



Milieurisicobeoordeling behorend bij de aanvraag GGO IM-MV 18-006

Datum: 2 juli 2018

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

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

Opgemerkt moet worden dat voor studies met mensen niet primair het risico voor de patiënt wordt getoetst. Deze toets wordt sinds het in werking treden van de Wet medisch wetenschappelijk onderzoek met mensen beoordeeld door de Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek (CCMO).

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

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

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

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

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

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

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



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

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

I. Ziekten bij de mens, met inbegrip van allergische en toxische effecten.

Het is van belang na te gaan in hoeverre de toepassing van het ggo kan leiden tot het ontstaan van ziekten. Hierbij moeten de ziekteverwekkende eigenschappen van het ggo worden vergeleken met die van het uitgangsgenoom. Van de meeste ziekteverwekkende organismen is de pathogeniteit bekend. De pathogeniteit van het uitgangsgenoom is een belangrijk uitgangspunt. Omdat de ziekteverwekkende eigenschappen van een ggo niet enkel worden bepaald door de pathogeniteit van het uitgangsgenoom worden ook de genetische modificatie en de toepassing in beschouwing genomen. In de Richtlijn worden diverse beoordelingsaspecten genoemd welke de ziekteverwekkende eigenschappen van een ggo kunnen beïnvloeden. Deze beoordelingsaspecten worden later in deze notitie nader toegelicht.

II. Ziekten bij dieren en planten, met inbegrip van allergische en toxische effecten.

Omdat in klinische studies toegepaste ggo's veelal zijn afgeleid van uitgangsgenomen die niet in staat zijn een plantaardige gastheer te infecteren wordt verondersteld dat deze ggo's bij planten geen ziekten kunnen veroorzaken. Mochten er in een voorkomend geval toch overwegingen zijn bij de combinatie gastheer/gekloneerde genen die betrekking hebben op de plantpathogeniteit, dan worden deze alsnog in beschouwing genomen. Voor ziekten bij dieren geldt een overeenkomstige argumentatie als verwoord onder het kopje ziekten bij de mens. In de notitie worden ziekten bij de mens en ziekten bij dieren gezamenlijk behandeld.

III. Effecten op de populatiedynamiek van soorten binnen het milieu en effecten op de genetische diversiteit van elk van die populaties.

Effecten op patiënten of proefdieren welke optreden ten gevolge van de toediening van een ggo behoren niet tot het wettelijke kader waarbinnen de milieurisicobeoordeling wordt uitgevoerd. Effecten op patiënten of proefdieren vallen onder de medische verantwoordelijkheid van de behandelend (dieren)arts en worden in het geval van klinische studies bij mensen beoordeeld door de CCMO. Echter, effecten op mens en dier in de omgeving van patiënt of proefdier (niet-doelpopulaties) kunnen afgeleid worden uit de effecten die mogelijk kunnen optreden bij de patiënt / proefdier. Daarom worden effecten op de doelpopulatie in de overwegingen betrokken waarbij in vervolgens nagegaan moet worden in hoeverre derden met het ggo in contact komen en als dit het geval is wat de kans is dat effecten optreden.

IV. Gewijzigde gevoeligheid voor ziekteverwekkers, waardoor de verspreiding van besmettelijke ziekten wordt vergemakkelijkt en/of nieuwe reservoirs of vectoren worden gecreëerd.

Gevoeligheid voor ziekteverwekkers is van groot belang bij de beoordeling van genetisch gemodificeerde planten en andere hogere organismen. De gevoeligheid voor ziekteverwekkers van micro-organismen is niet van toepassing bij de beoordeling van genetisch gemodificeerde virussen, virale vectoren en bacteriën.

V. Het in gevaar brengen van preventieve of therapeutische medische en veterinaire behandelingen.

Als voorbeeld noemt de Richtlijn hierbij het in gevaar brengen van preventieve of therapeutische medische, veterinaire of plantenbeschermingsbehandelingen, door het ontstaan van antibioticumresistentie door genoverdracht. Ten aanzien van de genoemde plantbeschermingsbehandelingen gelden dezelfde overwegingen als die werden genoemd in het kader van ziekten bij planten, in paragraaf II. Om deze reden worden effecten op plantenbeschermingsbehandelingen niet in de milieurisicobeoordeling opgenomen. Het in gevaar brengen van medische en veterinaire behandelingen wordt later uitgewerkt voor specifieke aspecten behorend bij de betreffende studie.

VI. Effecten op biogeochemische cycli.

Met betrekking tot de effecten op biogeochemische cycli moet met name ingegaan worden op recycling van koolstof en stikstof uit organisch materiaal in de bodem. Van een ggo dat in een klinische studie bij mens of dier wordt toegepast kan over het algemeen uitgesloten worden dat zij gedurende langere tijd buiten een gastheer overleven in het



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

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

Ziekten bij mens en dier

(toelichting op onderdeel I, II en IV)

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

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

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

Pathogeniteit en virulentie (onderdeel A in Tabel 2)

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

Infectiviteit (onderdeel A in Tabel 2)

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



Gastheerbereik en tropisme (onderdeel A in Tabel 2)

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

Replicatie en transmissie (onderdeel A in Tabel 2)

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

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

Toxigeniteit en allergeniteit (onderdeel D in Tabel 2)

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

Genoverdracht naar andere organismen (onderdeel C in Tabel 2)

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

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

Veranderingen van populatiedynamiek in natuurlijke milieu's

(toelichting op onderdeel III)

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



Het in gevaar brengen van preventieve of therapeutische behandelmethoden

(toelichting op onderdeel V)

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

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

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

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

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

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



Milieurisicobeoordeling behorend bij aanvraag GGO IM-MV 18-006

Titel aanvraag: Open-label, single-dose, multi-centre trial investigating an adeno-associated viral vector containing a codon-optimized Padua derivative of human factor IX gene (AAV5-hFIXco-Padua, AMT-061) administered to adult patients with severe or moderately-severe hemophilia B.

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

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

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

1. In Nederland wordt Adeno Associated Virus (AAV) beschouwd als een virus van pathogeniteitsklasse 2, dat voor zijn replicatie de hulp van andere virussen, in casu een adenovirus of een herpesvirus, nodig heeft. Infectie met wildtype AAV is asymptomatisch en het is niet bekend dat AAV enige waarneembare pathologie veroorzaakt. Recent heeft de COGEM geadviseerd om AAV in te schalen als een virus van pathogeniteitsklasse 1 (A2.1, A2.3, A2.4, A2.5, A2.6)*
2. AAV is een enkelstrengs DNA virus zonder envelop behorend tot de humane parvovirussen (A2.1)
3. De prevalentie van neutraliserende antilichamen in de Europese populatie tegen AAV is 3.2% (AAV5), 19% (AAV8), 59% (AAV2) en 50.5% (AAV1). Tot aan 80% van de humane populatie is seropositief voor AAV2 en ruim 90% van de volwassen humane populatie is seropositief voor AAV (A2.3, A2.6)*
4. Het gastheerbereik van de AAV serotypes die gedetecteerd zijn in mensen beperkt zich tot primaten (A2.3)
5. Preklinische studies in niet-humane primaten tonen aan dat AAV5 een sterk tropisme heeft voor de lever. Vector DNA sequenties worden ook gedetecteerd in de milt en de bijniere (A2.3)*
6. De meest waarschijnlijke infectieroutes voor AAV verlopen via de luchtwegen en via de gastro-intestinale route. De primaire route van overdracht is via contact met slijmvliezen (A2.6)*
7. AAV virusdeeltjes zijn relatief stabiel en verliezen buiten een gastheer in het milieu niet meteen hun infectiviteit. Blootstelling aan hitte, UV straling of extreme pH kan (recombinant) AAV inactiveren (A2.7)*
8. Het genoom van AAV heeft een grootte van ongeveer 4,7 kilobasen (kb) en bestaat uit drie componenten: één regulatorisch gen (*rep*) en één structureel gen (*cap*), die beide essentieel zijn voor replicatie en productie, en de Inverted Terminal Repeats (ITRs) die het virale genoom flankeren (A2.2)*



B. De genetische modificatie

9. De virale vector is een recombinante AAV vector met daarin gekloneerd het humane coagulatie factor IX-Padua (FIX-Padua) gen (A1.3)
10. FIX-Padua is een natuurlijk voorkomende variant van FIX welke één aminozuur verschilt van “wildtype” FIX (A1.3)
11. Het FIX eiwit is een serine protease die geproduceerd wordt door de lever. Het eiwit circuleert in de bloedbaan en is cruciaal voor bloedstolling*
12. De virale vector is afgeleid van een AAV serotype 2 (AAV2) vector, maar het virusdeeltje heeft capside eiwitten afkomstig van het humane AAV serotype 5 (AAV5) virus. AAV5 heeft een sterk tropisme voor de lever (A2.1, A2.3)
13. De vector bevat twee DNA sequenties (ITRs) die afkomstig zijn van het virale genoom van AAV2 (A2.1)
14. De *rep* en *cap* virale genen van de AAV2 vector zijn verwijderd en vervangen door een expressiecassette bevattende de LP1 enhancer/promotor, een Simian Virus 40 (SV40) intron, het codon geoptimaliseerde factor IX-Padua transgen en een SV40 polyadenylatie signaal. De AAV2 ITRs zijn in de vector behouden (A2.9, 2.11)
15. De virale vector is replicatiedeficiënt doordat de *rep* en *cap* genen van AAV verwijderd zijn. Ook in aanwezigheid van een helpervirus is de virale vector replicatiedeficiënt (A2.9)
16. De LP1 enhancer/promotor sequentie bestaat uit opeenvolgende segmenten van de humane apolipoproteïne hepatic control region (HCR) en de humane alpha-1-antitrypsine (hAAT) gen promotor (A2.11)
17. De LP1 enhancer/promotor zorgt voor lever-specifieke expressie van het transgen (A2.11)
18. Het SV40 intron wordt gebruikt om de expressie van het transgen te verbeteren. Het SV40 intron is een gemodificeerde variant van het SV40 small T antigen intron (A2.11)*
19. Het transgen FIX-Padua is codon geoptimaliseerd en is gebaseerd op een natuurlijk voorkomende FIX variant. Codon optimalisatie leidt niet tot een verandering in de aminozuursequentie van het eiwit, maar heeft tot doel om eiwit expressie te vergroten. De sequentie van FIX-Padua is identiek aan de sequentie van ggo AMT-060 welke al in klinische studies is toegepast, met uitzondering van twee nucleotide veranderingen die leiden tot vervanging van een arginine door een leucine in het factor IX eiwit (A1.3, A2.11, A2.12, A5.1)
20. De expressiecassette bevat verder een SV40 polyadenylatie signaal (SV40 polyA) welke het mRNA stabiliseert en nodig is voor efficiënte translatie van het transgene mRNA transcript (A2.11)*
21. De expressiecassette in de virale vector wordt geflankeerd door twee ITRs afkomstig van AAV serotype 2 (A2.11)
22. Het vector genoom bevat vijf kleine DNA fragmenten met een grootte tussen de 4 en 23 nucleotiden. Deze fragmenten zijn de overblijfselen van de kloneringsprocedure en bevatten geen coderende sequenties of functionele elementen (A2.11)



Tabel 1. Vaststelling van de bij de genetische modificatie ingebrachte of verwijderde sequenties

Sequenties gebruikt voor genetische modificatie	Herkomst	Plaats in de vector	Functie in de patiënt
ITR	AAV2	Voor de expressiecassette	Nodig voor inpakken virusdeeltjes
LP1 promotor/enhancer	Humaan	In de expressiecassette voor de SV40 intron sequentie	Lever-specifieke expressie van FIX-Padua
SV40 intron	Simian Virus 40 (SV40)	In de expressiecassette na de LP1 promotor/enhancer en voor FIX-Padua	Efficiënte expressie van FIX-Padua
Codon geoptimaliseerd factor IX-Padua (FIX-Padua)	Humaan	In de expressiecassette achter het SV40 intron en voor SV40 polyA	FIX-Padua codeert voor een natuurlijk voorkomende variant van het humane factor IX eiwit betrokken bij bloedstolling
SV40 polyadenylatie signaal (SV40 polyA)	Simian Virus 40 (SV40)	In de expressiecassette achter FIX-Padua	Draagt zorg voor stabilisatie en efficiënte translatie van het FIX-Padua mRNA
ITR	AAV2	Achter de expressiecassette	Nodig voor inpakken virusdeeltjes
Deletie <i>rep</i> gen	AAV2	Afwezig	Niet van toepassing
Deletie <i>cap</i> gen	AAV2	Afwezig	Niet van toepassing

C. Het ggo

23. In de virale vector (AAV5-hFIXco-Padua) zijn de *rep* en *cap* genen verwijderd waardoor de vector replicatiedeficiënt is. Een virusdeeltje kan een cel slechts éénmaal infecteren (A2.9, A2.13)*
24. Doordat het capsida van het virusdeeltje bestaat uit AAV5 eiwitten zal het gastheerbereik en weefseltropisme hetzelfde zijn als voor wildtype AAV5 (A2.15)
25. Toediening van AAV5-hFIXco-Padua zal een immunologische respons induceren die zeer vergelijkbaar is als de respons geïnduceerd door een natuurlijk infectie met wildtype AAV (A2.16)
26. Het factor IX (FIX) eiwit is een natuurlijk humaan eiwit dat in de bloedbaan aanwezig is (A2.11)*



27. Het ggo (AAV5-hFIXco-Padua) 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. Expressie van de Rep en Cap eiwitten door de insectencellen resulteert in replicatie en packaging in nieuw gevormde capsid partikels van het vector genoom. Het resultaat van dit proces is een recombinant en volledig replicatiedeficiënt AAV5-hFIXco-Padua partikel dat alleen de transgen expressiecassette bevat geflankeerd door de twee ITRs (A2.8, A2.12, A2.13)
28. De drie recombinante baculovirussen welke gebruikt worden voor de productie van AAV5-hFIXco-Padua zijn vervaardigd met gebruikmaking van gelineariseerd baculovirus DNA en een pPSC10 donor plasmide. Het gelineariseerde baculovirus DNA mist het gehele polyhedrine gen en een deel van de naastgelegen, essentiële ORF1629 sequentie. De pPSC10 plasmide bevat het insert van interesse (Rep, Cap of de FIX-Padua expressiecassette) en sequenties homolog aan het baculovirus genoom. Na co-transfectie van Sf9 cellen met het gelineariseerde baculovirus DNA en pPSC10 vindt recombinatie plaats, resulterend in uitwisseling van het insert en herstel van ORF1629. Als resultaat van deze recombinatie ontstaat circulair, recombinant baculovirus DNA. Dit baculovirus kan worden vermeerderd in insectencelweek, maar is geattenuëerd door de afwezigheid van het polyhedrine gen (A2.8, A2.12)*
29. Baculovirussen kunnen niet repliceren in zoogdiercellen. Zij hebben een beperkt gastheerbereik en zijn doorgaans beperkt tot een aantal nauwverwante insectensoorten. Met betrekking tot pathogeniteit worden baculovirussen niet gezien als schadelijk voor mensen (A2.9, A3.2)
30. Recombinatie tijdens de productie kan leiden tot replicatiecompetente AAV virusdeeltjes (rcAAV). Met een bio-assay wordt de aanwezigheid van rcAAV in de batch getest. De gevoeligheid van de bio-assay is 1 rcAAV virusdeeltje per 2x10E9 genoom bevattende virusdeeltjes. Tot nu toe is in geen enkele van de batches geproduceerd met het baculovirus productie systeem rcAAV gedetecteerd (A2.17, A3.2)
31. De productie van AAV5-hFIXco-Padua brengt grote hoeveelheden infectieus baculovirus met zich mee. Het proces bevat een aantal stappen om het baculovirus te verwijderen door neutralisatie (door middel van detergentia) of door fysieke verwijdering (door middel van chromatografie stappen en filtratie). Elke batch wordt getest op de aanwezigheid van overgebleven infectieus baculovirus met een bio-assay. De test is gekwalificeerd voor gebruik en heeft een detectielimiet van 6.8 infectieuze baculovirus units (i.e. partikels) per ml. Tot nu toe is in geen enkele van de geproduceerde batches infectieus baculovirus gedetecteerd (A3.2)
32. Tijdens de productie van de virusbatch kunnen gastheercel sequenties van de insectencellen en productiesysteem gerelateerde sequenties (bijvoorbeeld *rep*, baculovirus DNA) terechtkomen in AAV virusdeeltjes. Dit is een bekend fenomeen voor recombinante AAV vectoren die in andere klinische studies worden toegepast. Het is niet bekend of dergelijke sequenties in aparte AAV virusdeeltjes zitten of in AAV5-hFIXco-Padua virusdeeltjes waarin ook het FIX-Padua transgen aanwezig is. Aangezien de batch getest wordt op de afwezigheid van replicatiecompetente virusdeeltjes, zullen dit replicatiedeficiënte virusdeeltjes zijn. Om de aanwezigheid van dergelijke niet-vector gerelateerde sequenties te detecteren wordt de virusbatch gecontroleerd met verschillende qPCR assays specifiek voor deze sequenties (A3.2)*



33. Sequentieanalyse van de AAV5-hFIXco-Padua vector toont aan dat meer dan 99% van het DNA dat aanwezig is in AAV5-hFIXco-Padua het verwachte vector genoom betreft. Kleine hoeveelheden (0.2% van het totaal) van baculovirus afkomstig DNA en sporen van insectencel DNA werden gedetecteerd. Tijdens kwaliteitstesten wordt er gecontroleerd op deze DNA onzuiverheden. Voor eerdere vectoren geproduceerd met het baculovirus expressie systeem was het aangetoond dat deze fragmenten geen coderende sequenties bevatten (A2.13)
34. De sporen van insectencel DNA welke gedetecteerd worden in AAV5-hFIXco-Padua zijn korte sequenties die willekeurig verspreid liggen over het insectencel genoom. Deze resultaten suggereren dat deze sequenties DNA onzuiverheden zijn welke aanwezig zijn in AAV5-hFIXco-Padua en niet het resultaat zijn van recombinatie, maar van aspecificiteit van het Rep packaging eiwit (A2.13)
35. De batch wordt getest op overgebleven baculovirus DNA door middel van een qPCR assay. Deze assay heeft een detectielimiet van 5.0×10^{-10} gram equivalenten per milliliter. De maximaal toegestane hoeveelheid is 8×10^{-9} gram equivalenten per 1.0×10^{13} genoomkopieën (A3.2)
36. AAV5-hFIXco-Padua is beoordeeld op full length Rep niveaus door middel van een qPCR. Deze assay detecteert de aanwezigheid van Rep sequenties in de batch. Deze assay heeft een detectielimiet van 2.2×10^7 kopieën per milliliter. De maximaal toegestane hoeveelheid is 9×10^8 kopieën per 1.0×10^{13} genoomkopieën (A3.2)
37. In een batch zitten zeer lage hoeveelheden (de aanwezigheid van deze virusdeeltjes in de batch is 2 tot 3 log lager dan de AAV5-hFIXco-Padua virusdeeltjes) van niet-vector gerelateerde sequenties (*rep*, baculovirus DNA, insectencel DNA) in aparte replicatiedeficiënte, al dan niet infectieuze, AAV virusdeeltjes. De kans dat derden blootgesteld worden aan dergelijke virusdeeltjes is onwaarschijnlijk. Doordat de virusdeeltjes replicatiedeficiënt zijn zullen ze tijdelijk in het lichaam aanwezig blijven. Uit preklinische en klinische studies is gebleken dat AAV virusdeeltjes slechts gedurende korte tijd (één week) in het milieu terecht kunnen komen door shedding via urine, speeksel, bloed en sperma. Gezien de afbraak van virusdeeltjes in het lichaam en de relatief lage hoeveelheden virusdeeltjes met niet-vector gerelateerde sequenties, zal de hoeveelheid van deze deeltjes die in het milieu terecht komt nagenoeg verwaarloosbaar klein zijn (A5.2, A5.3)*
38. In het onwaarschijnlijke geval dat derden worden blootgesteld aan AAV virusdeeltjes met niet-vector gerelateerde sequenties, zoals het *rep* gen, baculovirus DNA of insectencel 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 herkend en afgebroken worden (A5.2, A5.3)*
39. Na infectie van een cel is de kans klein dat de virale vector in het genoom zal integreren, omdat voor een dergelijke integratie de activiteit van het *rep* genproduct nodig is en dit gen niet aanwezig is op de AAV virale vector. Het vector DNA zal voornamelijk episomaal in de getransduceerde cellen aanwezig blijven. Uit andere studies met AAV vectoren die ook het *rep* gen missen, blijkt dat de integratiefrequentie in het genoom lager is dan de spontane mutatie frequentie in het humane genoom en dat daardoor de kans op insertionele mutagenese bij derden verwaarloosbaar klein is*
40. In de patiënt is er een mogelijkheid dat nieuwe virusdeeltjes van de vector of van recombinanten van de vector gevormd worden als gevolg van tijdelijke complementatie van het ggo met AAV *rep* en *cap* genen. Hiertoe is het noodzakelijk dat in dezelfde cel wildtype AAV én een helpervirus, zoals adenovirus, herpes simplex virus, pseudorabies virus of humaan papilloma virus, aanwezig zijn. De kans dat het ggo én



wildtype AAV én een helpervirus tegelijkertijd in een cel aanwezig zijn is zeer klein aangezien een cel met drie verschillende virusdeeltjes tegelijkertijd geïnfecteerd moet zijn. Indien er toch tijdelijke complementatie optreedt en een recombinant AAV virusdeeltje gevormd wordt dan zal het virusdeeltje nog steeds replicatiedeficiënt zijn en slechts tijdelijk in het lichaam aanwezig zijn. Dat dergelijke virusdeeltjes gevormd worden, vervolgens in het milieu terecht komen, derden infecteren en dat daardoor een schadelijk effect optreedt, is zeer onwaarschijnlijk. Concluderend kan gesteld worden dat het risico van complementatie verwaarloosbaar klein is (A5.2, A5.3,)*

41. In de patiënt is er een mogelijkheid dat nieuwe virusdeeltjes gevormd worden als gevolg van homologe recombinatie van het ggo met wildtype AAV. 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. Aan een dergelijke uitwisseling zijn geen gevolgen verbonden, omdat de erbij ontstane virussen qua eigenschappen identiek zijn aan het ggo (A5.2, A5.3)
42. Niet-homologe recombinatie kan in theorie een hybride sequentie met van wildtype AAV afkomstige rep en cap sequenties en de FIX-Padua expressiecassette opleveren. De maximale packaging capaciteit van AAV capsiden is ongeveer 5 kb en de rep, cap en ITR sequenties zijn al 4.7 kb. Toevoeging van de FIX-Padua expressiecassette zal de maximale packaging capaciteit van AAV overstijgen waardoor deze hybriden niet kunnen worden ingepakt in wildtype AAV capsiden (A5.2, A5.3)
43. Er bestaat een theoretische kans op recombinatie tussen het SV40 intron of de SV40 polyA sequentie in het ggo en wildtype SV40. Hiervoor dient het ggo en het SV40 virus allereerst in dezelfde cel aanwezig te zijn. SV40 is een virus dat van nature voorkomt bij apen. Door de geringe homologie van SV40 met het ggo kan gesteld worden dat recombinatie een onwaarschijnlijke gebeurtenis is. Daarbij zal homologe recombinatie alleen leiden tot uitwisseling van het SV40 intron of de SV40 polyA sequentie. Het is onwaarschijnlijk dat hierdoor een schadelijk effect zal optreden (A5.2, A5.3)*
44. Indien derden blootgesteld worden aan het ggo kan dit resulteren in de (over)expressie van FIX-Padua. Van FIX-Padua wordt verwacht dat er een hogere FIX activiteit is bij dezelfde dosis van het ggo ten opzichte van AMT-060. 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 dierstudies blijkt dat overexpressie van FIX in muizen geen nadelige effecten tot gevolg heeft. Uit de literatuur is bekend dat alleen in patiënten met zeer hoge FIX-Padua niveaus (>700% ten opzichte van normale niveau, supra-fysiologische niveaus) trombose gezien wordt. Om een dergelijke dosis te kunnen halen moet er een vijf keer hogere dosis worden toegediend dan gepland is in de huidige studie. 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 (A5.2)*
45. Aangezien FIX-Padua een mutatie heeft ten opzichte van FIX, is er een mogelijkheid dat het FIX-Padua eiwit als lichaamsvreemd gezien wordt. In honden is de immunologische activiteit van het FIX-Padua eiwit onderzocht en er werden geen antilichamen of T-cel activiteiten tegen het FIX eiwit gevonden, ook niet na blootstelling met het FIX eiwit. Daarnaast is de mogelijke immunologische activiteit van het FIX-Padua eiwit onderzocht met gebruikmaking van onder andere epitooop voorspellende software (EpiMatrix system). Hierbij 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 (A5.2)



46. AAV infectie is van nature beperkt tot primaten. Zowel mensen als primaten hebben mogelijk bestaande (neutraliserende) antilichamen tegen AAV. Dientengevolge is de kans op en het effect van uitscheiding beperkt. Infecties met AAV komen frequent en wereldwijd voor (A2.3, A5.2, A5.3)*
47. Het ggo is replicatiedeficiënt en AAV is niet pathogeen. Onbedoelde blootstelling van derden aan AAV5-hFIXco-Padua zal resulteren in expressie van het humane FIX-Padua eiwit en inductie van een immuunrespons tegen de AAV5-hFIXco-Padua capside eiwitten (naar verwachting niet tegen het geëxprimeerde transgen). De immuunrespons tegen AAV5 capside eiwitten zal asymptomatisch zijn, op dezelfde manier als dat een natuurlijk voorkomende infectie met AAV een asymptomatische immuunrespons induceert. De kans dat derden, mochten zij worden blootgesteld aan het ggo, daarvan nadelige of zelfs waarneembare effecten ondervinden is verwaarloosbaar klein (A5.2, A5.3, A5.4, A5.5)

D. Milieugerelateerde gegevens afkomstig uit eerdere experimenten

48. Na intramusculaire toediening van op AAV2 gebaseerde virale partikels (5×10^8 tot 1×10^{10} infectieuze partikels/kg, overeenkomend met ongeveer 5×10^{10} tot 1×10^{12} genoom kopieën/kg) aan java-apen (*Macaca fascicularis*) werden op verschillende tijdstippen na toediening lichaamsvloeistoffen en excreties verzameld en geanalyseerd. Monsters werden geanalyseerd voor de aanwezigheid van vector-afkomstig DNA door middel van PCR, en voor infectieuze partikels door middel van een bio-assay. Serum, urine, feces, speeksel en traan en nasale vloeistoffen waren PCR-positief tot 7 dagen na vector toediening. Infectieuze AAV partikels werden echter alleen in het serum van alle dieren gedetecteerd. Infectieuze partikels werden nooit gedetecteerd in het serum na de eerste week. Vector DNA kon niet alleen worden gedetecteerd in spieren, maar ook in de lever en in de lymfknoep*
49. Er zijn verschillende klinische studies uitgevoerd met AAV2 en AAV8 met daarin gekloneerd het humane FIX gen (A5.1)
50. Biodistributie is bestudeerd door de aanwezigheid van vector sequenties te bepalen in verschillende monsters zoals plasma, sperma, speeksel, neus secreties, urine en feces. Na toediening van AAV5-hFIX aan een proefpersoon is shedding aangetoond in urine, speeksel, feces, neus secreties, sperma en bloed (A5.1)
51. Een fase I/II klinische studie met een op één aminozuur na identiek ggo (AMT-060) is uitgevoerd in 10 hemofilie B patiënten. De patiënten kregen AMT-060 intraveneus toegediend in een dosis van 5×10^{12} genoom kopieën/kg of 2×10^{13} genoom kopieën/kg. In 3 van de 10 patiënten werd een milde asymptomatische verhoging van ALT (Alanine Aminotransferase) waargenomen die behandeld werd met corticosteroiden. Geen van de patiënten ontwikkelden inhiberende antilichamen tegen FIX (A5.1)
52. In de AMT-060 studie werden op dag 1 en 2 monsters genomen van bloed, speeksel, neus secreties, urine, sperma en feces (sperma en feces alleen op dag 1). Dit werd wekelijks herhaald tot en met week 12 (sperma en feces alleen in de weken 1, 3, 6, 9 en 12), om de week van week 12 tot en met week 26, elke 13 weken van week 26 tot en met week 156 en elke 26 weken van week 156 tot en met week 234. Bemonstering vond plaats voor de individuele patiënt en voor het specifieke monstertype totdat 3 opeenvolgende negatieve monsters zijn gedetecteerd voor de patiënt en voor het betreffende monstertype. In alle monsters is de aanwezigheid van vector DNA geanalyseerd met behulp van qPCR (A5.1)



53. In de AMT-060 studie is shedding van vector DNA waargenomen in bloed, speeksel, neus secreties, urine, sperma en feces van patiënten uit zowel de groep die de hoge dosis als de groep die de lage dosis heeft toegediend gekregen. Bij de patiënten die de lage dosis toegediend hebben gekregen kon vector DNA in sommige patiënten gedetecteerd worden in bloed tot aan de laatste monstername (week 78), in urine tot week 11, in speeksel tot week 20, in neus secreties tot week 18, in feces tot week 16 en in sperma tot aan de laatste monstername (week 78). Bij de patiënten die de hoge dosis toegediend hebben gekregen kon vector DNA in alle patiënten gedetecteerd worden in bloed tot aan de laatste monstername (week 52) en in sommige patiënten in urine tot week 22 en in speeksel, neus secreties, feces en sperma tot aan de laatste monstername (week 52) (A5.1)
54. 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 (A5.1)
55. Een aantal preklinische studies zijn uitgevoerd met AAV5-hFIX in apen, wildtype muizen en in een muizenmodel van hemofilie B. In alle tot nog toe uitgevoerde preklinische studies zijn geen nadelige effecten geobserveerd die gerelateerd waren aan het ggo*
56. Na intraveneuze toediening van AAV5-hFIX (5×10^{11} tot 9.3×10^{13} genoom kopieën/kg) aan java-apen op eenzelfde wijze als de vector zal worden toegediend in deze klinische studie, kon humaan factor IX eiwit worden gedetecteerd in het plasma. In alle groepen piekten factor IX niveaus rond 7 dagen na toediening. Tussen de 7 dagen en 1 maand na toediening nam factor IX geleidelijk af, om stabiel te blijven gedurende de rest van de studie (tot 6 maanden na toediening)*
57. Na intraveneuze toediening van AAV5-hFIX (5×10^{11} tot 9.3×10^{13} genoom kopieën/kg) aan java-apen werden na 6 maanden de hoogste concentraties vector DNA gemeten in de lever, bijniere en nieren. In alle overige geanalyseerde weefsels waren de vector DNA niveaus minimaal 5 tot 10 maal lager in alle groepen ten opzichte van de niveaus in de lever*
58. Na intraveneuze toediening van AAV5-hFIX (5×10^{11} tot 9.3×10^{13} genoom kopieën/kg) aan java-apen werd vector DNA gedetecteerd in serum, urine en speeksel. Vector DNA werd niet gedetecteerd in feces op enig tijdstip in een van de apen. In vergelijking met serum waren de absolute vector DNA concentraties in urine en speeksel twee tot vier logs lager. Urine was volledig geklaard in week 8, serum en speeksel waren volledig geklaard tussen de 8 en 12 weken*
59. Vector DNA niveaus in de testikels, de bijballen en zaadblaasjes correleerden met de dosis en bedroegen 1×10^4 tot 1×10^5 genoom kopieën per μg genomisch DNA in de hoogst gedoseerde groep (9.3×10^{13} genoom kopieën/kg). Vector DNA werd niet aangetoond in het sperma van de java-apen in de laagst gedoseerde groep (5×10^{11} genoom kopieën/kg) en sporen werden gedetecteerd in sommige dieren van de twee hoogst gedoseerde groepen (2.5×10^{13} en 9.3×10^{13} genoom kopieën/kg). In de hoogst gedoseerde groep had slechts 1 dier meetbare niveaus van vector DNA dat minder dan 1 genoom kopie per ml bedroeg*
60. In een fase 1/2 klinische studie werden AAV5 vectoren (5×10^{11} tot 1.8×10^{13} genoom kopieën/kg) via een enkele intraveneuze infusie toegediend. Uitscheiding van vector DNA was dosis gerelateerd en de hoogste concentratie was gemeten in serum waar het piekte op de dag na toediening en afnam tot niet detecteerbare niveaus na 3 of 4 weken, afhankelijk van de dosis. Vector DNA was niet meer detecteerbaar in alle samples (serum, speeksel, nasale secreties, urine en feces) na 2 tot 4 weken, afhankelijk van de toegediende dosis. Sperma monsters afgenomen in week 4, 8, 12 en op een later tijdstip waren op alle tijdstippen negatief voor vector DNA*
61. Een fase 1/2 klinische studie met AAV8-hFIX toont aan dat de grootte en duur van AAV uitscheiding in plasma, sperma, speeksel, urine en feces dosis afhankelijk lijkt met de hoogste hoeveelheid viraal DNA geobserveerd in patiënten die de hoogste dosis (2×10^{12} genoom



kopieën/kg) toegediend kregen. Het vector genoom in speeksel, urine, sperma, feces en plasma was ongeveer 6 weken na toediening geklaard*

E. Patiëntgebonden aspecten

62. Het primaire doel van deze klinische studie is om de veiligheid en werkzaamheid van een enkele intraveneuze toediening van AAV5-hFIXco-Padua te evalueren in patiënten met ernstige of gematigd ernstige hemofilie B (A1.2, A1.3)
63. Hemofilie B is een zeldzame bloedziekte veroorzaakt door een tekort aan factor IX. Hemofilie B is een X-gebonden, recessieve ziekte welke ongeveer 1 op de 25.000 levende mannelijke pasgeborenen betreft (A1.3)*
64. AAV5-hFIXco-Padua is ontworpen om een codon geoptimaliseerde variant van het humane coagulatiefactor IX gen aan de lever van patiënten welke lijden aan hemofilie B te verstrekken, waardoor stabiele expressie van coagulatiefactor IX wordt hersteld en de bloedingsverschijnselen en de kwaliteit van leven van de patiënten wordt verbeterd (A1.2, A1.3, A2.11, A6)*
65. AAV5-hFIXco-Padua (AMT-061) is op sequentieniveau identiek aan AAV5-hFIX (AMT-060) met uitzondering van twee mutaties in de FIX sequentie. Dit zorgt voor één enkele aminozuurverandering waardoor de aminozuursequentie van het FIX eiwit overeenkomt met de natuurlijk voorkomende Padua FIX 'gain-of-function' mutant. Door deze sequentieverandering wordt verwacht dat er hogere FIX activiteit is bij dezelfde dosis ten opzichte van AMT-060 (A1.3, A2.12, A5.1)
66. De toediening van het ggo aan de patiënt en de monitoring van de patiënt vinden plaats op een patiëntenafdeling (A4.3, A5.7)
67. Een enkele dosis variërend van 5×10^{12} gc/kg (equivalent aan ongeveer 5×10^{13} totale partikels/kg en ongeveer 2×10^{11} infectieuze partikels/kg) tot 1×10^{14} gc/kg (equivalent aan ongeveer 1×10^{15} totale partikels/kg en ongeveer 4×10^{12} infectieuze partikels/kg) van AAV5-hFIXco-Padua zal intraveneus worden toegediend (A4.4)*
68. Om medische redenen dienen patiënten na toediening enkele uren tot 24 uur in het ziekenhuis te verblijven voor monitoring van tolerantie voor AAV5-hFIXco-Padua (A5.7, A5.8)
69. Behandelde patiënten worden niet in isolatie gehouden op enig tijdstip en er zijn geen additionele maatregelen vereist in hypothetische situaties waarbij medische behandeling interventies of behandelingen op een andere fysieke locatie vereisen (A5.10)
70. Na toediening van AAV5-hFIXco-Padua zullen bloed- en spermamonsters afgenomen worden voor studie doeleinden. Bemonstering zal doorgaan voor de individuele patiënt en voor het specifieke monstertype totdat 3 opeenvolgende negatieve monsters zijn gedetecteerd voor de patiënt en voor het betreffende monstertype. Dit wordt gezien als bewijs voor complete en permanente klaring (A1.4, A4.7, A4.8)
71. Monsterafname, het transport van de monsters binnen het ziekenhuis en de bewerking en opslag van de monsters in het ziekenhuis zal plaatsvinden op gelijke wijze als voor monsters van patiënten die niet met het ggo zijn behandeld. 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 (A1.4, A4.7)
72. Monsters die niet worden geanalyseerd in het ziekenhuis zullen worden getransporteerd naar een extern laboratorium voor verwerking en analyse. Dit maakt geen deel uit van de onderhavige aanvraag (A1.4, A4.7)



73. Gebaseerd op preklinische studies wordt vector DNA verwacht in bloed-, speeksel-, urine-, feces- en spermamonsters gedurende enkele weken na toediening van AAV5-hFIXco-Padua aan de proefpersoon. Infectieuze partikels blijven beperkt tot het plasma en worden geklaard uit de circulatie binnen 48 tot 72 uur na toediening (A5.1)*
74. Gebaseerd op klinische studies wordt vector DNA verwacht in neus secreties, bloed-, speeksel-, urine-, feces- en spermamonsters gedurende maanden na toediening van AAV5-hFIXco-Padua aan de proefpersoon (A5.1)
75. In totaal zullen 40 patiënten in de studie opgenomen worden (A4.1)
76. Hoewel het optreden van AAV kiembaantransmissie niet is aangetoond in preklinische studies of in de literatuur beschreven is, kan niet volledig uitgesloten worden dat er kiembaantransmissie kan optreden. Om de potentiële kans op kiembaantransmissie helemaal uit te sluiten geeft de aanvrager aan dat behandelde 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 (A5.5)*
77. Er worden verder geen inclusie- of exclusiecriteria gehanteerd in het kader van de veiligheid voor mens en milieu (A5.6)

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

78. In de ziekenhuisapotheek wordt de infusiezak met AAV5-hFIXco-Padua in een bioveiligheidskabinet klasse 2 gereed gemaakt (A1.4, A.1.11, A4. 2, A5.9)
79. Tijdens de preparatie van AAV5-hFIXco-Padua zullen standaard veiligheidsvoorschriften worden toegepast en zal het personeel beschermende kleding en handschoenen dragen (A5.9)
80. Tijdens de toediening van AAV5-hFIXco-Padua zullen standaard voorschriften worden toegepast om morsen en aerosolvorming te beperken. Het medisch personeel dat AAV5-hFIX toedient zal beschermende kleding en handschoenen dragen (A5.9)
81. De voorgevulde slang van de infusiezak zal in verbinding worden gebracht met de hoofdinfusieslang, welke ook gevuld is met 0.9% natriumchloride oplossing. Wanneer de intraveneuze katheter verwijderd wordt na voltooiing van de infusie, is er een vergroot risico op morsen en/of aerosolvorming. Dit risico is beperkt door de infusieslang door te spoelen met 0.9% natriumchloride oplossing voor verwijdering van de intraveneuze katheter (A5.9)
82. De infusiezak zal binnen het ziekenhuis worden getransporteerd conform het gestelde in de Regeling ggo (A1.4, A4.2)
83. Achtergebleven AAV5-hFIXco-Padua in de ampullen en materialen die in aanraking zijn geweest met het ggo zullen worden afgevoerd conform het gestelde in de Regeling ggo. Het afval, waaronder gebruikte ampullen, slangetjes, naalden, spuitjes, de infusiezak en persoonlijke beschermingsmiddelen, zal worden afgevoerd conform het gestelde in de Regeling ggo (A1.4, A4.3, A4.9, A5.9)
84. De katheter, slangetjes, infusiezak en andere hulpmiddelen die gebruikt zijn worden afgevoerd conform het gestelde in de Regeling ggo. Niet wegwerpbaar materiaal wordt na gebruik schoongemaakt met een desinfectans met een virusdodende activiteit, en indien mogelijk, geautoclaveerd. Contact oppervlakken worden gedesinfecteerd met een vergelijkbaar desinfectans (A5.9)
85. Afval van monsterafname zal worden afgevoerd als regulier afval van patiënten (A4.7)



86. De patiëntenkamer op de afdeling zal worden gedesinfecteerd volgens standaard ziekenhuisprocedures met bijvoorbeeld een waterstofperoxide oplossing, of ander door het ziekenhuis goedgekeurd desinfectans (A4.3)
87. Besmettingen zullen worden gedesinfecteerd met een 1000 ppm chlooroplossing (A4.3, A5.9)

G. Productie en Batch

88. Productie van het ggo vindt plaats onder current Good Manufacturing Practices condities door het bedrijf uniQure Inc. en valt niet onder de aangevraagde werkzaamheden (A1.4, A3.1)
89. De drie baculovirussen Bac-Rep, Bac-Cap en Bac-hFIX-Padua, benodigd voor de productie van het ggo, worden geproduceerd in Sf9 insectencellen (A2.8, A2.12)
90. Het ggo wordt geproduceerd in expresSF+ insectencellen, welke afkomstig zijn van *Spodoptera frugiperda*, met behulp van de drie verschillende recombinante baculovirussen (A2.8, A2.12, A2.13)
91. De gebruikte insectencellen en de recombinante baculovirussen worden geproduceerd volgens internationale ICH (International Conference on Harmonisation) en Ph. Eur. (European Pharmacopeia) richtlijnen (A3.2)
92. Productcontrole en vrijgifte testen vinden plaats gedurende verschillende stadia van het productieproces door de tussenproducten te testen voor microbiologische verontreiniging en vector partikel inhoud. De gezuiverde vector preparaties zijn gecontroleerd door te testen voor verschillende parameters gerelateerd aan inhoud, zuiverheid, biologische activiteit en identiteit en voor een verscheidenheid aan bekende en hypothetische onzuiverheden (A3.2)
93. Een eerdere batch van AAV5-hFIXco-Padua was toegewezen om als primaire referentiestandaard te dienen. Deze batch was geproduceerd met dezelfde baculovirus zaaistocks als degene die gebruikt worden om andere AAV5-hFIXco-Padua batches te produceren. De primaire referentiestandaard was volledig gesequenced waarbij homologie met de referentiestandaard was aangetoond. Deze resultaten lieten een correcte sequentie identiteit van de vector zien (A2.12)
94. AAV5-hFIXco-Padua batches anders dan de referentiestandaard worden niet routinematig gesequenced, aangezien deze worden geproduceerd met dezelfde baculovirus zaaistocks als de primaire referentiestandaard. Een deel van de kwaliteitscontrole testen zijn indicatief voor de correcte identiteit van de DNA sequentie; vector DNA identiteit, vector DNA compositie, potentie, infectieuze vector titer en genoom kopie concentratie (A2.12)
95. Na productie wordt het ggo getransporteerd naar de ziekenhuisapotheek van het ziekenhuis. Hier wordt het ggo in ontvangst genomen en opgeslagen conform het gestelde in de Regeling ggo (A1.4, A1.11, A4.2)



DEEL 2. MILIEURISICOANALYSE VAN DE AANGEVRAAGDE WERKZAAMHEDEN

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

Tabel 2.1 milieurisicoanalyse van de expressie regulerende sequenties (LP1 enhancer/promotor, SV40 intron, SV40 polyadenylatie signaal):

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

Bepaling van eigenschappen die schadelijke effecten kunnen hebben <i>(Identificatie en toelichting “oorzaak-gevolg” relaties)</i>	Evaluatie van de mogelijke gevolgen van elk schadelijk effect, indien dit optreedt, en evaluatie van de waarschijnlijkheid van het optreden <i>(rekening houdend met de wijze van introductie en het introductie milieu)</i>	Schatting van het risico dat aan de betreffende eigenschap van het ggo verbonden is
<p>De promotor heeft een functie bij de regulatie van de genexpressie. Een promotor is een specifieke DNA sequentie waaraan RNA polymerase kan binden om vervolgens stroomafwaarts gelegen coderende sequenties af te lezen. Een promotor op zichzelf kan geen schadelijk effect veroorzaken. Echter, de mate waarin een promotor actief is, is van invloed op de mate van expressie van genen die door de promotor worden gereguleerd.</p> <p>De mate van activiteit van een promotor kan afhankelijk zijn van de omstandigheden. Een constitutieve promotor heeft een constante activiteit, die niet of nauwelijks wordt veranderd door de omstandigheden. Bij een induceerbare promotor wordt de activiteit bepaald door de aan- of afwezigheid van signaalstoffen in de cel. De activiteit van een promotor kan ook afhankelijk zijn van het cel- of weefseltype waarin de promotor zich bevindt.</p> <p>De LP1 promotor /enhancer die in dit geval gebruikt wordt is een weefsel-specifieke promotor en zorgt voor lever-specifieke expressie van het transgen.</p> <p>Of de mate van expressie en het expressiepatroon van een</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden De schadelijke effecten die op kunnen treden als gevolg van de aanwezigheid van de expressie regulerende sequenties kunnen alleen worden geëvalueerd in relatie tot de schadelijke effecten van het genproduct (het factor IX-Padua (FIX-Padua) eiwit). De mate van expressie en het expressiepatroon van hFIXco-Padua wordt gereguleerd door deze regulerende sequenties.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Eventuele geïdentificeerde schadelijke effecten zullen optreden in de levercellen of de bloedbaan.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen De mogelijke gevolgen zijn afhankelijk van de uitkomst van de risicoanalyse van hFIXco-Padua (zie tabel 2.3), rekening houdende met het verwachte expressiepatroon.</p> <p>II Waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen Eventuele geïdentificeerde schadelijke effecten zullen optreden in levercellen of de bloedbaan.</p> <p>III. Het risico Het risico is afhankelijk van de uitkomst van de risicoanalyse van hFIXco-Padua (tabel 2.3).</p>



<p>promotor een schadelijk effect heeft wordt niet direct door een promotor veroorzaakt, maar vooral door het gen dat tot expressie komt.</p> <p>Naast de promotor bevat de vector als regulerende sequenties een SV40 intron sequentie en een SV40 polyadenylatie (polyA) signaal. De intron sequentie zorgt ervoor dat de expressie van actief genproduct wordt verbeterd. Evenals andere regulerende sequenties, bijvoorbeeld de promotor, zal de SV40 intron sequentie zelf geen schadelijk effect veroorzaken omdat deze sequentie niet zal worden vertaald in een genproduct. Een polyA signaal is nodig voor het proces van vertaling van het messenger RNA na transcriptie.</p> <p>Er wordt vanuit gegaan dat de expressie regulerende SV40 sequenties constitutief actief zijn in alle humane celtypen. De oorzaak-gevolg relaties die kunnen leiden tot schadelijk effecten van het ggo en met name van het genproduct hFIXco-Paduaworden beschreven in Tabel 2.3.</p>		
--	--	--



Tabel 2.2 milieurisicoanalyse van de genetisch gemodificeerde AAV vector:

<p>Bepaling van eigenschappen die schadelijke effecten kunnen hebben (<i>Identificatie en toelichting “oorzaak-gevolg” relaties</i>)</p>	<p>Evaluatie van de mogelijke gevolgen van elk schadelijk effect, indien dit optreedt, en evaluatie van de waarschijnlijkheid van het optreden (<i>rekening houdend met de wijze van introductie en het introductie milieu</i>)</p>	<p>Schatting van het risico dat aan de betreffende eigenschap van het ggo verbonden is</p>
<p>A. Persistentie en invasiviteit</p>		
<p>Bij de bepaling van het milieurisico van veranderde persistentie en invasiviteit van een ggo toegepast in medisch en veterinaire onderzoek gaat het om de bepaling van mogelijke effecten van de genetische modificatie op het gastheerbereik, de infectiviteit, en de pathogeniteit en virulentie voor potentiële gastheren (mensen en dieren) in het milieu.</p> <p>Van een hogere persistentie en invasiviteit van een virale vector ten opzichte van het natuurlijk voorkomende wildtype virus waarvan het is afgeleid, kan sprake zijn indien het ggo na toediening aan een patiënt of proefdier, langer dan het wildtype virus in een actieve vorm aanwezig kan blijven, en er vervolgens uitscheiding kan plaatsvinden van infectieuze deeltjes van het ggo in het milieu, en deze uitscheiding leidt tot infectie van andere organismen.</p> <p>Daarbij moet in beschouwing genomen worden dat de vector door de genetische modificatie veranderd kan zijn in zijn weefseltropisme, gastheerbereik, en in de mate van infectiviteit en virulentie. Hierbij spelen onder andere de mogelijkheden voor replicatie en transmissie een rol.</p> <p>Deze veranderingen kunnen leiden tot een gewijzigd ziektebeeld in gastheren die vatbaar zijn voor infectie door het wildtype virus, of tot uitbreiding van de ziekte naar nieuwe gastheren.</p> <p>Bij de bepaling van het milieurisico van veranderde persistentie en invasiviteit van een ggo toegepast in medisch en veterinaire onderzoek gaat het om de bepaling van mogelijke effecten van de genetische modificatie op het gastheerbereik, de infectiviteit, en de pathogeniteit en virulentie voor potentiële gastheren (mensen en dieren) in het milieu.</p> <p>Van het ouderorganisme (wildtype AAV) zijn alleen de</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijk gevolgen, indien ze optreden</p> <p>AAV infecties komen veelvuldig voor, over de hele wereld, zonder dat daarmee enig ziektebeeld in verband wordt gebracht. Ruim 90% van de volwassen humane populatie is seropositief voor AAV. Indien verhoogde persistentie of invasiviteit, of een uitbreiding van het gastheerbereik van de vector aanleiding zou geven tot ziektebeelden dan zouden de gevolgen groot kunnen zijn, maar alleen indien het ziektebeeld gepaard gaat met significante hinder of klachten. Indien de functies van het Rep eiwit worden gecompliceerd, dan kan er replicatie optreden van de vector. Daardoor zou shedding kunnen toenemen, wat tot gevolg kan hebben dat de blootstelling aan de vector wordt verhoogd.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</p> <p>De meest voor de hand liggende manier waarop de gedeleteerde virale genen <i>rep</i> en <i>cap</i> en hun genproducten zouden kunnen voorkomen in een cel waarin de vector zich bevindt, is via complementatie. Complementatie van de afwezige virale functies is alleen mogelijk als een cel behalve de vector ook geïnfecteerd is met wildtype AAV. Voor productie van de vector moet eenzelfde cel ook nog geïnfecteerd zijn met een helpervirus, bijvoorbeeld een adeno- of herpesvirus. Voor een blijvende vermeerdering van de vector zal in iedere nieuw geïnfecteerde cel weer moeten worden voldaan aan de zelfde voorwaarden: aanwezigheid van wt AAV en helpervirus. De kans dat dit daadwerkelijk zal optreden is gering, aangezien de drie virussen (wt AAV, AAV5-hFIXco-Padua en een van de helpervirussen) tegelijkertijd in dezelfde cel aanwezig dienen te zijn. Indien wildtype AAV of helpervirus niet meer in dezelfde cel aanwezig zijn zal de (tijdelijke) replicatie uitdoven.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen</p> <p>De <i>rep</i> en <i>cap</i> genen zijn verwijderd waardoor de vector replicatiedeficiënt is. Hierdoor is de vector verminderd persistent en invasief ten opzichte van wildtype AAV.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen</p> <p>De mogelijke gevolgen kunnen alleen plaatsvinden onder speciale omstandigheden, namelijk aanwezigheid van wildtype AAV én een helpervirus in de zelfde cel waarin zich de vector bevindt, en zelfs dan zal het gaan om een uitdovende infectie.</p> <p>III. Het risico</p> <p>Het risico dat verwijdering van de <i>rep</i> en <i>cap</i> genen zal leiden tot een verhoogde persistentie en invasiviteit is verwaarloosbaar klein.</p>



<p>Inverted Terminal Repeats (ITRs) in de vector aanwezig. In het ouderorganisme hebben de ITRs een functie bij de replicatie van het virus en bij de plaats specifieke integratie van het virus in het genoom van de gastheer. Zowel voor de replicatie als voor de integratie is het virus afhankelijk van andere genproducten, met name de Rep eiwitten gecodeerd door het AAV <i>rep</i> gen.</p> <p>De vraag is of deletie van de AAV genen <i>rep</i> en <i>cap</i> leidt tot een verandering van persistentie en/of invasiviteit in vergelijking tot wildtype AAV.</p>		
B. Selectieve voordelen		
<p>Voor de milieurisicoanalyse van een ggo toegepast in medisch of veterinair onderzoek zijn die selectieve voordelen relevant die leiden tot verhoogde persistentie en invasiviteit. De oorzaak-gevolg relaties die hierbij een rol spelen zijn behandeld onder A.</p> <p>Van een selectief voordeel van een virale vector (i.e. het ggo) ten opzichte van het natuurlijk voorkomende wildtype virus waarvan het is afgeleid, kan sprake zijn indien het ggo na toediening aan een patiënt of proefdier, langer dan het wildtype virus in een actieve vorm aanwezig kan blijven, en er vervolgens shedding kan plaatsvinden van infectieuze deeltjes van het ggo in, en deze shedding leidt tot infectie van andere organismen.</p> <p>Daarbij moet in beschouwing genomen worden dat het ggo door de genetische modificatie veranderd kan zijn in zijn weefseltropisme, gastheerbereik, en in de mate van infectiviteit en virulentie. Hierbij spelen onder andere de mogelijkheden voor replicatie en transmissie een rol.</p> <p>Deze veranderingen kunnen leiden tot een gewijzigd ziektebeeld in gastheren die vatbaar zijn voor infectie door het wildtype virus, of tot uitbreiding van de ziekte naar nieuwe gastheren.</p> <p>Van het ouderorganisme AAV zijn alleen de Inverted Terminal Repeats (ITRs) in het ggo aanwezig. In het ouderorganisme hebben de ITRs een functie bij de replicatie van het virus en bij de plaats-specifieke integratie van het virus in het genoom van de gastheer. Zowel voor de replicatie als voor de integratie is het virus afhankelijk van andere genproducten, met name de Rep eiwitten gecodeerd door het AAV <i>rep</i> gen.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijk gevolgen, indien ze optreden AAV infecties komen veelvuldig voor, over de hele wereld, zonder dat daarmee enig ziektebeeld in verband wordt gebracht. Ruim 90% van de volwassen humane populatie is seropositief voor AAV. Indien verhoogde persistentie of invasiviteit, of een uitbreiding van het gastheerbereik van de vector aanleiding zou geven tot ziektebeelden dan zouden de gevolgen groot kunnen zijn, maar alleen indien het ziektebeeld gepaard gaat met significante hinder of klachten. Indien de functies van het Rep eiwit worden gecomplementeerd, dan kan er replicatie optreden van de vector. Daardoor zou shedding kunnen toenemen, wat tot gevolg kan hebben dat de blootstelling aan de vector wordt verhoogd.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect De meest voor de hand liggende manier waarop de gedeleteerde virale genen <i>rep</i> en <i>cap</i> en hun genproducten zouden kunnen voorkomen in een cel waarin de vector zich bevindt, is via complementatie. Complementatie van de afwezige virale functies is alleen mogelijk als een cel behalve de vector ook geïnfecteerd is met wildtype AAV. Aanvullend moet eenzelfde cel ook geïnfecteerd zijn met een helpervirus, een adeno- of herpesvirus.</p> <p>Voor een blijvende vermeerdering van de vector zal in iedere nieuw geïnfecteerde cel weer moeten worden voldaan aan de zelfde voorwaarden: aanwezigheid van wt AAV en helpervirus. De kans dat dit daadwerkelijk zal optreden is gering, aangezien de drie virussen (wt AAV, AAV5-hFIXco-Padua en een van de helpervirussen) tegelijkertijd in dezelfde cel aanwezig dienen te zijn. Er mag vanuit worden gegaan dat het hier zal gaan om een uitdovende infectie.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen De <i>rep</i> en <i>cap</i> genen zijn verwijderd waardoor de vector replicatiedeficiënt is. Hierdoor heeft de vector geen selectieve voordelen ten opzichte van wildtype AAV.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen De mogelijke gevolgen kunnen alleen plaatsvinden onder speciale omstandigheden, namelijk aanwezigheid van wildtype AAV én een helpervirus in de zelfde cel waarin zich de vector bevindt, en zelfs dan zal het gaan om een uitdovende infectie.</p> <p>III. Het risico Het risico van selectieve voordelen is verwaarloosbaar klein.</p>



C. Kans op genoverdracht op andere soorten en de kans dat hierdoor selectieve voor- of nadelen op deze soorten worden overgedragen		
<p>Genoverdracht op andere soorten kan plaatsvinden door (homologe) recombinatie. Op de eerste plaats wordt in beschouwing genomen of er overdracht plaats kan vinden van het ggo naar andere virussen. Die kans is op de eerste plaats afhankelijk van de aanwezigheid van een verwant virus binnen het zelfde celcompartiment waarin het ggo zich bevindt. Vervolgens zijn de kans op recombinatie en de eigenschappen van het gevormde product afhankelijk van de genetische opbouw van het ggo. Van een mogelijk gevormde recombinant moet vervolgens worden nagegaan in hoeverre hieruit selectieve voor- of nadelen voortvloeien.</p> <p>Van het ouderorganisme AAV zijn alleen de Inverted Terminal Repeats (ITRs) in het ggo aanwezig. Deze kunnen uitsluitend recombineren met de ITRs van andere serotypen van AAV. Daarbij vindt een reciproke uitwisseling plaats van genetisch materiaal. Er vindt geen overdracht plaats naar andere virussen, omdat de AAV ITRs niet in andere virussen voorkomt. Verticale overdracht van AAV (kiembaantransmissie) is niet aangetoond in preklinische studies of in de literatuur beschreven.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden</p> <p>Recombinatie tussen de virale vector en wt AAV zal alleen resulteren in reciproke uitwisseling. De verwachting is dat de daarbij ontstane virussen qua eigenschappen identiek zullen zijn aan de uitgangsvirussen. Aan reciproke uitwisseling zijn daarom geen nadelige gevolgen verbonden. Er vindt geen overdracht plaats naar andere virussoorten.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</p> <p>Indien de vector aanwezig is in een gastheercel waarin ook AAV aanwezig is, dan bestaat er een zekere kans dat er uitwisseling plaatsvindt van (delen van) de ITRs.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen</p> <p>Reciproke uitwisseling zal niet leiden tot nadelige gevolgen.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen</p> <p>Er bestaat een zekere kans dat er reciproke uitwisseling optreedt.</p> <p>III. Het risico</p> <p>Er bestaat geen risico van effecten door overdracht van ITRs naar andere organismen.</p>
D. Effecten op doel en niet doel populaties		
<p>Effecten op de 'doelpopulatie' vallen niet onder het toetsingskader van de milieuregelgeving en worden om die reden hier niet direct in beschouwing genomen. De effecten op de patiënt / menselijke proefpersoon vallen onder de medische verantwoordelijkheid van de behandelende arts. Voor toediening van ggo's aan dieren gelden vergelijkbare overwegingen.</p> <p>Effecten op niet doelpopulaties zullen alleen op kunnen treden indien er sprake is van verspreiding van het ggo in de omgeving van de patiënt/ proefpersoon / proefdier. Een aantal aspecten betreffende pathogene effecten is al in beschouwing genomen onder A.</p> <p>In dit onderdeel worden de eventuele toxische en allergene effecten van het ggo beoordeeld op mensen en dieren in de omgeving van de patiënt. Elementen die daarbij in beschouwing genomen moeten worden zijn toxiciteit of andere schadelijke effecten zoals een effect van het ggo op het immuunsysteem, en allergeniteit van het genproduct. Bij de beoordeling moet rekening worden gehouden met de te verwachten blootstellingsweg en mate van blootstelling.</p> <p>Van het ouderorganisme AAV zijn alleen de Inverted Terminal</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden</p> <p>De ITRs hebben geen functie in afwezigheid van de Rep eiwitten. De aanwezigheid van de ITRs zal daarom niet leiden tot effecten op doel- en niet-doelpopulaties. Er kunnen daarom geen gevolgen worden geïdentificeerd, die hier besproken kunnen worden.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</p> <p>Er zullen geen effecten optreden op doel- of niet-doelpopulaties.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen</p> <p>Er zullen geen effecten optreden op doel- of niet-doelpopulaties.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen</p> <p>Er zullen geen effecten optreden op doel- of niet-doelpopulaties.</p> <p>III. Het risico</p> <p>Er bestaat geen risico van effecten op doel- of niet-doelpopulaties.</p>



<p>Repeats (ITRs) in het ggo aanwezig. In het ouderorganisme hebben de ITRs een functie bij de replicatie van het virus en bij de plaats specifieke integratie van het virus in het genoom van de gastheer. Van de ITRs worden geen eiwit expressieproducten afgeschreven en vertaald. Zowel voor de replicatie als voor de integratie is het virus afhankelijk van andere genproducten, met name de Rep eiwitten gecodeerd door het AAV <i>rep</i> gen. In afwezigheid van deze genproducten zullen de ITRs geen specifieke functie hebben. Van de ITRs zijn daarom geen effecten op doel- en niet-doelpopulaties te verwachten.</p>		
<p>E. Mogelijke effecten op menselijke en diergezondheid</p>		
<p>Aspecten gerelateerd aan de pathogeniteit van het ggo zijn reeds aan de orde geweest in persistentie en invasiviteit (onderdeel A). Aspecten gerelateerd aan toxiciteit of allergeniteit en andere gezondheidsgerelateerde effecten zijn aan de orde geweest in onderdeel D.</p> <p>Van het ouderorganisme AAV zijn alleen de Inverted Terminal Repeats (ITRs) in het ggo aanwezig. In het ouderorganisme hebben de ITRs een functie bij de replicatie van het virus en bij de plaats specifieke integratie van het virus in het genoom van de gastheer. Zowel voor de replicatie als voor de integratie is het virus afhankelijk van andere genproducten, met name de Rep eiwitten gecodeerd door het AAV <i>rep</i> gen. In afwezigheid van deze genproducten zullen de ITRs geen specifieke functie hebben. Van de ITRs zijn daarom geen effecten op menselijke en diergezondheid te verwachten.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijk gevolgen, indien ze optreden In onderdeel A is aangegeven dat, indien de functies van het Rep eiwit worden gecomplementeerd, er (tijdelijke) replicatie kan optreden van de vector. Daardoor zou shedding kunnen toenemen, wat tot gevolg kan hebben dat de blootstelling aan de vector wordt verhoogd. Van wildtype AAV zijn al geen pathogene eigenschappen bekend. In onderdeel D is aangegeven dat de ITRs geen functie hebben in afwezigheid van de Rep eiwitten. De aanwezigheid van de ITRs zal daarom niet leiden tot effecten op menselijke en diergezondheid, ook niet als de replicatiedeficiënte eigenschappen van de vector tijdelijk worden gecomplementeerd.</p> <p>De conclusie is dat er van de aanwezigheid van de ITRs geen specifieke effecten worden verwacht op de menselijke en diergezondheid. Er kunnen daarom geen gevolgen worden geïdentificeerd, die hier besproken kunnen worden.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Er worden geen schadelijke effecten verwacht.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen Er worden geen schadelijke effecten verwacht van de aanwezigheid van de ITRs.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen Er worden geen schadelijke effecten verwacht van de aanwezigheid van de ITRs</p> <p>III. Het risico Er bestaat geen risico van schadelijke effecten door de aanwezigheid van de ITRs op de menselijke en diergezondheid.</p>
<p>F. Mogelijke effecten op menselijke en diergezondheid ten gevolge van consumptie</p>		
<p>Er zal uitsluitend sprake van consumptie zijn indien het een toepassing op dieren betreft, en de proefdieren na afloop van het experiment voor menselijke consumptie of als diervoeder worden aangeboden. Alleen in dat geval wordt dat aspect in beschouwing genomen. Daarbij moet worden nagegaan in hoeverre consumptie van de tot expressie gebrachte genproducten van het ggo kan leiden tot gezondheidsschade voor mens of dier.</p> <p>In de onderhavige aanvraag is geen sprake van consumptie.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden Er is geen sprake van consumptie, gevolgen ten gevolge van consumptie worden daarom buiten beschouwing gelaten.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Niet van toepassing.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen Niet van toepassing.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen Niet van toepassing.</p> <p>III. Het risico Niet van toepassing.</p>



G. Effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu		
<p>In het algemeen wordt hieronder verstaan de negatieve effecten die ggo's kunnen hebben op (micro-) organismen die voorkomen als commensalen, of die verantwoordelijk zijn voor kringlopen van nutriënten of afbraak van organisch materiaal.</p> <p>Van het ouderorganisme AAV zijn alleen de Inverted Terminal Repeats (ITRs) in het ggo aanwezig. In het ouderorganisme hebben de ITRs een functie bij de replicatie van het virus en bij de plaats specifieke integratie van het virus in het genoom van de gastheer. Zowel voor de replicatie als voor de integratie is het virus afhankelijk van andere genproducten, met name de Rep eiwitten gecodeerd door het AAV <i>rep</i> gen. In afwezigheid van deze genproducten zullen de ITRs geen specifieke functie hebben. Van de aanwezigheid van de ITRs zijn daarom geen effecten te verwachten op microbiële populaties in mens dier of milieu.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijk gevolgen, indien ze optreden Van de aanwezigheid van de ITRs zijn geen effecten te verwachten op microbiële populaties in mens dier of milieu. Er kunnen daarom geen gevolgen worden geïdentificeerd, die hier besproken kunnen worden.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Er worden geen schadelijke effecten verwacht.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen Er worden geen gevolgen verwacht.</p> <p>II. De waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen Er worden geen gevolgen verwacht.</p> <p>III. Het risico Er bestaat geen risico dat de aanwezigheid van de ITRs leidt tot nadelige effecten te verwachten op microbiële populaties in mens dier of milieu.</p>
H. Veranderingen in de medische of veterinaire praktijk		
<p>Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde, directe en indirecte milieueffecten van de veranderde medische en veterinaire praktijk ten gevolge van de toepassing van de ggo's.</p> <p>Hieronder wordt verstaan dat de toepassing van het ggo kan leiden tot een verminderd effect en afgenomen toepasbaarheid van geneesmiddelen.</p> <p>Van het ouderorganisme AAV zijn alleen de Inverted Terminal Repeats (ITRs) in het ggo aanwezig. In het ouderorganisme hebben de ITRs een functie bij de replicatie van het virus en bij de plaats specifieke integratie van het virus in het genoom van de gastheer. Zowel voor de replicatie als voor de integratie is het virus afhankelijk van andere genproducten, met name de Rep eiwitten gecodeerd door het AAV <i>rep</i> gen. In afwezigheid van deze genproducten zullen de ITRs geen specifieke functie hebben. Van de aanwezigheid van de ITRs zijn daarom geen effecten te verwachten op de medische of veterinaire praktijk.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden Van de aanwezigheid van de ITRs zijn geen effecten te verwachten op de medische of veterinaire praktijk. Er kunnen daarom geen gevolgen worden geïdentificeerd, die hier besproken kunnen worden.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Er zullen geen effecten optreden op de medische of veterinaire praktijk.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen Er worden geen gevolgen verwacht voor de medische of veterinaire praktijk</p> <p>II. De waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen Er worden geen gevolgen verwacht voor de medische of veterinaire praktijk</p> <p>III. Het risico Er is geen sprake van risico van de aanwezigheid van de ITRs voor de medische of veterinaire praktijk.</p>



Tabel 2.3 milieurisicoanalyse van Factor IX-Padua (FIX-Padua):

Bepaling van eigenschappen die schadelijke effecten kunnen hebben <i>(Identificatie en toelichting "oorzaak-gevolg" relaties)</i>	Evaluatie van de mogelijke gevolgen van elk schadelijk effect, indien dit optreedt, en evaluatie van de waarschijnlijkheid van het optreden <i>(rekening houdend met de wijze van introductie en het introductie milieu)</i>	Schatting van het risico dat aan de betreffende eigenschap van het ggo verbonden is
A. Persistentie en invasiviteit		
<p>Bij de bepaling van het milieurisico van veranderde persistentie en invasiviteit van een ggo toegepast in medisch en veterinair onderzoek gaat het om de bepaling van mogelijke effecten van de genetische modificatie op het gastheerbereik, de infectiviteit, en de pathogeniteit en virulentie voor potentiële gastheren (mensen en dieren) in het milieu.</p> <p>Van een hogere persistentie en invasiviteit van een virale vector (i.e. het ggo) ten opzichte van het natuurlijk voorkomende wildtype virus waarvan het is afgeleid, kan sprake zijn indien het ggo na toediening aan een patiënt of proefdier, langer dan het wildtype virus in een actieve vorm aanwezig kan blijven, en er vervolgens shedding kan plaatsvinden van infectieuze deeltjes van het ggo in, en deze shedding leidt tot infectie van andere organismen. Daarbij moet in beschouwing genomen worden dat het ggo door de genetische modificatie veranderd kan zijn in zijn weefseltropisme, gastheerbereik, en in de mate van infectiviteit en virulentie. Hierbij spelen onder andere de mogelijkheden voor replicatie en transmissie een rol.</p> <p>Deze veranderingen kunnen leiden tot een gewijzigd ziektebeeld in gastheren die vatbaar zijn voor infectie door het wildtype virus, of tot uitbreiding van de ziekte naar nieuwe gastheren.</p> <p>De vraag is of expressie van de codon geoptimaliseerde FIX-Padua sequentie, dat codeert voor een bloedstollingsfactor met daarin één aminozuurverandering ten opzichte van de hFIX sequentie, leidt tot verandering in weefseltropisme, gastheerbereik, en in de mate van infectiviteit en virulentie van de virale vector in vergelijking met wildtype AAV. Hierbij moet in beschouwing worden genomen dat bij de constructie van het</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen van het schadelijke effect, indien het optreedt Het (stollings)factor IX eiwit is een serine protease die geproduceerd wordt door de lever. Het eiwit circuleert in de bloedbaan en is cruciaal voor bloedstolling. Indien als gevolg van expressie van de FIX-Padua sequentie een verhoogde persistentie of invasiviteit, of een uitbreiding van het gastheerbereik van de vector aanleiding zou geven tot ziektebeelden dan zouden de gevolgen groot kunnen zijn, maar alleen indien het ziektebeeld gepaard gaat met significante hinder of klachten.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Om een rol te kunnen spelen in de virusbiologie van de virale vector AAV zou het genproduct van de FIX-Padua sequentie op een of andere manier een activiteit moeten hebben die de afwezige Rep en capsid eiwitten zou kunnen complementeren.</p> <p>Complementatie van de afwezige virale functies is alleen mogelijk als een cel behalve de vector ook geïnfecteerd is met wildtype AAV. Voor productie van de vector moet eenzelfde cel ook nog geïnfecteerd zijn met een helpervirus, bv. een adeno- of herpesvirus. Voor een blijvende vermeerdering van de vector zal in iedere nieuw geïnfecteerde cel weer moeten worden voldaan aan de zelfde voorwaarden: aanwezigheid van wt AAV en helpervirus. De kans dat dit daadwerkelijk zal optreden is gering, aangezien de drie virussen (wt AAV, AAV5-hFIXco-Padua en een van de helpervirussen) tegelijkertijd in dezelfde cel aanwezig dienen te zijn. Indien wildtype AAV of helpervirus niet meer in dezelfde cel aanwezig zijn zal de (tijdelijke)</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen De gevolgen van een eventueel veranderde persistentie of invasiviteit van het ggo kunnen groot zijn, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt, in de normale gastheer, of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheer bereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p>II Waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen De waarschijnlijkheid dat de genetische modificatie leidt tot wijzigingen in persistentie of invasiviteit is te verwaarlozen.</p> <p>III. Het risico Het risico van verhoging van de persistentie of de invasiviteit bij toepassing van de virale vector voor de expressie van de FIX-Padua sequentie, is verwaarloosbaar klein.</p>



<p>ggo de <i>rep</i> en <i>cap</i> genen zijn gedeleteerd, en vervangen door een expressiecassette die het transgen FIX-Padua bevat, en dat van het oorspronkelijke AAV nog slechts de ITRs behouden zijn.</p> <p>Verandering in weefseltropisme, gastheerbereik, en in de mate van infectiviteit en virulentie van de vector kan alleen veroorzaakt worden door expressie van de FIX-Padua sequentie, als het genproduct op een of andere manier een activiteit zou kunnen hebben die de afwezige Rep en capsid eiwitten zou kunnen complementeren.</p>	<p>replicatie uitdoven.</p> <p>Van het FIX-Padua eiwit is niet bekend dat het effecten heeft op de virusbiologie van AAV. Gezien de normale functie van FIX in de mens zijn geen effecten op de AAV virusbiologie te verwachten. Expressie van FIX-Padua door de vector kan daarom niet leiden tot vorming van virusdeeltjes die de virale vector bevatten. Ook in omstandigheden dat er wel virusdeeltjes gevormd worden, is er geen reden om aan te nemen dat aanwezigheid van het FIX-Padua eiwit op een of andere manier invloed zal hebben op de virusbiologie van de vector, bijvoorbeeld door onderdeel uit te gaan maken van het capsid van de deeltjes. Op basis van deze gegevens kan worden uitgesloten dat langs deze weg de virale eigenschappen van de AAV virale vector veranderd zullen worden door expressie van de FIX-Padua sequentie. Doordat het capsid van het virusdeeltje bestaat uit AAV5 eiwitten zal het gastheerbereik en weefseltropisme hetzelfde zijn als voor wildtype AAV5. Uit preklinische studies blijkt dat de biodistributie en persistentie van het ggo vergelijkbaar zijn met andere AAV vectoren. De kans dat expressie van de FIX-Padua sequentie enig effect heeft op het gastheerbereik, de infectiviteit of de pathogeniteit, of de virulentie is daarom verwaarloosbaar klein.</p> <p>De kans dat het gastheerbereik van de virale vector zal worden uitgebreid is verwaarloosbaar klein.</p>	
<p>B. Selectieve voordelen</p>		
<p>Voor de milieurisicoanalyse van een ggo toegepast in medisch of veterinair onderzoek zijn die selectieve voordelen relevant die leiden tot verhoogde persistentie en invasiviteit. De oorzaak-gevolg relaties die hierbij een rol spelen zijn behandeld onder A.</p> <p>Hier is de vraag of expressie van de FIX-Padua sequentie, met daarin een aminozuurverandering ten opzichte van de hFIX sequentie, leidt tot verandering in weefseltropisme, gastheerbereik, en in de mate van infectiviteit en virulentie van de virale vector in vergelijking met wildtype AAV. Hierbij moet in beschouwing worden genomen dat bij de constructie van de virale vector de <i>rep</i> en <i>cap</i> genen zijn gedeleteerd, en vervangen door een expressiecassette die de FIX-Padua sequentie bevat, en dat van het oorspronkelijk AAV nog slechts de ITRs behouden zijn.</p> <p>Verandering in weefseltropisme, gastheerbereik, en in de mate van infectiviteit en virulentie van de virale vector kan alleen</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijk gevolgen, indien ze optreden Evenals in onderdeel A geldt dat, indien verhoogde persistentie of invasiviteit, of een uitbreiding van het gastheerbereik van de vector aanleiding zou geven tot ziektebeelden, de gevolgen groot zouden kunnen zijn, maar alleen indien het ziektebeeld gepaard gaat met significante hinder of klachten.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Op basis van de zelfde redentatie als onder persistentie en invasiviteit (onderdeel A van deze tabel) is de conclusie dat de waarschijnlijkheid dat de expressie van de geïnserteerde FIX-Padua sequentie leidt tot selectieve voordelen in de oorspronkelijke gastheer of in een nieuwe gastheer, verwaarloosbaar klein is. De kans dat het gastheerbereik van de virale vector AAV zal worden uitgebreid is eveneens verwaarloosbaar klein.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen De gevolgen van selectieve voordelen kunnen groot zijn, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt, in de normale gastheer, of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheer bereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p>II Waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen De waarschijnlijkheid dat de genetische modificatie leidt tot selectieve voordelen is te verwaarlozen.</p> <p>III. Het risico Het risico van selectieve voordelen bij toepassing van de virale vector AAV voor de expressie van de FIX-Padua sequentie, is verwaarloosbaar klein.</p>



<p>veroorzaakt worden door expressie van de FIX-Padua sequentie, als het genproduct op een of andere manier een activiteit zou kunnen hebben die de afwezige Rep en capsid eiwitten zou kunnen complementeren.</p>		
<p>C. Kans op genoverdracht op andere soorten en de kans dat hierdoor selectieve voor- of nadelen op deze soorten worden overgedragen</p>		
<p>Genoverdracht op andere soorten kan plaatsvinden door (homologe) recombinatie. Op de eerste plaats wordt in beschouwing genomen of er overdracht plaats kan vinden van het ggo naar andere virussen. Die kans is op de eerste plaats afhankelijk van de aanwezigheid van een verwant virus binnen het zelfde celcompartiment waarin het ggo zich bevindt. Vervolgens zijn de kans op recombinatie en de eigenschappen van het gevormde product afhankelijk van de genetische opbouw van het ggo. Van een mogelijk gevormde recombinant moet vervolgens worden nagegaan in hoeverre hieruit selectieve voor- of nadelen voortvloeien.</p> <p>De vraag is of de FIX-Padua sequentie kan worden overgedragen van de van AAV afgeleide vector naar andere virussen en of dit vervolgens voor deze virussen kan leiden tot een selectief voor- of nadeel. Selectieve voor- of nadelen kunnen daarbij alleen optreden als de expressie van de FIX-Padua sequentie op een of andere manier een interactie heeft met de virale levenscyclus.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden <i>Replicatiecompetente AAV virusdeeltjes</i> Recombinatie tijdens de productie van de virale vector kan leiden tot replicatiecompetente AAV virusdeeltjes (rcAAV) met gastheercel sequenties van de insectencellen en productiesysteem gerelateerde sequenties (bijvoorbeeld <i>rep</i>, baculovirus DNA).</p> <p><i>Replicatiedeficiënte virusdeeltjes met niet-vector sequenties</i> Tijdens de productie van de virusbatch kunnen gastheercel sequenties van de insectencellen en productiesysteem gerelateerde sequenties (bijvoorbeeld <i>rep</i>, baculovirus DNA) terechtkomen in replicatiedeficiënte AAV virusdeeltjes. Dit is een bekend fenomeen voor recombinante AAV vectoren die in andere klinische studies worden toegepast. Het is niet bekend of dergelijke sequenties in aparte AAV virusdeeltjes zitten of in AAV5-hFIXco-Padua virusdeeltjes waarin ook het FIX-Padua transgen aanwezig is. Expressie van de sequenties in deze virusdeeltjes kunnen mogelijk schadelijke effecten teweegbrengen.</p> <p><i>Complementatie met AAV in de patiënt</i> In de patiënt is er een mogelijkheid dat nieuwe virusdeeltjes gevormd worden als gevolg van tijdelijke complementatie van het ggo met AAV <i>rep</i> en <i>cap</i> genen. Indien door tijdelijke complementatie een recombinant AAV virusdeeltje gevormd wordt dan zal het virusdeeltje nog steeds replicatiedeficiënt zijn en slechts tijdelijk in het lichaam aanwezig zijn. Dat dergelijke virusdeeltjes gevormd worden, vervolgens in het milieu terechtkomen komen, derden infecteren en dat daardoor een schadelijk effect optreedt, is zeer onwaarschijnlijk. Concluderend kan gesteld worden dat het risico van complementatie verwaarloosbaar klein is.</p> <p><i>Recombinatie met AAV in de patiënt</i> In de patiënt is er een mogelijkheid dat nieuwe virusdeeltjes gevormd worden als gevolg van recombinatie van het ggo met wildtype AAV. Recombinatie tussen de vector en wildtype AAV zal alleen resulteren in uitwisseling van homologe sequenties zoals de ITRs. Hierdoor kunnen de <i>rep</i> en <i>cap</i> genen van het wildtype AAV uitgewisseld worden met de FIX-Padua expressiecassette van het ggo. De ontstane virusdeeltjes</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen De gevolgen van genoverdracht kunnen groot zijn, afhankelijk van de ernst van het ziektebeeld dat erdoor wordt veroorzaakt, in de normale gastheer, of, als er sprake is van een uitbreiding van het gastheer bereik, in een nieuwe gastheer.</p> <p>II Waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen De kans dat recombinatie en/of complementatie optreedt, is zeer klein. De kans dat dit leidt tot schadelijke gevolgen is verwaarloosbaar klein.</p> <p>III Het risico Het risico van genoverdracht is verwaarloosbaar klein.</p>



	<p>bevatten de FIX-Padua expressiecassette, maar zullen door de afwezigheid van de <i>rep</i> en <i>cap</i> genen nog steeds replicatiedeficiënt zijn. Aan een dergelijke uitwisseling zijn geen gevolgen verbonden, omdat de erbij ontstane virussen qua eigenschappen identiek zijn aan het ggo.</p> <p><i>Recombinatie met Adenovirus in de patiënt</i> In de patiënt kan door recombinitie rcAAV ontstaan met daarin (complete) sequenties van Ad5 of een ander helpervirus.</p> <p><i>Recombinatie met SV40 in de patiënt</i> Er bestaat een theoretische kans op recombinitie tussen het SV40 intron of de SV40 polyA sequentie in de FIX-Padua expressiecassette van het ggo en wildtype SV40. Homologe recombinitie zal vermoedelijk alleen leiden tot uitwisseling van het SV40 intron of de SV40 polyA sequentie.</p> <p><i>Conclusie</i> Door recombinitie of complementatie kunnen nieuwe recombinante (AAV) virusdeeltjes ontstaan. Als dit aanleiding zou geven tot ziektebeelden dan zouden de gevolgen groot kunnen zijn, maar alleen indien dit gepaard gaat met significante hinder of klachten.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</p> <p><i>Replicatiecompetente AAV virusdeeltjes</i> Met een bio-assay wordt de aanwezigheid van rcAAV in de batch getest. De gevoeligheid van de bio-assay is 1 rcAAV virusdeeltje per 2x10E9 genoom bevattende virusdeeltjes. Tot nu toe is in geen enkele van de batches geproduceerd met het baculovirus productie systeem rcAAV gedetecteerd.</p> <p><i>Virusdeeltjes met niet-vector sequenties</i> Tijdens de productie van de virusbatch kunnen gastheercel sequenties van de insectencellen en productiesysteem gerelateerde sequenties (bijvoorbeeld <i>rep</i>, baculovirus DNA) terechtkomen in AAV virusdeeltjes. Het is niet bekend of dergelijke sequenties in aparte AAV virusdeeltjes zitten of in AAV5-hFIXco-Padua virusdeeltjes waarin ook het FIX-Padua transgen aanwezig is. Aangezien de batch getest wordt op de afwezigheid van replicatiecompetente virusdeeltjes, zullen dit uitsluitend replicatiedeficiënte virusdeeltjes zijn. Om de aanwezigheid van dergelijke niet-vector gerelateerde sequenties te detecteren wordt de virusbatch gecontroleerd met verschillende qPCR assays specifiek voor deze sequenties. Sequentieanalyse van de AAV5-hFIXco-Padua vector toont</p>	
--	---	--



	<p>aan dat meer dan 99% van het DNA dat aanwezig is in AAV5-hFIXco-Padua het verwachte vector genoom betreft. Kleine hoeveelheden van baculovirus afkomstig DNA en sporen van insectencel DNA werden gedetecteerd. Tijdens kwaliteitstesten wordt er gecontroleerd op deze DNA onzuiverheden. Voor eerdere vectoren geproduceerd met het baculovirus expressie systeem was het aangetoond dat deze fragmenten geen coderende sequenties bevatten.</p> <p>De sporen van insectencel DNA welke gedetecteerd worden in AAV5-hFIXco-Padua zijn korte sequenties die willekeurig verspreid liggen over het insectencel genoom. Deze resultaten suggereren dat deze sequenties DNA onzuiverheden zijn welke aanwezig zijn in AAV5-hFIXco-Padua en niet het resultaat zijn van recombinatie, maar van specificiteit van het Rep packaging eiwit.</p> <p>De batch wordt getest op overgebleven baculovirus DNA door middel van een qPCR assay. Deze assay heeft een detectielimiet van 5.0×10^{-10} gram equivalenten per milliliter. De maximaal toegestane hoeveelheid is 8×10^{-9} gram equivalenten per 1.0×10^{13} genoomkopieën.</p> <p>AAV5-hFIXco-Padua is beoordeeld op full length Rep niveaus door middel van een qPCR. Deze assay detecteert de aanwezigheid van Rep sequenties in de batch. Deze assay heeft een detectielimiet van 2.2×10^7 kopieën per milliliter. De maximaal toegestane hoeveelheid is 9×10^8 kopieën per 1.0×10^{13} genoomkopieën.</p> <p>In een batch zitten zeer lage hoeveelheden van niet-vector gerelateerde sequenties (<i>rep</i>, baculovirus DNA, insectencel DNA) in aparte replicatiedeficiënte, al dan niet infectieuze, AAV virusdeeltjes. De kans dat derden blootgesteld worden aan dergelijke virusdeeltjes is onwaarschijnlijk. Doordat de virusdeeltjes replicatiedeficiënt zijn zullen ze tijdelijk in het lichaam aanwezig blijven. Uit preklinische en klinische studies is gebleken dat AAV virussequenties in het milieu terecht kunnen komen door shedding via urine, speeksel, bloed en sperma. Dit hoeft echter niet te betekenen dat het om infectieuze virusdeeltjes gaat. 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. Gezien de afbraak van virusdeeltjes in het lichaam en de relatief lage hoeveelheden virusdeeltjes met niet-vector gerelateerde sequenties, zal de hoeveelheid infectieuze virusdeeltjes met niet-vector gerelateerde sequenties die in het milieu terecht komt nagenoeg verwaarloosbaar klein zijn.</p>	
--	---	--



	<p>In het onwaarschijnlijke geval dat derden worden blootgesteld aan AAV virusdeeltjes met niet-vector gerelateerde sequenties, zoals het <i>rep</i> gen, baculovirus DNA of insectencel DNA, zijn er geen nadelige effecten te verwachten omdat <i>rep</i> 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 <i>rep</i> gen door het afweersysteem herkend en afgebroken worden. In het onwaarschijnlijke geval dat een eventuele infectie van derden optreedt zal dit een uitdovend effect zijn.</p> <p>Het risico van het optreden van schadelijke effecten in derden ten gevolge van in de batch aanwezige replicatiedeficiënte AAV virusdeeltjes met gastheercel sequenties van de insectencellen en productiesysteem gerelateerde sequenties (bijvoorbeeld <i>rep</i>, baculovirus DNA) is verwaarloosbaar klein.</p> <p><i>Complementatie met AAV in de patiënt</i> Aan het ontstaan van nieuwe virusdeeltjes als gevolg van complementatie met AAV <i>rep</i> en <i>cap</i> genen in de patiënt zijn geen schadelijke effecten verbonden. De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant. Daarbij dient het ggo én wildtype AAV én een helpervirus tegelijkertijd in een cel aanwezig te zijn, de kans hierop is zeer onwaarschijnlijk.</p> <p><i>Recombinatie met AAV in de patiënt</i> Aan het ontstaan van nieuwe virusdeeltjes als gevolg van recombinatie van het ggo met wildtype AAV zijn geen gevolgen verbonden, omdat de erbij ontstane virussen qua eigenschappen identiek zijn aan het ggo. Voor het optreden van een dergelijke gebeurtenis dienen bovendien het ggo én wildtype AAV én een helpervirus tegelijkertijd in een cel aanwezig te zijn hetgeen zeer onwaarschijnlijk is. De kans op het ontstaan van schadelijke effecten ten gevolge van recombinatie met wildtype AAV in de patiënt is verwaarloosbaar klein.</p> <p><i>Recombinatie met Adenovirus in de patiënt</i> De kans dat in de patiënt door recombinatie rcAAV ontstaan met daarin sequenties van Ad5 of een ander helpervirus is zeer onwaarschijnlijk omdat AAV virusdeeltjes een beperkte packaging capaciteit hebben en Ad5 te groot is om ingepakt te worden. Daarbij bevat het ggo geen helpervirus sequenties</p>	
--	--	--



	<p>waardoor de kans op homologe recombinatie onwaarschijnlijk is. Voor recombinatie dient daarbij het ggo én wildtype AAV én een helpervirus tegelijkertijd in een cel aanwezig te zijn, de kans hierop is zeer onwaarschijnlijk. Concluderend kan gesteld worden dat de kans op recombinatie tussen het ggo en helpervirussen en dat daardoor schadelijke effecten optreden verwaarloosbaar klein is.</p> <p><i>Recombinatie met SV40 in de patiënt</i> Voor recombinatie tussen het SV40 intron of de SV40 polyA sequentie in de FIX-Padua expressiecassette van het ggo en wildtype SV40 in de patiënt dienen het ggo en het SV40 virus allereerst in dezelfde cel aanwezig te zijn. SV40 is een virus dat van nature voorkomt bij apen. Door de geringe homologie van SV40 met het ggo kan gesteld worden dat recombinatie een onwaarschijnlijke gebeurtenis is. Daarbij zal homologe recombinatie alleen leiden tot uitwisseling van het SV40 intron of de SV40 polyA sequentie. Het is onwaarschijnlijk dat hierdoor een schadelijk effect zal optreden.</p> <p><i>Integratie in het genoom</i> Na infectie van een cel is de kans klein dat de virale vector in het genoom zal integreren, omdat voor een dergelijke integratie de activiteit van het <i>rep</i> genproduct nodig is en dit gen niet aanwezig is op de AAV vector. Het vector DNA zal voornamelijk episomaal in de getransfecteerde cellen aanwezig blijven. Uit andere studies met AAV vectoren die ook het <i>rep</i> gen missen, blijkt dat de integratiefrequentie in het genoom lager is dan de spontane mutatie frequentie in het humane genoom en dat daardoor de kans op insertionele mutagenese bij derden verwaarloosbaar klein is.</p> <p><i>Conclusie</i> Het ggo is replicatiedeficiënt en AAV is niet pathogeen. Na toediening kan het ggo in het milieu terecht komen door shedding. Doordat de virale vector replicatiedeficiënt is zal deze voor een beperkte tijd in het lichaam aanwezig blijven. De waarschijnlijkheid dat door recombinatie in de patiënt virussen met veranderde eigenschappen ontstaan is verwaarloosbaar klein. De kans dat derden blootgesteld worden aan het ggo en dat daardoor nadelige effecten optreden is verwaarloosbaar klein.</p>	
<p>D. Effecten op doel en niet doel populaties</p>		
<p>Effecten op de patiënten die aan de studie deelnemen (doelpopulatie) vallen niet onder het toetsingskader van de milieuregelgeving en worden om die reden hier niet direct in beschouwing genomen. De effecten op de patiënt vallen onder</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden In onderdeel A van tabel 2.2 is geconcludeerd dat AAV infecties veelvuldig voor komen, over de hele wereld, zonder dat daarmee enig ziektebeeld in verband wordt gebracht.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen (Over)expressie van het FIX-Padua eiwit kan mogelijk leiden tot trombose of een immunologische afweerreactie.</p>



<p>de medische verantwoordelijkheid van de behandelende arts.</p> <p>Effecten op niet-doelpopulaties zullen alleen op kunnen treden indien er sprake is van verspreiding van het ggo in de omgeving van de patiënt. Een aantal aspecten betreffende pathogene effecten is al in beschouwing genomen onder A.</p> <p>In dit onderdeel worden de eventuele effecten van het ggo beoordeeld op mensen in de omgeving van de patiënt. Bij de beoordeling moet rekening worden gehouden met de te verwachten blootstellingsweg en mate van blootstelling.</p> <p>De vraag is welke effecten het FIX-Padua kan hebben in de niet-doelpopulaties. Met effecten worden alle mogelijke (schadelijke en niet-schadelijke, zoals onder andere toxische en allergene) effecten bedoeld met uitzondering van gezondheidseffecten. Gezondheidseffecten worden onder onderdeel E besproken. Hiervoor moet worden nagegaan wat er bekend is over de effecten die FIX-Padua kan hebben op de mens. FIX-Padua is een normaal in de mens voorkomend genproduct, dat echter door de vector geproduceerd kan worden in de lever.</p>	<p>Mensen en primaten zijn bekende gastheren voor AAV. Afhankelijk van de blootstelling en de eigenschappen van de insertie kunnen er derden in de omgeving van de patiënt toxische of allergene effecten optreden.</p> <p>Het (stollings)factor IX eiwit is een serine protease die geproduceerd wordt door de lever. Het eiwit circuleert in de bloedbaan en is cruciaal voor bloedstolling. Indien derden blootgesteld worden aan het ggo kan dit resulteren in de (over)expressie van FIX-Padua. Een geringe overexpressie 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 meer zeer hoge FIX-Padua niveaus (>700% ten opzichte van normale niveau, supra-fysiologische niveaus) de kans aanwezig is op het optreden van trombose.</p> <p>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 eiwit kunnen optreden.</p> <p>Uit eerdere preklinische en klinische studies blijkt dat er geen andere nadelige effecten te verwachten zijn als gevolg van additionele expressie van FIX-Padua.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</p> <p>Sterke overexpressie van FIX-Padua tot supra-fysiologische niveaus kan mogelijk trombose veroorzaken. Om een dergelijke dosis te kunnen halen moet er echter zeker een vijf keer hogere dosis worden toegediend dan gepland is in de huidige studie. 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.</p> <p>In honden is de immunologische activiteit van het FIX-Padua eiwit onderzocht en er werden geen antilichamen of T-cel activiteiten tegen het FIX-Padua eiwit gevonden, ook niet na blootstelling met het FIX eiwit. Daarnaast is de mogelijke immunologische activiteit van het FIX-Padua eiwit onderzocht met onder andere epitooptools voorspellende software (EpiMatrix system). Hierbij 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</p>	<p>II Waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen</p> <p>De kans op schadelijke effecten ten gevolge van expressie van de FIX-Padua sequentie is verwaarloosbaar klein.</p> <p>III. Het risico</p> <p>Het risico van het optreden van mogelijke schadelijke effecten bij derden is verwaarloosbaar klein.</p>
---	---	--



	onwaarschijnlijk. De kans dat schadelijke effecten optreden bij derden is daarom verwaarloosbaar klein.	
E. Mogelijke effecten op menselijke gezondheid		
<p>Aspecten gerelateerd aan de pathogeniteit van het ggo zijn reeds aan de orde geweest in onderdeel A. Daar werd de vraag gesteld of expressie van de FIX-Padua sequentie door het ggo leidt tot verandering in weefseltropisme, gastheerbereik, en in de mate van infectiviteit en virulentie van de virale vector in vergelijking met wildtype AAV.</p> <p>Aspecten gerelateerd aan toxiciteit of allergeniteit en andere gezondheidsgelateerde effecten zijn onder D behandeld. Daarbij worden de eventuele toxische en allergene effecten van het ggo beoordeeld op mensen in de omgeving van de patiënt. Elementen die daarbij in beschouwing genomen moeten worden zijn toxiciteit of andere schadelijke effecten zoals een effect van het ggo op het immuunsysteem, en allergeniteit van het genproduct. Bij de beoordeling moet rekening worden gehouden met de te verwachten blootstellingsweg en mate van blootstelling.</p> <p>De vraag is welke effecten het FIX-Padua eiwit, met daarin één aminozuurverandering ten opzichte van de hFIX sequentie, kan hebben op de gezondheid van de mens. Gezien het gastheerbereik van de vector kunnen met name mensen geïnfecteerd worden. De mogelijke effecten anders dan op de menselijke gezondheid zijn reeds geïdentificeerd onder onderdeel D van deze tabel. Hiervoor moet worden nagegaan wat er bekend is over de effecten die het FIX-Padua eiwit kan hebben op de mens. FIX-Padua is een normaal in de mens voorkomend genproduct, dat echter door de vector geproduceerd kan worden in de lever.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijk gevolgen, indien ze optreden</p> <p>In onderdeel A van tabel 2.2 is geconcludeerd dat AAV infecties veelvuldig voor komen, over de hele wereld, zonder dat daarmee enig ziektebeeld in verband wordt gebracht. Ruim 90% van de volwassen humane populatie is seropositief voor AAV. Indien verhoogde persistentie of invasiviteit, of een uitbreiding van het gastheerbereik van de vector aanleiding zou geven tot ziektebeelden dan zouden de gevolgen groot kunnen zijn, maar alleen indien het ziektebeeld gepaard gaat met significante hinder of klachten.</p> <p>In D is geconcludeerd dat (over)expressie van het FIX-Padua eiwit mogelijk kan leiden tot trombose of een immunologische afweerreactie.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect</p> <p>In D is geconcludeerd dat de kans zeer klein is dat extreem hoge niveaus van FIX-Padua gehaald worden en dat de kans dat er een immunologisch verschil is tussen FIX en het FIX-Padua eiwit onwaarschijnlijk is.</p> <p>Daarnaast is het ggo replicatiedeficiënt en is AAV niet pathogeen. Onbedoelde blootstelling van derden aan AAV5-hFIXco-Padua zal resulteren in expressie van het humane FIX-Padua en inductie van een immuunrespons tegen de AAV5-hFIXco-Padua capsids eiwitten (naar verwachting niet tegen het geëxprimeerde transgen). Een immuunrespons tegen AAV5 capsids eiwitten zal asymptomatisch zijn, op dezelfde manier als dat een natuurlijk voorkomende infectie met AAV een asymptomatische immuunrespons 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.</p> <p>De waarschijnlijkheid van het optreden van mogelijke schadelijke effecten op de menselijke gezondheid is verwaarloosbaar klein.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen</p> <p>(Over)expressie van het FIX-Padua eiwit kan mogelijk leiden tot trombose of een immunologische afweerreactie.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen</p> <p>De kans op schadelijke effecten ten gevolge van expressie van FIX-Padua is verwaarloosbaar klein.</p> <p>III. Het risico</p> <p>Het risico van het optreden van mogelijke schadelijke effecten op de menselijke gezondheid is verwaarloosbaar klein.</p>



F. Mogelijke effecten op menselijke en diergezondheid ten gevolge van consumptie		
<p>Er zal uitsluitend sprake van consumptie zijn indien het een toepassing op dieren betreft, en de proefdieren na afloop van het experiment voor menselijke consumptie of als diervoeder worden aangeboden. Alleen in dat geval wordt dat aspect in beschouwing genomen. Daarbij moet worden nagegaan in hoeverre consumptie van de tot expressie gebrachte genproducten kunnen leiden tot gezondheidsschade voor mens of dier.</p> <p>In de onderhavige aanvraag is geen sprake van consumptie.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden Er is geen sprake van consumptie.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Niet van toepassing.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen Niet van toepassing.</p> <p>II Waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen Niet van toepassing.</p> <p>III. Het risico Niet van toepassing.</p>
G. Effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu		
<p>In het algemeen wordt hieronder verstaan de negatieve effecten die ggo's kunnen hebben op (micro-) organismen die voorkomen als commensalen, of die verantwoordelijk zijn voor kringlopen van nutriënten of afbraak van organisch materiaal.</p> <p>De vraag is of het expressieproduct van FIX-Padua, met daarin één aminozuurverandering ten opzichte van de hFIX sequentie, een effect heeft op andere microbiële populaties in mens, dier of het milieu.</p> <p>Expressie van het gen kan alleen plaatsvinden in levende cellen van de gastheer, de mens. Effecten in het milieu in het algemeen kunnen daarmee worden uitgesloten.</p> <p>Er is ook geen directe causale relatie te maken tussen expressie van de gastheer en micro-organismen die in of op de mens voorkomen.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijk gevolgen, indien ze optreden Het in deze studie te gebruiken ggo zal, zoals kenmerkend is voor virussen, buiten een gastheer geen activiteit vertonen. Er is ook geen directe causale relatie gevonden tussen expressie van de gastheer en micro-organismen die in of op de mens voorkomen.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Er zijn geen potentiële effecten geïdentificeerd. De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen Er zijn geen indicaties beschreven die duiden op een mogelijk gevolg.</p> <p>II Waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p> <p>III. Het risico Het risico is verwaarloosbaar klein.</p>
H. Veranderingen in de medische of veterinaire praktijk		
<p>Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde, directe en indirecte milieueffecten van de veranderde medische en veterinaire praktijk ten gevolge van de toepassing van de ggo's.</p> <p>Hieronder wordt verstaan dat de toepassing van het ggo kan leiden tot een verminderd effect en afgenomen toepasbaarheid van geneesmiddelen.</p> <p>De vraag is of expressie van FIX-Padua zal leiden tot een afname van de toepasbaarheid van geneesmiddelen.</p>	<p>I. Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden Expressie van FIX-Padua zoals dit in de aanvraag wordt beschreven zal niet leiden tot een negatief effect dat gevolgen heeft voor behandelmethoden die beschikbaar zijn in de huidige medische en veterinaire praktijk. Nagegaan moet worden of het FIX-Padua eiwit het werkingsmechanisme van een geneesmiddel kan verstoren.</p> <p>II. Waarschijnlijkheid van het optreden van het schadelijke effect Er zijn geen potentiële effecten geïdentificeerd. Het FIX-Padua eiwit komt van nature voor in de mens. De werking van geneesmiddelen zal in de patiënten dan ook niet anders zijn</p>	<p>I. Mogelijke gevolgen Er zijn geen gevolgen te verwachten.</p> <p>II Waarschijnlijkheid dat de gevolgen zich voordoen De vraag naar de waarschijnlijkheid is daarom niet relevant.</p> <p>III. Het risico Het risico is verwaarloosbaar klein.</p>



	dan in de natuurlijke populatie waarin FIX-Padua van nature aanwezig is.	
--	--	--



DEEL 3. BEPALING VAN HET ALGEHELE RISICO VAN HET GGO

Hieronder wordt de milieurisicoanalyse uitgevoerd van de voorgestelde introductie van een replicatiedeficiënt AAV met daarin gekloneerd de sequentie coderend voor het humane factor IX-Padua eiwit. Potentieel significante risico's zijn die risico's waarvan niet is vastgesteld dat deze risico's geen significante effecten hebben.

Schatting van het risico dat aan de toepassing van alle ingebrachte sequenties is verbonden	Strategieën voor risicobeheer bij de doelbewuste introductie van de GGO's. <i>(Eventuele aanvulling op strategieën die reeds zijn opgenomen in de aanvraag)</i>	Bepaling van het algehele risico van het ggo
De te gebruiken virale vector AAV5-hFIXco-Padua is replicatiedeficiënt. AAV infecties komen veelvuldig voor, over de hele wereld, zonder dat daarmee enig ziektebeeld in verband wordt gebracht. Het risico op schadelijke effecten ten gevolge van expressie van FIX-Padua is verwaarloosbaar klein. De kans dat recombinitie en/of complementatie optreedt met andere virussen waardoor infectieuze recombinante virussen ontstaan is zeer klein. De kans dat dit leidt tot schadelijke gevolgen is verwaarloosbaar klein.	Aangezien de risico's verwaarloosbaar klein zijn is het voorschrijven van additionele risicobeheersmaatregelen overbodig.	Het algehele risico is verwaarloosbaar klein.