



Milieurisicobeoordeling behorend bij de aanvraag GGO IM-MV 15-013

Datum: 2 november 2016

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

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

Opgemerkt moet worden dat voor studies met mensen niet primair het risico voor de patiënt wordt getoetst. Deze toets wordt sinds het in werking treden van de Wet medisch wetenschappelijk onderzoek met mensen beoordeeld door de Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek (CCMO). Voor studies met dieren geldt dat het welzijn van de dieren en de hiermee verband houdende ethische overwegingen getoetst wordt door de Commissie Biotechnologie bij Dieren (CBD).

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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



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

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

Ziekten bij mens en dier

(toelichting op onderdeel I, II en IV)

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

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

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

Pathogeniteit en virulentie (onderdeel A in Tabel 2)

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

Infectiviteit (onderdeel A in Tabel 2)

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



Gastheerbereik en tropisme (onderdeel A in Tabel 2)

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

Replicatie en transmissie (onderdeel A in Tabel 2)

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

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

Toxigeniteit en allergeniteit (onderdeel D in Tabel 2)

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

Genoverdracht naar andere organismen (onderdeel C in Tabel 2)

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

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

Veranderingen van populatiedynamiek in natuurlijke milieu's

(toelichting op onderdeel III)

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



Het in gevaar brengen van preventieve of therapeutische behandelmethoden

(toelichting op onderdeel V)

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

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

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

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

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

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



Milieurisicobeoordeling behorend bij aanvraag GGO IM-MV 15-013

Titel aanvraag: Gene therapy Clinical development program comprising of clinical trials using SAR422459, a non-replicating, recombinant lentivirus vector derived from Equine Infectious Anemia Virus (EIAV) to express ATP Binding Cassette A4 (ABCA4) transporter and correct its defective expression or function in photoreceptors of patients with Stargardt macular degeneration and other ABCA4-associated retinopathies

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

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

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

1. De te gebruiken virale vector is afgeleid van *Equine Infectious Anemia Virus* (EIAV) (A2.1, A2.8)
2. EIAV behoort tot de familie *Retroviridae* en het genus *Lentivirus* (A1.3, A2.1)
3. Het wildtype EIAV genoom bevat zes open leesramen (Open Reading Frames, ORFs) coderend voor de structurele genen gag, pol en env, de regulatoire genen rev en tat en het S2 eiwit. Aan het uiteinde van het genoom bevinden zich aan weerszijden de *Long Terminal Repeats* (LTR) welke een rol spelen bij reversie transcriptie, integratie van het provirus in het genoom van de gastheer en regulatie van de synthese van het lentivirale RNA. Verder bevat het EIAV genoom cis-acterende sequenties betrokken bij virale replicatie en genexpressie: de *primer binding site* (PBS), het *packaging signaal* (ψ), de *polypurine tract* (PPT), de *central polypurine tract* (cPPT) en het *Rev response element* (RRE) (A2.8)
4. Het gastheerbereik van EIAV is beperkt tot equidae (paarden, pony's, ezels, muilieren en zebra's). EIAV is geen humaan pathogeen en kan niet op mensen worden overgedragen (A2.3, A2.4, A2.5, A2.15)
5. EIAV is endemisch in Noord- en Zuid Amerika, delen van Europa het Midden Oosten, Azië, Rusland en Zuid Afrika. In Nederland zijn er geen uitbraken met EIAV gerapporteerd in de afgelopen 10 jaar en bloedmonsters van meer dan 2000 paarden die in 2015 in Nederland zijn getest, zijn negatief voor EIAV bevonden (A2.3, aanvullende informatie 24-03-2016)
6. Infectie met EIAV wordt gekarakteriseerd door een acute fase waarbij viremie, koorts en trombocytopenie optreden, gevolgd door een chronische fase gekarakteriseerd door terugkerende viremie, anemie, gewichtsverlies en oedeemvorming. Het merendeel van de geïnfecteerde dieren wordt chronisch drager van het pathogeen (A2.1, A2.5)
7. EIAV infecteert onder andere macrofagen (A2.1)
8. Gedurende de acute fase van ziekte kan het dier overlijden, echter dit komt zeer weinig voor en is geassocieerd met hoge virusreplicatie (A2.1)



9. EIAV wordt meestal verspreid via bloedzuigende insecten, voornamelijk vliegen, maar kan ook worden overgedragen via aërosolen, bloed, speeksel, lichaamsvloeistoffen en materialen verontreinigd met lichaamssappen. Merries kunnen de ziekte doorgeven op hun ongebooren veulens via de placenta (A2.6)
10. De kans op ziekteoverdracht is het grootst gedurende de symptomatische fase van de ziekte, aangezien de virus niveaus in het bloed dan maximaal zijn (A2.6)
11. EIAV kan slechts gedurende enkele uren na de initiële beet worden overgedragen door paardenvliegen (A2.7)
12. Het EIAV virus replicateert niet in insecten cellen. Insecten dienen slechts als vector om bloed over te dragen via hun monddelen (A2.7)
13. EIAV kan tot 4 dagen overleven op naalden die op kamertemperatuur bewaard worden (A2.7)
14. Buiten een levend organisme wordt aangenomen dat EIAV kort kan overleven, in het bijzonder onder droge condities. Dit wordt onderbouwd door studies met HIV, aangezien beide lentivirussen zijn, waarbij de stabiliteit van HIV partikels afhankelijk is van de vloeistof waarin het zich bevindt, de concentratie, temperatuur, zuurgraad, zonlicht en luchtvochtigheid. In bloed kan HIV tot 42 dagen infectieus blijven bij kamertemperatuur. Onder experimentele condities kan celvrij HIV, gedroogd op een dekglasje in 10% serum, voor meer dan 7 dagen infectieus blijven (A2.7)

B. De genetische modificatie

15. De virale vector SAR422459 is een niet-replicerende, recombinante lentivirale vector gebaseerd op EIAV. Het betreft hier een zogeheten SIN (zelf-inactiverend) lentiviraal vectorsysteem. De virale vector bevat geen van de originele virale genen (A1.3, A2.1, A2.8)
16. De EIAV vector is gebaseerd op een non-pathogene provirale EIAV kloon, pSPEIAV19 (accession nummer U01866) (A2.2)
17. De virale vector bevat 861 nucleotiden van wildtype EIAV, overeenkomstig met minder dan 10% van het virale genoom (A2.1, A2.8)
18. De virale vector is ontworpen om het ontstaan van replicatiecompetent lentivirus (RCL) te voorkomen door het transgen en de virale genen coderend voor de eiwitten benodigd voor packaging, reverse transcriptie en integratie te verdelen over drie plasmiden. In de transfervector die het transgen tot expressie brengt zijn de ORFs coderend voor de genen *gag*, *pol*, *tat*, *rev*, *S2* en *env* verwijderd. In de packaging vectoren is er gebruik gemaakt van een heteroloog envelop eiwit (VSV-G) en een codon geoptimaliseerd ORF coderend voor de genen *gag* en *pol*, waardoor sequentie homologie geminimaliseerd is (A2.8, A2.9)
19. Sequenties betrokken bij virale replicatie die ingebed zijn in de verwijderde genen (cPPT en RRE) zijn afwezig in de vector. Deze omvatten het centrale polypurine tract (cPPT) welke geconserveerd is in lentivirussen maar waarvan de exacte functie niet bekend is, en het Rev response element (RRE), wat door het Rev eiwit herkend wordt en export van RNA uit de kern faciliteert. Het packaging signaal (ψ) en de polypurine tract (PPu) zijn wel aanwezig in de virale transfervector (A2.8)
20. In de EIAV 5' LTR bevindt zich een extra nucleotide ten opzichte van de referentie sequentie. Uit sequentie analyse en openbaar beschikbare EIAV sequenties blijkt dat de sequentie inclusief de extra nucleotide de correcte EIAV 5'LTR betreft (A2.12, aanvullende informatie 03-10-2016)
21. Uit SIN vectoren is een deel van de 3' LTR, het zogenaamde U3 domein, verwijderd. Tijdens reverse transcriptie naar het provirale genoom wordt deze deletie overgenomen in de 5' LTR, waardoor deze vector geen functionele LTR's meer bezit. Dit reduceert de kans op mobilisatie van de vector uit het genoom van de gastheer aanzienlijk. In het geval van een superinfectie van de getransduceerde cel met een wildtype lentivirus kan de transfervector in principe niet meer worden gemobiliseerd uit het genoom van de gastheercel. In het U3



domein van de LTR bevinden zich zogenaamde promoter en enhancer sequenties. Indien een lentivirale vector in het genoom van de gastheer integreert in de buurt van een proto-oncogen kan dit U3 domein leiden tot de activering van het betreffende proto-oncogen. In de SIN vectoren is het U3 domein echter uit de 3' LTR verwijderd. Naast de reductie van de kans op mobilisatie van de vector is hierdoor tevens de mogelijke activering van naburige proto-oncogenen door het U3 domein teniet gedaan (CGM/090331-03)(2.8, A5.2.1)

22. De SAR422459 vector (transfervector), welke het ATP Binding Cassette A4 (ABCA4) gen tot expressie brengt, is gebaseerd op EIAV. De structurele en functionele virale eiwitten benodigd voor het inpakken van het virale vectorgenoom, reverse transcriptie en integratie worden tot expressie gebracht vanaf twee aparte packaging vectoren; de pESGPK packaging vector (brengt EIAV gag en pol tot expressie), en de pHGK envelop packaging vector (brengt een heteroloog viraal envelop eiwit tot expressie)(A2.1, A2.8)
23. SAR422459 wordt geproduceerd van de pONYKABCA4 plasmide. Deze bevat een promoter gebaseerd op de humane *Cytomegalovirus* (hCMV) promoter en het virale vectorgenoom, welke ingepakt wordt in de virale partikels in de vorm van enkelstrengs RNA. Het virale vectorgenoom bevat cis-acterende EIAV sequenties (ψ , PPU, 5' LTR, 3' SIN LTR) welke nodig zijn voor het inpakken van het virale vectorgenoom en DNA synthese, reverse transcriptie en integratie van het vectorgenoom in het genoom van de gastheer cel. Verder bevat de vector een ORF voor NeoR, het ABCA4 gen onder controle van een hCMV promoter en een gemodificeerd *Woodchuck hepatitis virus post-transcriptioneel regulator* element (WPRE). De plasmide backbone bevat daarnaast een kanamycine resistentiegen en een bacteriële orgin of replication (ori) welke geen onderdeel uitmaken van de virale vector en welke niet worden geïntegreerd in het gastheergenoom (A2.8, A2.11, aanvullende informatie 01-08-2016)
24. De ORF voor neomycin fosfotransferase II (NeoR) van *Escherichia coli* transposon Tn5 draagt zorg voor verkrijging van hoge titers van lentivirale vectoren in afwezigheid van het Rev gen. De ORF moet gelokaliseerd zijn downstream van het packaging signaal, maar upstream van de ABCA4 expressie cassette om deze hoge opbrengst te bewerkstelligen en maakt dus deel uit van de lentivirale vector dat wordt geïntegreerd in het DNA van de patiënt. De ORF voor NeoR wordt niet gebruikt als selectie marker en bevat geen promoter of polyadenylatiesignaal (A2.11, aanvullende informatie 24-03-2016)
25. Functioneel NeoR eiwit zorgt voor antibiotica resistentie in zowel eukaryotische cellen (tegen onder andere genticine) als prokaryoten zoals bacteriën (tegen onder andere kanamycine)*
26. De eerste hCMV promotor aanwezig op de de lentivirale vector maakt transcriptie mogelijk beginnend vanaf de R regio van het 5'LTR, deze promoter is geen onderdeel van het lentivirale genoom dat wordt getranscribeerd en wordt ingepakt in de lentivirale partikels (A2.8, A2.11, aanvullende informatie 01-08-2016)
27. Het ABCA4 gen staat onder controle van een tweede hCMV promoter, welke wel onderdeel is van de lentivirale vector en geïntegreerd zal worden in het DNA van de patiënt (A2.8, A2.11)
28. Het gen ABCA4 codeert voor de humane fotoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter (A2.11)
29. In de ABCA4 sequentie zijn 3 zogenaamde synonieme mutaties aanwezig ten opzichte van de referentie sequentie. Deze mutaties hebben geen invloed op het ingebouwde aminozuur (A2.8, aanvullende informatie 03-10-2016)
30. Het gemodificeerde WPRE element zorgt voor verhoogde ABCA4 expressie als gevolg van stabilisatie van het transcript (A2.11)
31. De WPRE sequentie is afkomstig van het dierpathogene *Woodchuck hepatitis virus*, welke behoort tot de familie *Hepadnaviridae* en het genus *Orthohepadnavirus*. Hiertoe behoort ook het verwante, humane *Hepatitis B virus**



32. De gag-pol vector (pESGPK) brengt de EIAV genen gag en pol tot expressie middels een humane immediate/early hCMV promoter. De sequentie coderend voor gag en pol is codon geoptimaliseerd, gevolgd door een heterologe polyA sequentie afkomstig van *Simian Virus 40* (SV40). Codon optimalisatie leidt niet tot een verandering in de aminozuursequentie van de eiwitten, maar verkleint de homologie met het pONYKABCA4 plasmide, waardoor de kans op homologe recombinatie tussen deze vectoren verkleind is. Het Gag poly-eiwit bevat de structurele matrix, capside en nucleocapside eiwitten. Het Gag/Pol poly-eiwit bevat de protease, reverse transcriptase en integrase enzymen. De pESGPK vector bevat ook een kanamycine resistentie gen, een bacteriële origin of replication en een synthetisch intron bestaand uit de 5'-donor site van het eerste intron van humaan beta-globine en de 'branch' en 3' acceptor site van het intron van een immuunglobuline heavy chain variabele regio (A2.8, A5.2.1, A5.4, aanvullende informatie 24-03-2016, 01-08-2016 en 03-10-2016)
33. De envelop packaging vector (pHGK) brengt het *Vesicular Stomatitis Virus* glycoproteïne (VSV-G) heterologe envelop eiwit tot expressie. Verder bevat deze vector een CMV promoter en een heterologe polyA sequentie, een kanamycine resistentie gen, een bacteriële origin of replication en een intronsequentie van konijn beta-globine (A2.8, aanvullende informatie 01-08-2016, 03-10-2016)
34. Alle plasmiden die gebruikt worden tijdens de productie van SAR422459 zijn gesequenced en er zijn geen afwijkingen gevonden ten opzichte van de verwachte sequentie (A2.10, A2.12, aanvullende informatie 01-08-2016)
35. Naast sequencing is de integriteit van de lentivirale vector gecontroleerd na reverse-transcriptie van het RNA genoom middels digestie-PCR. Daarnaast is Northern Blotting toegepast om te verifiëren of het verwachte transcript aanwezig is in getransduceerde cellen. Uit deze analyses blijkt dat mRNA (en de verwachte digestie fragmenten) van de correcte lengte aanwezig is in de virale partikels en geproduceerd wordt in getransduceerde cellen. Southern Blotting bevestigt bovendien dat ook het geïntegreerde genoom in getransduceerde cellen overeenkomt met de verwachte grootte (A2.12, aanvullende informatie 24-03-2016 en 03-10-2016)
36. De pONYKABCA4 plasmide wordt samen met de packaging vectoren pESGPK en pHGK getransfecteerd in HEK293T cellen (humane embryonale niercellijn). De virale sequenties aanwezig in HEK293T cellen (SV40 largeT antigen en adenovirus type 5 DNA sequenties) hebben weinig homologie met de sequenties van het EIAV, waardoor homologe recombinatie kan worden uitgesloten. Ook kunnen deze sequenties niet ter vervanging dienen van de gedeleteerde sequenties van het EIAV genoom, waardoor geen replicerend EIAV gevormd kan worden. De HEK293T cellen zijn vrij van lentivirussen, zoals human immunodeficiency virus (HIV)-1, HIV-2, human T-cell lymphotropic virus (HTLV)-1 en -2, simian immunodeficiency virus (SIV) en andere non-humane lentivirussen, waardoor recombinatie met, en complementatie van, de virale vector niet mogelijk is (A2.10, A2.13, aanvullende informatie 24-03-2016)

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

Coderende sequenties gebruikt voor genetische modificatie	Herkomst	Plaats in de vector	Functie
CMVp-R-PBS-U5 LTR	Humaan cytomegalovirus/EIAV	Voor Packaging signaal	Regulatie van virale integratie en transcriptie
Packaging signaal (ATTG ipv ATG voor Gag)	EIAV	Tussen CMVp-R-U5 LTR en NeoR ORF	Nodig voor inpakken virale genoom in virusdeeltjes
NeoR ORF	<i>Escherichia coli</i> transposon	Tussen packaging signaal en	Zorgt dat hoge titers van



	Tn5	CMV promoter	vector batches behaald kunnen worden in afwezigheid van Rev-gen
hCMV promoter	Humaan Cytomegalovirus	Tussen NeoR ORF en ABCA4 gen	Zorgt voor expressie van ABCA4
ABCA4 ORF	Humaan	Tussen CMV promoter en WPRE	Codeert voor ABCA4
WPRE	Woodchuck hepatitis virus	Tussen ABCA4 en PPU	Verhoogt expressie van ABCA4
PPU	EIAV	Tussen WPRE en SIN 3' LTR	Nodig voor second strand DNA synthese
SIN 3' LTR	EIAV	Na PPU	Regulatie van virale integratie en transcriptie

C. Het GGO

37. Het GGO, SAR422459, is een niet-replicerend lentiviraal virusdeeltje welke het humane ABCA4 gen tot expressie brengt (A1.3)
38. ABCA4, ook bekend als ABCR, is een retina-specifieke adenosine trifosfaat-binding cassette (ABC) transporter gen. Dit gen verzorgt transport van retinal en vergelijkbare retinoïden en voorkomt daardoor formatie van toxische bisretinoïden als pyridinium bis-retinoïde (A2E), een belangrijke component van lipofuscine. Indien toxische bisretinoïden ophopen leidt dit tot degeneratie van lichtgevoelige fotoreceptoren en retinale pigment epitheliale cellen (A1.3)
39. Het GGO, SAR422459, zal in het doelweefsel (fotoreceptoren) expressie van ABCA4 faciliteren en daarmee het defecte transport van retinoïden corrigeren waardoor vorming en ophoping van toxische bisretinoïden (zoals A2E) voorkomen wordt (A1.3, A2.16)
40. De replicatiedeficiënte lentivirale vector kan slechts éénmalig een cel infecteren. Na infectie integreert de virale vector als provirus in het genoom van de gastheercel. De sequenties coderend voor eiwitten betrokken bij replicatie, waaronder gag, pol en rev, zijn afwezig in deze gastheercellen waardoor er geen nieuwe virale partikels gevormd kunnen worden en er dus geen verdere spreiding naar andere gastheercellen kan plaatsvinden (A2.11, A2.16, A2.17)
41. Lentivirale vectoren kunnen behalve delende cellen ook niet delende cellen infecteren*
42. Door het gebruik van het VSV-G envelop eiwit is het tropisme van de vector verbreed. VSV-G gepseudotyperde lentivirale vectoren hebben een breed gastheerbereik en kunnen de meeste zoogdiercellen, en ook niet-zoogdiercellen, infecteren. Door gebruik van het VSV glycoproteïne kunnen ook de humane fotoreceptoren (target cellen) getransduceerd worden (A2.15)
43. Voor VSV-G gepseudotyperde lentivirale partikels wordt een halfwaardetijd van 10 uur aangehouden bij 37°C (CGM/090331-03)*
44. Tijdens de productie van de virale vector is er een theoretische kans aanwezig op het ontstaan van RCL. Voor de generatie van RCL zijn minimaal twee aparte recombinatie gebeurtenissen nodig. Na eventuele recombinatie zijn de ORFs coderend voor de genen *tat*, *Rev*, *S2*



- en *env* nog steeds afwezig, evenals de virale sequenties cPPT en het RRE, omdat deze niet aanwezig zijn in de transfervector en de packaging vectoren. Zodoende zal er, zelfs na eventuele recombinatie, geen volvirulent EIAV gevormd kunnen worden (A2.11, 2.8)
45. Verspreiding van het GGO wordt niet verwacht aangezien geen replicatie van de vector kan optreden en replicatie competente partikels niet zijn gedetecteerd tijdens de productie van SAR422459 of gerelateerde vectoren gebouwd uit dezelfde voorloper-vector (A2.17)
 46. Theoretisch kan de vector zich vanuit getransduceerde cellen verspreiden na co-infectie met replicatie competente wildtype retrovirussen. Doordat SAR422459 een zelf-inactiverende vector is zonder transcriptie of encapsidatie-competent RNA, en doordat het afgeleid is van EIAV, wat geen humane cellen kan transduceren, is de kans op recombinatie in doelweefsels niet aanwezig (A2.17)
 47. In theorie is er een mogelijkheid tot het ontstaan van RCL door recombinatie van de virale vector met humane endogene retrovirale sequenties (HERVs). HERV sequenties zijn aanwezig in het humane genoom. De meerderheid van de HERVs zijn gerelateerd aan beta-, gamma- en spuma-retrovirussen, die een lage homologie hebben met EIAV. Voor recombinatie tussen de virale vector en HERVs is de aanwezigheid van sequentie homologie noodzakelijk. De virale vector bevat slechts een gedeelte van het lentivirale genoom (de LTR's en het packaging signaal), waardoor recombinatie onwaarschijnlijk is (A2.17, 01-08-2016)
 48. De virusbatch wordt getest op de aanwezigheid van RCL via een zogenaamde PERT (kwantitatieve reverse transcriptase (RT)) test. Deze test is een indirecte methode om vector partikels te kwantificeren. De PERT test detecteert reverse transcriptie activiteit van alle retrovirussen en detecteert dus ook RCL indien het virus waarvan RCL afkomstig zijn onbekend is. Tijdens twee stadia van het productieproces wordt deze uitgevoerd: op de 'end of production cellen (EOPC)' en op 5% van het uiteindelijke gezuiverde vector product. Voorafgaand aan de PERT test vindt er een kweekperiode van het testmateriaal plaats om eventueel aanwezig RCL virus te amplificeren. (A3.2, aanvullende informatie 24-03-2016 en 01-08-2016)
 49. Indien RT activiteit wordt waargenomen in een batch dan worden additionele tests uitgevoerd om te bepalen of dit het gevolg is van replicerend virus, of dat dit door een niet-overdraagbare entiteit komt. Deze tests omvatten onder andere inoculatie van gefiltreerd supernatant op verse HEK293 cellen, gevolgd door passages en daaropvolgende PERT analyse. In geen van de batches tot op heden geproduceerd is RCL gedetecteerd (A3.2, aanvullende informatie 24-03-2016)
 50. Tijdens assay validatie zijn diverse hoeveelheden infectieuze units getest en gedetecteerd, met een minimum van 8 focus forming units (FFU). In een aan de patiënt toe te dienen virusbatch is minder dan 1 RCL aanwezig (A3.2, aanvullende informatie 01-08-2016, 03-10-2016)
 51. Er is een functionele humane CMV promotor aanwezig in het GGO die geïntegreerd zal worden in het gastheergenoom (A2.11)
 52. Er is een WPRE aanwezig in het GGO die geïntegreerd zal worden in het gastheergenoom. Recombinatie met wild-type *Woodchuck hepatitis virus* wordt uitgesloten aangezien dit virus alleen tropisme heeft voor de in Noord-Amerika endemische *Marmota monax*. Eventuele recombinatie met het gerelateerde Hepatitis B virus worden geminimaliseerd aangezien patiënten met Hepatitis B infectie worden uitgesloten van deelname (A2.11, A5.2.1, A5.6, aanvullende informatie 24-03-2016)
 53. Na toediening in het oog zal de virale vector op een willekeurige plek in het gastheer genoom integreren. Hierdoor bestaan de kans op ontregeling van genen betrokken bij proliferatie waardoor tumoren kunnen ontstaan. De kans dat insertionele mutagenese van de lentivirale vector direct carcinogeen is, is beperkt doordat het EIAV lentivirale vector systeem zo gemaakt is dat alle virale genen en promotor/enhancer sequenties afwezig zijn waardoor de mogelijke transactivering van naburige proto-oncogenen niet plaats zal vinden (A5.2.2, A5.4, aanvullende informatie 24-03-2016)



54. SAR422459 zal in een natuurlijke omgeving waarschijnlijk niet overleven aangezien deze replicatiedeficiënt is en daardoor niet pathogeen of virulent is. Daardoor kan SAR422459, ofwel direct, ofwel via een vector, geen andere organismen infecteren (A5.1)
55. Het GGO codeert niet voor de accessoire genen die geassocieerd zijn met pathogenese van het wildtype virus (A5.1)
56. Na toediening van de EIAV vector aan de patiënt zal de vector zich waarschijnlijk niet kunnen verspreiden buiten het oog aangezien het GGO geïnactiveerd wordt door complement in het humane immuunsysteem (A2.17, A5.3)
57. In de patiënt zal het aantal vrije virusdeeltjes iedere dag met een factor $2^{2.4}$ (reductiefactor = $2^{2.4}$) afnemen, uitgaande van een halfwaardetijd van lentivirale vectoren van 10 uur. Vanuit de patiënt is de kans zeer klein dat er vrije virusdeeltjes terechtkomen in het milieu*
58. Er is geen kans op kiembaantransmissie aangezien de viruspartikels zullen worden ingespoten in het oog, slechts eenmalig een cel kunnen infecteren en zich vervolgens niet verder kunnen verspreiden. Bovendien is er tijdens experimenten in dieren waarbij de vector is ingespoten in het oog, geen vector waargenomen in de gonaden (A2.17, A5.1, aanvullende informatie 01-08-2016)

D. Milieugerelateerde gegevens afkomstig uit eerdere experimenten

59. Er zijn geen fysiologische of pathogene effecten geobserveerd in preklinische studies waarbij ABCA4 tot expressie werd gebracht in cellen en/of weefsels waar dat normaliter niet het geval is zoals bepaalde retinale pigment epitheelcellen (A2.16)
60. Er is geen cytotoxiciteit waargenomen in studies met HT1080 fibrosarcoma cellen en ARPE-19 humane retinale epitheelcellen waarbij deze cellen getransduceerd werden met de ABCA4 EIAV lentivirale vector met verschillende doses virale vector (A2.16)
61. In individuen die blootgesteld zijn aan SAR422459 kan een humorale en cellulaire immuunrespons geïnduceerd worden tegen het VSV-G eiwit. Dergelijke immuunresponsen zijn geobserveerd in konijnen die blootgesteld werden aan SAR422459 via intraveneuze toediening (A2.17)
62. De virale vector kan in theorie vanuit de patiënt in het milieu terechtkomen door uitscheiding van de virale vector via lichaamssappen (bijvoorbeeld tranen, urine). Biodistributie is getest gedurende een periode van 3 maanden na subretinale injectie van SAR422459 in konijnen en makaken, waarbij DNA uit diverse weefsels en witte buffycoats is geanalyseerd op aanwezigheid van EIAV packaging signaal DNA sequenties middels kwantitatieve PCR. Vector persistentie, bepaald in plasma, en vector shedding, geanalyseerd in glasvocht, tranen en speeksel, zijn ook bepaald middels kwantitatieve PCR van het EIAV packaging signaal (A4.7, A5.1, A5.3, aanvullende informatie 03-10-2016)
63. In konijnen werd SAR422459 DNA met name gedetecteerd in de retina (doelweefsel), inclusief de choroïde laag en enkel andere oogstructuren. Er werd geen vector gedetecteerd in hersenen, geslachtsklieren, lever, milt, buffy coat en speeksel, of in het niet-geïnjecteerde controle oog. Vector RNA werd gedetecteerd in plasma in één van de zes monsters op dag 2, in glasvocht van het oog in zes van de zes monsters op dag 3, vijf van de zes monsters op dag 8 en één van de zes monsters op dag 29, in traanvocht in twee van de zes monsters op dag 2 en één van de zes monsters op dag 5. Het positieve signaal in traanvocht is waarschijnlijk het gevolg van verontreiniging van het oog oppervlak ten gevolge van de subretinale injectie van SAR422459 (A5.1)
64. In konijnen is na subretinale injectie van SAR422459 een afweerreactie geobserveerd in meerdere dieren. Deze hadden antistofreacties tegen het vector envelop eiwit VSV-G2 en tegen een HEK293T-geassocieerd antigeen. Deze antistofreacties hadden geen schadelijke gevolgen voor deze dieren. In non-humane primaten is 1 anti-VSV-G2 respons gerapporteerd (A5.2.2)



65. In preklinische studies met primaten werd SAR422459 DNA gedetecteerd in buffy coat monsters van het merendeel van de behandelde dieren, meestal op niveaus beneden de kwantificatielimiet. Echter, op dag 2 en 5 werd in 1 van de 6 dieren een kwantificeerbare hoeveelheid kopieën gedetecteerd van respectievelijk 417 en 96,6 kopieën (A5.1)
66. In preklinische studies met primaten werd geen bewijs gevonden voor een toename in vector kopie aantal in de buffy coat naarmate tijd verstreek, wat betekent dat geen replicatie van de vector optreedt (A5.1)
67. In preklinische studies met primaten werd geen SAR422459 gedetecteerd in de hersenen, eierstokken, teelballen, milt, optisch chiasma of de oogzenuw op dag 92. In de lever van 2 van de 6 dieren werd vector DNA gedetecteerd beneden de kwantificeerbare detectielimiet van 10 kopieën (1 kopie gedetecteerd). Andere dagen zijn niet getest in de biodistributie studie (A5.1)
68. In plasma werd vector RNA gedetecteerd in 2 van 6 primaten op dag 2 en 3, echter meestal op niveaus beneden de kwantificeerbare limiet van 100 of 333 kopieën (tussen de 26 en 535 kopieën gedetecteerd). In speeksel van primaten is geen SAR422459 gedetecteerd (A5.1)
69. In traanvocht van het geïnjecteerde oog van primaten, getest één of twee dagen na injectie, is geen vector gedetecteerd. Ook in primatenstudies met vergelijkbare vectoren (SAR421869 en Retinostat) werd geen vector gedetecteerd in traanvocht (A5.1, aanvullende informatie 03-10-2016)
70. De in preklinische studies met primaten gevonden vector buiten het oog kan duiden op een beschadigde retina gedurende de procedure en lekkage van de vector in de bloedbaan achter in het oog. Echter, indien er in patiënten vector in de bloedbaan terecht komt dan wordt dit snel geïnactiveerd door humaan serum (A5.1)
71. De gecombineerde data van de konijnen en primaten studies laten zien dat de vector na injectie in het oog grotendeels in datzelfde oog behouden blijft en niet of nauwelijks in de omgeving kan vrijkomen via lichaamssappen zoals tranen. Systemische verspreiding in de bloedbaan wordt in enkele gevallen waargenomen, echter de hoeveelheden liggen meestal beneden de kwantificatielimiet. Deze bevindingen komen overeen met eerdere studies waarbij gebruik is gemaakt van EIAV vectoren zoals Retinostat, UshStat en Prosavin (A5.1, aanvullende informatie 03-10-2016)
72. Genexpressiestudies met reportergenen of ABCA4 hebben laten zien dat EIAV vectoren retinale cellen kunnen transduceren en dat de transgenexpressie meer dan 16 maanden aanwezig blijft (A5.1)
73. Er zijn geen aanwijzingen gevonden dat de vector pathogeen is gedurende de niet-klinische testfase (A5.1)
74. In 23 patiënten die tot op heden behandeld zijn met de vector zijn geen vector componenten gevonden boven de kwantificeerbare detectielimiet van de PCR test in bloed, plasma of urine op een van de geteste tijdstippen (van screening tot week 48 voor bloed; van screening tot week 2 voor urine). De kwantificatielimiet van de test daarbij is 10 tot 100 kopieën DNA voor buffy coat en 100 tot 333 kopieën RNA voor plasma en urine monsters. Wel is in twee patiënten een anti-VSV-G antistof respons waargenomen (A2.17, A4.6, A5.1, aanvullende informatie 24-03-2016, 01-08-2016 en 03-10-2016)
75. In klinische studies tot op heden uitgevoerd met SAR422459 zijn geen ernstige bijwerkingen gerapporteerd (A5.1)
76. Van de 22 patiënten die tot op heden behandeld zijn met de vector is er in 2 een anti-VSV-G respons gevonden (bij toediening van dosering van 6×10^5 transducerende units per oog) zonder dat er enige impact was op patiëntveiligheid. In drie andere klinische gentherapie studies gebaseerd op dezelfde vector als SAR422459 werd in 1 studie een specifieke antistof respons tegen VSV-G gevonden in 4 patiënten. Drie van hen hadden ook een response tegen het oorspronkelijke EIAV capsid eiwit p26 ontwikkeld. Tot op



heden zijn er geen ernstige bijwerkingen geïdentificeerd die geassocieerd zijn met het ontwikkelen van een antilichaam respons tegen VSV-G of p26 (A5.2.2)

77. Carcinogeniteitsstudies zijn nog niet uitgevoerd met de SAR422459 lentivirale vector. Er is een potentieel risico op mutagenese en tumorvorming, ook al is dat risico klein doordat alle virale genen en promotor sequenties verwijderd zijn en daardoor kan transactivatie van proximale genen niet optreden. Gezien de overeenkomsten met een gerelateerde vector, Prosavin, worden de resultaten met betrekking tot integratie van de vector in twee *in vitro* studies en een *in vivo* studie relevant geacht. Uit één *in vitro* studie blijkt dat op EIAV gebaseerde vectoren vergelijkbaar zijn qua integratiepatroon met vectoren gebaseerd op HIV. Een tweede *in vitro* studie laat zien dat het integratiepatroon in langzaam delende humane cellen vergelijkbaar is met dat van de snel delende humane HEK293T cellen. In de *in vivo* studie werd het integratiepatroon in ratten *in vivo* vergeleken met dat van bovengenoemde *in vitro* data. Ook hier bleken geen verschillen te zijn (A5.2.2, aanvullende informatie 01-08-201)

E. Patiëntgebonden aspecten

78. Het doel van de klinische studie is om de veiligheid van, tolerantie voor en biologische werkzaamheid van oplopende doses SAR422459 te testen om zodoende een nieuwe therapie te ontwikkelen tegen Stargardt maculaire degeneratie (SMD) (A1.2, A1.3)
79. SMD is een erfelijke oogziekte die een ernstige vorm van maculaire dystrofie veroorzaakt die vergelijkbaar is met leeftijds-gerelateerde maculaire degeneratie in ouderen, maar die in de kindertijd aanvangt. De ziekte is autosomaal recessief erfelijk en wordt veroorzaakt door mutaties in het ABCA4 gen. Er zijn momenteel geen effectieve therapieën om de ziekte te vertragen of genezen. Het merendeel van de patiënten zal uiteindelijk blind of ernstig visueel beperkt worden (A1.3)
80. Door SAR422459 toediening wordt het correcte ABCA4 cDNA in fotoreceptorcellen tot expressie gebracht waardoor de pathofysiologie die leidt tot SMD wordt gestopt of zelfs wordt teruggedraaid (A1.3)
81. Het GGO wordt eenmalig toegediend met een spuit via subretinale injectie. De toegediende dosis zal variëren tussen de 10^4 en 10^7 transducerende units (A4.2, A4.4)
82. Een deel van de virale vector zal worden geïntegreerd in het DNA van geïnfecteerde cellen van de patiënt, waardoor expressie van het ABCA4 eiwit zal worden geïnduceerd (A1.3, A2.11)
83. Na subretinale injectie kan de patiënt een immuunrespons ontwikkelen (A5.2.2)

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

84. Het aantal te behandelen patiënten is maximaal 500 (A4.1)
85. De einddatum voor de klinische studies is 31 december 2050 (A1.5)
86. Als exclusiecriteria wordt gehanteerd dat de patiënten vrij zijn van HIV, HTLV, Hepatitis A, Hepatitis B en Hepatitis C virus infecties (A5.6, aanvullende informatie 03-10-2016)
87. Hospitalisatie van patiënten is geen vereiste bij de behandeling. Indien hospitalisatie plaatsvindt, zullen routine postoperatieve protocollen gevolgd worden en zal de betrokken chirurg de patiënt ontslaan wanneer mogelijk. De patiënt kan op een kamer met andere patiënten aangezien het risico op uitscheiding van de vector verwaarloosbaar klein wordt geacht. Indien patiëntenmonsters gemorst worden zullen de standaard ziekenhuisprocedures gelden, zoals desinfectie met 70% ethanol (A5.7, A5.8)



88. Het GGO wordt ingevroren ($\leq -70^{\circ}\text{C}$) bij de apotheek bezorgd, het pakket wordt gecontroleerd en getransporteerd naar een opslagruimte die goedgekeurd is voor opslag van biologische agentia, alwaar het product wordt opgeslagen in een -80°C vriezer (A1.4, A4.2)
89. Voorbereiding van de injectiespuit zal plaatsvinden in een veiligheidskabinet (klasse II) in een ML-II laboratorium. Deze ruimte is goedgekeurd voor voorbereiding van het GGO volgens ziekenhuisrichtlijnen. Het GGO zal worden ontdooid volgens voorschriften van de ziekenhuisapotheek. Transport van de ampullen vindt plaats volgens Bijlage 1 van de Regeling GGO en de ziekenhuisrichtlijnen (A1.4, A4.2)
90. De injectiespuit zal op kamertemperatuur worden vervoerd naar de operatiekamer in een container en zal uit de container gehaald worden op het moment dat de patiënt gereed is voor injectie (A4.2)
91. Het GGO zal worden toegediend door middel van subretinale injectie. Toediening zal gebeuren in een operatiekamer conform de 'werkgroep infectie preventie (WIP) richtlijn gentherapie' en de 'Basismaateregelen infectiepreventie in een operatiekamercomplex' (A1.4, A4.3, A5.9)
92. Na de injectieprocedure zal het oog afgeplakt worden en wordt de patiënt naar de post-operatieruimte gebracht ter observatie van tenminste één uur. Voor ontslag uit het ziekenhuis zal de routine procedure gelden (A1.4, A5.8)
93. Afval zal worden afgevoerd conform het ziekenhuisbeleid voor GGO's en biologisch gevaarlijke afvalmaterialen (A4.2, A4.9)
94. Monsterafname van bloed en urine gebeurt de dag voor de operatie, vervolgens vóór ontslag van de patiënt uit het ziekenhuis, en op meerdere tijdstippen na de procedure. Dit gebeurt conform lokale richtlijnen beschreven in de Richtlijnen veilig werken met biologische agentia. Afname, verwerking en transport van de monsters zal gebeuren conform de basismaatregelen Hygiëne en Infectie preventie (HIP)(A1.4, A4.6, A4.7)
95. Bloedmonsters zullen worden genomen vóór de procedure, en op diverse tijdstippen na de procedure (e.g. dag 1, week 1, 2, 4, 12, 24, 36 en 48 na behandeling). Bloedafname voor PCR om de vector te monitoren zal worden gedaan op dag 0 (operatie), dag 1, en diverse weken na behandeling om optimale monitoring van vector en vector producten te monitoren (A4.8, A5.12)
96. Afgenomen monsters zullen worden vervoerd in speciale containers in lekvrije plastic zakken. Indien noodzakelijk zullen monsters worden opgeslagen bij -80°C alvorens ze op droogijs worden vervoerd naar het analytisch laboratorium (A4.7)
97. Detectie van vector partikels en getransduceerde cellen zal gebeuren met een door Oxford BioMedica (UK) Ltd. ontwikkelde, kwantitatieve reverse transcriptase PCR (RT-qPCR) methode die het EIAV packaging signaal herkent. Deze test kan worden gebruikt voor detectie van EIAV vectoren in vloeibare monsters en heeft een detectielimiet van 100 kopieën, afhankelijk van het volume van het te testen monster. De DNA qPCR test heeft een kwantificeerbare detectielimiet van 10 kopieën per μg DNA. SAR422459 wordt niet verwacht aanwezig te zijn in de afgenomen monsters, aangezien in de 23 tot nu toe behandelde patiënten geen vector is gedetecteerd in plasma, urine en bloed monsters (A4.6, A4.7, A4.8, aanvullende informatie 03-10-2016)
98. Na 1 dag zal de patiënt terugkomen naar de kliniek waar het oogverband zal worden verwijderd. Deze zal vervolgens worden vernietigd door verbranding of autoclaveren (A1.4)
99. Indien het verband loslaat buiten de kliniek dan zal het wederom worden vastgemaakt met verbandmateriaal dat is meegekregen uit het ziekenhuis. Hierbij zullen beschermende handschoenen worden gedragen. Hierna wordt handdesinfectie toegepast. Alle gebruikte materialen zullen worden gemarkeerd als biologisch afval, worden geretourneerd naar het ziekenhuis en worden verbrand als ziekenhuis afval (A1.4)



100. Alle afvalmaterialen, zoals handschoenen, maskers, schorten, injectiespuiten, ampullen en monsters die niet gebruikt worden voor analyse zullen worden vernietigd door verbranding (of equivalent) conform het ziekenhuisbeleid voor GGO-materialen en biologische materialen. Bewijzen van vernietiging zullen worden gegenereerd en kopieën daarvan worden bijgehouden in de Trial Master File (A4.9)
101. De hoeveelheid afvalmateriaal zal beperkt zijn door de beperkte verwachte hoeveelheid afval per patiënt (A4.9)
102. In geval van morsen zullen standaard procedures gevolgd worden conform de basismaatregelen HIP. Om besmette oppervlakten te desinfecteren worden deze behandeld met Terralin 0,5% (A1.4, A4.7)
103. Aangezien het GGO replicatiedeficiënt is en het risico op uitscheiding van een patiënt verwaarloosbaar klein wordt geacht zijn er geen speciale voorschriften opgesteld indien patiënten behandeld worden voor andere medische aandoeningen dan hun oogziekte (A5.10)
104. Patiënten worden 48 weken gevolgd in het huidige studieprotocol (A5.12)
105. Patiënten die behandeld zijn zullen geïnstrueerd worden minimaal 3 maanden af te zien van het doneren van bloed, organen, weefsels en cellen voor transplantatie, zodat introductie van de vector in het milieu voorkomen wordt (A5.6, aanvullende informatie 01-08-2016)

G. Productie en Batch

106. Productie van de lentivirale vector vindt buiten Nederland plaats door Novaseps, te België, onder verantwoordelijkheid van Sanofi. Transport naar het Radboudumc vindt plaats onder verantwoordelijkheid van Sanofi (A1.4, A3.1)
107. Zowel de End-Of-Production cellen (EOPC) en de virusbatch worden voorafgaand aan vrijgifte getest op de aanwezigheid van RCL via een op celweek gebaseerde test. In een aan de patiënt toe te dienen virusbatch is minder dan 1 RCL aanwezig. (A2.10, A3.2, A5.2.1, aanvullende informatie 01-08-2016, 03-10-2016)
108. Vrijgave gebeurt alleen indien RT activiteit wel aanwezig is bij de positieve controle en het spiked test sample, maar niet in de negatieve controle en het test sample (A3.2, aanvullende informatie 24-03-2016)
109. De identiteit van SAR422459 wordt gecontroleerd door de aanwezigheid van het ABCA4 transgen te bevestigen middels PCR. Andere kwaliteitscontroles die uitgevoerd worden zijn onder andere RNA kopie aantal, vector potentie (A3.2)
110. De virusbatch wordt onder andere ook getest op identiteit, steriliteit en afwezigheid van mycoplasma, virale verontreinigingen, endotoxines en schadelijke of toxische substanties (A3.2)
111. Een batch SAR422459 wordt alleen vrijgegeven indien afwezigheid van RCL is bevestigd middels de beschreven PERT-assay, de identiteit van de vector is bevestigd middels PCR, waarbij het ABCA4 transgen gedetecteerd wordt, steriliteit is bevestigd en afwezigheid van endotoxine is bevestigd. Er is geen RCL gedetecteerd in de tot nu toe geproduceerde vector batches (A3.2, A3.3, aanvullende informatie 24-03-2016)



DEEL 2. MILIEURISICOANALYSE VAN DE AANGEVRAAGDE WERKZAAMHEDEN

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

Tabel 2.1 milieurisicobeoordeling van de regulerende sequenties (CMVp-R-U5, packaging signaal, CMVp, WPRE, PPU en SIN 3' LTR):

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

Bepaling van eigenschappen die schadelijke effecten kunnen hebben <i>(Identificatie en toelichting “oorzaak-gevolg” relaties)</i>	Evaluatie van de mogelijke gevolgen van elk schadelijk effect, indien dit optreedt, en evaluatie van de waarschijnlijkheid van het optreden <i>(rekening houdend met de wijze van introductie en het introductie milieu)</i>	Schatting van het risico dat aan de betreffende eigenschap van het GGO verbonden is
<p>De CMV promotoren hebben een functie bij de regulatie van de genexpressie. Een promotor is een specifieke DNA sequentie waaraan RNA polymerase kan binden om vervolgens stroomafwaarts gelegen coderende sequenties af te lezen. Een promotor op zichzelf kan geen schadelijk effect veroorzaken. Echter, de mate waarin een promotor actief is, is van invloed op de mate van expressie van genen die door de promotor worden gereguleerd. De mate van activiteit van een promotor kan afhankelijk zijn van de omstandigheden. Een constitutieve promotor heeft een vaste mate van activiteit, die niet of nauwelijks wordt veranderd door de omstandigheden. Bij een induceerbare promotor wordt de activiteit bepaald door de aan- of afwezigheid van signaalstoffen in de cel. De activiteit van een promotor kan ook afhankelijk zijn van het cel- of weefseltype waarin de promotor zich bevindt.</p> <p>De expressie van de het ABCA4 gen wordt gereguleerd door de humane CMV promotor. Of de mate van expressie en het expressiepatroon van een promotor een schadelijk effect heeft wordt niet direct door een promotor veroorzaakt, maar alleen</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijk gevolgen, indien ze optreden De schadelijke effecten die op kunnen treden als gevolg van de aanwezigheid van de regulerende sequenties kunnen alleen worden geëvalueerd in relatie tot de schadelijke effecten van het genproduct (ABCA4). De mate van expressie en het expressiepatroon van ABCA4 wordt gereguleerd door deze regulerende sequenties.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Eventuele geïdentificeerde schadelijke effecten zullen constitutief op kunnen treden in de getransduceerde cellen.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen: De mogelijke gevolgen zijn afhankelijk van de uitkomst van de risicoanalyse van ABCA4, rekening houdende met het verwachte expressiepatroon.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid: Eventuele geïdentificeerde schadelijke effecten zullen constitutief op kunnen treden in de getransduceerde.</p> <p>III. Het risico: Het risico wordt bepaald door de uitkomst van de risicoanalyse van ABCA4 (tabel 2.3).</p>



<p>door het genproduct dat door de promoter tot expressie komt.</p> <p>Naast de promoter bevat de vector de volgende regulerende sequenties: CMVp-R-U5, packaging signaal (ψ), WPRE, PPU en SIN 3' LTR.</p> <p>De LTRs spelen een rol bij reversie transcriptie, integratie van het provirus in het genoom van de gastheer en regulatie van de synthese van het lentivirale RNA. In SIN vectoren is het U3 domein uit de 3' LTR verwijderd. Tijdens reverse transcriptie naar het provirale genoom wordt deze deletie overgenomen in de 5' LTR waardoor deze vector geen functionele LTR's meer bezit. Naast de reductie op mobilisatie van de vector is hierdoor tevens de mogelijke activering van naburige proto-oncogenen door het U3 domein teniet gedaan.</p> <p>De cis-acterende EIAV sequenties ψ en PPU zijn nodig voor het inpakken van het virale vectorgenoom en reverse transcriptie</p> <p>De WPRE sequentie is afkomstig van <i>Woodchuck hepatitis virus</i> en vergroot expressie van de transgene cassette.</p>		
---	--	--



Tabel 2.2 milieurisicobeoordeling van het genetisch gemodificeerde *Equine Infectious Anemia Virus (EIAV)*:

Bepaling van eigenschappen die schadelijke effecten kunnen hebben <i>(Identificatie en toelichting "oorzaak-gevolg" relaties)</i>	Evaluatie van de mogelijke gevolgen van elk schadelijk effect, indien dit optreedt, en evaluatie van de waarschijnlijkheid van het optreden <i>(rekening houdend met de wijze van introductie en het introductie milieu)</i>	Schatting van het risico dat aan de betreffende eigenschap van het GGO verbonden is
A. Persistentie en invasiviteit		
<p>Bij de bepaling van het milieurisico van veranderde persistentie en invasiviteit van een GGO toegepast in medisch en veterinair onderzoek gaat het om de bepaling van mogelijke effecten van de genetische modificatie op het gastheerbereik, de infectiviteit en de pathogeniteit en virulentie voor potentiële gastheren (mensen en dieren) in het milieu.</p> <p>Van een hogere persistentie en invasiviteit van een virale vector (i.e. het GGO) ten opzichte van het natuurlijk voorkomende wildtype virus waarvan het is afgeleid, kan sprake zijn indien het GGO na toediening aan een patiënt langer dan het wildtype virus in een actieve vorm aanwezig kan blijven en er vervolgens shedding kan plaatsvinden van infectieuze deeltjes. Deze shedding kan leiden tot infectie van andere organismen.</p> <p>Daarbij moet in beschouwing genomen worden dat het GGO door de genetische modificatie veranderd kan zijn in zijn weefsel-tropisme, gastheerbereik en in de mate van infectiviteit en virulentie. Hierbij spelen onder andere de mogelijkheden voor replicatie en transmissie een rol.</p> <p>Deze veranderingen kunnen leiden tot een gewijzigd ziektebeeld in gastheren die vatbaar zijn voor infectie door het wildtype virus of tot uitbreiding van de ziekte naar nieuwe gastheren.</p> <p>De virale vector welke gebruikt wordt voor subretinale injectie is een niet-replicerende, recombinante lentivirale vector gebaseerd op EIAV. Het betreft hier een zogeheten zelf-inactiverend (SIN) lentiviraal vectorsysteem. De virale vector is ontworpen om het ontstaan van replicatiecompetent lentivirus (RCL) te voorkomen door het transgen en de virale genen coderend voor de eiwitten benodigd voor packaging, reverse transcriptie en integratie te verdelen over drie plasmiden. De</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt EIAV behoort tot de familie <i>Retroviridae</i> en het genus <i>Lentivirus</i>. Het gastheerbereik van EIAV is beperkt tot equidae (paarden, pony's, ezels, muilieren en zebra's). EIAV infecteert vooral monocyten en macrofagen. Infectie met EIAV wordt gekarakteriseerd door een acute fase waarbij viremie, koorts en trombocytopenie optreden, gevolgd door een chronische fase gekarakteriseerd door terugkerende viremie, anemie, gewichtsverlies en oedeemvorming. Gedurende de acute fase van ziekte kan het dier overlijden, echter dit komt zeer weinig voor en is geassocieerd met hoge virusreproductie. Het merendeel van de geïnfecteerde dieren wordt chronisch drager van het pathogeen. EIAV wordt veelal verspreid via bloedzuigende insecten zoals vliegen, maar kan ook van paard op paard worden overgedragen door bijvoorbeeld aërosolen. Verspreiding kan ook gebeuren van merrie naar ongeboren veulens gedurende de zwangerschap.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect De transfervector welke het transgen ATP Binding Cassette A4 (ABCA4) tot expressie brengt is gebaseerd op EIAV. In deze vector is ongeveer 90% van de EIAV sequenties verwijderd om een replicatiedeficiënte lentivirale vector te produceren. De structurele en functionele virale eiwitten benodigd voor het inpakken van het virale vectorgenoom, reverse transcriptie en integratie worden tot expressie gebracht vanaf twee aparte packaging vectoren; de gag/pol packaging component (brengt EIAV gag en pol tot expressie), en de envelop packaging component (brengt een heteroloog viraal envelop eiwit tot expressie). EIAV is geen humaan pathogeen en kan niet op mensen</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen: De gevolgen van een eventueel verhoogde persistentie of invasiviteit van het GGO kunnen groot zijn, zoals het ontstaan van trombocytopenie of anemie, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheer bereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid: De lentivirale vector heeft een VSV-G envelop waardoor het tropisme is uitgebreid. De virale vector is vanwege de genetische modificaties echter niet in staat om te repliceren. Het virusdeeltje kan slechts éénmaal een cel infecteren. De waarschijnlijkheid dat het leidt tot verhoogde persistentie of invasiviteit is te verwaarlozen.</p> <p>III. Het risico: Het risico van verhoging van de persistentie of de invasiviteit bij toepassing van de uitgangsvector is verwaarloosbaar klein.</p>



<p>ORFs coderend voor de genen <i>tat</i>, <i>env</i>, <i>S2</i> en <i>rev</i> zijn verwijderd. Verder is er gebruik gemaakt van een heteroloog envelop eiwit en een codon geoptimaliseerd ORF coderend voor de genen <i>gag</i> en <i>pol</i>, waardoor sequentie homologie geminimaliseerd is.</p> <p>Hierbij is het de vraag of de genetische modificaties in het genoom leiden tot een verandering in persistentie en/of invasiviteit in vergelijking tot het wildtype EIAV.</p>	<p>worden overgedragen. De replicatiedeficiënte lentivirale vector kan slechts éénmalig een cel infecteren. Na infectie integreert de virale vector als provirus in het genoom van de gastheercel. De <i>gag/pol</i> en envelop sequenties zijn afwezig in deze gastheercellen waardoor er geen nieuwe virale partikels gevormd kunnen worden en er dus geen verdere spreiding naar andere gastheercellen kan plaatsvinden. Hierdoor is de kans op verspreiding naar en infectie van derden gereduceerd.</p> <p>De stabiliteit van EIAV partikels wordt vergelijkbaar geacht met die van HIV-1 partikels, aangezien beiden lentivirussen zijn. De stabiliteit van de lentivirale partikels is afhankelijk van de vloeistof waarin het zich bevindt, de concentratie, temperatuur, zuurgraad, zonlicht en luchtvochtigheid. In bloed kan HIV-1 tot 42 dagen infectieus blijven bij kamertemperatuur. Onder experimentele condities kan celvrij HIV-1, gedroogd op een dekglasje in 10% serum, voor meer dan 7 dagen infectieus blijven. Voor VSV-G gepseudotyperde lentivirale partikels wordt een halfwaardetijd van 10 uur aangehouden bij 37°C.</p> <p>Door het gebruik van het VSV-G envelop eiwit is het tropisme van de vector verbreed. VSV-G gepseudotyperde lentivirale vectoren hebben een breed gastheerbereik en kunnen de meeste zoogdiercellen, en ook niet-zoogdiercellen, infecteren.</p> <p>Productie virusbatch en ontstaan RCL</p> <p>Tijdens de productie van de virale vector is er een theoretische kans aanwezig op het ontstaan van RCL. Voor de generatie van RCL zijn minimaal 2 aparte recombinatie gebeurtenissen nodig. Na eventuele recombinatie zijn de ORFs coderend voor de genen <i>tat</i>, <i>rev</i>, <i>env</i> en <i>S2</i> nog steeds afwezig, evenals de virale sequenties cPPT en het RRE, omdat deze niet aanwezig zijn in de transfervector en de packaging vectoren.</p> <p>De HEK productie cellen bevatten geen sequenties homologe aan de sequenties van het EIAV genoom waardoor homologe recombinatie kan worden uitgesloten. De productie cellen zijn vrij van lentivirussen, waardoor recombinatie met en complementatie van de virale vector niet mogelijk is. Verder is in de <i>gag-pol</i> plasmide gebruik gemaakt van een heteroloog envelop eiwit en een codon geoptimaliseerd ORF coderend voor de genen <i>gag</i> en <i>pol</i>, waardoor sequentie homologie geminimaliseerd is en de kans op recombinatie hierdoor klein is.</p> <p>In theorie is er ook een mogelijkheid tot het ontstaan van RCL door recombinatie van de virale vector met humane endogene retrovirale sequenties (HERVs). HERV sequenties zijn</p>	
--	--	--



	<p>aanwezig in het humane genoom. Voor recombinatie tussen de virale vector en HERVs is de aanwezigheid van sequentie homologie noodzakelijk. De meerderheid van de HERVs zijn gerelateerd aan beta-, gamma- en spuma-retrovirussen, die een lage homologie hebben met EIAV. De virale vector bevat bovendien slechts een gedeelte van het lentivirale genoom (de LTR's en het packaging signaal), waardoor recombinatie onwaarschijnlijk is.</p> <p>Voorafgaand aan vrijgifte van de virusbatch wordt deze getest op de aanwezigheid van RCL en een batch wordt alleen vrijgegeven wanneer deze RCL test negatief is. In geen van de batches tot op heden geproduceerd is RCL gedetecteerd. De RCL test is gebaseerd op een product enhanced reverse transcriptase (PERT) assay. De PERT test detecteert reverse transcriptie activiteit van alle retrovirussen en detecteert dus ook RCL indien het virus waarvan RCL afkomstig zijn onbekend is. De assay wordt uitgevoerd op 'end of production cellen (EOPC)' en op 5% van het uiteindelijke gezuiverde vector product. Tijdens assay validatie zijn diverse hoeveelheden infectieuze units getest en gedetecteerd, met een minimum van 8 focus forming units (FFU).</p> <p>De maximale dosis virus partikels die aan een patiënt zal worden toegediend is 10^7 transducerende units. In een aan de patiënt toe te dienen virusbatch is minder dan 1 RCL aanwezig.</p> <p>De kans dat er daadwerkelijk een infectieus RCL aanwezig is in de virusbatch is op grond van de bovenstaande overwegingen verwaarloosbaar klein.</p> <p>Ontstaan RCL na injectie in de patiënt. Aangezien wildtype EIAV geen humane cellen kan transduceren is het zeer onwaarschijnlijk dat recombinatie optreedt in humane weefsels getransduceerd met de lentivirale vector SAR422459. Ook de kans op recombinatie met in getransduceerde cellen aanwezige HERVs is onwaarschijnlijk door minimale sequentie homologie. Het is tevens onwaarschijnlijk dat in de getransduceerde cellen recombinatie optreedt tussen de lentivirale vector en humane retrovirussen die mogelijk in doelweefsels aanwezig kunnen zijn, aangezien de mate van homologie tussen deze virussen gereduceerd is door deleties en mutaties in de lentivirale vector. Bovendien zijn de patiënten vrij van HIV, HTLV, Hepatitis B en Hepatitis C virus infecties. Hierdoor is complementatie en/of recombinatie van de vector met deze virussen niet mogelijk.</p>	
--	--	--



	<p>De kans dat er daadwerkelijk infectieus RCL ontstaat in de patiënt is op grond van de bovenstaande overwegingen verwaarloosbaar klein.</p> <p>Verspreiding van viruspartikels buiten de patiënt. De virale partikels kunnen in theorie vanuit de patiënt in het milieu terechtkomen via bloed, urine of traanvocht. Dit kan zich onder andere voordoen bij afname van bloed of bij verwondingen waarbij een open wond ontstaat. De partikels kunnen verspreid worden naar derden via accidentele injectie of contact met een open wond of via traanvocht. De kans op nadelige effecten van de virale partikels in het milieu is zeer klein omdat deze buiten het lichaam niet lang infectieus blijven. Indien de virale partikels in een ander individu dan de patiënt terechtkomen dan zullen deze partikels geïnactiveerd worden door het immuunsysteem. Behalve deze afweerreactie zijn hierbij geen bijwerkingen te verwachten. Bovendien zal de hoeveelheid viruspartikels waarmee derden in aanraking kunnen komen vele malen kleiner zijn dan de hoeveelheid partikels die in het oog van de patiënt worden geïnjecteerd. Daardoor wordt het risico op eventuele negatieve effecten verkleind ten opzichte van de situatie in patiënten.</p> <p>De waarschijnlijkheid dat de genetische modificaties leiden tot verhoogde persistentie of invasiviteit van de lentivirale vector ten opzichte van het wildtype EIAV is verwaarloosbaar klein.</p>	
B. Selectieve voordelen		
<p>Voor de milieurisicobeoordeling van een GGO toegepast in medisch of veterinair onderzoek zijn die selectieve voordelen relevant die leiden tot verhoogde persistentie en invasiviteit. De oorzaak-gevolg relaties die hierbij een rol spelen zijn behandeld onder A.</p> <p>Hierbij is het de vraag of de genetische modificaties in het genoom leiden tot een selectief voordeel dat een verandering geeft in weefseltropisme, gastheerbereik en de mate van infectiviteit en virulentie van de vector in vergelijking tot het wildtype EIAV.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt Evenals onder A van deze tabel geldt dat indien verhoogde persistentie of invasiviteit of een uitbreiding van het gastheerbereik van de vector aanleiding zou geven tot ziektebeelden dan zouden de gevolgen groot kunnen zijn, maar alleen indien het ziektebeeld gepaard gaat met significante hinder of klachten.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect De virale vector welke gebruikt wordt voor subretinale injectie is een niet-replicerende, recombinante lentivirale vector gebaseerd op EIAV. Het betreft hier een zogeheten SIN lentiviraal vectorsysteem. De virale vector is ontworpen om het ontstaan van replicatiecompetent lentivirus (RCL) te voorkomen door het transgen en de virale genen coderend voor de eiwitten benodigd voor packaging, reverse transcriptie en integratie te verdelen over drie plasmiden. De ORFs coderend voor de genen <i>tat</i>, <i>rev</i>, <i>S2</i> en <i>env</i> zijn verwijderd.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen: De gevolgen van selectieve voordelen kunnen groot zijn, zoals het ontstaan van trombocytopenie of anemie, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheer bereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid: De lentivirale vector is gepseudotyped met een VSV-G envelop waardoor het tropisme is uitgebreid. De virale vector is vanwege de genetische modificaties echter niet in staat om te repliceren. Het virusdeeltje kan slechts éénmaal een cel infecteren. De waarschijnlijkheid dat de genetische modificaties leiden tot selectieve voordelen is te verwaarlozen.</p> <p>III. Het risico: Het risico van selectieve voordelen bij toepassing van de lentivirale vector is verwaarloosbaar klein.</p>



	<p>Hierdoor is de virale vector replicatiedeficiënt en kan het virusdeeltje slechts éénmaal een cel infecteren. De kans op het ontstaan van RCL of dat de verloren functies gecompenseerd worden is zoals besproken onder onderdeel A van deze tabel verwaarloosbaar klein.</p> <p>Zoals reeds is aangegeven onder onderdeel A van deze tabel, is het gastheerbereik door het gebruik van de VSV-G envelop verbreed. VSV-G gepseudotyperde lentivirale vectoren hebben een breed gastheerbereik en kunnen de meeste zoogdiercellen, en ook niet-zoogdiercellen, infecteren. Het is echter onwaarschijnlijk dat de genetische modificaties in het genoom van de lentivirale vector een positief effect hebben op de virusbiologie van de vector. Een toegenomen virulentie en het optreden van een mogelijk schadelijk effect is dan ook zeer onwaarschijnlijk.</p>	
C. Kans op genoverdracht op andere soorten en de kans dat hierdoor selectieve voor- of nadelen op deze soorten worden overgedragen		
<p>Van genoverdracht op andere soorten kan alleen sprake zijn indien (homologe) recombinatie heeft plaatsgevonden. Op de eerste plaats wordt in beschouwing genomen of er overdracht plaats kan vinden van het GGO naar andere virussen. Die kans is op de eerste plaats afhankelijk van de aanwezigheid van een verwant virus (dat homologieën vertoont met de vector) binnen hetzelfde celcompartiment waarin het GGO zich bevindt. Vervolgens zijn de kans op recombinatie en de eigenschappen van het gevormde product afhankelijk van de genetische opbouw van het GGO. Van een mogelijk gevormde recombinant moet vervolgens worden nagegaan in hoeverre hieruit selectieve voor- of nadelen voortvloeien.</p> <p>De vraag is of de genetische modificaties geheel of gedeeltelijk kunnen worden overgedragen naar nadere virussen en of dit vervolgens voor deze virussen kan leiden tot een selectief voor- of nadeel.</p> <p>Selectieve voor- of nadelen kunnen alleen optreden als de genetische modificaties op een of andere manier een interactie hebben met de virale levenscyclus.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt Recombinatie tussen de lentivirale vector en wildtype lentivirussen kan resulteren in het ontstaan van RCLs. Evenals onder A geldt dat indien dergelijke RCLs aanleiding zouden geven tot ziektebeelden dan zouden de gevolgen groot kunnen zijn, maar alleen indien het ziektebeeld gepaard gaat met significante hinder of klachten.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect De virale vector is ontworpen om het ontstaan van RCL te voorkomen door het transgen en de virale genen coderend voor de eiwitten benodigd voor packaging, reverse transcriptie en integratie te verdelen over drie plasmiden. De ORFs coderend voor de genen <i>tat</i>, <i>rev</i>, <i>S2</i> en <i>env</i> zijn verwijderd. Verder is er gebruik gemaakt van een heteroloog envelop eiwit en een codon geoptimaliseerd ORF coderend voor de genen gag en pol, waardoor sequentie homologie geminimaliseerd is. Bovendien is de virale vector zelf-inactiverend (SIN). Uit SIN vectoren is een deel van de 3' LTR, het zogenaamde U3 domein, verwijderd. Tijdens reverse transcriptie naar het provirale genoom wordt deze deletie overgenomen in de 5' LTR waardoor deze vector geen functionele LTR's meer bezit. Dit reduceert de kans op mobilisatie van de vector uit het genoom van de gastheer aanzienlijk. In het geval van een superinfectie van de getransduceerde cel met een wildtype lentivirus kan de transfervector in principe niet meer worden gemobiliseerd uit het genoom van de gastheercel.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen: De gevolgen van genoverdracht kunnen groot zijn, zoals het ontstaan van trombocytopenie of anemie, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheer bereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid: De waarschijnlijkheid dat de genetische modificaties kunnen worden overgedragen naar andere virussen en dat dit vervolgens voor deze virussen kan leiden tot een selectief voor- of nadeel is verwaarloosbaar klein.</p> <p>III. Het risico: Het risico is verwaarloosbaar klein.</p>



	<p>Aangezien wildtype EIAV geen humane cellen kan infecteren is het zeer onwaarschijnlijk dat recombinatie optreedt in humane weefsels getransduceerd met de lentivirale vector SAR422459. Ook de kans op recombinatie met in getransduceerde cellen aanwezige HERVs dan wel andere (lenti)virussen zoals HIV of HTLV is onwaarschijnlijk door minimale sequentie homologie. Zoals beschreven onder A van deze tabel is de kans dat er RCL ontstaat verwaarloosbaar klein.</p> <p>De eerste CMV promoter is geen onderdeel van het lentivirale genoom dat wordt getranscribeerd van de transfervector en dat wordt ingepakt in de lentivirale partikels. De tweede aanwezige CMV promoter is wel onderdeel van de transfervector en zal worden geïntegreerd in het DNA van de patiënt. Het risico van recombinatie van de CMV promoter met cytomegalovirussen in de patiënt, waardoor vervolgens een selectief voor- of nadeel ontstaat, is echter verwaarloosbaar klein.</p> <p>De WPRE sequentie is afkomstig van het dierpathogene <i>Woodchuck hepatitis virus</i>, welke behoort tot de familie <i>Hepadnaviridae</i> en het genus <i>Orthohepadnavirus</i>. Hiertoe behoort ook het verwante, humane <i>Hepatitis B virus</i>. Patiënten zijn vrij van onder andere <i>Hepatitis B virus</i> infecties. Het risico van recombinatie van de WPRE sequentie met verwante virussen is daarom verwaarloosbaar klein.</p> <p>De waarschijnlijkheid dat de genetische modificaties kunnen worden overgedragen naar andere virussen en dat dit vervolgens voor deze virussen kan leiden tot een selectief voor- of nadeel is verwaarloosbaar klein.</p>	
--	--	--



D. Effecten op doel en niet-doel populaties		
<p>Effecten op de patiënten die aan de studie deelnemen (doelpopulatie) vallen niet onder het toetsingskader van de milieuregelgeving en worden om die reden hier niet direct in beschouwing genomen. De effecten op de patiënt vallen onder de medische verantwoordelijkheid van de behandelend arts. Effecten op niet-doelpopulaties zullen alleen op kunnen treden indien er sprake is van verspreiding van de vector in de omgeving van de patiënt. Een aantal aspecten betreffende pathogene effecten is al in beschouwing genomen onder A. In dit onderdeel worden de eventuele effecten van het GGO beoordeeld op dieren in de omgeving van de patiënt. Bij de beoordeling moet rekening worden gehouden met de te verwachten blootstellingsweg en mate van blootstelling.</p> <p>De vraag is welke effecten de genetische modificaties kunnen hebben op de niet-doelpopulatie. Met effecten worden schadelijke en niet-schadelijke effecten bedoeld, zoals eventuele toxische en allergene effecten.</p> <p>Hiervoor moet worden nagegaan wat er bekend is over de effecten die de genetische modificaties kunnen hebben op dieren. Specifieke gezondheidseffecten voor de mens worden onder onderdeel E besproken.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt EIAV behoort tot de familie <i>Retroviridae</i> en het genus <i>Lentivirus</i>. Het gastheerbereik van EIAV is beperkt tot equidae (paarden, pony's, ezels, muil dieren en zebra's). EIAV infecteert vooral monocyt en macrofagen. Infectie met EIAV wordt gekarakteriseerd door een acute fase waarbij viremie, koorts en trombocytopenie optreden, gevolgd door een chronische fase gekarakteriseerd door terugkerende viremie, anemie, gewichtsverlies en oedeemvorming. Gedurende de acute fase van ziekte kan het dier overlijden, echter dit komt zeer weinig voor en is geassocieerd met hoge virusreproductie. Het merendeel van de geïnfecteerde dieren wordt chronisch drager van het pathogeen. EIAV wordt veelal verspreid via bloedzuigende insecten zoals vliegen, maar kan ook van paard op paard worden overgedragen door bijvoorbeeld aerosolen. Verspreiding kan ook gebeuren van merrie naar ongeboren veulens gedurende de zwangerschap. EIAV is niet endemisch in Nederland.</p> <p>Indien de lentivirale partikels in derden (inclusief dieren) terechtkomen, dan zal na infectie van een cel de virale vector op een willekeurige plek in het gastheer genoom integreren. Hierdoor bestaat de kans op ontregeling van genen betrokken bij proliferatie waardoor tumoren kunnen ontstaan. Daarnaast kan een afweerreactie ontstaan tegen de VSV-G gepseudotyperde virale partikels.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Kans op blootstelling aan RCL of vrije lentivirale partikels De virale vector is ontworpen om het ontstaan van RCL te voorkomen door het transgen en de virale genen coderend voor de eiwitten benodigd voor packaging, reverse transcriptie en integratie te verdelen over drie plasmiden. De ORFs coderend voor de genen <i>gag</i>, <i>pol</i>, <i>tat</i>, <i>rev</i>, <i>S2</i> en <i>env</i> zijn verwijderd. Het gastheerbereik van de lentivirale vector is door het gebruik van de VSV-G envelop verbreed. VSV-G gepseudotyperde lentivirale vectoren hebben een breed gastheerbereik en kunnen de meeste zoogdiercellen, en ook niet-zoogdiercellen, infecteren.</p> <p>Lentivirale vrije vectordeeltjes of gerelateerde RCLs kunnen vanuit de patiënt worden overgedragen naar derden. Zoals beschreven onder A van deze tabel is de kans echter verwaarloosbaar klein dat RCLs in de virusbatch aanwezig</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen: De genetische modificaties in de lentivirale vector kunnen leiden tot het optreden van (schadelijke) effecten.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid: De waarschijnlijkheid dat de genetische modificaties in de lentivirale vector leiden tot het optreden van (schadelijke) effecten op doel en niet-doel populaties is verwaarloosbaar klein.</p> <p>III. Het risico: De kans op het optreden van (schadelijke) effecten en de mogelijke gevolgen voor het milieu zijn verwaarloosbaar klein.</p>



	<p>zijn.</p> <p>De vector is replicatiedeficiënt, en zoals reeds beschreven in onderdeel A van tabel 2.2 is de kans op verspreiding naar en infectie van derden gereduceerd.</p> <p>Na infectie van de doelwit cellen in het oog zal de lentivirale vector stabiel in het genoom van de gastheercel opgenomen worden. Biodistributie- en sheddingstudies met konijnen en primaten, waarbij de vector gedetecteerd wordt middels qPCR voor het EIAV packaging signaal, hebben laten zien dat geïntegreerde vector en vrije virale partikels met name werden gevonden in de retina (het doelweefsel) en andere oogweefsels, maar niet of slechts in kleine hoeveelheden in andere weefsels. De in preklinische studies met primaten gevonden vector buiten het oog kan duiden op een beschadigde retina gedurende de procedure en lekkage van de vector in de bloedbaan achter in het oog. Mocht na toediening van de virale partikels aan de patiënt toch lekkage in de bloedbaan plaatsvinden, dan zal de vector zich waarschijnlijk niet verder kunnen verspreiden in het lichaam aangezien het GGO geïnactiveerd wordt door het humane immuun systeem. In 23 patiënten die tot op heden behandeld zijn met de virale vector zijn geen vector componenten gevonden boven de kwantificeerbare detectielimiet van de PCR test in bloed of urine. De detectielimiet van de test daarbij is 10 kopieën per µg DNA voor bloed en 100 kopieën per 4 mL RNA voor urine.</p> <p>In traanvocht van het geïnjecteerde oog van primaten, getest één of twee dagen na injectie, is geen vector gedetecteerd. Ook in primatenstudies met vergelijkbare vectoren (SAR421869 en Retinostat) werd geen vector gedetecteerd in traanvocht.</p> <p>Het geïnjecteerde oog van de patiënt zal na de procedure gedurende 24 uur worden afgedekt om zo eventuele verspreiding van de vector, mocht die aanwezig zijn in traanvocht, tegen te gaan. Na 1 dag zal de patiënt terugkomen naar de kliniek waar het oogverband zal worden verwijderd. Het verband zal vervolgens worden vernietigd door verbranding of autoclaveren. Indien het oogverband al eerder loslaat dan zal de patiënt dit volgens instructies met meegegeven materialen weer herbevestigen.</p> <p>Op grond van bovenstaande overwegingen is het onwaarschijnlijk dat er vrije virusdeeltjes terechtkomen in het milieu.</p> <p>Kans op mutagenese en carcinogenese</p>	
--	--	--



	<p>De kans dat insertionele mutagenese van de lentivirale vector direct carcinogeen is, is beperkt doordat alle virale genen en de promotor en enhancer sequenties in het U3 domein van de 3'LTR verwijderd zijn (SIN vector) en daardoor kan mogelijke transactivatie van proximale proto-oncogenen niet optreden.</p> <p>Er zijn geen carcinogeniteitsstudies uitgevoerd met de SAR422459 lentivirale vector, echter wel met een gerelateerde vector, Prosavin. Gezien de overeenkomsten tussen beide vectoren worden de resultaten met betrekking tot deze <i>in vitro</i> en <i>in vivo</i> studies relevant geacht. Deze studies beschrijven dat, <i>in vitro</i>, het integratie patroon van vectoren gebaseerd op EIAV vergelijkbaar is met dat van op HIV gebaseerde vectoren, dat de integratie patronen vergelijkbaar zijn in snel en langzaam delende cellen en dat het integratiepatroon van de <i>in vitro</i> studies vergelijkbaar is met dat in cellen van ratten <i>in vivo</i>. Op grond van bovenstaande overwegingen is de kans op carcinogenese met SAR422459 vergelijkbaar met die van op HIV-gebaseerde lentivirale SIN-vectoren, die al in meerdere klinische trials zijn toegepast.</p> <p>Kans op ontwikkelen van een immuunrespons In 2 van de 23 tot nu toe met SAR422459 behandelde patiënten is een antistof response waargenomen tegen het VSV-G envelop eiwit. Dit had echter geen invloed op patiëntveiligheid. Ook in konijnen en primaten zijn antistof responsen waargenomen tegen het VSV-G envelop eiwit. Dit resulteerde niet in schadelijke effecten.</p> <p>Mocht blootstelling aan derden toch gebeuren, dan kunnen de virusdeeltjes alleen overleven als ze via direct bloed-bloed contact worden overgedragen. Bovendien zullen infectieuze lentivirale partikels na accidentele toediening aan derden geïnactiveerd worden door het complement systeem in humaan serum. Zelfs als verspreiding naar derden (of dieren) gebeurt, dan kan de vector slechts eenmaal een cel infecteren en wordt verdere verspreiding van het GGO niet verwacht aangezien geen replicatie van de vector kan optreden en replicatie competente partikels niet zijn gevonden tijdens de productie van SAR224459 of gerelateerde vectoren gebouwd uit dezelfde voorloper-vector.</p> <p>De verloren functies van de lentivirale vector kunnen in theorie gecompenseerd worden indien een retrovirus in dezelfde cel aanwezig is als de vector. De expressie-producten van het wildtype virus kunnen in dat geval gebruikt worden door de vector, wat de vector de mogelijkheid biedt te repliceren. Hierdoor is er een theoretische kans op verdere verspreiding. De waarschijnlijkheid dat een dergelijke gebeurtenis zich</p>	
--	---	--



	<p>voordoet is echter verwaarloosbaar klein zoals aangegeven onder A van deze tabel.</p> <p>De kans dat derden geïnfecteerd worden met RCLs of vrije virusdeeltjes is verwaarloosbaar klein.</p>	
E. Mogelijke effecten op menselijke gezondheid		
<p>Aspecten gerelateerd aan de pathogeniteit van het GGO zijn reeds aan de orde geweest in onderdeel A. Daar werd de vraag gesteld of de genetische modificaties in het genoom van EIAV leiden tot verandering in weefseltropisme, gastheerbereik en in de mate van infectiviteit en virulentie van de virale vector in vergelijking met wildtype EIAV.</p> <p>Aspecten gerelateerd aan toxiciteit of allergeniteit en andere gezondheidsgerelateerde effecten zijn hier aan de orde. Daarbij worden de eventuele toxische en allergene effecten van het GGO beoordeeld op mensen in de omgeving van de patiënt. Elementen die daarbij in beschouwing genomen moeten worden zijn toxiciteit of andere schadelijke effecten zoals een effect van het GGO op het immuunsysteem en allergeniteit van het genproduct. Bij de beoordeling moet rekening worden gehouden met de te verwachten blootstellingsweg en mate van blootstelling.</p> <p>De vraag is welke effecten de genetische modificaties in het genoom van EIAV kunnen hebben op de gezondheid van de doelpopulatie. Hieronder worden mensen verstaan, met uitzondering van de behandelde patiënt. Hiervoor moet worden nagegaan wat er bekend is over de effecten die de genetische modificaties kunnen hebben op de mens.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</p> <p>In onderdeel A van deze tabel is geconcludeerd dat de gevolgen van een eventueel verhoogde persistentie of invasiviteit van het GGO groot kunnen zijn, zoals het ontstaan van trombocytopenie of anemie, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheer bereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p>Indien de lentivirale partikels in derden terechtkomen dan zal na infectie van een cel de virale vector op een willekeurige plek in het gastheer genoom integreren. Hierdoor bestaan de kans op ontregeling van genen betrokken bij proliferatie waardoor tumoren kunnen ontstaan. Daarnaast kan een afweerreactie worden gestart tegen de VSV-G gepseudotyperde virale partikels.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</p> <p>Zoals beschreven onder onderdeel A van deze tabel is de kans verwaarloosbaar klein dat RCLs in de virusbatch aanwezig zijn. Patiënten zullen worden geïnjecteerd met lentivirale partikels, echter zoals beschreven onder D van deze tabel is geconcludeerd dat de kans verwaarloosbaar klein dat verspreiding naar derden plaatsvindt. Verspreiding naar de gonaden is in preklinische studies niet waargenomen. Ook de kans op vorming van RCL in de patiënt is verwaarloosbaar klein. Derhalve is de kans op transmissie van virusdeeltjes naar derden of via kiembaancelinfectie verwaarloosbaar klein.</p> <p>Zoals reeds aangegeven in onderdeel D van deze tabel, kunnen de virusdeeltjes, in geval blootstelling aan derden toch gebeurt, alleen overleven als ze via direct bloed-bloed contact worden overgedragen. Bovendien zullen infectieuze lentivirale partikels na accidentele toediening aan derden geïnactiveerd worden door het complement systeem in humaan serum. Zelfs als verspreiding naar derden gebeurt, dan kan de vector slechts eenmaal een cel infecteren en wordt verdere verspreiding van het GGO niet verwacht aangezien geen replicatie van de vector kan optreden en replicatie competente</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen:</p> <p>De genetische modificaties in de lentivirale vector kunnen leiden tot het optreden van (schadelijke) effecten.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid:</p> <p>De waarschijnlijkheid dat de genetische modificaties in de lentivirale vector leiden tot het optreden van (schadelijke) effecten op de menselijke en diergezondheid is verwaarloosbaar klein.</p> <p>III. Het risico:</p> <p>De kans op het optreden van (schadelijke) effecten en de mogelijke gevolgen voor het milieu zijn verwaarloosbaar klein.</p>



	<p>partikels niet zijn gevonden tijdens de productie van SAR224459 of gerelateerde vectoren gebouwd uit dezelfde voorloper-vector.</p> <p>De verloren functies van de lentivirale vector kunnen in theorie gecompenseerd worden indien een retrovirus in dezelfde cel aanwezig is als de vector. De expressie-producten van het wildtype virus kunnen in dat geval gebruikt worden door de vector, wat de vector de mogelijkheid biedt te repliceren. Hierdoor is er een theoretische kans op verdere verspreiding. De waarschijnlijkheid dat een dergelijke gebeurtenis zich voordoet is echter verwaarloosbaar klein zoals aangegeven onder A van deze tabel.</p> <p>Kans op ontwikkelen van een immuunrespons Van de 22 patiënten die tot op heden behandeld zijn met de vector is er in 2 een anti-VSV-G respons gevonden zonder dat er enige impact was op patiëntveiligheid.</p>	
F. Mogelijke effecten op menselijke en diergezondheid ten gevolge van consumptie		
<p>Er zal uitsluitend sprake van consumptie zijn indien het een toepassing op dieren betreft en de proefdieren na afloop van het experiment voor menselijke consumptie of als diervoeder worden aangeboden. Alleen in dat geval wordt dat aspect in beschouwing genomen. Daarbij moet worden nagegaan in hoeverre consumptie van de tot expressie gebrachte genproducten kunnen leiden tot gezondheidsschade voor mens of dier.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt Er is geen sprake van consumptie.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Het is uitgesloten dat er schadelijke effecten optreden.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen: Niet van toepassing.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid: Niet van toepassing.</p> <p>III. Het risico: Niet van toepassing.</p>
G. Effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu		
<p>In het algemeen wordt hieronder verstaan de negatieve effecten die GGO's kunnen hebben op (micro-) organismen die voorkomen als commensalen of die verantwoordelijk zijn voor kringlopen van nutriënten of afbraak van organisch materiaal. De vraag is hier of de genetische modificaties in het genoom van EIAV een effect kunnen hebben op andere microbiële populaties in mens, dier of het milieu.</p> <p>Infectie kan alleen optreden in humane en dierlijke cellen. Virale deeltjes zijn replicatiedeficiënt en kunnen een cel slechts éénmaal infecteren. Effecten in het milieu in het algemeen kunnen daarmee worden uitgesloten.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt De in deze studie te gebruiken vector kan geen interactie aangaan met microbiële populaties.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Er zijn geen potentiële effecten geïdentificeerd. De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen: Er zijn geen gevolgen te verwachten.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid: De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p> <p>III. Het risico: Het risico is verwaarloosbaar klein.</p>



H. Veranderingen in de medische of veterinaire praktijk		
<p>Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde, directe en indirecte milieueffecten van de veranderde medische en veterinaire praktijk ten gevolge van de toepassing van de GGO's.</p> <p>Hieronder wordt verstaan dat de toepassing van het GGO kan leiden tot een verminderd effect en afgenomen toepasbaarheid van geneesmiddelen.</p> <p>De vraag is of de genetische modificaties in het genoom van EIAV zullen leiden tot veranderingen in de medische praktijk.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt Aangezien de vector verminderd virulent is ten opzichte van wildtype EIAV zullen er geen gevolgen zijn voor de behandelmethoden die beschikbaar zijn in de huidige medische of veterinaire praktijk. Het doel van de studies is om een nieuwe therapie te ontwikkelen tegen Stargardt maculaire degeneratie. Dit is een ernstige aandoening waarbij het merendeel van de patiënten uiteindelijk blind of ernstig visueel beperkt wordt. Momenteel is er geen effectieve behandeling tegen deze aandoening. Hier zijn geen nadelige gevolgen voor mens of milieu aan verbonden.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Er zijn geen potentiële schadelijke effecten geïdentificeerd. De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen: Er zijn geen gevolgen te verwachten.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid: De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p> <p>III. Het risico: Het risico is verwaarloosbaar klein.</p>



Tabel 2.3 milieurisicobeoordeling van de ATP Binding Cassette A4 (ABCA4) en het neomycin phosphotransferase II (NeoR) open reading frame (ORF) van Escherichia coli transposon Tn5:

Bepaling van eigenschappen die schadelijke effecten kunnen hebben <i>(Identificatie en toelichting "oorzaak-gevolg" relaties)</i>	Evaluatie van de mogelijke gevolgen van elk schadelijk effect, indien dit optreedt, en evaluatie van de waarschijnlijkheid van het optreden <i>(rekening houdend met de wijze van introductie en het introductie milieu)</i>	Schatting van het risico dat aan de betreffende eigenschap van het GGO verbonden is
A. Persistentie en invasiviteit		
<p>Bij de bepaling van het milieurisico van veranderde persistentie en invasiviteit van een GGO toegepast in medisch onderzoek gaat het om de bepaling van mogelijke effecten van de genetische modificatie op het gastheerbereik, de infectiviteit en de pathogeniteit en virulentie voor potentiële gastheren (mensen en dieren) in het milieu.</p> <p>Van een hogere persistentie en invasiviteit kan sprake zijn indien het GGO na toediening aan een patiënt, langer dan het ouderorganisme in een actieve vorm aanwezig kan blijven en vervolgens kan verspreiden in het milieu. In dat geval moet beoordeeld worden of verspreiding vervolgens kan leiden tot een infectie van andere organismen.</p> <p>De vraag is of de ABCA4 en/of de NeoR sequentie een effect kunnen hebben op de persistentie en invasiviteit van de toegepaste virale vector. Hierbij moet in beschouwing genomen worden dat voor de productie van de virale vector een zelf-inactiverend (SIN) lentiviraal vectorsysteem gebruikt is. De virale vector is ontworpen om het ontstaan van replicatiecompetent lentivirus (RCL) te voorkomen door het transgen en de virale genen coderend voor de eiwitten benodigd voor packaging, reverse transcriptie en integratie te verdelen over drie plasmiden. De ORFs coderend voor de genen <i>tat</i>, <i>rev</i>, <i>S2</i> en <i>env</i> zijn verwijderd. De virale vector is replicatiedeficiënt en daardoor kan het virusdeeltje slechts éénmaal een cel infecteren. Er is geen promotor aanwezig die het ORF voor NeoR transcribeert, en ook de polyadenylatie sequentie ontbreekt. De getransduceerde fotoreceptorcellen in het oog zullen derhalve het NeoR eiwit niet tot expressie brengen. Om een rol te kunnen spelen in de virusbiologie van de vector zouden ABCA4, of de NeoR sequentie, op de een of</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt In theoretische omstandigheden dat er mogelijk virusdeeltjes gevormd worden (zoals beschreven in Tabel 2.2) is er geen reden om aan te nemen dat ABCA4 of het NeoR ORF invloed zullen hebben op de virusbiologie van de vector.</p> <p>De getransduceerde fotoreceptorcellen in het oog zullen het correcte ABCA4 tot expressie brengen. Hierdoor wordt de pathofysiologie die leidt tot Stargardt maculaire degeneratie gestopt of zelfs teruggedraaid. Er zijn geen fysiologische of pathogene effecten geobserveerd in preklinische studies waarbij ABCA4 tot expressie werd gebracht in cellen en/of weefsels waar dat normaliter niet het geval is zoals retinale pigment epitheelcellen. Ook is geen cytotoxiciteit waargenomen in <i>in vitro</i> studies met onder andere humane retinale epitheelcellen die getransduceerd werden met de ABCA4 EIAV lentivirale vector.</p> <p>Een functioneel NeoR eiwit kan resistentie tegen antibiotica bewerkstelligen in zowel pro- als eukaryoten.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Van ABCA4 of de NeoR sequentie is niet bekend dat het effecten heeft op de virusbiologie van EIAV. Er is ook geen scenario denkbaar waarlangs zo'n effect zou kunnen optreden. Expressie van ABCA4 door, of de aanwezigheid van het NeoR ORF in, de vector zal daarom op zichzelf niet leiden tot vorming van virusdeeltjes die de virale vector bevatten.</p> <p>Door het gebruik van het VSV-G envelop eiwit is het tropisme</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen: De gevolgen van een verhoogde persistentie en invasiviteit kunnen groot zijn, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheer bereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid: De waarschijnlijkheid dat de insertie van ABCA4 of het NeoR ORF leidt tot een verhoogde persistentie of invasiviteit is verwaarloosbaar klein.</p> <p>III. Het risico: Het risico van verhoogde persistentie en invasiviteit is verwaarloosbaar klein.</p>



<p>andere manier een activiteit moeten hebben die de afwezige virale genproducten en regulatoire sequenties zou kunnen complementeren.</p>	<p>van de vector verbreed. VSV-G gepseudotyperde lentivirale vectoren hebben een breed gastheerbereik en kunnen de meeste zoogdiercellen, en ook niet-zoogdiercellen, infecteren.</p> <p>De getransduceerde fotoreceptor cellen zullen gedurende lange tijd in patiënten aanwezig blijven. Gen expressie studies met reporter genen of ABCA4 hebben laten zien dat EIAV vectoren retinale cellen kunnen transduceren en dat de transgen expressie meer dan 16 maanden aanwezig blijft. Na toediening van de virale partikels aan de patiënt zal de vector zich waarschijnlijk niet kunnen verder kunnen verspreiden in het lichaam met uitzondering van het oog aangezien het GGO geïnactiveerd wordt door het humane immuun systeem. In 23 patiënten die tot op heden behandeld zijn met de vector in reeds gestarte klinische studies zijn geen vector componenten gevonden boven de kwantificeerbare detectielimiet van de PCR test in bloed of urine. De detectielimiet van de test daarbij is 10 kopieën DNA per µg voor bloed en 100 kopieën RNA per 4 mL voor urine.</p> <p>De waarschijnlijkheid dat ABCA4 of het NeoR ORF leidt tot een verhoogde persistentie of invasiviteit is verwaarloosbaar klein.</p>	
<p>B. Selectieve voordelen</p>		
<p>Voor de milieुरisicobeoordeling van een GGO toegepast in medisch of veterinair onderzoek zijn die selectieve voordelen relevant die leiden tot verhoogde persistentie en invasiviteit. De oorzaak-gevolg relaties die hierbij een rol spelen zijn behandeld onder A.</p> <p>Het is onder dit onderdeel de vraag of expressie van de ABCA4 sequentie, of aanwezigheid van het NeoR ORF, leidt tot selectieve voordelen die een verandering in weefsel tropisme, gastheerbereik en in de mate van infectiviteit en virulentie van de virale vector in vergelijking met wildtype EIVA teweeg brengt.</p> <p>Hierbij moet in beschouwing genomen worden dat voor de productie van de virale vector een SIN lentiviraal vectorsysteem is. De virale vector is ontworpen om het ontstaan van replicatiecompetent lentivirus (RCL) te voorkomen door het transgen en de virale genen coderend voor de eiwitten benodigd voor packaging, reverse transcriptie en integratie te verdelen over drie plasmiden. De ORFs coderend voor de genen <i>tat</i>, <i>rev</i>, <i>S2</i> en <i>env</i> zijn verwijderd. De virale vector is replicatiedeficiënt en daardoor kan het virusdeeltje slechts éénmaal een cel infecteren. Om een rol te</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt</p> <p>In theoretische omstandigheden dat er mogelijk virusdeeltjes gevormd worden (zoals beschreven in Tabel 2.2) is er geen reden om aan te nemen dat ABCA4 of het NeoR ORF invloed zullen hebben op de virusbiologie van de vector.</p> <p>Evenals onder A geldt dat de getransduceerde fotoreceptorcellen in het oog het correcte ABCA4 tot expressie zullen brengen. Hierdoor wordt de pathofysiologie die leidt tot Stargardt maculaire degeneratie gestopt of zelfs teruggedraaid. Er zijn geen fysiologische of pathogene effecten geobserveerd in preklinische studies waarbij ABCA4 tot expressie werd gebracht in cellen en/of weefsels waar dat normaliter niet het geval is zoals sommige retinale pigment epitheelcellen. Ook is geen cytotoxiciteit waargenomen in <i>in vitro</i> studies met onder andere humane retinale epitheelcellen die getransduceerd werden met de ABCA4 EIAV lentivirale vector.</p> <p>Evenals onder A geldt dat de getransduceerde fotoreceptorcellen in het oog het ORF voor NeoR niet tot expressie zullen brengen door afwezigheid van een promotor, waardoor geen schadelijke effecten zijn te verwachten.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen:</p> <p>De gevolgen van een verhoogde persistentie en invasiviteit kunnen groot zijn, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheer bereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid:</p> <p>De waarschijnlijkheid dat de insertie van ABCA4 of het NeoR ORF leidt tot selectieve voordelen is verwaarloosbaar klein.</p> <p>III. Het risico:</p> <p>Het risico van selectieve voordelen is verwaarloosbaar klein.</p>



<p>kunnen spelen in de virusbiologie van de vector zou ABCA4, of de NeoR sequentie, op de een of andere manier een activiteit moeten hebben die de afwezige virale genproducten en regulatoire sequenties zou kunnen complementeren.</p>	<p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Zoals beschreven in onderdeel A van deze tabel is de waarschijnlijkheid dat er als gevolg van selectieve voordelen een mogelijk schadelijk effect ontstaat verwaarloosbaar klein.</p>	
<p>C. Kans op genoverdracht op andere soorten en de kans dat hierdoor selectieve voor- of nadelen op deze soorten worden overgedragen</p>		
<p>Genoverdracht op andere soorten kan plaatsvinden door (homologe) recombinatie. Op de eerste plaats wordt in beschouwing genomen of er overdracht plaats kan vinden van de vector naar andere virussen. Die kans is op de eerste plaats afhankelijk van de aanwezigheid van een verwant virus binnen het zelfde celcompartiment waarin de vector zich bevindt. Vervolgens zijn de kans op recombinatie en de eigenschappen van het gevormde product afhankelijk van de genetische opbouw van het GGO. Van een mogelijk gevormde recombinant moet vervolgens worden nagegaan in hoeverre hieruit selectieve voor- of nadelen voortvloeien.</p> <p>Onder dit onderdeel wordt de vraag gesteld of de ABCA4, danwel de NeoR sequentie kan worden overgedragen naar andere virussen en of dit vervolgens voor deze virussen kan leiden tot een selectief voor- of nadeel. Selectieve voor- of nadelen kunnen alleen optreden als de expressie van ABCA4 vervolgens een interactie heeft met de virale levenscyclus.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt In theoretische omstandigheden dat er mogelijk virusdeeltjes gevormd worden (zoals beschreven in Tabel 2.2) is er geen reden om aan te nemen dat ABCA4 invloed zal hebben op de virusbiologie van de vector. Er is geen reden om aan te nemen dat NeoR getranscribeerd wordt aangezien deze geen promotor sequentie bevat. Een functioneel NeoR eiwit kan resistentie tegen antibiotica bewerkstelligen in zowel pro- als eukaryoten.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect In onderdeel C van Tabel 2.2 is geconcludeerd dat de waarschijnlijkheid dat de genetische modificaties kunnen worden overgedragen naar andere virussen en dat dit vervolgens voor deze virussen kan leiden tot een selectief voor- of nadeel verwaarloosbaar klein is. De overdracht van genetisch materiaal naar (pathogene) bacteriën is zeer onwaarschijnlijk. Bovendien ontbreekt de promotor die het ORF voor NeoR transcribeert en derhalve zal het NeoR eiwit niet tot expressie komen. Hierdoor zijn schadelijke effecten uit te sluiten.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen: De gevolgen van genoverdracht kunnen groot zijn, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheer bereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p>II Waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen De waarschijnlijkheid dat overdracht van de ABCA4 sequentie of het NeoR ORF op andere soorten kan plaatsvinden is verwaarloosbaar klein.</p> <p>III Het risico Het risico van genoverdracht is verwaarloosbaar klein.</p>



D. Effecten op doel en niet-doel populaties		
<p>Effecten op de patiënten die aan de studie deelnemen (doelpopulatie) vallen niet onder het toetsingskader van de milieuregelgeving en worden om die reden hier niet direct in beschouwing genomen. De effecten op de patiënt vallen onder de medische verantwoordelijkheid van de behandelend arts.</p> <p>Effecten op niet-doelpopulaties zullen alleen op kunnen treden indien er sprake is van verspreiding van het GGO in de omgeving van de patiënt. Een aantal aspecten betreffende pathogene effecten is al in beschouwing genomen onder A.</p> <p>In dit onderdeel worden de eventuele effecten van het GGO beoordeeld op mensen in de omgeving van de patiënt. Bij de beoordeling moet rekening worden gehouden met de te verwachten blootstellingsweg en mate van blootstelling.</p> <p>De vraag is welke effecten de ABCA4 en/of de NeoR sequentie kunnen hebben in de niet-doelpopulaties. Met effecten worden alle mogelijke (schadelijke en niet-schadelijke, zoals onder andere toxische en allergene) effecten bedoeld met uitzondering van gezondheidseffecten. Gezondheidseffecten worden onder onderdeel E besproken.</p> <p>Hiervoor moet worden nagegaan wat er bekend is over de effecten die ABCA4 en NeoR kunnen hebben op de mens en op dieren.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt De mogelijke schadelijke effecten zijn reeds beschreven in onderdeel A van deze tabel. De getransduceerde fotoreceptorcellen in het oog zullen het correcte ABCA4 tot expressie brengen. Hierdoor wordt de pathofysiologie die leidt tot Stargardt maculaire degeneratie gestopt of zelfs teruggedraaid. Er zijn geen fysiologische of pathogene effecten geobserveerd in preklinische studies waarbij ABCA4 tot expressie werd gebracht in cellen en/of weefsels waar dat normaliter niet het geval is zoals retinale pigment epitheelcellen. Ook is geen cytotoxiciteit waargenomen in <i>in vitro</i> studies met onder andere humane retinale epitheelcellen die getransduceerd werden met de ABCA4 EIAV lentivirale vector. Er is geen promotor aanwezig die het ORF voor NeoR transcribeert, en ook de polyadenylatie sequentie ontbreekt. De getransduceerde fotoreceptorcellen in het oog zullen derhalve het NeoR eiwit niet tot expressie brengen. Hierdoor zijn schadelijke effecten uit te sluiten.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect In onderdeel A van deze tabel is beschreven dat de kans dat derden geïnfecteerd raken met de viruspartikels en dat daardoor een schadelijk effect kan optreden verwaarloosbaar klein is.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen: De gevolgen op doel en niet-doel populaties kunnen groot zijn, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheer bereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid: De waarschijnlijkheid dat expressie van ABCA4 of aanwezigheid van het NeoR ORF leiden tot het optreden van (schadelijke) effecten op doel en niet-doel populaties is verwaarloosbaar klein.</p> <p>III. Het risico: De kans op het optreden van (schadelijke) effecten en de mogelijke gevolgen voor het milieu zijn verwaarloosbaar klein.</p>
E. Mogelijke effecten op menselijke gezondheid		
<p>Aspecten gerelateerd aan de pathogeniteit van het GGO zijn reeds aan de orde geweest in onderdeel A. Daar werd de vraag gesteld of expressie van de ABCA4 sequentie of aanwezigheid van het NeoR ORF door het GGO leidt tot verandering in weefseltropisme, gastheerbereik en in de mate van infectiviteit en virulentie van de virale vector in vergelijking met wildtype EIAV.</p> <p>Aspecten gerelateerd aan toxiciteit of allergeniteit en andere gezondheidsgerelateerde effecten zijn onder D behandeld. Daarbij worden de eventuele toxische en allergene effecten van het GGO beoordeeld op mensen in de omgeving van de patiënt. Elementen die daarbij in beschouwing genomen moeten worden zijn toxiciteit of andere schadelijke effecten zoals een effect van het GGO op het immuunsysteem en allergeniteit van het genproduct. Bij de beoordeling moet</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt De mogelijke schadelijke effecten zijn reeds beschreven in onderdeel A van deze tabel.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect In onderdeel A van deze tabel is beschreven dat de kans dat derden geïnfecteerd raken met de viruspartikels en dat daardoor een schadelijk effect kan optreden verwaarloosbaar klein is.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen: De gevolgen op doel en niet-doel populaties kunnen groot zijn, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt in de normale gastheer of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheer bereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid: De waarschijnlijkheid dat expressie van ABCA4 of aanwezigheid van het NeoR ORF leiden tot het optreden van (schadelijke) effecten op menselijke gezondheid is verwaarloosbaar klein.</p> <p>III. Het risico: De kans op het optreden van (schadelijke) effecten en de mogelijke gevolgen voor het milieu zijn verwaarloosbaar klein.</p>



<p>rekening worden gehouden met de te verwachten blootstellingsweg en mate van blootstelling.</p> <p>De vraag is welke effecten de ABCA4 en/of de NeoR sequentie kunnen hebben op de gezondheid van de mens. De mogelijke effecten anders dan op de menselijke gezondheid zijn reeds geïdentificeerd onder onderdeel D van deze tabel.</p> <p>Hiervoor moet worden nagegaan wat er bekend is over de effecten die ABCA4 en NeoR kunnen hebben op de mens.</p>		
<p>F. Mogelijke effecten op menselijke en diergezondheid ten gevolge van consumptie</p>		
<p>Er zal uitsluitend sprake van consumptie zijn indien het een toepassing op dieren betreft en de proefdieren na afloop van het experiment voor menselijke consumptie of als diervoeder worden aangeboden. Alleen in dat geval wordt dat aspect in beschouwing genomen. Daarbij moet worden nagegaan in hoeverre consumptie van de tot expressie gebrachte genen kunnen leiden tot gezondheidsschade voor mens of dier.</p> <p>In onderhavige aanvraag is geen sprake van consumptie.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden Er is geen sprake van consumptie, gevolgen ten gevolge van consumptie worden daarom buiten beschouwing gelaten.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Het is uitgesloten dat er schadelijke effecten optreden.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen: Niet van toepassing.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid: Niet van toepassing.</p> <p>III. Het risico: Niet van toepassing.</p>
<p>G. Effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu</p>		
<p>In het algemeen wordt hieronder verstaan de negatieve effecten die GGO's kunnen hebben op (micro-) organismen die voorkomen als commensalen of die verantwoordelijk zijn voor kringlopen van nutriënten of afbraak van organisch materiaal.</p> <p>De vraag is of de expressie van de ABCA4 sequentie, of aanwezigheid van het NeoR ORF een effect heeft op andere microbiële populaties in mens, dier of het milieu. Expressie van de sequentie kan alleen plaatsvinden in levende cellen van de gastheer. Effecten in het milieu in het algemeen kunnen daarmee worden uitgesloten. Er is geen directe causale relatie te maken tussen expressie van de gastheer en micro-organismen die in of op de mens voorkomen.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt De viruspartikels blijven buiten het lichaam niet lang infectieus. Daarom is de conclusie dat er geen effecten kunnen optreden op microbiële populaties in mens, dier of milieu.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Er zijn geen potentiële effecten geïdentificeerd. De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen: Er zijn geen gevolgen te verwachten.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid: De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p> <p>III. Het risico: Het risico is verwaarloosbaar klein.</p>
<p>H. Veranderingen in de medische of veterinaire praktijk</p>		
<p>Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde, directe en indirecte milieueffecten van de veranderde medische en veterinaire praktijk ten gevolge van de toepassing van de GGO's.</p> <p>Hieronder wordt verstaan dat de toepassing van het GGO kan leiden tot een verminderd effect en afgenomen toepasbaarheid van geneesmiddelen.</p> <p>De vraag is of de expressie van de ABCA4 sequentie, of</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt In onderdeel A van deze tabel is beschreven dat de kans dat derden geïnfecteerd raken met de viruspartikels en dat daardoor een schadelijk effect kan optreden verwaarloosbaar klein is. Buiten het lichaam blijven de viruspartikels niet lang infectieus. Expressie van ABCA4, of aanwezigheid van het ORF voor NeoR, zoals dit in de aanvraag wordt beschreven zal niet leiden tot een negatief effect dat gevolgen heeft voor</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen: Er zijn geen gevolgen te verwachten.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid: De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p> <p>III. Het risico: Het risico is verwaarloosbaar klein.</p>



<p>aanwezigheid van het NeoR ORF zullen leiden tot veranderingen in de medische praktijk.</p>	<p>behandelmethode die beschikbaar zijn in de huidige medische en veterinaire praktijk. Het doel van de studies is om een nieuwe therapie te ontwikkelen tegen Stargardt maculaire degeneratie. Dit is een ernstige aandoening, waarbij het merendeel van de patiënten uiteindelijk blind of ernstig visueel beperkt wordt. Momenteel is er geen effectieve behandeling tegen deze aandoening. Hier zijn geen nadelige gevolgen voor mens of milieu aan verbonden.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</p> <p>Er zijn geen potentiële (schadelijke) effecten geïdentificeerd op de medische of veterinaire praktijk. De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p>	
---	--	--



DEEL 3. BEPALING VAN HET ALGEGHELE RISICO VAN HET GGO

Hieronder wordt de milieurisicobeoordeling uitgevoerd van de voorgestelde lentivirale vector welke resulteert in het tot expressie brengen van ABCA4. Potentieel significante risico's zijn die risico's waarvan niet is vastgesteld dat deze risico's geen significante effecten hebben.

Schatting van het risico dat aan de toepassing van alle ingebrachte sequenties is verbonden	Strategieën voor risicobeheer bij de doelbewuste introductie van de GGO's <i>(Eventuele aanvulling op strategieën die reeds zijn opgenomen in de aanvraag)</i>	Bepaling van het algehele risico van het GGO
<p>Zowel voor de gebruikte lentivirale vector als voor de hierin gekloneerde ABCA4 en NeoR sequenties is geconcludeerd dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn. Deze lentivirale partikels kunnen in derden terechtkomen. De kans hierop en het ontstaan van schadelijke effecten hiervan zullen echter ook dan verwaarloosbaar klein zijn.</p>	<p>Aangezien er geen risico's zijn geconstateerd die groter worden geschat dan verwaarloosbaar klein, is risicomanagement uit het oogpunt van milieuveiligheid niet noodzakelijk.</p> <p>Om de kans op het optreden van mogelijke schadelijke effecten in derden te minimaliseren, moet voorkomen worden dat derden wordt blootgesteld aan het GGO. Om de kans op blootstelling van derden te verkleinen moet verspreiding vanuit de patiënt teruggedrongen worden. Hiertoe worden door de aanvrager de volgende maatregelen genomen.</p> <ol style="list-style-type: none">1. Het oog waarin SAR422459 geïnjecteerd is zal gedurende de eerste dag na toediening worden afgedekt volgens de in de aanvraag omschreven procedures2. Al het materiaal dat in aanraking is geweest met SAR422459 wordt afgevoerd volgens de in de aanvraag omschreven procedures.	<p>Onder toepassing van de in de studie toegepaste strategieën voor risicobeheer is het algehele risico van het GGO verwaarloosbaar klein.</p>