



> 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](http://www.ggo-vergunningverlening.nl)

**Contactpersoon**  
Bureau GGO

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

**Ons kenmerk**  
IM-MV 18-001\_000.ob.1

**Uw kenmerk**  
A&Mbu18036

# Ontwerpbeschikking GGO IM-MV 18-001

## 1. AANLEIDING<sup>1</sup>

1.1 De Staatssecretaris van Infrastructuur en Waterstaat (hierna: de Staatssecretaris) heeft op 23 januari 2018 een aanvraag, gedateerd 19 januari 2018, van het Academisch Ziekenhuis behorende bij de openbare universiteit Rotterdam te Rotterdam ontvangen. Deze aanvraag heeft het kenmerk IM-MV 18-001.

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 klinische studie in patiënten met hemofilie B. 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 factor IX-Padua eiwit (AAV5-hFIXco-Padua).

1.3 Hemofilie B is een zeldzame bloedziekte veroorzaakt door een tekort aan (stollings)factor IX (FIX). De ziekte treft ongeveer 1 op de 25.000 levende mannelijke pasgeborenen. Het FIX eiwit is een serine protease die geproduceerd wordt door de lever. Het eiwit circuleert in de bloedbaan en is cruciaal voor bloedstolling. Het ggo bevat een codon geoptimaliseerde variant van het humane coagulatie factor IX gen waarin twee mutaties zijn aangebracht. Dit zorgt voor één enkele aminozuurverandering waardoor de aminozuursequentie van het FIX eiwit overeenkomt met de natuurlijk voorkomende Padua FIX 'gain-of-function' mutant. Het FIX-Padua eiwit heeft een hogere activiteit dan het normale FIX eiwit. AAV5-hFIXco-Padua wordt toegediend aan patiënten die lijden aan hemofilie B. Hiermee wordt beoogd om expressie van coagulatie factor IX te herstellen en om de bloedingsverschijnselen en de kwaliteit van leven van de patiënten te verbeteren.

1.4 De voorgenomen werkzaamheden zullen plaatsvinden in de gemeente Rotterdam.

<sup>1</sup> Voor definities van gebruikte begrippen zie ook artikel 1 van de vergunning.

## **2. BEOORDELINGSKADER**

2.1 Een studie waarbij gentherapie wordt toegepast in proefpersonen valt onder de doelbewuste introductie voor overige doeleinden. Zie ook paragraaf 8.3 van de nota van toelichting bij het Besluit ggo.

### ***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 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 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 23 maart 2018.

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 Waterstaat 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 risicobeoordeling navolgbaar is.

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.

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

**Ons kenmerk**  
IM-MV 18-001\_000.ob.1

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).

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

##### **4.1. Gastheerorganisme (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 onder andere 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, de integratie in het gastheergenoom en deze hebben een functie bij replicatie. 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 weefsel tropisme. 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 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. 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.

##### **4.2. De insertie (factor IX-Padua)**

De insertie bestaat uit een expressiecassette met daarin de codon geoptimaliseerde sequentie coderend voor het humane factor IX (FIX)-Padua eiwit. In de sequentie van FIX zijn twee nucleotide veranderingen geïntroduceerd die leiden tot vervanging van een arginine in een leucine in het factor IX eiwit. Hierdoor komt de aminozuursequentie van het FIX eiwit overeen met de natuurlijk voorkomende Padua FIX 'gain-of-function' mutant (FIX-Padua), welke een hogere activiteit heeft dan het normale FIX eiwit bij dezelfde dosis. Het FIX eiwit is een serine protease die geproduceerd wordt door de lever. Het eiwit circuleert in de bloedbaan en is cruciaal voor bloedstolling.

##### **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

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

Ons kenmerk  
IM-MV 18-001\_000.ob.1

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 FIX-Padua expressiecassette opgenomen.

De expressiecassette bevat naast de FIX-Padua sequentie een humane LP1 promotor /enhancer en een SV40 polyadenylatie (polyA) signaal. Tussen de LP1 promotor /enhancer en de FIX-Padua sequentie bevindt zich een SV40 intron. Het SV40 polyadenylatie (polyA) signaal en het SV40 intron zijn gebaseerd op de sequentie van *Simian virus 40*.

De LP1 promotor /enhancer draagt zorg voor lever-specifieke expressie van de FIX-Padua sequentie. Dit betekent dat FIX-Padua in humane cellen specifiek in de lever tot expressie komt. Het SV40 intron wordt gebruikt om de expressie van het transgen te verbeteren. Het SV40 polyadenylatie signaal is nodig voor effectieve translatie van het FIX-Padua 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 (AAV5-hFIXco-Padua) 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. Het genproduct van de geïntroduceerde FIX-Padua sequentie kan niet in verband worden gebracht met een functie in de virusbiologie van de vector. Het is daarom niet te verwachten dat het transgen de functie van de vector op een of andere manier zal beïnvloeden. Door het replicatie defectieve karakter is de vector ook verminderd persistent in vergelijking tot het wildtype AAV.

#### **4.4. Beschrijving van het onderzoek**

Het onderzoek zal plaatsvinden in het Academisch Ziekenhuis behorende bij de openbare universiteit Rotterdam te Rotterdam. In totaal zullen 40 patiënten met hemofilie B in de studie opgenomen worden. De toediening van het ggo aan de patiënt en de monitoring van de patiënt vinden plaats op een patiëntenafdeling. Een enkele dosis variërend van  $5 \times 10^{12}$  genoomkopieën per kilogram (gc/kg) tot  $1 \times 10^{14}$  gc/kg van AAV5-hFIXco-Padua zal intraveneus aan patiënten worden toegediend. Tijdens de toediening van AAV5-hFIXco-Padua zullen standaard voorschriften worden toegepast om morsen en aerosolvorming te beperken. Het medisch personeel dat het ggo toedient zal beschermende kleding en handschoenen dragen. Om medische redenen dienen patiënten na toediening enkele uren tot 24 uur in het ziekenhuis te verblijven voor monitoring van tolerantie voor het ggo.

#### **4.5. Productie, vervoer, bemonstering en afvalbehandeling**

##### *Productie en vervoer*

De productie van het ggo vindt plaats onder current Good Manufacturing Practice (cGMP) condities en maakt geen onderdeel uit van de onderhavige aanvraag. Het ggo wordt geproduceerd in expresSF+ insectencellen, welke afkomstig zijn van *Spodoptera frugiperda*, met behulp van drie verschillende recombinante baculovirussen. De drie baculovirussen bestaan uit dezelfde baculovirus backbone, maar bevatten ieder een ander insert. Een baculovirus bevat twee AAV rep genen, Bac(Rep), beide afkomstig van AAV2 en onder controle van een insectencel-specifieke promotor. Een baculovirus bevat het AAV cap gen, Bac(Cap), afkomstig van AAV5 en onder controle van een insectencel-specifieke promotor. Een baculovirus bevat het AAV vector genoom, Bac(hFIX-Padua), bestaande uit de therapeutische transgen expressiecassette welke geflankeerd wordt door twee van AAV2 afkomstige ITRs. De drie baculovirussen Bac(Rep), Bac(Cap) en Bac(hFIX-Padua), benodigd voor de productie van het ggo, worden geproduceerd in Sf9 insectencellen. De gebruikte insectencellen en de recombinante baculovirussen worden geproduceerd volgens internationale ICH (*International Conference on Harmonisation*) en Ph. Eur.

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

**Ons kenmerk**  
IM-MV 18-001\_000.ob.1

(*European Pharmacopeia*) richtlijnen. Productcontrole en vrijgifte testen vinden plaats gedurende verschillende stadia van het productieproces. De gezuiverde virusdeeltjes zijn gecontroleerd door te testen voor verschillende parameters gerelateerd aan onder andere zuiverheid, biologische activiteit en identiteit.

Na productie wordt het ggo getransporteerd naar de apotheek van het ziekenhuis. Hier wordt het ggo in ontvangst genomen en opgeslagen conform het gestelde in de Regeling ggo. In de ziekenhuisapotheek wordt de infusiezak met het ggo in een bioveiligheidskabinet van klasse II gereed gemaakt voor toediening. Tijdens de preparatie van het ggo zullen standaard veiligheidsvoorschriften worden toegepast in de ziekenhuisapotheek en zal het personeel beschermende kleding en handschoenen dragen. De infusiezak met het ggo zal binnen het ziekenhuis worden getransporteerd conform het gestelde in de Regeling ggo.

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

**Ons kenmerk**  
IM-MV 18-001\_000.ob.1

#### *Monstername en -analyse*

Na toediening van het ggo zullen bloed- en spermamonsters worden genomen. Monsterafname, het transport van de monsters binnen het ziekenhuis en de bewerking en opslag van de monsters in het ziekenhuis zullen plaatsvinden conform het gestelde in de Regeling ggo. Voor alle humane monsters worden routine maatregelen genomen, bedoeld om pathogenen in bloed te controleren en om ziekenhuispersoneel te beschermen tegen pathogenen in het bloed. Deze maatregelen omvatten het dragen van handschoenen en een laboratoriumjas of uniform. Monsters die niet worden geanalyseerd in het ziekenhuis zullen worden getransporteerd naar het centrale laboratorium volgens de ggo regelgeving.

Gebaseerd op de resultaten uit een klinische studie wordt verwacht dat bloed- en spermamonsters genomen tot meerdere maanden na toediening van het ggo aan de proefpersoon vector DNA kunnen bevatten. Dit hoeft niet te betekenen dat er infectieuze virusdeeltjes aanwezig zijn in de geteste monsters. 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.

#### *Afval en besmet materiaal*

Het afval, waaronder gebruikte ampullen, slangetjes, naalden, spuiten, de infusiezak en persoonlijke beschermingsmiddelen die gebruikt zijn worden afgevoerd conform het gestelde in de Regeling ggo. Niet wegwerpbaar materiaal worden na gebruik schoongemaakt met een desinfectant met een virusdodende activiteit, en indien mogelijk, geautoclaveerd. Contact oppervlakken worden gedesinfecteerd met een vergelijkbaar desinfectant. De patiëntenkamer op de afdeling zal worden gedesinfecteerd met een desinfectans, waarbij gebruikte oppervlakten met een 250 ppm chlooroplossing schoongemaakt worden. Besmettingen zullen worden gedesinfecteerd met een 1000 ppm chlooroplossing.

#### **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 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.

## 5. MILIEURISICOANALYSE

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.

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

### 5.1. Algemeen

In de milieurisicobeoordeling 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 blootgesteld worden aan het ggo.

**Ons kenmerk**  
IM-MV 18-001\_000.ob.1

### 5.2. Het GGO

#### *Persistentie, invasiviteit en selectieve voordelen*

In de virale vector AAV5-hFIXco-Padua 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 FIX eiwit in de mens, geen redenen om aan te nemen dat FIX-Padua effecten heeft op de virusbiologie van AAV of dat het eiwit de functies van de *rep* en *cap* genen kan complementeren. Expressie van FIX-Padua door de virale vector kan daarom 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. De gevoeligheid van de bio-assay is 1 rcAAV virusdeeltje per 2x10<sup>9</sup> genoom bevattende virusdeeltjes. Een batch wordt verworpen indien rcAAV gedetecteerd wordt.

Tijdens de productie van de virusbatch kunnen onbedoeld gastheercel sequenties van de insectencellen en productiesysteem gerelateerde sequenties (bijvoorbeeld *rep*, baculovirus 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 verschillende qPCR assays specifiek voor deze sequenties. Uit sequentieanalyse van een batch van de AAV5-hFIXco-Padua vector blijkt dat de aanwezigheid van deze sequenties in de replicatiedeficiënte virusdeeltjes 2 tot 3 log lager is dan de AAV5-hFIXco-Padua 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 FIX-Padua expressiecassette van het ggo. De ontstane virusdeeltjes bevatten de FIX-Padua 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.

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

**Ons kenmerk**  
IM-MV 18-001\_000.ob.1

### **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 (over)expressie van het humane FIX-Padua eiwit en inductie van een immuunrespons tegen de AAV5-hFIXco-Padua capsid eiwitten en het FIX-Padua eiwit. Een geringe (over)expressie van FIX mag als normaal beschouwd worden, aangezien in gezonde individuen FIX niveaus kunnen variëren van 50% tot 200% ten opzichte van de (normale) referentiewaarde van 1 internationale unit/ml. Uit de literatuur is bekend dat alleen in patiënten met zeer hoge FIX-Padua niveaus (>700% ten opzichte van normale niveau, supra-fysiologische niveaus) de kans aanwezig is op het optreden van trombose.

Aangezien FIX-Padua een mutatie heeft ten opzichte van FIX, is er een mogelijkheid dat het FIX-Padua eiwit als lichaamsvreemd gezien wordt. Hierdoor zou een afweerreactie tegen het FIX-Padua eiwit kunnen optreden.

Een afweerreactie tegen AAV5 capsid 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 zullen terechtkomen zullen vele malen lager zijn dan de toegediende dosis.

### **5.4. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijk effect**

Het ggo is replicatiedeficiënt en AAV is niet pathogeen. Na toediening kan het ggo in het milieu terecht komen door shedding.

De kans dat derden geïnfecteerd raken met het ggo en daarmee trombose of een afweerreactie tegen FIX-Padua ontwikkelen is onwaarschijnlijk. Om trombose te kunnen veroorzaken moet het niveau van FIX-Padua in het lichaam vijf keer hoger zijn dan het niveau dat bereikt wordt met de dosis die in deze studie zal worden toegediend. In de fase 1/2 AMT-060 studie met nagenoeg hetzelfde ggo zijn FIX activiteitsniveaus tot 12% van de normale humane niveaus waargenomen, waardoor de kans zeer klein is dat extreem hoge niveaus gehaald worden. Met behulp van bioinformatische analyse werden geen significante verschillen gevonden in de immunologische activiteit van het FIX-Padua eiwit ten opzichte van het wildtype FIX eiwit. De kans dat er een immunologisch verschil is tussen FIX en het FIX-Padua eiwit is onwaarschijnlijk.

Een fase I/II klinische studie met een op één aminozuur na identiek ggo (AAV5-hFIX) is uitgevoerd in tien hemofilie B patiënten. Ze kregen AAV5-hFIX intraveneus toegediend in een dosis van  $5 \times 10^{12}$  gc/kg of  $2 \times 10^{13}$  gc/kg. Bij de patiënten die de hoge dosis toegediend hebben gekregen kon vector DNA gedetecteerd worden tot aan de laatste monsternamen (52 weken na toediening) in bloed, speeksel, neus secreties, feces en sperma. Dit hoeft niet te betekenen dat er infectieuze virusdeeltjes aanwezig

zijn in de geteste monsters. 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.

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 en baculovirus DNA, zijn er geen nadelige effecten te verwachten omdat *rep* sequenties van nature in AAV virusdeeltjes voorkomen. Wildtype AAV heeft geen pathogene eigenschappen en baculovirussen zijn insectenvirussen die niet kunnen repliceren in zoogdiercellen en geen nadelige effecten hebben op mensen. Daarnaast betreft het hier, gezien de uitkomst van de test op rcAAV, replicatiedeficiënte virusdeeltjes. Van de volwassen humane populatie is 90% seropositief voor AAV waardoor AAV virusdeeltjes met bijvoorbeeld een *rep* gen door het afweersysteem herkent 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 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.

### **5.5. Schatting van het risico van het ggo**

In de bovenstaande overwegingen wordt geconcludeerd dat voor de gebruikte virale vector AAV5-hFIXco-Padua 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. Alleen zeer hoge concentraties van het FIX-Padua eiwit kunnen mogelijk leiden tot trombose. Het is echter onwaarschijnlijk dat dergelijke concentraties in derden bereikt worden. 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 behandelde

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

**Ons kenmerk**  
IM-MV 18-001\_000.ob.1



patiënten vereist worden een condoom te gebruiken in de periode na toediening van AAV5-hFIXco-Padua totdat de AAV5 vector geklaard is uit het sperma. Hiertoe dienen minstens drie opeenvolgende verzamelde spermamonsters negatief te zijn voor aanwezigheid van AAV5-hFIXco-Padua vector DNA.

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

In Bijlage II, onder D1 van de Richtlijn worden 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 risicoanalyse worden al deze punten hieronder opgesomd voor de in deze vergunning aangevraagde werkzaamheden, met hun bijbehorende conclusies.

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

Ons kenmerk  
IM-MV 18-001\_000.ob.1

### **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 FIX-Padua eiwit heeft geen effecten op de virusbiologie van AAV en 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 FIX-Padua eiwit heeft geen effecten op de virusbiologie van AAV en het eiwit maakt geen onderdeel uit van het virusdeeltje. Het risico dat selectieve voordelen of nadelen op het ggo worden overgedragen 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, buiten het gegeven dat zeer hoge concentraties van FIX-Padua mogelijk kunnen leiden tot trombose. De kans op overdracht op andere soorten en de selectieve

voordelen of nadelen die op deze soorten kunnen worden overgedragen is 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 FIX-Padua 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 FIX-Padua eiwit plaatsvinden. Er zijn geen pathogene effecten bekend die het gevolg zijn van additionele expressie van FIX-Padua, buiten het gegeven dat zeer hoge concentraties van FIX-Padua mogelijk kunnen leiden tot trombose. 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 18-001\_000.ob.1

#### **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 FIX-Padua 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 FIX-Padua eiwit plaatsvinden. Er zijn geen pathogene effecten bekend die het gevolg zijn van additionele expressie van FIX-Padua, buiten het gegeven dat zeer hoge concentraties van FIX-Padua mogelijk kunnen leiden tot trombose. 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.

#### **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 zal gelijktijdig met de publicatie van de onderhavige ontwerpbeschikking om advies worden gevraagd.

#### **8. OPMERKINGEN VAN ANDERE LIDSTATEN**

Lidstaten kunnen opmerkingen maken naar aanleiding van de bij de Europese Commissie ingediende samenvatting van deze aanvraag.

#### **9. CONCLUSIE**

Zowel voor de gebruikte AAV vector als voor de hierin gekloneerde FIX-Padua 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 te 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.

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

**Ons kenmerk**  
IM-MV 18-001\_000.ob.1

## Besluit

- I. Aan het Academisch Ziekenhuis behorende bij de openbare universiteit Rotterdam 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 Rotterdam.
- III. De aanvraag 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**

## Voorschriften

**Ons kenmerk  
IM-MV 18-001\_000.ob.1**

### 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 Waterstaat;
  - c. Het Besluit ggo: het Besluit genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013;
  - d. De Regeling ggo: de Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013;
  - e. AAV: *Adeno-associated Virus*;
  - f. rAAV: replicatiedeficiënt recombinant *Adenovirus-geassocieerd virus*;
  - g. rcAAV: replicatiecompetent *Adenovirus-geassocieerd virus*;
  - h. HSV: *Herpes simplex virus*;
  - i. SV40: *Simian virus 40*;
  - j. polyA: polyadenylatie;
  - k. ITR: inverted terminal repeats;
  - l. Rep: regulator gen van AAV dat de replicatie reguleert;
  - m. Cap: structureel gen van AAV dat codeert voor het capsid eiwit;
  - n. FIX: (stollings)factor IX eiwit dat circuleert in de bloedbaan en cruciaal is voor bloedstolling;
  - o. gc: genoomkopieën;
  - p. kg: kilogram;
  - q. cGMP: current Good Manufacturing Practice;
  - 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**

4. 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.
5. 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.

6. De medewerkers die worden betrokken bij de werkzaamheden, worden van de inhoud van deze vergunning in kennis gesteld voordat zij met de werkzaamheden aanvangen.

### Artikel 3.      **Bijzondere voorschriften**

1. Patiënten dienen effectieve anticonceptie in combinatie met een barrièremiddel in acht te nemen totdat drie opeenvolgende spermamonsters negatief zijn getest voor de aanwezigheid van AAV5-hFIXco-Padua vector DNA.
2. De vector zal niet toegepast worden wanneer er klinische aanwijzingen zijn voor een actieve virale infectie.
3. De behandelde patiënten worden uitgesloten van donatie van bloed, cellen en weefsels.

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

**Ons kenmerk**  
IM-MV 18-001\_000.ob.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**

4. 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.
5. 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.
6. 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 Inspectie Leefomgeving en Transport gemeld te worden.
7. Iedere onvoorziene omstandigheid die de werkzaamheden betreft zoals beschreven onder II moet onverwijld aan de Inspectie Leefomgeving en Transport worden gemeld. De gegevens voor het melden staan vermeld op de website van de Inspectie Leefomgeving en Transport en op de website van Bureau ggo.

### Artikel 6.      **Inwerkingtreding**

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

NIET VERWIJDEREN BEGIN BLADWIJZER

Hier komt de officiële ondertekening van dit document

EINDE BLADWIJZER NIET VERWIJDEREN