

> Retouradres: RIVM/VSP/BGGO, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven.

**Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal**
Directie Veiligheid en
Risico's

RIVM/VSP/Bureau GGO
Antonie van
Leeuwenhoeklaan 9
Postbus 1
3720 BA Bilthoven
www.ggo-
vergunningverlening.nl

Contactpersoon
Bureau GGO

T 030 274 2793
F 030 274 4401
bggo@rivm.nl

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1

Uw kenmerk

Beschikking GGO IM-MV 16-002_000

1. AANLEIDING¹

1.1 De Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu (hierna: de Staatssecretaris) heeft op 25 februari 2016 een aanvraag, gedateerd 22 februari 2016, van het Academisch Ziekenhuis Leiden, te Leiden ontvangen. Deze aanvraag heeft het kenmerk IM-MV 16-002.

1.2 Het gaat om een aanvraag om een vergunning voor doelbewuste introductie voor overige doeleinden, als bedoeld in artikel 3.7, eerste lid, van het Besluit genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013 (hierna: Besluit ggo). De aanvraag heeft betrekking op een fase 1 klinische studie in patiënten met gewrichtsreuma. Gewrichtsreuma (reumatoïde artritis) is een veelvoorkomende auto-immuunziekte waarbij de gewrichten ontstoken zijn. Het afweersysteem valt de gewrichten van het eigen lichaam aan. Na verloop van tijd leidt dit tot onomkeerbare schade aan de gewrichten.

1.3 In deze studie wordt gebruik gemaakt van een replicatiedeficiënt genetisch gemodificeerd Adenovirus-geassocieerd virus (rAAV), waarin een sequentie is ingebracht die codeert voor het humane interferon- β (IFN- β) eiwit. De virale vector, ART-I02, is door verwijdering van een aantal virale genen replicatiedeficiënt gemaakt, waardoor het virus zich in de cel niet kan vermenigvuldigen. ART-I02 is ontworpen om het IFN- β gen aan fibroblast-achtige synoviocyten in gewrichten van patiënten met gewrichtsreuma te verstrekken, waardoor ontstekings-geïnduceerde expressie van IFN- β wordt bewerkstelligd. De verwachting is dat dit resulteert in afname van de pijn en zwelling en verbeterde gewrichtsfunctie. Het doel van de fase 1 klinische studie is om de veiligheid van de toediening van ART-I02 te evalueren voor de behandeling van gewrichtsreuma.

1.4 De voorgenomen werkzaamheden zullen plaatsvinden in de gemeente Leiden.

¹ Voor definities van gebruikte begrippen zie ook artikel 1 van de vergunning.

2. BEOORDELINGSKADER

2.1 Een studie waarbij genterapie wordt toegepast in proefpersonen valt onder de doelbewuste introductie voor overige doeleinden.

Wettelijk kader

2.2 Het wettelijk beoordelingskader voor aanvragen om een vergunning voor doelbewuste introductie voor overige doeleinden bestaat uit paragraaf 9.2.2 van de Wet milieubeheer en hoofdstuk 3 van het Besluit ggo.

2.3 Uit artikel 3.2, eerste lid, van het Besluit ggo volgt de bevoegdheid om te beslissen op aanvragen om een vergunning als bedoeld in dat artikel voor de doelbewuste introductie voor overige doeleinden.

2.4 Een vergunning voor de doelbewuste introductie voor overige doeleinden kan slechts om een beperkt aantal redenen worden geweigerd (zie artikel 9.2.2.3, tweede lid, van de Wet milieubeheer). Het belang van de bescherming van de gezondheid van de mens en van het milieu is in dit geval het enige, rechtstreeks bij deze beschikking betrokken belang dat kan worden meegewogen. Voorschriften en beperkingen mogen slechts in het belang van de bescherming van de gezondheid van de mens en van het milieu aan de vergunning worden verbonden (zie artikel 9.2.2.3, vijfde lid, van de Wet milieubeheer).

3. PROCEDURELE ASPECTEN

3.1 De aanvraag moet onder meer een milieurisicobeoordeling bevatten overeenkomstig bijlage II bij richtlijn nr. 2001/18/EG van het Europees Parlement en de Raad van de Europese Unie van 12 maart 2001 inzake de doelbewuste introductie van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu en tot intrekking van richtlijn nr. 90/220/EEG van de Raad van de Europese Gemeenschappen van 23 april 1990 (PbEU L 106) (hierna: richtlijn 2001/18), zoals aangevuld met daarop betrekking hebbende besluiten of aanbevelingen van de Raad van de Europese Unie of van de Europese Commissie. Zie ook de definitie van "milieurisicobeoordeling" in artikel 1.5 van het Besluit ggo.

3.2 De aanvraag is getoetst aan de milieurisicobeoordeling over de risico's voor mens en milieu die aan de voorgenomen handelingen met ggo's verbonden kunnen zijn.

3.3 De aanvraag is aangevuld. De aanvulling is ontvangen op 13 april 2016.

3.4 De aanvraag, inclusief de aanvullende informatie, is gecontroleerd op volledigheid. Deze beschikking is gebaseerd op een volledige aanvraag.

3.5 Een deel van de bijlagen bij de aanvraag is door de aanvrager als vertrouwelijk gekenmerkt. Op grond van Artikel 19.3 van de Wet milieubeheer heeft de Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu ingestemd met het verzoek van de aanvrager om deze bijlagen vertrouwelijk te behandelen. Bij de aanvraag heeft de aanvrager al een openbare samenvatting van deze vertrouwelijke informatie geleverd waaruit de risicoanalyse navolgbaar is.

**Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal**
Directie Veiligheid en
Risico's

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1

3.6 Deze beschikking is voorbereid met toepassing van afdeling 3.4 van de Algemene wet bestuursrecht, afdeling 13.2 van de Wet milieubeheer, en de paragrafen 3.2.1 en 3.2.2 van het Besluit ggo. De toepassing van afdeling 3.4 van de Algemene wet bestuursrecht en afdeling 13.2 van de Wet milieubeheer is in overeenstemming met artikel 9.2.2.3, vierde lid, van de Wet milieubeheer.

3.7 Bij de voorbereiding van deze beschikking is ook toepassing gegeven aan artikel 3.10, eerste lid, van het Besluit ggo. Ingevolge deze bepaling wordt binnen 30 dagen na ontvangst van de aanvraag een samenvatting van de aanvraag aan de Europese Commissie gezonden. Bij de beslissing op de aanvraag neemt de Staatssecretaris in aanmerking de opmerkingen die andere lidstaten van de Europese Unie hebben gemaakt (artikel 3.10, tweede lid, tweede volzin, van het Besluit ggo).

Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal
Directie Veiligheid en
Risico's

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1

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

4.1. Het uitgangsgenoom (AAV)

Algemeen:

De virale vector die in deze studie wordt gebruikt is afgeleid van een humaan *Adeno-associated Virus* subtype 2 (AAV-2). AAV behoort tot de familie *Parvoviridae*, genus *Dependovirus*, en is een enkelstrengs DNA virus zonder envelop. Het *Adeno-associated Virus* (AAV) is afhankelijk van een helpervirus voor replicatie. Van *Adenovirus* en *Herpes simplex virus* (HSV) is bekend dat zij voor AAV als helpervirus kunnen optreden. Het wildtype AAV virus bezit een tweetal genen, *rep* en *cap*, die verantwoordelijk zijn voor de replicatie en voor de vorming van het manteleiwit van het virus. De *rep* en *cap* genen zijn omgeven door twee zogenaamde *Inverted Terminal Repeats* (ITR's). Deze ITR's zijn nodig voor het inpakken van het genetisch materiaal in de virusmantel en de integratie in het gastheergenoom. De ITR's hebben ook een functie bij replicatie van AAV. Het helpervirus zorgt ervoor dat de geïnfecteerde cel in een zodanige fysiologische staat wordt gebracht dat vermenigvuldiging van AAV mogelijk wordt.

Infecties met AAV komen bij mensen veelvuldig voor. Ruim 90% van de volwassen mensen is seropositief voor AAV. Infecties met AAV worden niet in verband gebracht met een ziektebeeld. Er zijn verschillende serotypen van AAV bekend welke onder andere verschillen in gastheerspecificiteit en weefseltropisme. Omdat een infectie met AAV niet in verband gebracht wordt met enig ziektebeeld, wordt AAV gezien als een zeer geschikt uitgangsvirus voor vectoren voor genterapie.

Infectie, replicatie en uitscheiding

De meest waarschijnlijke infectieroutes van AAV verlopen via de luchtwegen, via de fecaal-orale route of via de ogen. Verticale overdracht van AAV (kiembaantransmissie) is niet aangetoond in preklinische studies of in de literatuur beschreven. AAV-2 kenmerkt zich door een breed celtropisme (spieren, hersenen, longen, lever). Daarnaast wordt AAV gekenmerkt door een hoge stabiliteit buiten de gastheer. AAV kan integreren in het genoom van de gastheercel en kan daar latent aanwezig blijven. Latent wildtype AAV-2 kan bij aanwezigheid van een helpervirus gereactiveerd worden. De genetisch gemodificeerde vector is replicatiedeficiënt ten gevolge van de ontbrekende *rep* en *cap* genen. De vector kan cellen wel infecteren en met lage frequentie in het genoom integreren.

4.2. De modificaties (IFN- β)

De insertie bestaat uit een expressiecassette met daarin de sequentie coderend voor het humane interferon- β (IFN- β) eiwit. Het IFN- β eiwit is een cytokine. Het eiwit wordt door cellen uitgescheiden en speelt een rol in het afweersysteem. Het eiwit heeft een antivirale werking.

4.3. Het ggo

Constructie

Voor de constructie van het GGO is een AAV serotype 2 uitgangsvector gebruikt. Deze uitgangsvector, AAV *rep/cap*, kan zich, door afwezigheid van *rep* en *cap* genen niet vermenigvuldigen. De ITR's zijn de enige AAV sequenties die nog aanwezig zijn in de uitgangsvector. Deze ITR's zijn niet-coderende sequenties die een rol spelen in de replicatie en de vorming van virusdeeltjes. Tussen deze twee ITR's is de IFN- β expressiecassette opgenomen.

De expressiecassette bevat naast de IFN- β sequentie een NF- κ B responsieve promotor en een humaan groeihormoon polyadenylatie (polyA) signaal. De NF- κ B responsieve promotor sequentie bestaat uit 6 opeenvolgende NF- κ B motieven (GGGACTTTCC) van de *Long Terminal Repeat* (LTR) afkomstig van *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) gefuseerd met een minimale humane *Cytomegalovirus* (CMV) promotor.

De NF- κ B responsieve promotor draagt zorg voor ontsteking-geïnduceerde expressie van de IFN- β sequentie. Dit betekent dat IFN- β in humane cellen specifiek tot expressie komt in ontstoken weefsels. Het humaan groeihormoon polyA signaal is nodig voor effectieve translatie van het IFN- β mRNA transcript. Al deze regulatoire sequenties worden niet vertaald in een eiwit.

De virale vector is afgeleid van een AAV serotype 2 (AAV2) vector, maar het virusdeeltje heeft capsid eiwitten afkomstig van het humane AAV serotype 5 (AAV5) virus.

Virulentie

Het GGO (ART-I02) is replicatiedeficiënt, dat wil zeggen dat het GGO niet in staat is zich zelfstandig te vermeerderen door het ontbreken van de *rep* en *cap* genen. Een virusdeeltje kan een cel slechts éénmaal infecteren. Van het IFN- β eiwit is bekend dat het een antivirale werking heeft. Deze antivirale werking kan potentieel zorgen voor verminderde replicatie van AAV. Gezien de normale functie van IFN- β in de mens zijn geen andere effecten op de AAV virusbiologie te verwachten dan een potentieel verminderde replicatie. Doordat het capsid van het virusdeeltje bestaat uit AAV5 eiwitten zal het gastheerbereik en weefsel tropisme hetzelfde zijn als voor wildtype AAV5. Door het replicatie defectieve karakter is de vector verminderd persistent in vergelijking tot het wildtype AAV.

4.4. Beschrijving van het onderzoek

Het onderzoek zal plaatsvinden in het Academisch Ziekenhuis Leiden te Leiden. In totaal zullen maximaal 50 patiënten in de studie opgenomen worden. De toediening van het GGO aan de patiënt vindt plaats in een behandelkamer in het CHDR. De 4 uren observatieperiode na de toediening vindt plaats in een algemene patiëntenkamer in het CHDR. Een enkele dosis van het GGO variërend van 1×10^{11} tot 5×10^{13} vector genomen per patiënt zal intra-articulair worden toegediend met behulp van echografie in het CHDR. Tijdens de toediening van het GGO zal de reumatoloog en ander aanwezig personeel handschoenen, een mond- en neuskapje, veiligheidsbril en wegwerpjas dragen. Gedurende de gehele procedure is de deur van de behandelkamer gesloten. De huid rondom de injectieplaats wordt voor en na de injectie schoongemaakt met 70% alcohol. Na injectie wordt de injectieplaats bedekt met verband, welke wordt verwijderd na afloop van de 4-uren observatieperiode en wordt afgevoerd als klinisch afval. Om medische redenen dienen patiënten na toediening 4 uur in het CHDR te verblijven.

4.5. Productie, vervoer, bemonstering en afvalbehandeling

Productie en vervoer

De productie van het GGO vindt plaats in de Verenigde Staten en het *fill and finish* proces wordt uitgevoerd door het bedrijf Halix B.V. Dit maakt geen onderdeel uit van de onderhavige aanvraag.

Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal
Directie Veiligheid en
Risico's

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1

Het GGO wordt geproduceerd in HEK293T/17 cellen, een humane embryonale niercellijn, met behulp van twee verschillende plasmiden, pART-I02 en pDP5-Kan3. Het plasmide pART-I02 bevat het AAV vector genoom bestaande uit de expressiecassette met daarin het transgen. De expressiecassette wordt geflankeerd door twee van AAV2 afkomstige ITRs. Het plasmide pDP5-Kan3 bevat het AAV2 *rep* gen, het AAV5 *cap* gen en de van adenovirus type 5 afkomstige helpersequenties E2A, E4 en VA. Expressie van de Rep en Cap eiwitten door de cellen resulteert in replicatie en packaging in nieuw gevormde capside partikels van het vector genoom. Het resultaat van dit proces is een recombinant en volledig replicatiedeficiënt ART-I02 partikel dat alleen de transgen expressiecassette bevat geflankeerd door de twee ITRs.

De gebruikte HEK293T/17 cellen worden geproduceerd volgens internationale ICH (*International Conference on Harmonisation*) en Ph. Eur. (*European Pharmacopeia*) richtlijnen. Productcontrole en vrijgiftetesten vinden plaats gedurende verschillende stadia van het productieproces. De gezuiverde virusdeeltjes zijn gecontroleerd door te testen op onder andere zuiverheid, biologische activiteit en identiteit.

Na productie wordt het GGO getransporteerd naar de ziekenhuisapotheek van het LUMC. Hier wordt het GGO in ontvangst genomen en opgeslagen in de GMP faciliteit van het LUMC conform het gestelde in de Regeling ggo. In de GMP faciliteit van het LUMC wordt de injectiespuit met het GGO in een bioveiligheidskabinet van klasse 2 gereed gemaakt voor toediening. Tijdens de preparatie van het GGO in het LUMC zullen ML-II werkvoorschriften gehanteerd worden conform de Regeling ggo en draagt het personeel beschermende kleding en handschoenen. Na preparatie van de injectiespuit met het GGO in het LUMC wordt deze getransporteerd naar de behandelkamer in het CHDR conform de *ADR classification UN3373 and shipping instructions*.

Monsternamen en -analyse

Na toediening van het GGO zullen biopten, bloed-, speeksel-, urine-, feces-, en spermamonsters worden afgenomen in het CHDR en zullen biopten worden afgenomen in het LUMC. Afname van bloed-, speeksel-, urine-, feces-, en spermamonsters in het CHDR zal plaatsvinden conform de richtlijn "Werkgroep Infectie Preventie: persoonlijke hygiëne medewerkers en persoonlijke hygiëne patiënt en bezoeker". Het personeel draagt handschoenen en een wegwerplaboratoriumjas. Afname van biopten in het CHDR en LUMC vindt plaats in een behandelkamer. Medisch personeel draagt handschoenen, een mond- en neuskapje, veiligheidsbril en wegwerpjas. Gedurende de gehele procedure is de deur van de behandelkamer gesloten. De huid rondom de bioptieplaats wordt vóór en na de monsterafname schoongemaakt met 70% alcohol. Na monsterafname wordt de bioptieplaats bedekt met verband, welke wordt afgevoerd als klinisch afval.

Monsters zullen worden getransporteerd conform geldende transportrichtlijnen. Het transport en de opslag van de monsters binnen het CHDR en het LUMC zullen plaatsvinden conform het gestelde in de Regeling ggo. Bewerking van de monsters in het CHDR zal plaatsvinden conform de richtlijn "Werkgroep Infectie Preventie: microbiologische veiligheid in diagnostische laboratoria. Het personeel draagt handschoenen en een wegwerplaboratoriumjas. Analyse van de monsters in het LUMC zal plaatsvinden in de normale diagnostische laboratoria. Analyse van bloed- en urinemonsters zal uitgevoerd worden met behulp van geautomatiseerde analyseapparatuur voor hematologische en biochemische parameters.

Gebaseerd op de resultaten uit dierstudies wordt verwacht dat bloed-, speeksel-, urine-, feces- en spermamonsters genomen tot enkele weken na toediening van het GGO aan de proefpersoon vector DNA zullen bevatten en dat alleen bloedmonsters genomen tot 72 uur na toediening van het GGO aan de proefpersoon infectieuze partikels zullen bevatten.

Afval en besmet materiaal

Al het afval dat (mogelijk) besmet is, wordt afgevoerd als klinisch afval en verbrand. De

**Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal**
Directie Veiligheid en
Risico's

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1

vloer van de ruimte waarin het GGO wordt toegediend in het CDHR en de ruimten waarin de monsters worden afgenomen in het CHDR en LUMC zullen worden gedesinfecteerd met een 1000 ppm chlooroplossing. Besmettingen in het CHDR en LUMC zullen worden gedesinfecteerd met een 1000 ppm chlooroplossing. Alle materialen gebruikt gedurende de schoonmaak zullen worden afgevoerd als klinisch afval.

**Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal**
Directie Veiligheid en
Risico's

4.6. Interactie met het milieu

Het GGO dat in deze studie aan de proefpersonen toegediend wordt is gebaseerd op een AAV vector. Op basis van experimenten in proefdieren en klinische studies met vergelijkbare vectoren, wordt verwacht dat het GGO niet of in het ergste geval (in aanwezigheid van een helpervirus) tijdelijk kan repliceren in mensen. In afwezigheid van helpervirussen komen vrijwel geen infectieuze vectordeeltjes vrij. In aanwezigheid van een helpervirus kunnen kleine hoeveelheden virusdeeltjes vrijkomen, deze hoeveelheden zijn vele malen kleiner dan de hoeveelheden die bij de behandeling van de patiënt worden toegediend. Verspreiding in het milieu kan voornamelijk plaatsvinden ten gevolge van lekkage van de vector uit de injectieplaats kort nadat het GGO aan de patiënten is toegediend. Hierdoor kunnen derden blootgesteld worden aan het GGO en kan een infectie van derden niet worden uitgesloten. De hoeveelheid vrijgekomen vectordeeltjes zal echter vele malen kleiner zijn dan de hoeveelheden die tijdens de behandeling aan de patiënt worden toegediend. Aangezien het GGO niet in staat is tot replicatie zal een eventuele infectie uitdoven.

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1

5. MILIEURISICOBEOORDELING

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

De milieurisicobeoordeling is uitgevoerd voor de in de aanvraag beschreven werkzaamheden.

5.1. Algemeen

Van het GGO dat in het milieu gebracht zal worden geeft de aanvrager op basis van resultaten uit diermodellen en vergelijkbare klinische studies in mensen aan, dat de therapie naar verwachting zal leiden tot een kortdurende aanwezigheid van vectordeeltjes in de patiënt.

In de milieurisicoanalyse wordt beoordeeld of en hoe derden blootgesteld kunnen worden aan het GGO, en of vervolgens infectie van derden met het GGO op kan treden. Daarnaast wordt ook in beschouwing genomen welke schadelijke effecten op kunnen treden als derden geïnfecteerd raken met het GGO. Bij de beoordeling wordt uitgegaan van het feit dat de uitgangsvector AAV beschouwd kan worden als een niet-pathogeen virus.

5.2. Het GGO

Persistentie, invasiviteit en selectieve voordelen

In de virale vector ART-I02 zijn de *rep* en *cap* genen verwijderd die essentieel zijn voor replicatie van het virus. Deze deleties leiden niet tot een schadelijk effect zoals een verhoogde persistentie of invasiviteit. Integendeel, ze leiden tot een verlaagde persistentie en invasiviteit aangezien de virale vector vanwege deze deleties replicatiedeficiënt is. Er zijn, mede gezien de normale functie van het IFN- β eiwit in de mens, geen redenen om aan te nemen dat IFN- β effecten heeft op de virusbiologie van AAV anders dan een potentieel verminderde replicatie. Expressie van IFN- β door de virale vector kan niet leiden tot vorming van nieuwe virusdeeltjes. Doordat het capsid

van het virusdeeltje bestaat uit AAV5 eiwitten zal het gastheerbereik en weefsel tropisme hetzelfde zijn als voor wildtype AAV5. Uit preklinische studies blijkt dat de biodistributie en persistentie van het GGO vergelijkbaar zijn met andere AAV vectoren.

Recombinante AAV virusdeeltjes

Recombinatie tijdens de productie van de virale vector kan leiden tot replicatiecompetente AAV virusdeeltjes (rcAAV). De AAV vector heeft echter een beperkte packaging capaciteit. Met een bio-assay wordt de aanwezigheid van rcAAV in de batch getest. Na incubatie van HeLa cellen met een monster van de batch in aanwezigheid van wildtype adenovirus worden de monsters geanalyseerd voor de aanwezigheid van AAV DNA met behulp van qPCR. De gevoeligheid van de bio-assay is 10 rcAAV virusdeeltjes per 4×10^{10} ART-I02 vector genoom kopieën. Een batch wordt verworpen indien rcAAV gedetecteerd wordt.

Tijdens de productie van de virusbatch kunnen gastheercelsequenties van de productiecellen en productiesysteem gerelateerde sequenties (bijvoorbeeld rep, kanamycine DNA) terechtkomen in replicatiedeficiënte AAV virusdeeltjes. Dit is een bekend fenomeen voor recombinante AAV vectoren die in andere klinische studies worden toegepast. Om de aanwezigheid van dergelijke niet-vector gerelateerde sequenties te detecteren wordt de virusbatch gecontroleerd met qPCR assays specifiek voor deze sequenties. De aanwezigheid van virusdeeltjes met niet-vector gerelateerde sequenties in de batch is 100 keer lager dan de ART-I02 virusdeeltjes.

Genoverdracht

Na toediening van het GGO kan in aanwezigheid van wildtype AAV complementatie van *rep* en *cap* genen optreden en kan replicatie van de vector mogelijk plaatsvinden. Uiteraard is ook dan, evenals voor replicatie van wildtype AAV, de aanwezigheid (co-infectie van dezelfde cel) van helpervirussen, namelijk adenovirus of herpesvirus, essentieel. Indien het GGO in een cel al in contact komt met helpervirussen én wildtype AAV, dan zal deze repliceren en vervolgens een andere cel kunnen infecteren. In deze nieuw geïnfecteerde cel zal alleen replicatie op kunnen treden als aan dezelfde voorwaarden wordt voldaan. Deze tijdelijke replicatie zal in afwezigheid van het helpervirus ophouden waardoor eventuele verspreiding van het virus hierdoor uiteindelijk zal uitdoven.

Daarnaast is er een theoretische kans dat in de patiënt door recombinatie rcAAV ontstaan met daarin sequenties van een helpervirus. Recombinatie tussen de vector en wildtype AAV zal alleen resulteren in uitwisseling van homologe sequenties zoals de ITRs. Hierdoor kunnen de *rep* en *cap* genen van het wildtype AAV uitgewisseld worden met de IFN- β expressiecassette van het GGO. De ontstane virusdeeltjes bevatten de IFN- β expressiecassette, maar zullen door de afwezigheid van de *rep* en *cap* genen nog steeds replicatiedeficiënt zijn.

Verticale transmissie

Er zijn geen redenen om aan te nemen dat transmissie van het genetisch materiaal via de kiembaan (verticale transmissie) plaats zal vinden.

5.3. Mogelijk schadelijke effecten van het GGO en de evaluatie van de mogelijke gevolgen van deze effecten

Onbedoelde blootstelling van derden aan het GGO kan resulteren in expressie van het normale humane IFN- β eiwit en inductie van een immuunrespons tegen de ART-I02 capsid eiwitten. Het IFN- β eiwit zal alleen tot expressie worden gebracht tijdens ontstekingen. Uit preklinische *in vitro* en *in vivo* studies blijkt dat expressie van IFN- β resulteert in een immuunmodulerend effect. Er werden geen toxische effecten gezien door injectie van ratten en apen met ART-I02. Verder werden er geen ernstige bijwerkingen waargenomen in klinische studies met patiënten met gewrichtsreuma

**Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal**
Directie Veiligheid en
Risico's

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1

welke herhaaldelijke doses met IFN- β eiwit kregen. Bovendien is recombinant IFN- β geregistreerd als behandeling voor multiple sclerose (MS). Veelvoorkomende bijwerkingen van systemische IFN- β therapie zijn griepachtige symptomen en injectieplaats reacties. Een afweerreactie tegen AAV5 capside eiwitten zal asymptomatisch zijn, op dezelfde manier als dat een natuurlijk voorkomende infectie met AAV een asymptomatische afweerreactie induceert. Het GGO heeft een brede biodistributie en het is aannemelijk dat shedding zal optreden. Echter, de concentraties van het GGO die in het milieu terecht zullen komen zullen vele malen lager zijn dan de toegediende dosis.

Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal
Directie Veiligheid en
Risico's

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1

5.4. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijk effect

Uit eerdere preklinische studies blijkt dat er geen schadelijke effecten van het GGO zijn waargenomen in diverse diersystemen. Het GGO is replicatiedeficiënt en AAV is niet pathogeen. Na toediening zal het GGO slechts gedurende korte tijd in het milieu terecht kunnen komen door shedding. In een fase 1/2 klinische studie werden AAV5 vectoren (5×10^{11} tot 1.8×10^{13} genoomkopieën/kg) via een enkele intraveneuze infusie toegediend. Vector DNA was niet meer detecteerbaar in alle geteste samples (serum, speeksel, nasale secreties, urine en feces) 4 weken na toediening. Preklinische studies met recombinant AAV laten zien dat urine geen infectieuze AAV partikels bevat en dat infectieuze vectordeeltjes beperkt zijn tot het plasma en verwijderd zijn uit de circulatie binnen 48 tot 72 uur na toediening.

Doordat het GGO replicatiedeficiënt is, zal deze een beperkte tijd in het lichaam aanwezig blijven. Het GGO heeft een brede biodistributie en het is aannemelijk dat shedding zal optreden. Echter, de concentraties van het GGO die in het milieu terecht zullen komen zullen vele malen lager zijn dan de toegediende dosis. Doordat de hoeveelheid van het GGO in derden vele malen kleiner zal zijn dan in patiënten, is de kans op negatieve effecten verkleind ten opzichte van de situatie in patiënten. De kans op verdere verspreiding van het GGO naar derden is verwaarloosbaar klein aangezien het GGO replicatiedeficiënt is. Patiënten die behandeld zijn met het GGO worden uitgesloten van het doneren van bloed, organen, weefsels en cellen voor transplantatie.

Ook voor de aanwezigheid van replicatiedeficiënte virusdeeltjes met niet-vector gerelateerde sequenties geldt dat deze slechts een beperkte tijd in de patiënt aanwezig blijven en tijdelijk kunnen worden uitgescheiden in het milieu. In het onwaarschijnlijke geval dat derden worden blootgesteld aan AAV virusdeeltjes met niet-vector gerelateerde sequenties, zoals het *rep* gen, kanamycine DNA of gastheercel DNA, zijn er geen nadelige effecten te verwachten omdat *rep* sequenties van nature in AAV virusdeeltjes voorkomen. Wildtype AAV heeft geen pathogene eigenschappen. Daarnaast betreft het hier, gezien de uitkomst van de test op rAAV, replicatiedeficiënte virusdeeltjes. Van de volwassen humane populatie is 90% seropositief voor AAV waardoor AAV virusdeeltjes met bijvoorbeeld een *rep* gen door het afweersysteem herkend en afgebroken worden. In het onwaarschijnlijk geval dat een eventuele infectie van derden optreedt zal dit een uitdovend effect zijn. De kans op nadelige effecten in derden van recombinante AAV virusdeeltjes met niet-vector gerelateerde sequenties is daarom verwaarloosbaar klein.

In de patiënt is er een mogelijkheid dat nieuwe virusdeeltjes gevormd worden als gevolg van complementatie of recombinatie van het GGO met AAV *rep* en *cap* genen. Hiertoe is het noodzakelijk dat in dezelfde cel het GGO én wildtype AAV én een helpervirus, zoals *adenovirus*, *herpes simplex virus*, *pseudorabies virus* of *humana papilloma virus*, aanwezig zijn. Aan het ontstaan van nieuwe virusdeeltjes als gevolg van complementatie of recombinatie met AAV *rep* en *cap* genen in de patiënt zijn geen schadelijke effecten verbonden. De mogelijk ontstane virusdeeltjes bij complementatie zijn qua eigenschappen identiek aan het GGO en zullen door de afwezigheid van de *rep* en *cap* genen nog steeds replicatiedeficiënt zijn. Virusdeeltjes die als gevolg van recombinatie de *rep* en *cap* bezitten zullen identiek zijn aan wildtype AAV. De

waarschijnlijkheid van het ontstaan van dergelijke virusdeeltjes waaraan geen schadelijke effecten verbonden zijn is daarbij ook zeer onwaarschijnlijk omdat daarvoor het GGO én wildtype AAV én een helpervirus tegelijkertijd in een cel aanwezig moeten zijn.

Het GGO is replicatiedeficiënt en AAV is niet pathogeen. Na toediening zal het GGO slechts gedurende korte tijd in het milieu terecht kunnen komen door shedding. Doordat de virale vector replicatiedeficiënt is, zal deze voor een beperkte tijd in het lichaam aanwezig blijven. De waarschijnlijkheid dat derden geïnfecteerd worden met in de patiënt ontstane recombinante virussen met veranderde eigenschappen is verwaarloosbaar klein. Daarbij zijn in eerdere studies geen nadelige effecten van het GGO beschreven.

**Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal**
Directie Veiligheid en
Risico's

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1

5.5. Schatting van het risico van het GGO

In de bovenstaande overwegingen wordt geconcludeerd dat voor de gebruikte virale vector ART-I02 de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn. De te gebruiken virale vector is replicatiedeficiënt en zal daardoor tijdelijk vanuit de patiënt in het milieu terecht kunnen komen. AAV infecties komen veelvuldig voor, over de hele wereld, zonder dat daarmee enig ziektebeeld in verband wordt gebracht. Zowel voor de gebruikte AAV vector als voor de hierin gekloneerde IFN- β sequentie is geconcludeerd dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn. De kans dat recombinatie en/of complementatie optreedt met andere virussen waardoor infectieuze recombinante virussen ontstaan is zeer klein. De kans dat dit leidt tot schadelijke gevolgen in derden is verwaarloosbaar klein.

5.6. Maatregelen voor risicobeheer

Het optreden van AAV kiembaantransmissie is niet aangetoond in preklinische studies en ook niet in de literatuur beschreven. Om de theoretische kans op kiembaantransmissie helemaal uit te sluiten geeft de aanvrager aan dat het volgende inclusiecriteria gehanteerd wordt: "patiënten dienen effectieve anticonceptie in combinatie met een barrièremiddel in acht te nemen gedurende de eerste drie maanden na behandeling of totdat drie opeenvolgende spermamonsters negatief zijn".

6. CONCLUSIES VAN MOGELIJKE MILIEUEFFECTEN VAN DE INTRODUCTIE

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

1. Waarschijnlijkheid dat het ggo in natuurlijke habitats persistent en invasief wordt onder omstandigheden van de voorgestelde introductie

In de genetisch gemodificeerde AAV vector zijn de *rep* en *cap* genen verwijderd waardoor de vector replicatiedeficiënt is. AAV infecties komen veelvuldig voor, over de hele wereld, zonder dat daarmee enig ziektebeeld in verband wordt gebracht. Door de deleties van de *rep* en *cap* genen is de vector verminderd persistent en invasief ten opzichte van wildtype AAV. Complementatie van de afwezige virale functies is alleen mogelijk als een cel het GGO bevat en tegelijkertijd ook geïnfecteerd is met wildtype AAV én een helpervirus. De mogelijk ontstane virusdeeltjes bij complementatie zijn qua eigenschappen identiek aan het GGO en zullen door de afwezigheid van de *rep* en *cap* genen nog steeds replicatiedeficiënt zijn. Het IFN- β eiwit heeft geen effecten op de virusbiologie van AAV anders dan een potentieel verminderde replicatie en op het replicatiedeficiënte karakter van het GGO. Derhalve is de kans verwaarloosbaar klein dat het GGO in natuurlijke

habitats persistent en invasief wordt onder omstandigheden van de voorgestelde introductie in het milieu.

2. Selectieve voordelen of nadelen die op het ggo zijn overgedragen en de waarschijnlijkheid dat zulks geschiedt onder de omstandigheden van de voorgestelde introductie

Door de deleties van de *rep* en *cap* genen is de genetisch gemodificeerde AAV vector replicatiedeficiënt. Hierdoor heeft de vector geen selectieve voordelen ten opzichte van wildtype AAV. Infecties met AAV worden niet in verband gebracht met een ziektebeeld. Complementatie van de afwezige virale functies is alleen mogelijk als een cel het GGO bevat en tegelijkertijd ook geïnfecteerd is met wildtype AAV én een helpervirus. De mogelijk ontstane virusdeeltjes bij complementatie zijn qua eigenschappen identiek aan het GGO en zullen door de afwezigheid van de *rep* en *cap* genen nog steeds replicatiedeficiënt zijn. Het IFN- β eiwit heeft geen effecten op de virusbiologie van AAV anders dan een potentieel verminderde replicatie en het eiwit maakt geen onderdeel uit van het virusdeeltje. Het risico dat selectieve voordelen of nadelen op het GGO worden overgedragen anders dan een potentieel verminderde replicatie is verwaarloosbaar klein.

3. Kans op overdracht op andere soorten onder de omstandigheden van de voorgestelde introductie van het ggo en selectieve voordelen of nadelen die op deze soorten kunnen worden overgedragen

De waarschijnlijkheid van het optreden van recombinatie van het GGO met wildtype AAV virussen in de proefpersonen, derden of niet-doelwit organismen is verwaarloosbaar klein. Doordat de virale vector replicatiedeficiënt is zal deze voor een beperkte tijd in het lichaam aanwezig blijven. Het ontstaan van recombinante virusdeeltjes is alleen mogelijk als een cel het GGO bevat en tegelijkertijd ook geïnfecteerd is met wildtype AAV én een helpervirus. De waarschijnlijkheid dat door recombinatie in de patiënt virussen met veranderde eigenschappen ontstaan is verwaarloosbaar klein. Er zijn geen nadelige effecten van het GGO beschreven. Derhalve is de kans op overdracht op andere soorten en de selectieve voordelen of nadelen die op deze soorten kunnen worden overgedragen verwaarloosbaar klein.

4. Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde milieueffecten van de directe en indirecte interacties tussen het ggo en de proefpersoon, en tussen het ggo en niet-doelwitorganismen

Expressie van de IFN- β sequentie heeft geen effect op het gastheerbereik, de infectiviteit of de pathogeniteit voor potentiële gastheren van het GGO (mensen en dieren) in het milieu. Het GGO is slechts tijdelijk aanwezig in de patiënt als gevolg van het replicatiedeficiënte karakter van de virale vector wegens het ontbreken van de *rep* en *cap* genen. Daardoor zal gedurende een korte periode productie van het IFN- β eiwit plaatsvinden. Het IFN- β eiwit zal alleen tot expressie worden gebracht tijdens ontstekingen. Er zijn geen pathogene effecten te verwachten die het gevolg zijn van additionele expressie van IFN- β in derden. Doordat de hoeveelheid van het GGO in derden vele malen kleiner zal zijn dan in patiënten, is het risico op negatieve effecten verkleind ten opzichte van de situatie in patiënten. Aangezien het GGO replicatiedeficiënt is zal de virale vector tijdelijk vanuit de patiënt in het milieu terecht kunnen komen. De kans dat derden of niet-doelwitorganismen geïnfecteerd raken met het GGO en dat daardoor een schadelijk effect optreedt, is verwaarloosbaar klein.

5. Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde effecten op de menselijke gezondheid van mogelijke directe en indirecte interacties tussen het ggo en personen die werken met, in contact komen met of in de nabijheid komen van ggo-introductie

Expressie van de IFN- β sequentie heeft geen effect op het gastheerbereik, de infectiviteit of de pathogeniteit voor potentiële gastheren van het GGO (mensen en

Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal
Directie Veiligheid en
Risico's

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1

dieren) in het milieu. Het GGO is slechts tijdelijk aanwezig in de patiënt als gevolg van het replicatiedeficiënte karakter van de virale vector wegens het ontbreken van de *rep* en *cap* genen. Daardoor zal gedurende een korte periode productie van het IFN- β eiwit plaatsvinden. Het IFN- β eiwit zal alleen tot expressie worden gebracht tijdens ontstekingen. Er zijn geen pathogene effecten te verwachten die het gevolg zijn van additionele expressie van IFN- β in derden. Doordat de hoeveelheid van het GGO in derden vele malen kleiner zal zijn dan in patiënten, is het risico op negatieve effecten verkleind ten opzichte van de situatie in patiënten. Aangezien het GGO replicatiedeficiënt is zal de virale vector tijdelijk vanuit de patiënt in het milieu terecht kunnen komen. De kans dat derden of niet-doelwitorganismen geïnfecteerd raken met het GGO en dat daardoor een schadelijk effect optreedt, is verwaarloosbaar klein.

Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal
Directie Veiligheid en
Risico's

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1

6. Mogelijke verandering in de staande medische praktijk

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

7. ADVIES

De COGEM heeft op 19 juli 2016 advies (CGM/160719-02) uitgebracht over de onderhavige ontwerpbesikking. De COGEM is van mening dat ART-I02 afdoende moleculair is gekarakteriseerd en als apathogeen aangemerkt kan worden. Met het oog op het productiesysteem en de controle van de vectorbatch acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de vectorbatch rcAAV bevat. Ditzelfde geldt voor de kans op recombinatie of complementatie van ART-I02 in de patiënt onder de door de aanvrager voorgestelde voorwaarde dat patiënten met een actieve (virale) infectie uitgesloten worden van deelname. De COGEM kan de kans op blootstelling van derden ten gevolge van uitscheiding van het ggo evenwel niet geheel uitsluiten. Om de eventuele nadelige effecten van uitscheiding te minimaliseren acht de COGEM het van belang dat patiënten effectieve anticonceptie in combinatie met een barrièremiddel in acht dienen te nemen gedurende de eerste drie maanden na behandeling of totdat er na een periode van 75 dagen gedurende drie opeenvolgende testen geen vector DNA in het sperma kan worden aangetoond en dienen de behandelde patiënten te worden uitgesloten van donatie van bloed, cellen en weefsels. Onder navolging van deze voorschriften en het eerder genoemde voorschrift betreffende het uitsluiten van patiënten met een actieve virale infectie is de COGEM van mening dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met de ART-I02 vector verwaarloosbaar klein zijn.

8. ZIENSWIJZEN

Naar aanleiding van de kennisgeving van de aanvraag en de ontwerpbesikking zijn zienswijzen ingebracht door:

1. M. Bos, te Lelystad, ook namens stichting Ekopark te Lelystad, De Gentschvrije Burgers, en Europees Consumentenplatform. Met ondersteuning van Stichting Natuurwetmoeders te Almere en W. van Dort
2. T. Tromp te Lelystad, namens Stichting Ekopark
3. M. Lieve te Lelystad, namens Stichting Ekopark
4. C. Dorjee te Lelystad
5. J.B.W. Rienks te Biddinghuizen
6. M. Madu te Lelystad
7. W. Schoots te Lelystad
8. J. Verwaarjen te Lelystad
9. M.T. v/d Riet te Lelystad

10. B. Zwaal te Lelystad
11. J. Bots te Lelystad
12. S. Gosing te Lelystad
13. J. Pooshum te Lelystad
14. L. de Meller te Lelystad
15. M. Kraus te Lelystad
16. N. v. Dooren te Lelystad
17. B. v/d Maat te Lelystad
18. M.L. Oen te Lelystad
19. R. v. Dijk te Lelystad
20. H. v. Dijk te Lelystad
21. P. Mual te Lelystad
22. J. Kanis te Lelystad
23. M. v/d Jagt te Lelystad
24. T.G. v. Delft te Lelystad
25. J. Geurts te Lelystad
26. B.H. Bokhorst te Lelystad
27. F. Verburg te Lelystad
28. M.J.C v/d Sloot te Lelystad
29. J. Rijnaarts te Bergen
30. H. Draaisma te Lelystad
31. A. de Harde te Lelystad
32. C. Gerritsma te Lelystad
33. C. Plat te Lelystad
34. C. Postel te Lelystad
35. T. v. Henstergen te Lelystad
36. J. Meersman te Lelystad
37. O. Buis te Lelystad
38. E.J. Visser te Lelystad
39. P.H. Goveia te Lelystad
40. S. Thakoeidajal te Lelystad
41. M. Rogten te Lelystad
42. V. Pitambersingh te Lelystad
43. M.T. Doeschot te Lelystad
44. H. Poleij te Lelystad, namens stichting Ekopark
45. E.A. van Nifterik te Swifterbant
46. D. Mekkes te Dalen
47. H. Mekkes te Dalen
48. M.L. Swaans te Rotterdam

**Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal**
Directie Veiligheid en
Risico's

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1

Zienswijzen van bovenstaande 48 indieners

1. De indieners van de zienswijzen hebben bezwaren tegen ggo's omdat het bij genetische manipulatie gaat om een pseudowetenschap.

Reactie: Het is onduidelijk hoe deze zienswijze betrekking heeft op de onderhavige studie. Daarom wordt niet inhoudelijk op deze zienswijze ingegaan. De indieners van deze zienswijze geven niet aan welke risico's voor mens en milieu zij zien.

Overeenkomstig artikel 9.2.2.3, tweede lid Wet milieubeheer kan een vergunning slechts in het belang van de bescherming van mens en milieu worden geweigerd.

2. De indieners van de zienswijzen hebben bezwaren tegen ggo's omdat het milieu, het (riool- en grond)water, de bodem en de lucht zwaar verontreinigd kunnen worden als de gentiche organismen ontsnappen of doelbewust losgelaten worden.

Reactie: Het is onduidelijk hoe deze zienswijze betrekking heeft op de onderhavige studie. De mogelijke schadelijke effecten voor mens en milieu zijn uitgebreid beschouwd in de milieurisicoanalyse, waaruit blijkt dat de toepassing van het GGO niet zal leiden tot een risico voor mens en milieu. De COGEM concludeert in haar advies

(CGM/160719-02) dat de risico's van deze studie voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

3. De indieners van de zienswijzen hebben bezwaren tegen ggo's omdat het niet meer mogelijk is deze beslissing terug te draaien wanneer men genetisch gemanipuleerde organismen eenmaal in het milieu heeft losgelaten. De in het milieu gebrachte gentiche organismen kunnen een gevaar opleveren voor de gezondheid van het milieu, van de mens, het dier en de plant. Het is mogelijk dat ggo's mede verband houden met Agrobacterium & Morgellons Disease. Vooral laboranten en boeren moeten beducht zijn voor besmetting.

Reactie: De mogelijke schadelijke effecten voor mens en milieu zijn uitgebreid beschouwd in de milieurisicoanalyse, waaruit blijkt dat de toepassing van het GGO niet zal leiden tot een risico voor mens en milieu. Het is onduidelijk hoe het punt over Agrobacterium & Morgellons Disease betrekking heeft op de onderhavige studie. Daarom wordt verder niet inhoudelijk op deze zienswijze ingegaan. Overeenkomstig artikel 9.2.2.3, tweede lid Wet milieubeheer kan een vergunning slechts in het belang van de bescherming van mens en milieu worden geweigerd.

4. De indieners van de zienswijzen hebben bezwaren tegen ggo's omdat over een langere tijd in het oneindig complexe ecosysteem veranderingen kunnen optreden, waarvan de aard en omvang met de huidige stand van de wetenschap onmogelijk is te overzien.

Reactie: De mogelijke schadelijke effecten voor mens en milieu zijn uitgebreid beschouwd in de milieurisicoanalyse, waaruit blijkt dat de toepassing van het GGO, zowel op korte als op langere termijn, niet zal leiden tot een risico voor mens en milieu. De COGEM concludeert in haar advies (CGM/160719-02) dat de risico's van deze studie voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

5. De indieners van de zienswijzen hebben bezwaren tegen ggo's omdat genetische vervuiling potentieel vervuiling is die zichzelf vermenigvuldigt.

Reactie: Het is onduidelijk hoe deze zienswijze betrekking heeft op de onderhavige studie. Daarom wordt niet inhoudelijk op deze zienswijze ingegaan. De indieners van deze zienswijze geven niet aan welke risico's voor mens en milieu zij zien. Overeenkomstig artikel 9.2.2.3, tweede lid Wet milieubeheer kan een vergunning slechts in het belang van de bescherming van mens en milieu worden geweigerd.

6. De indieners van de zienswijzen hebben bezwaren tegen ggo's omdat dit de kwaliteit van het leven van alle toekomstige generaties van alle levensvormen in het gedrang kan brengen.

Reactie: Het is onduidelijk hoe deze zienswijze betrekking heeft op de onderhavige studie. Daarom wordt niet inhoudelijk op deze zienswijze ingegaan. De indieners van deze zienswijze geven niet aan welke risico's voor mens en milieu zij zien. Overeenkomstig artikel 9.2.2.3, tweede lid Wet milieubeheer kan een vergunning slechts in het belang van de bescherming van mens en milieu worden geweigerd.

7. De indieners van de zienswijzen hebben bezwaren tegen ggo's omdat in deze situatie er maar één zinnige beslissing mogelijk is: geen genetische manipulatie! In plaats daarvan moeten reeds bestaande natuurlijke technologieën op grond van een ruimer inzicht in de werkelijkheid onderzocht en aangewend worden, en waar nodig moeten zij ontwikkeld worden.

Reactie: Het is onduidelijk hoe deze zienswijze betrekking heeft op de onderhavige studie. Daarom wordt niet inhoudelijk op deze zienswijze ingegaan. De indieners van deze zienswijze geven niet aan welke risico's voor mens en milieu zij zien. Overeenkomstig artikel 9.2.2.3, tweede lid Wet milieubeheer kan een vergunning slechts in het belang van de bescherming van mens en milieu worden geweigerd.

**Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal**
Directie Veiligheid en
Risico's

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1

8. De indieners van de zienswijzen vinden dit levensgevaarlijk en onethisch en vinden dat deze proeven niet mogen worden uitgevoerd. En zeker niet op mensen die ziek zijn van gewrichtsreuma. Ze vragen zich af of de deelnemende mensen wel weten welk risico zij lopen en of zij weten dat er een therapeutisch gen, dat via een gentech techniek is verkregen, wordt ingebracht? En als de gentech injectie niet werkt? Dan hebben de proefpersonen wel kans op mogelijke ernstige bijwerkingen. En hoeveel dieren zoals resusapen, konijnen en knaagdieren zijn al opgeofferd tijdens de onderzoeken die al eerder gedaan zijn?

Reactie: De mogelijke schadelijke effecten voor mens en milieu zijn uitgebreid beschouwd in de milieurisicobeoordeling, waaruit blijkt dat de toepassing van het ggo niet zal leiden tot een risico voor mens en milieu. De COGEM heeft positief geadviseerd (CGM/160719-02) over de milieurisicobeoordeling en geconcludeerd dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

De mogelijke risico's, eventuele voordelen voor de patiënten en andere medisch ethische aspecten verbonden aan klinische studies worden beoordeeld door de Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek (CCMO). De CCMO waarborgt de bescherming van proefpersonen betrokken bij medisch-wetenschappelijk onderzoek. Het onderzoeksvoorstel wordt door de CCMO getoetst volgens de criteria van de Wet medisch-wetenschappelijk onderzoek met mensen (WMO).

Voor het uitvoeren van proeven met dieren geldt op grond van artikel 10a, eerste lid, van de Wet op de dierproeven dat instemming van de dierexperimentencommissie benodigd is. Deze commissie beoordeelt onder andere de ethische aspecten van het gebruik van dieren voor de betreffende proefdoeleinden.

9. De indieners van de zienswijzen geven aan dat de 4 uren observatieperiode na de toediening plaats vindt in een algemene patiëntenkamer in het CHDR. Dit lijkt hen niet verstandig vanwege mogelijk besmettingsgevaar.

Reactie: De mogelijke schadelijke effecten voor mens en milieu zijn uitgebreid beschouwd in de milieurisicobeoordeling, waaruit blijkt dat de toepassing van het ggo niet zal leiden tot een risico voor mens en milieu. De COGEM heeft positief geadviseerd (CGM/160719-02) over de milieurisicobeoordeling en geconcludeerd dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

10. De indieners van de zienswijzen wijzen erop dat verticale overdracht van AAV (kiembaantransmissie) niet is aangetoond in preklinische studies of in de literatuur is beschreven. Dat het niet is aangetoond of in de literatuur is beschreven wil niet zeggen dat verticale overdracht niet mogelijk is.

Reactie: De mogelijke schadelijke effecten voor mens en milieu zijn uitgebreid beschouwd in de milieurisicoanalyse, waaruit blijkt dat de toepassing van het GGO niet zal leiden tot een risico voor mens en milieu. De mogelijkheid van verticale transmissie van AAV kan echter niet worden uitgesloten. In de risicomanagementmaatregelen is daarom opgenomen dat patiënten effectieve anticonceptie in combinatie met een barrièremiddel in acht dienen te nemen gedurende de eerste drie maanden na behandeling of totdat er na een periode van 75 dagen gedurende drie opeenvolgende testen geen vector DNA in het sperma kan worden aangetoond. De risico's voor mens en milieu zijn hiermee verwaarloosbaar klein.

11. Het baart de indieners van de zienswijzen zorgen dat AAV virusdeeltjes relatief stabiel zijn en buiten een gastheer in het milieu niet meteen hun infectiviteit verliezen.

Reactie: De mogelijke schadelijke effecten voor mens en milieu zijn uitgebreid beschouwd in de milieurisicoanalyse, waaruit blijkt dat de toepassing van het GGO niet zal leiden tot een risico voor mens en milieu. De COGEM concludeert in haar advies (CGM/160719-02) dat de risico's van deze studie voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

12. De indieners van de zienswijzen verwijzen naar een fragment van een gentherapie studie met een adenovirus vector.

**Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal**
Directie Veiligheid en
Risico's

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1

Reactie: Het is onduidelijk hoe deze zienswijze betrekking heeft op de onderhavige studie aangezien in deze studie een AAV virusdeeltje wordt gebruikt en geen adenovirale vector. Daarom wordt niet inhoudelijk op deze zienswijze ingegaan. De indieners van deze zienswijze geven niet aan welke risico's voor mens en milieu zij zien. Overeenkomstig artikel 9.2.2.3, tweede lid Wet milieubeheer kan een vergunning slechts in het belang van de bescherming van mens en milieu worden geweigerd.

Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal
Directie Veiligheid en
Risico's

13. De indieners van de zienswijzen vinden dat deze experimentele genterapieproef niet mag plaatsvinden. Ze vragen zich af waarom zij als bezorgde burgers de aangewezen personen zijn om te bewijzen dat deze proeven niet veilig zijn? Is dat niet de wereld op zijn kop? Volgens de indieners van de zienswijzen moet de aanvrager bewijzen dat zijn proef veilig is! Er zijn te veel onzekerheden.

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1

Reactie: De mogelijke schadelijke effecten voor mens en milieu zijn uitgebreid beschouwd in de milieurisicoanalyse, waaruit blijkt dat de toepassing van het GGO niet zal leiden tot een risico voor mens en milieu. De COGEM concludeert in haar advies (CGM/160719-02) dat de risico's van deze studie voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

14. De indieners van de zienswijzen vinden dat deze patiënten natuurlijk geholpen moeten worden, maar vragen zich af of een gentech injectie wel de aangewezen methode is. Genen bestaan in netwerken. Eén gen één eigenschap, een reductionistische opvatting en die is allang achterhaald. Bovendien is er veel proefdierenleed: het gebruik van o.a. apen neemt door genterapie-onderzoek alleen maar toe.

Reactie: Het is onduidelijk hoe deze zienswijze betrekking heeft op de onderhavige studie. Daarom wordt niet inhoudelijk op deze zienswijze ingegaan. De indieners van deze zienswijze geven niet aan welke risico's voor mens en milieu zij zien. Overeenkomstig artikel 9.2.2.3, tweede lid Wet milieubeheer kan een vergunning slechts in het belang van de bescherming van mens en milieu worden geweigerd.

15. De indieners van de zienswijzen wijzen erop dat gentechproeven, die ook gebruik maken van AAV5 of van AAV1 hebben gefaald.

Reactie: Deze zienswijze is niet gericht op de milieurisicoanalyse, maar heeft betrekking op ethische argumenten welke gewaarborgd wordt door de CCMO. De indieners van de zienswijze geven niet aan welke risico's voor mens en milieu zij zien. Overeenkomstig artikel 9.2.2.3, tweede lid Wet milieubeheer kan een vergunning slechts in het belang van de bescherming van mens en milieu worden geweigerd.

16. De indieners van de zienswijzen verwijzen naar fragmenten, citaten van Donella Meadows, Dr. S Druker en David Suzuki en een uitspraak van Richard Strohmman.

Reactie: Deze zienswijze is niet gerelateerd aan de specifieke milieurisico's van de aangevraagde werkzaamheden maar is van algemene aard. De indieners van de zienswijze geven niet aan welke specifieke risico's voor mens en milieu zij van de onderhavige studie zien. Vergunningaanvragen voor introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde organismen worden van geval tot geval uitvoerig beoordeeld. De mogelijke schadelijke effecten voor mens en milieu zijn uitgebreid beschouwd in de milieurisicoanalyse, waaruit blijkt dat de toepassing van het GGO niet zal leiden tot een risico voor mens en milieu. De COGEM concludeert in haar advies (CGM/160719-02) dat de risico's van deze studie voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

17. De indieners dringen er op aan, deze experimentele gentechproef niet door te laten gaan, zeker met het oog op eerdergenoemde teleurstellende uitkomsten. Het hardt zijn toch de patiënten getroffen, die met hoge verwachtingen meededen aan de proeven.

Reactie: Deze zienswijze is niet gericht op de milieurisicoanalyse, maar heeft betrekking op ethische argumenten welke gewaarborgd wordt door de CCMO. De

indieners van de zienswijze geven niet aan welke risico's voor mens en milieu zij zien. Overeenkomstig artikel 9.2.2.3, tweede lid Wet milieubeheer kan een vergunning slechts in het belang van de bescherming van mens en milieu worden geweigerd.

18. De indieners van de zienswijzen vinden het gevaarlijke experimenten. Zolang men niet weet wat genen onderling doen, ze werken namelijk samen, maar hoe is nog niet echt bekend, blijven dit volgens de indieners van de zienswijzen gevaarlijke experimenten met onzekere uitkomst. Daarbij wordt naar uitspraken van Richard Strohman gerefereerd.

Reactie: De mogelijke schadelijke effecten voor mens en milieu zijn uitgebreid beschouwd in de milieurisicobeoordeling, waaruit blijkt dat de toepassing van het ggo niet zal leiden tot een risico voor mens en milieu. De COGEM heeft positief geadviseerd (CGM/160719-02) over de milieurisicobeoordeling en geconcludeerd dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

De mogelijke risico's, eventuele voordelen voor de patiënten en andere medisch ethische aspecten verbonden aan klinische studies worden beoordeeld door de Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek (CCMO). De CCMO waarborgt de bescherming van proefpersonen betrokken bij medisch-wetenschappelijk onderzoek. Het onderzoeksvoorstel wordt door de CCMO getoetst volgens de criteria van de Wet medisch-wetenschappelijk onderzoek met mensen (WMO).

19. De indieners van de zienswijzen geven aan dat de aangevraagde gentichefproef uit de koker van Arthrogeen komt. Zij kregen eerder subsidies voor onderzoek van het Reumafonds. Waarom wordt er zo geheimzinnig gedaan en worden de namen van de schrijvers in de brieven met de aanvragen verwijderd? Waarom is haast alles in het Engels gesteld?

Reactie: De naam van de rechtspersoon die de aanvraag heeft gedaan is openbaar. Namen van personen en andere persoonsgegevens worden vertrouwelijk behandeld en derhalve worden deze gegevens uit de brieven verwijderd. Het staat de aanvragers vrij om de aanvraag in het Engels in te dienen.

20. De indieners van de zienswijzen verwijzen naar diverse fragmenten waarin de juistheid en betrouwbaarheid van wetenschappelijke literatuur en gepubliceerde klinische studies in twijfel wordt getrokken.

Reactie: Deze zienswijze heeft geen betrekking op de onderhavige studie. Daarom wordt niet inhoudelijk op deze zienswijze ingegaan.

21. De indieners van de zienswijzen verwijzen naar een fragment over de stier Herman.

Reactie: Deze zienswijze heeft geen betrekking op de onderhavige studie. Daarom wordt niet inhoudelijk op deze zienswijze ingegaan.

22. De indieners van de zienswijzen verwijzen naar een artikel over de associatie van reumatoïde artritis met pesticiden en andere blootstellingen op de boerderij.

Reactie: Deze zienswijze heeft geen betrekking op de onderhavige studie. Daarom wordt niet inhoudelijk op deze zienswijze ingegaan.

23. De indieners van de zienswijzen vinden dat er binnen het traject naar de vergunningverlening iets behoorlijk fout lijkt te zijn gegaan en dat de ontwerpbesluitontbrenging onterecht en veel te snel is afgegeven. Vanwege het ontbreken van een aantal belangrijke gegevens, in dit geval het onderzoek naar AAV5/2 (kiembaantransmissie) hadden de vergunningen dus niet verleend mogen worden.

Reactie: De mogelijke schadelijke effecten voor mens en milieu zijn uitgebreid beschouwd in de milieurisicoanalyse, waaruit blijkt dat de toepassing van het GGO niet zal leiden tot een risico voor mens en milieu. De mogelijkheid van verticale transmissie van AAV kan echter niet worden uitgesloten. In de risicomanagementmaatregelen is daarom opgenomen dat patiënten effectieve anticonceptie in combinatie met een

Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal
Directie Veiligheid en
Risico's

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1

barrièremiddel in acht dienen te nemen gedurende de eerste drie maanden na behandeling of totdat er na een periode van 75 dagen gedurende drie opeenvolgende testen geen vector DNA in het sperma kan worden aangetoond. De risico's voor mens en milieu zijn hiermee verwaarloosbaar klein.

Zienswijze van het CHDR

24. De indieners van de zienswijze wijzen erop dat de promotor in ART-I02 in de ontwerpbesluiting wordt aangeduid als "een NF-κB promotor". In de aanvraag is deze promotor omschreven als "NF-κB responsive promotor". De indieners van de zienswijzen verzoeken om "een NF-κB promotor" te vervangen door "een NF-κB responsieve promotor".

Reactie: De tekst "NF-κB promotor" is in de beschikking vervangen door "NF-κB responsieve promotor". De samenstelling en functie van de promotor zijn correct beschreven in de ontwerpbesluiting, waardoor deze tekstuele aanpassing geen gevolgen heeft voor de inhoud van de milieurisicobeoordeling.

**Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal**
Directie Veiligheid en
Risico's

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1

9. OPMERKINGEN VAN ANDERE LIDSTATEN

Er zijn geen opmerkingen ontvangen.

10. CONCLUSIE

Zowel voor de gebruikte AAV vector als voor de hierin gekloneerde IFN-β expressiecassette is geconcludeerd dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn. De te gebruiken virale vector is replicatiedeficiënt en zal daardoor slechts tijdelijk vanuit de patiënt in het milieu terecht kunnen komen. Ten gevolge hiervan kunnen derden mogelijk aan het GGO worden blootgesteld en kan zelfs infectie van derden niet op voorhand worden uitgesloten. De schadelijke effecten die dien ten gevolge kunnen optreden zullen ook dan met inachtneming van de voorgeschreven risicobeheersmaatregelen verwaarloosbaar klein zijn.

Op basis van het voorgaande is de Staatssecretaris van oordeel dat aan de aangevraagde werkzaamheden, als deze onder de voorwaarden zoals aangevraagd worden uitgevoerd, geen mogelijke effecten verbonden zijn die onaanvaardbaar zijn voor mens en milieu. De aanvraag voldoet daarmee aan de wettelijke vereisten. Er zijn op basis van artikel 9.2.2.3, tweede lid van de Wet milieubeheer dan ook geen redenen om de aangevraagde werkzaamheden te weigeren.

Naar aanleiding van deze overwegingen zal de vergunning worden verleend.

Besluit

- I. Aan het Academisch Ziekenhuis Leiden, te Leiden, wordt vergunning verleend voor doelbewuste introductie voor overige doeleinden als bedoeld in artikel 3.2, eerste lid, van het Besluit ggo.
- II. De vergunning heeft uitsluitend betrekking op de in de aanvraag beschreven werkzaamheden in de gemeente Leiden.
- III. De aanvraag met bijbehorende aanvullingen maakt deel uit van deze vergunning.
- IV. Aan de vergunning worden de navolgende voorschriften verbonden.

**Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal**
Directie Veiligheid en
Risico's

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1

Voorschriften

Artikel 1. **Definities en begrippen**

1. Op deze vergunning zijn de volgende definities van toepassing:
 - a. COGEM: de Commissie genetische modificatie, ingesteld bij artikel 2.26 van de Wet milieubeheer;
 - b. de Staatssecretaris: de Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu;
 - c. Het Besluit ggo: het Besluit genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013;
 - d. De Regeling ggo: de Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013;
 - e. ggo: genetisch gemodificeerd organisme;
 - f. rAAV: replicatiedeficient genetisch gemodificeerd Adenovirus-geassocieerd virus;
 - g. IFN- β : interferon-bèta;
 - h. AAV: Adeno-associated Virus;
 - i. HSV: Herpes simplex virus;
 - j. ITR: inverted terminal repeats;
 - k. rcAAV: replicatiecompetent Adenovirus-geassocieerd virus;
 - l. polyA: polyadenylatie;
 - m. HIV: Human Immunodeficiency Virus;
 - n. LTR: Long Terminal Repeat;
 - o. CMV: cytomegalovirus;
 - p. Rep: regulatorisch gen van AAV dat de replicatie reguleert;
 - q. Cap: structureel gen van AAV dat codeert voor het capsid eiwit;
 - r. ICH: International Conference on Harmonisation;
 - s. Ph. Eur.: European Pharmacopeia;
 - t. qPCR: kwantitatieve Polymerase-kettingreactie;
2. Voor het overige zijn de definities van het Besluit ggo en de Regeling ggo op deze vergunning van toepassing.
3. Bij ieder voorschrift van deze vergunning kunnen, met het oog op de bescherming van de gezondheid van de mens en van het milieu, door de Staatssecretaris nadere eisen worden gesteld. De vergunninghouder dient aan de gestelde nadere eisen te voldoen.

Artikel 2. **Algemene voorschriften**

1. De werkzaamheden als bedoeld onder II, mogen uitsluitend doorgang vinden voor zover die zijn opgenomen in een beschrijving van voorgenomen werkzaamheden als bedoeld in artikel 4 en voor zover er minstens 15 dagen zijn verstreken na verzending van die beschrijving conform artikel 4 aan de Staatssecretaris of zodra de ontvangst van de beschrijving van voorgenomen werkzaamheden schriftelijk is bevestigd.

2. De vergunninghouder dient zich tijdens de uitvoering van de werkzaamheden als bedoeld onder II, te verzekeren van de volledige zeggenschap over de werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen.
3. De medewerkers die worden betrokken bij de werkzaamheden, worden van de inhoud van deze vergunning in kennis gesteld voordat zij met de werkzaamheden aanvangen.

**Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal**
Directie Veiligheid en
Risico's

Artikel 3. **Bijzondere voorschriften**

1. Patiënten dienen effectieve anticonceptie in combinatie met een barrièremiddel in acht te nemen gedurende de eerste drie maanden na behandeling of totdat er na een periode van 75 dagen gedurende drie opeenvolgende testen geen vector DNA in het sperma kan worden aangetoond.
2. De vector zal niet toegepast worden wanneer er klinische aanwijzingen zijn voor een actieve virale infectie met een helpervirus.
3. De behandelde patiënten worden uitgesloten van donatie van bloed, cellen, organen en weefsels.

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1

Artikel 4. **Voorschriften met betrekking tot de beschrijving van voorgenomen werkzaamheden**

1. De vergunninghouder is verplicht voor de aanvang van de werkzaamheden een beschrijving van de voorgenomen werkzaamheden in overeenstemming met artikel 42 van de Regeling ggo aangetekend te zenden aan de Staatssecretaris.

Artikel 5. **Voorschriften met betrekking tot controle**

1. Iedere wijziging van gegevens met betrekking tot de vergunningaanvraag (bijvoorbeeld wijziging van contactpersoon of milieuveiligheidsfunctionaris) moeten in het logboek worden opgenomen en onverwijld schriftelijk aan de Staatssecretaris worden gemeld.
2. Gedurende het uitvoeren van de onder II bedoelde werkzaamheden op de locatie moet regelmatig en doelmatig gecontroleerd worden op afwijkingen ten opzichte van de gegevens in de onderliggende aanvraag. Deze afwijkingen dienen te worden genoteerd in het logboek.
3. Afwijkingen, zoals bedoeld in het tweede lid, die van invloed kunnen zijn op de risico's van de werkzaamheden voor mens en milieu, dienen onverwijld telefonisch en schriftelijk aan de Staatssecretaris gemeld te worden.
4. Iedere onvoorziene omstandigheid die de werkzaamheden betreft zoals beschreven onder II moet onverwijld telefonisch en schriftelijk aan de Staatssecretaris worden gemeld.
5. Bij een melding, als bedoeld in het derde en vierde lid, moeten aan de Staatssecretaris onverwijld de gegevens zoals gevraagd in het meldingsformulier "onvoorziene omstandigheden en afwijkingen introductie in het milieu" worden doorgegeven. Dit formulier is beschikbaar via de website <http://www.ggo-vergunningverlening.nl>.

Artikel 6. Inwerkingtreding

1. Deze beschikking treedt in werking overeenkomstig artikel 20.3 van de Wet milieubeheer.

Op het tijdstip van afgifte van deze vergunning zijn de adresgegevens als volgt:

De Staatssecretaris:

De Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu, p.a. Directie Veiligheid en Risico's,
Postbus 20901, 2500 EX, Den Haag.

Voor een melding:

Bij een schriftelijke melding kan contact opgenomen worden met het RIVM/VSP/Bureau GGO, RIVM/VSP/Bureau GGO, Antonie van Leeuwenhoeklaan 9, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven of via (030) 274 4401.

Bij een telefonische melding kan 24 uur per dag contact opgenomen worden met het Ministerie, 0800-3518700 (vanuit buitenland: 00 31 70 4568625). Tijdens kantooruren kan ook contact opgenomen worden met het RIVM/VSP/Bureau GGO, telefoonnummer (030) 274 2793.

26 juli 2016,

DE STAATSSECRETARIS VAN INFRASTRUCTUUR EN MILIEU,

namens deze,

de directeur Veiligheid en Risico's,



drs. ing. Peter Torbijn

**Directoraat-generaal
Milieu en Internationaal**
Directie Veiligheid en
Risico's

Ons kenmerk
IM-MV 16-002_000.bes.1