 18: 799-803

9. Lowy *et al.* (1971). Murine leukemia virus: High-frequency activation in vitro by 5-iododeoxyuridine and 5-bromodeoxyuridine. *Science* 174: 155-156
10. Rasmussen HB (1997). Interactions between exogenous and endogenous retroviruses. *J. Biomed. Sci.* 4: 1-8
11. Vanden Abeele *et al.* (2024). Considering endogenous retroviruses present in mammalian species in environmental risk Assessment - A review of scientific information on endogenous retroviruses in respect to their risk for human health and environment during production and use of genetically modified organisms. COGEM rapport CGM 2024-03
12. Goff SP (2013). Retroviridae. In: *Fields virology*, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.* Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
13. Zufferey R *et al.* (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo delivery. *J. Virol.* 72: 9873-9880
14. Kappes JC & Wu X (2002). Safety consideration in vector development *Somat. Cell Mol. Genet.* 126: 147-158
15. Modlich U *et al.* (2009). Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors. *Mol. Ther.* 17: 1919-1928
16. Corrigan-Curay J *et al.* (2012). Challenges in vector and trial design using retroviral vectors for long-term gene correction in hematopoietic stem cell gene therapy. *Mol. Ther.* 20: 1084-1094
17. COGEM (2021). Heroverweging inschaling werkzaamheden met replicatiedeficiënte lenti- en gammaretrovirale vectordeeltjes onder Ingeperkt Gebruik. COGEM advies CGM/210218-01
18. Takeuchi Y *et al.* (2008). Identification of gammaretroviruses constitutively released from cell lines used for human immunodeficiency virus research. *J. Virol.* 82: 12585-12588
19. Delviks-Frankenberry K *et al.* (2012). Recombinant origin, contamination, and de-discovery of XMRV. *Curr. Opin. Virol.* 2: 499-507
20. Takeuchi Y *et al.* (2008). Identification of gammaretroviruses constitutively released from cell lines used for human immunodeficiency virus research. *J. Virol.* 82: 12585-12588
21. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) - Rous sarcoma virus. https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202204988 (bezocht: 3 juli 2024)
22. Schambach A *et al.* (2006). Overcoming promoter competition in packaging cells improves production of self-inactivating retroviral vectors. *Gene Ther.* 13: 1524-1533
23. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) – Friend murine leukemia virus. https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=19982474&taxon_name=Friend%20murine%20leukemia%20virus (bezocht: 3 juli 2024)
24. Cmarik J & Ruscetti S (2010). Friend spleen focus-forming virus activates the tyrosine kinase sf-Stk and the transcription factor PU.1 to cause a multi-stage erythroleukemia in mice. *Viruses* 2: 2235-2257
25. Hacein-Bey-Abina S *et al.* (2014). A modified γ -retrovirus vector for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 371: 1407-1417
26. Cornetta K *et al.* (2023). Replication competent retrovirus testing (RCR) in the National Gene Vector Biorepository: No evidence of RCR in 1,595 post-treatment peripheral blood samples obtained from 60 clinical trials. *Mol. Ther.* 31: 801-809