



## BIJLAGE 2 BIJ DE TOELICHTING VAN DE REGELING TOT WIJZIGING VAN DE REGELING GGO

Gestandaardiseerde milieurisicobeoordeling voor humane cellen genetisch gemodificeerd met virale vectoren afgeleid van Adeno-associated dependoparvovirus A of B zonder schadelijke sequenties.

### 1. KENMERKEN VAN DE GEBRUIKTE GGO'S EN HUN INTRODUCTIE

#### 1.1 Het uitgangsgo

##### *Humane cellen*

De humane cellen zijn afkomstig van de proefpersoon zelf (autoloog) dan wel van een donor (allogeen).

##### *Adeno-associated dependoparvovirus A of B*

De virale vector is afgeleid van *Adeno-associated dependoparvovirus A* dan wel *Adeno-associated dependoparvovirus B* (AAV). AAV behoort tot de familie *Parvoviridae*, genus *Dependoparvovirus*, en is een enkelstrengs DNA virus zonder envelop. AAV is afhankelijk van een helpervirus voor replicatie. Van onder andere adenovirus en herpes simplex virus is bekend dat zij voor AAV als helpervirus kunnen optreden. Het wildtype AAV bezit een tweetal genen, *rep* en *cap*, die verantwoordelijk zijn voor de replicatie en voor de vorming van het manteleiwit van het virus. Daarnaast zijn de door het *rep* gen gecodeerde eiwitten betrokken bij de gerichte integratie van het virusgenoom in het genoom van de gastheer. De *rep* en *cap* genen worden geflankeerd door twee *Inverted Terminal Repeats* (ITR's). De ITR's zijn regulatoire sequenties die nodig zijn voor het inpakken van het genetisch materiaal in de virusmantel, hebben een functie bij de replicatie van AAV en zijn betrokken bij de integratie van het virale DNA in het genoom van de gastheer. Het helpervirus zorgt ervoor dat de geïnfecteerde cel in een zodanige fysiologische staat wordt gebracht dat vermenigvuldiging van AAV mogelijk wordt. Bij afwezigheid van een helpervirus zal AAV een latente infectie veroorzaken, waarbij het virale genoom voornamelijk episomaal in de cel aanwezig is. Het virale genoom kan echter ook integreren in het gastheergenoom.

De meest waarschijnlijke infectieroutes van AAV verlopen via de luchtwegen en via de fecaal-orale route. De primaire route van overdracht is via contact met slijmvliezen. AAV kenmerkt zich door een hoge stabiliteit buiten de gastheer. AAV's kunnen bijna alle gewervelde dieren, inclusief de mens, infecteren. Infecties met AAV komen bij mensen veelvuldig voor. Ruim 90% van de volwassen mensen is seropositief voor AAV. Infecties met AAV worden niet in verband gebracht met een ziektebeeld. Er zijn verschillende serotypen van AAV bekend die onder andere verschillen in gastheerspecificiteit en weefseltropisme.

#### 1.2 De modificatie

AAV *rep* en *cap* zijn in de virale vector vervangen door een expressiecassette. De expressiecassette bevat geen schadelijke sequenties.

#### 1.3 Het ggo

##### *Constructie van de virale vector*

De gebruikte virale vector is gebaseerd op AAV en kan zich door de afwezigheid van de *rep* en *cap* genen niet vermenigvuldigen. De ITR's zijn de enige AAV sequenties die nog aanwezig zijn in de virale vector. Tussen deze twee ITR's is de expressiecassette opgenomen.

##### *Constructie van de genetisch gemodificeerde cellen*

Voor de constructie van de genetisch gemodificeerde cellen is een replicatiedeficiënte AAV vector gebruikt. Het vectordeeltje kan slechts éénmaal een cel infecteren, waardoor het effect uitdovend zal zijn. Met de vectordeeltjes worden cellen van de proefpersoon dan wel de donor *ex vivo* getransduceerd. Het virale genoom zal voornamelijk episomaal in de cel aanwezig zijn, maar kan ook integreren in het gastheergenoom.

##### *Virulentie en stabiliteit van het ggo*

Het ggo bestaat uit *ex vivo* getransduceerde humane cellen. De genetisch gemodificeerde cellen kunnen gedurende lange tijd in de proefpersoon aanwezig blijven. De genetisch gemodificeerde cellen



kunnen vanuit de proefpersoon in het milieu terechtkomen en verspreiden naar derden via bloed, lymfe of excreta. Echter, de cellen kunnen buiten het lichaam van de gastheer (de proefpersoon) niet overleven.

Er kunnen als restant van het productieproces residuele infectieuze vectordeeltjes aanwezig zijn in het toe te dienen medisch product. Deze vectordeeltjes kunnen via shedding vanuit de proefpersoon in het milieu terechtkomen en verspreiden naar derden. Deze residuele vectordeeltjes zijn replicatiedeficiënt, dat wil zeggen dat de virale vector niet in staat is zich zelfstandig te vermeerderen door het ontbreken van de *rep* en *cap* genen. Een vectordeeltje kan een cel slechts éénmaal infecteren. Door het replicatiedeficiënte karakter is de vector verminderd persistent in vergelijking tot het wildtype AAV. Het is de verwachting dat deze vectordeeltjes, evenals wildtype AAV, een hoge stabiliteit hebben buiten de gastheer.

## **1.4 Werkzaamheden**

### *Productie*

De productie van de genetisch gemodificeerde AAV partikels en de genetisch gemodificeerde humane cellen maakt geen onderdeel uit van de aanvraag. De genetisch gemodificeerde AAV partikels en de genetisch gemodificeerde humane cellen zijn geproduceerd onder (*current*) *Good Manufacturing Practice* (GMP) dan wel onder de principes van (*current*) GMP. Het productieproces is van dusdanige aard dat er geen infectieus helpervirus aanwezig is in het medisch product dat aan de proefpersoon wordt toegediend. Er kunnen residuele infectieuze AAV partikels aanwezig zijn in het medisch product. Met het medisch product wordt hierna gedoeld op de genetisch gemodificeerde humane cellen, inclusief mogelijk aanwezige residuele infectieuze AAV partikels.

### *Transport*

Intern transport van het medisch product vindt plaats in een gesloten, breukvaste, lekdichte verpakking. Intern transport van monsters afkomstig van de proefpersonen die het medisch product kunnen bevatten, vindt plaats conform het transport van reguliere patiëntenmonsters.

### *Opslag*

Het medisch product wordt opgeslagen in een gesloten, breukvaste, lekdichte dubbele houder in een ruimte met beperkte toegang. Monsters afkomstig van de proefpersonen die het medisch product kunnen bevatten, worden opgeslagen conform de opslag van reguliere patiëntenmonsters.

### *Preparatie en toediening*

Preparatie en toediening van het medisch product vinden plaats conform standaard ziekenhuishygiënische maatregelen.

### *Monsterafname en verwerking*

Afnemen van monsters van de proefpersonen die het medisch product kunnen bevatten en verwerking van die monsters vinden plaats conform standaard ziekenhuishygiënische maatregelen.

### *Afvalverwerking en besmet materiaal*

Afval dat het medisch product bevat dan wel in aanraking is geweest met het medisch product gedurende preparatie en toediening, wordt afgevoerd als specifiek ziekenhuisafval dan wel als afval dat ggo's bevat. Afval van monsters, van monsterafname en van verwerking van monsters afkomstig van de proefpersonen die het medisch product kunnen bevatten, wordt afgevoerd als specifiek ziekenhuisafval dan wel als afval dat ggo's bevat.

Niet wegwerpbaar materiaal worden gedesinfecteerd met een geschikt gevalideerd desinfectans, dan wel geautoclaveerd. In geval van morsen worden besmette oppervlakken gedesinfecteerd met een geschikt gevalideerd desinfectans.

## **1.5 Interactie met het milieu**

De getransduceerde cellen kunnen buiten de gastheer (de proefpersoon) niet overleven. In de getransduceerde cellen is het virale genoom voornamelijk episomaal in de cel aanwezig, maar dit kan ook integreren in het gastheergenoom. Mogelijk aanwezige residuele AAV vectordeeltjes zijn replicatiedeficiënt en een vectordeeltje kan een cel slechts éénmaal infecteren. Verspreiding van deze



vectordeeltjes in het milieu kan voornamelijk plaatsvinden tijdens de toediening en kort nadat het medisch product aan de proefpersoon is toegediend. Hierdoor kunnen derden en niet-doelwitorganismen blootgesteld worden aan deze vectordeeltjes en kan een infectie van derden en niet-doelwitorganismen niet worden uitgesloten. Indien vectordeeltjes aanwezig zijn in het medisch product, dan zal de hoeveelheid vrijgekomen vectordeeltjes vele malen kleiner zijn dan de hoeveelheid die tijdens de behandeling aan de proefpersoon wordt toegediend. Aangezien deze vectordeeltjes niet in staat zijn tot replicatie zal een eventuele infectie uitdoven.

## 2 MILIEURISICOBEOORDELING

De milieurisicobeoordeling is een technisch-wetenschappelijk werkproces waarbij de mogelijke risico's voor de menselijke gezondheid en het milieu die verbonden zijn aan de werkzaamheden inzichtelijk worden gemaakt.

### 2.1 Algemeen

In de milieurisicobeoordeling wordt beoordeeld of en hoe derden en niet-doelwitorganismen blootgesteld kunnen worden aan het ggo, en of vervolgens transmissie van het ggo naar derden en niet-doelwitorganismen op kan treden. Daarnaast wordt ook in beschouwing genomen welke schadelijke effecten op kunnen treden als het ggo wordt overgedragen naar derden of niet-doelwitorganismen.

### 2.2 Het ggo

#### *Het medisch product*

Het ggo bestaat uit humane cellen welke getransduceerd zijn met een replicatiedeficiënte virale vector afgeleid van AAV zonder schadelijke sequenties. Er kunnen residuele infectieuze AAV vectordeeltjes aanwezig zijn in het toe te dienen medisch product.

### 2.3 Mogelijke schadelijke effecten van het ggo en de evaluatie van de mogelijke gevolgen van deze effecten

#### *Schadelijke effecten gerelateerd aan de persistentie van de genetisch gemodificeerde humane cellen*

Na transductie van de cel kan de beoogde sequentie in het gastheergenoom integreren. Hierdoor bestaat de kans op ontregeling van genen betrokken bij proliferatie waardoor tumoren kunnen ontstaan.

Mogelijke schadelijke effecten die zouden kunnen optreden door expressie van de genproducten zoals aanwezig in de expressiecassette, zullen afhankelijk zijn van de eigenschappen van de specifieke inserties. Aangezien de beoogde expressiecassette geen schadelijke sequenties bevat, worden geen schadelijke effecten verwacht.

#### *Schadelijke effecten gerelateerd aan de persistentie, invasiviteit en selectieve voordelen van mogelijk aanwezige residuele AAV vectordeeltjes*

In de virale vector zijn de *rep* en *cap* genen verwijderd die essentieel zijn voor replicatie van het virus. Deze deleties leiden niet tot een schadelijk effect zoals een verhoogde persistentie of invasiviteit. Integendeel, ze leiden tot een verlaagde persistentie en invasiviteit aangezien de virale vector vanwege deze deleties replicatiedeficiënt is.

Schadelijke effecten worden niet verwacht, aangezien AAV niet pathogeen is en de expressiecassette geen schadelijke sequenties bevat. Onbedoelde blootstelling van derden en niet-doelwitorganismen aan de toegepaste vector kan resulteren in inductie van een immuunrespons tegen de AAV capsid eiwitten. Deze afweerreactie tegen de AAV capsid eiwitten zal asymptomatisch zijn, op dezelfde manier als dat een natuurlijk voorkomende infectie met AAV een asymptomatische afweerreactie induceert.

#### *Schadelijke effecten gerelateerd aan recombinatie met of complementatie van virale sequenties in het vectorgenoom*

Het virale vectorgenoom kan in theorie recombineren indien wildtype AAV en een helpervirus in dezelfde cel aanwezig zijn als het vectorgenoom. Recombinatie kan een hybride sequentie met van AAV afkomstige *rep* en *cap* sequenties en de expressiecassette opleveren. De maximale packagingca-



paciteit van AAV capsiden is ongeveer 5.2 kilobasen (kb) en de *rep*, *cap* en ITR sequenties zijn al ongeveer 4.7 kb. Toevoeging van de expressiecassette zal de maximale packagingcapaciteit van AAV in de praktijk overtreffen waardoor deze hybriden niet kunnen worden ingepakt in AAV capsiden.

Daarnaast kan recombinatie tussen de vector en wildtype AAV resulteren in uitwisseling van homologe sequenties (i.e. de ITRs). Hierdoor kunnen de *rep* en *cap* genen van het wildtype AAV uitgewisseld worden met de expressiecassette van de toegepaste vector. De ontstane virusdeeltjes bevatten de expressiecassette, maar zullen door de afwezigheid van de *rep* en *cap* genen nog steeds replicatiedeficiënt zijn. Anderzijds kunnen er virusdeeltjes ontstaan die de *rep* en *cap* genen bevatten, maar waarbij de expressiecassette afwezig is.

De verloren functies van de virale vector kunnen in theorie gecompenseerd worden indien wildtype AAV en een helpervirus in dezelfde cel aanwezig zijn als de vector. De expressie-producten van het wildtype virus kunnen in dat geval gebruikt worden door de vector, wat de replicatiedeficiënte vector de mogelijkheid biedt te repliceren en andere cellen te infecteren. De hierbij gevormde deeltjes zijn identiek aan de toegepaste vector.

Aan het ontstaan van nieuwe virusdeeltjes als gevolg van complementatie of recombinatie van de toegepaste vector met wildtype AAV zijn geen gevolgen verbonden, omdat de erbij ontstane virussen qua eigenschappen identiek zijn aan de toegepaste vector dan wel wildtype AAV.

#### *Schadelijke effecten gerelateerd aan niet-vector gerelateerde sequenties in mogelijk aanwezige residuele virale partikels*

Tijdens de productie van de AAV vector kunnen gastheercelsequenties van de productiecellen en productiesysteem gerelateerde sequenties terechtkomen in al dan niet infectieuze AAV partikels. Mogelijke schadelijke effecten die dientengevolge zouden kunnen optreden zullen afhankelijk zijn van de eigenschappen van de gevormde deeltjes.

#### *Schadelijke effecten gerelateerd aan insertionele mutagenese van mogelijk aanwezige residuele vectordeeltjes*

Na transductie van de cel kan de virale vector in het gastheergenoem integreren. Hierdoor bestaat de kans op ontregeling van genen betrokken bij proliferatie waardoor tumoren kunnen ontstaan.

#### *Schadelijke effecten gerelateerd aan kiembaantransmissie van mogelijk aanwezige residuele vectordeeltjes*

Na transductie van een kiembaancel kan de virale vector in het gastheergenoem integreren. Mogelijke schadelijke effecten die dientengevolge zouden kunnen optreden zullen afhankelijk zijn van het virale vectorgenoem en de plaats van integratie in het gastheergenoem.

## **2.4 Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect**

### *Waarschijnlijkheid dat schadelijke effecten gerelateerd aan de persistentie van de genetisch gemodificeerde humane cellen zullen optreden*

Genetisch gemodificeerde cellen kunnen gedurende lange tijd in de proefpersoon aanwezig blijven. De genetisch gemodificeerde cellen kunnen vanuit de proefpersoon in het milieu terechtkomen via bloed, lymfe of excreta. De genetisch gemodificeerde cellen kunnen onder andere verspreid worden naar derden via accidentele injectie of contact met een open wond of het slijmvlies van de ogen, neus en mond. De kans op nadelige effecten van de genetisch gemodificeerde cellen in het milieu is verwaarloosbaar omdat de cellen buiten het lichaam van de gastheer (de proefpersoon) niet kunnen overleven. Indien de genetisch gemodificeerde cellen in een ander individu dan de proefpersoon terechtkomen, dan zullen deze cellen doorgaans vernietigd worden door de afweerreactie tegen deze lichaamsvreemde cellen. Behalve deze afweerreactie zijn hierbij geen bijwerkingen te verwachten.

Indien de genetisch gemodificeerde cellen in een immuungecompromitteerd persoon terechtkomen dan bestaat er een theoretische kans dat deze cellen in deze persoon kunnen persisteren. In dit geval kunnen dezelfde effecten optreden als in de proefpersoon. Doordat de hoeveelheid genetisch gemodificeerde cellen in derden vele malen kleiner zal zijn dan in de proefpersoon en er geen sprake is van preconditionering in derden, wordt de kans op negatieve effecten verwaarloosbaar geacht.

Geconcludeerd wordt dat de waarschijnlijkheid van het optreden van mogelijke schadelijke effecten gerelateerd aan persistentie van de genetisch gemodificeerde humane cellen verwaarloosbaar is.



### *Waarschijnlijkheid dat schadelijke effecten gerelateerd aan persistentie, invasiviteit en selectieve voordelen van mogelijk aanwezige residuele AAV vectordeeltjes zullen optreden*

Verspreiding van mogelijk aanwezige residuele vectordeeltjes in het milieu kan voornamelijk plaatsvinden tijdens de toediening en kort nadat het medisch product aan de proefpersoon is toegediend. Hierdoor kunnen derden en niet-doelwitorganismen blootgesteld worden aan deze virusdeeltjes en kan een infectie van derden en niet-doelwitorganismen niet worden uitgesloten. Aangezien de beoogde virale vector niet in staat is tot replicatie zal een eventuele infectie uitdoven.

De hoeveelheid vrijgekomen vectordeeltjes zal vele malen kleiner zijn dan de hoeveelheid die mogelijk residueel in het medisch product aanwezig is en tijdens de behandeling aan de proefpersoon wordt toegediend. Hierdoor is de kans op negatieve effecten door deze vectordeeltjes verkleind ten opzichte van de situatie in de proefpersoon.

Bovendien zullen deze vectordeeltjes na toediening van het medisch product slechts gedurende beperkte tijd in het milieu terecht kunnen komen door uitscheiding. In klinische studies met AAV vectoren is vector DNA gedetecteerd in onder andere urine, feces en speeksel gedurende enkele weken tot maanden na toediening van de AAV vector aan de proefpersoon. Het aanwezig zijn van AAV DNA sequenties hoeft niet te betekenen dat ook daadwerkelijk infectieuze partikels aanwezig zijn. Preklinische studies met recombinant AAV laten zien dat urine geen infectieuze AAV partikels bevat en dat infectieuze vectordeeltjes beperkt zijn tot het plasma en verwijderd zijn uit de circulatie binnen 48 tot 72 uur na toediening.

Geconcludeerd wordt dat de waarschijnlijkheid van het optreden van mogelijke schadelijke effecten gerelateerd aan persistentie, invasiviteit en selectieve voordelen van mogelijk aanwezige residuele vectordeeltjes klein is.

### *Waarschijnlijkheid dat schadelijke effecten gerelateerd aan recombinatie met of complementatie van virale sequenties in het vectorgenoom zullen optreden*

Het is onwaarschijnlijk dat in de getransduceerde cellen complementatie optreedt van de AAV vector dan wel dat er recombinatie optreedt tussen de AAV vector sequenties en wildtype AAV dat mogelijk in de cellen aanwezig kan zijn, aangezien hiervoor de toegepaste vector én wildtype AAV én een helpervirus tegelijkertijd in dezelfde cel aanwezig dienen te zijn, hetgeen zeer onwaarschijnlijk is. Bovendien zal de recombinante dan wel gecomplementeerde AAV vector, indien gevormd, nog steeds afhankelijk zijn van een helpervirus. Indien het helpervirus niet meer in dezelfde cel aanwezig is, zal de replicatie en eventuele verspreiding van de AAV vector uitdoven.

De kans dat er recombinatie dan wel complementatie optreedt in de proefpersoon dan wel in derden of niet-doelwitorganismen is op grond van de bovenstaande overwegingen zeer klein.

### *Waarschijnlijkheid dat schadelijke effecten gerelateerd aan niet-vector gerelateerde sequenties in mogelijk aanwezige residuele virale partikels zullen optreden*

Ook voor de mogelijke aanwezigheid van AAV partikels met niet-vector gerelateerde sequenties geldt dat deze slechts een beperkte tijd in de proefpersoon aanwezig blijven en tijdelijk kunnen worden uitgescheiden in het milieu. Indien vectordeeltjes aanwezig zijn in het medisch product, dan zal de hoeveelheid vrijgekomen vectordeeltjes vele malen kleiner zijn dan de hoeveelheid die tijdens de behandeling aan de proefpersoon wordt toegediend. Hierdoor is de kans op negatieve effecten door deze vectordeeltjes verkleind ten opzichte van de situatie in de proefpersoon. Daarnaast zijn deze partikels hoogstwaarschijnlijk replicatiedeficiënt, aangezien de packagingcapaciteit van AAV beperkt is en het onwaarschijnlijk is dat door recombinatie een AAV wordt gevormd dat *rep*, *cap* én een additionele, functionele sequentie bevat. In het geval dat een eventuele infectie van derden of niet-doelwitorganismen optreedt, zal dit een uitdovend effect zijn. Bovendien is gebleken dat niet-vector gerelateerde sequenties niet tot expressie komen.

Geconcludeerd wordt dat de waarschijnlijkheid dat schadelijke effecten gerelateerd aan niet-vector gerelateerde sequenties in mogelijk aanwezige virale partikels zullen optreden verwaarloosbaar is.

### *Waarschijnlijkheid dat schadelijke effecten gerelateerd aan insertionele mutagenese van mogelijk aanwezige residuele vectordeeltjes zullen optreden*

Bij afwezigheid van een helpervirus zal AAV een latente infectie veroorzaken, waarbij het virale genoom voornamelijk episomaal in de cel aanwezig is. Het virale genoom kan echter ook integreren in het gastheergenoom. Gerichte integratie van AAV in het genoom van de gastheer is afhankelijk van de aanwezigheid van de Rep eiwitten. In afwezigheid van deze eiwitten is integratie voornamelijk



willekeurig. Daarnaast is er, voor zover bekend, tot op heden geen tumorvorming waargenomen in klinische studies die zijn uitgevoerd met recombinante AAV vectoren.

Blootstelling van derden en niet-doelwitorganismen aan mogelijk aanwezige residuele vectordeeltjes gevolgd door een eventuele infectie kan niet worden uitgesloten. Echter, indien vectordeeltjes aanwezig zijn in het medisch product, dan zal de hoeveelheid vrijgekomen vectordeeltjes vele malen kleiner zijn dan de hoeveelheid die tijdens de behandeling aan de proefpersoon wordt toegediend. Hierdoor is de kans op negatieve effecten door deze vectordeeltjes verkleind ten opzichte van de situatie in de proefpersoon. Aangezien de beoogde vector niet in staat is tot replicatie zal een eventuele infectie uitdoven.

Geconcludeerd wordt dat de waarschijnlijkheid van het optreden van schadelijke effecten gerelateerd aan insertionele mutagenese verwaarloosbaar is.

#### *Waarschijnlijkheid dat schadelijke effecten gerelateerd aan kiembaantransmissie van mogelijk aanwezige residuele vectordeeltjes zullen optreden*

Op AAV gebaseerd vector DNA kan enkele weken tot maanden na toediening van de AAV vector in sperma aangetoond worden. Dit is een tijdelijk fenomeen. Het vectorgenoom is aanwezig in de vloeistof en niet in de spermacellen. Daarnaast integreren op AAV gebaseerde vectoren niet efficiënt in het celgenoom, maar zijn voornamelijk episomaal aanwezig, waardoor deze niet persistenten in actief replicerende cellen. Tevens is het optreden van kiembaantransmissie van op AAV gebaseerde virale vectoren niet aangetoond in preklinische studies of in de literatuur beschreven.

Geconcludeerd wordt dat de waarschijnlijkheid dat kiembaantransmissie optreedt verwaarloosbaar is.

### **2.5 Schatting van het algehele risico van het ggo**

Het algehele milieurisico van de toepassing van het ggo is verwaarloosbaar.

### **2.6 Maatregelen voor risicobeheer**

Er zijn vanuit milieurisico oogpunt geen maatregelen voor risicobeheer noodzakelijk.

## **3. CONCLUSIES VAN MOGELIJKE MILIEUEFFECTEN VAN DE INTRODUCTIE**

In bijlage II, onder D1, van de Richtlijn 2001/18 wordt een aantal punten opgesomd die, waar passend, dienen als basis voor de conclusies over de mogelijke milieueffecten van de voorgenomen introductie van de ggo's in het milieu. Voor de volledigheid van de risicobeoordeling worden al deze punten hieronder opgesomd met hun bijbehorende conclusies.

### **3.1 Waarschijnlijkheid dat het ggo in natuurlijke habitats persistent en invasief wordt onder de omstandigheden van de voorgestelde introductie**

De waarschijnlijkheid dat de genetisch gemodificeerde cellen persistent en invasief worden is verwaarloosbaar, omdat de genetisch gemodificeerde cellen op zichzelf, buiten de proefpersoon, niet levensvatbaar zijn. De genetisch gemodificeerde cellen zullen in derden naar verwachting geen verhoogde persistentie of invasiviteit hebben in vergelijking met niet gemodificeerde cellen. Het risico dat de genetisch gemodificeerde cellen in natuurlijke habitats persistent en invasief worden is verwaarloosbaar.

De kans dat residuele infectieuze deeltjes die mogelijk aanwezig zijn ten tijde van toediening persistent en invasief worden is verwaarloosbaar. Het betreft immers replicatiedeficiënte vectordeeltjes. AAV infecties komen veelvuldig voor, over de hele wereld, zonder dat daarmee enig ziektebeeld in verband wordt gebracht. Door de deleties van de *rep* en *cap* genen is de vector verminderd persistent en invasief ten opzichte van wildtype AAV. Complementatie van de afwezige virale functies is alleen mogelijk als een cel een AAV vectordeeltje bevat en tegelijkertijd ook geïnfecteerd is met wildtype AAV én een helpervirus. De mogelijk ontstane virusdeeltjes bij complementatie zijn qua eigenschappen identiek aan de toegepaste vector en zullen door de afwezigheid van de *rep* en *cap* genen nog steeds replicatiedeficiënt zijn. Derhalve is de kans verwaarloosbaar dat residuele AAV vectordeeltjes in natuurlijke habitats persistent en invasief wordt onder de omstandigheden van de voorgestelde introductie.



### ***3.2 Selectieve voordelen of nadelen die op het ggo worden overgedragen en de waarschijnlijkheid dat zulks geschiedt onder de omstandigheden van de voorgestelde introductie(s)***

De waarschijnlijkheid van een verhoogd selectief voordeel bij toepassing van het ggo is verwaarloosbaar. De genetisch gemodificeerde cellen zijn op zichzelf, buiten de proefpersoon, niet levensvatbaar en zullen in het milieu niet persisteren. De genetisch gemodificeerde cellen zullen in derden naar verwachting geen selectieve voordelen hebben in vergelijking met niet gemodificeerde cellen.

Door de deleties van de *rep* en *cap* genen is de genetisch gemodificeerde AAV vector replicatiedeficiënt. Hierdoor heeft de vector geen selectieve voordelen ten opzichte van wildtype AAV. Infecties met AAV worden niet in verband gebracht met een ziektebeeld. Complementatie van de afwezige virale functies is alleen mogelijk als een cel de toegepaste vector bevat en tegelijkertijd ook geïnfecteerd is met wildtype AAV én een helpervirus. De mogelijk ontstane virusdeeltjes bij complementatie zijn qua eigenschappen identiek aan de toegepaste vector en zullen door de afwezigheid van de *rep* en *cap* genen nog steeds replicatiedeficiënt zijn. Derhalve zijn de risico's van selectieve voordelen of nadelen die op de genetisch gemodificeerde AAV vector zijn overgedragen verwaarloosbaar.

### ***3.3 Kans op genoverdracht op andere soorten onder de omstandigheden van de voorgestelde introductie van het ggo en selectieve voordelen of nadelen die op deze soorten worden overgedragen***

Het is onwaarschijnlijk dat in de getransduceerde cellen complementatie optreedt van de AAV vector dan wel dat er recombinatie optreedt tussen de AAV vector en wildtype AAV dat mogelijk in de cellen aanwezig kan zijn, aangezien hiervoor de AAV vector én wildtype AAV én een helpervirus tegelijkertijd in dezelfde cel aanwezig dienen te zijn, hetgeen zeer onwaarschijnlijk is. Bovendien zal de recombinante dan wel gecomplementeerde AAV vector, indien gevormd, nog steeds afhankelijk zijn van een helpervirus. Indien het helpervirus niet meer in dezelfde cel aanwezig is, zal de replicatie en eventuele verspreiding van de AAV vector uitdoven.

Aan het ontstaan van nieuwe virusdeeltjes als gevolg van complementatie of recombinatie van de genetisch gemodificeerde AAV vector met wildtype AAV zijn geen gevolgen verbonden, omdat de erbij ontstane virussen qua eigenschappen identiek zijn aan de toegepaste AAV vector dan wel wildtype AAV. Derhalve is het risico van genoverdracht op andere soorten en selectieve voordelen of nadelen die op deze soorten worden overgedragen verwaarloosbaar.

### ***3.4 Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde milieueffecten van de directe en indirecte interacties tussen het ggo en doelwitorganismen (indien van toepassing)***

Het doelwitorganisme van een klinische studie is de proefpersoon. Proefpersonen vallen buiten het beoordelingskader van de Richtlijn 2001/18. De mogelijke risico's, eventuele voordelen voor de proefpersonen en andere medisch ethische aspecten verbonden aan klinische studies worden beoordeeld door de Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek (CCMO) en worden door de CCMO getoetst volgens de criteria van de Wet medisch-wetenschappelijk onderzoek met mensen (WMO).

### ***3.5 Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde milieueffecten van de directe en indirecte interacties tussen het ggo en niet-doelwitorganismen, inclusief de effecten op de populatie van concurrenten, prooien, gasteren, symbionten, predatoren, parasieten en ziekteverwekkers***

De werkzaamheden vinden plaats in een gecontroleerde ziekenhuissetting waardoor er geen sprake is van direct of indirect contact tussen de gemodificeerde cellen en het milieu anders dan mensen. Mogelijke gevolgen zijn daarom niet aan de orde in geval van cellen.

In de genetisch gemodificeerde AAV vector zijn de *rep* en *cap* genen verwijderd waardoor de vector replicatiedeficiënt is. AAV infecties komen veelvuldig voor, over de hele wereld, zonder dat daarmee enig ziektebeeld in verband wordt gebracht. De expressiecassette bevat geen schadelijke sequenties. Aangezien de virale vector replicatiedeficiënt is, zullen mogelijk aanwezige residuele vectordeeltjes slechts tijdelijk vanuit de proefpersoon in het milieu terecht kunnen komen. Indien vectordeeltjes aanwezig zijn in het medisch product, dan zal de hoeveelheid vrijgekomen residuele vectordeeltjes vele malen kleiner zijn dan de hoeveelheid die tijdens de behandeling aan de proefpersoon wordt toegediend. De kans dat niet-doelwitorganismen geïnfecteerd raken met mogelijk aanwezige residuele vectordeeltjes en dat daardoor een schadelijk effect optreedt, is verwaarloosbaar.



### ***3.6 Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde effecten op de menselijke gezondheid van mogelijke directe en indirecte interacties tussen het ggo en personen die werken met, in contact komen met of in de nabijheid komen van de ggo-introductie(s)***

De kans op nadelige effecten van de genetisch gemodificeerde cellen in het milieu is verwaarloosbaar omdat de cellen buiten het lichaam van de gastheer (de proefpersoon) niet kunnen overleven. Indien de genetisch gemodificeerde cellen in een ander individu dan de proefpersoon terechtkomen, dan zullen deze cellen doorgaans vernietigd worden door de afweerreactie tegen deze lichaamsvreemde cellen. De kans dat derden geïnfecteerd raken met de genetisch gemodificeerde cellen én dat daardoor een schadelijk effect kan optreden is verwaarloosbaar.

In de genetisch gemodificeerde AAV vector zijn de *rep* en *cap* genen verwijderd waardoor de vector replicatiedeficiënt is. AAV infecties komen veelvuldig voor, over de hele wereld, zonder dat daarmee enig ziektebeeld in verband wordt gebracht. De expressiecassette bevat geen schadelijke sequenties. Aangezien de virale vector replicatiedeficiënt is, zullen mogelijk aanwezige residuele vectordeeltjes slechts tijdelijk vanuit de proefpersoon in het milieu terecht kunnen komen. Indien vectordeeltjes aanwezig zijn in het medisch product, dan zal de hoeveelheid vrijgekomen residuele vectordeeltjes vele malen kleiner zijn dan de hoeveelheid die tijdens de behandeling aan de proefpersoon wordt toegediend. De kans dat derden geïnfecteerd raken met mogelijk aanwezige residuele vectordeeltjes en dat daardoor een schadelijk effect optreedt, is verwaarloosbaar.

### ***3.7 Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde effecten op de gezondheid van dieren en effecten op de voeder/voedselketen van consumptie van het ggo en alle daarvan afgeleide producten indien deze voor diervoeder bestemd zijn***

Consumptie dan wel toepassing als diervoeder vindt niet plaats. Mogelijke gevolgen zijn daarom niet aan de orde.

### ***3.8 Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde effecten op biogeochemische processen die veroorzaakt worden door mogelijke directe en indirecte interacties tussen het ggo en doelwit- en niet-doelwitorganismen in de nabijheid van de ggo-introductie(s)***

De werkzaamheden vinden plaats in een gecontroleerde ziekenhuissetting waardoor er geen sprake is van direct of indirect contact tussen de gemodificeerde cellen en het milieu anders dan mensen. Residuele virusdeeltjes zullen, zoals kenmerkend is voor virussen, buiten een gastheer geen activiteit vertonen. Mogelijke gevolgen zijn daarom niet aan de orde.

### ***3.9 Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde, directe en indirecte milieueffecten van de specifieke technieken die voor het beheer van de ggo's worden gebruikt, indien deze verschillen van de voor non-ggo's gebruikte technieken (mogelijke verandering in de staande medische praktijk)***

Toepassing van het ggo zal niet leiden tot veranderingen in de medische praktijk die nadelige effecten hebben op mens en milieu.