



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

Gestandaardiseerde milieurisicobeoordeling voor humane cellen genetisch gemodificeerd met virale vectoren afgeleid van muizen gamma-retrovirussen dan wel humaan immunodeficiëntievirus, waarbij geen risico bestaat op de vorming van replicatiecompetent virus en waarbij residuele infectieuze retrovirale of lentivirale partikels afwezig zijn.

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

#### 1.1 Het uitgangsgenoom

##### *Humane cellen*

De humane cellen zijn afkomstig van de proefpersoon zelf (autoloog) dan wel van een donor (allogeen). Humaan immunodeficiëntievirus (HIV) positieve proefpersonen en HIV positieve donoren zijn uitgesloten van studies waarbij lentivirale vectoren worden toegepast.

##### *Muizen gamma-retrovirus*

De retrovirale vector is gebaseerd op een muizen gamma-retrovirus. Dit virus behoort tot de familie *Retroviridae* en het genus *Gammaretrovirus*. Het wildtype genoom bevat drie open leesramen coderend voor de structurele genen *gag*, *pol* en *env*. Aan het uiteinde van het genoom bevinden zich aan weerszijden de *Long Terminal Repeats* (LTR's), welke een rol spelen bij reverse transcriptie, integratie van het provirus in het genoom van de gastheer en regulatie van de synthese van het retrovirale RNA. Verder bevat het genoom cis-acterende sequenties betrokken bij virale replicatie, packaging en genexpressie.

Muizen gamma-retrovirussen kunnen worden verspreid via bloed en van moeder op nageslacht. Een infectie met muizen gamma-retrovirussen kan resulteren in tumorvorming in de gastheer. Tot op heden is er geen bewijs gevonden dat muizen gamma-retrovirussen infecties in mensen kunnen veroorzaken.

##### *Humaan immunodeficiëntievirus*

De lentivirale vector is gebaseerd op HIV. Dit virus behoort tot de familie *Retroviridae* en het genus *Lentivirus*. Het wildtype genoom bevat negen open leesramen coderend voor de structurele genen *gag*, *pol* en *env*, de regulatoire genen *tat* en *rev* en de accessoire genen *vif*, *vpr*, *nef*, en afhankelijk van het type *vpu* (in geval van HIV-1) dan wel *vpx* (in geval van HIV-2). Aan het uiteinde van het genoom bevinden zich aan weerszijden de LTR's, welke een rol spelen bij reverse transcriptie, integratie van het provirus in het genoom van de gastheer en regulatie van de synthese van het lentivirale RNA. Verder bevat het genoom cis-acterende sequenties betrokken bij virale replicatie, packaging en genexpressie.

Het gastheerbereik van HIV is beperkt tot mensen en apen. HIV wordt verspreid via seksueel contact, bloedtransfusie, besmette injectiespuiten en van moeder naar kind gedurende de zwangerschap, bevalling en via borstvoeding. Infectie met HIV kan resulteren in AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*). Een HIV infectie wordt doorgaans onder controle gehouden met behulp van antiretrovirale medicatie.

#### 1.2 De modificatie

Het gebruikte transgen codeert niet voor sequenties die in staat zijn de replicatiedeficiënte retrovirale dan wel lentivirale vector te complementeren.

#### 1.3 Het ggo

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

De gebruikte virale vector is gebaseerd op een muizen gamma-retrovirus dan wel HIV. De LTR's in het virale vectorgenoom dienen zelf-inactiverend (SIN) te zijn voor studies waarbij lentivirale vectoren worden toegepast. De gebruikte productiecellen zijn vrij van HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2 en andere relevante retrovirussen en lentivirussen die kunnen leiden tot complementatie dan wel recombinatie van de retrovirale dan wel lentivirale vector.



## *Constructie van de genetisch gemodificeerde cellen*

Voor de constructie van de genetisch gemodificeerde cellen is een replicatiedeficiënte retrovirale vector dan wel replicatiedeficiënte lentivirale vector gebruikt. Het virusdeeltje kan slechts éénmaal een cel infecteren, waardoor het effect uitdovend zal zijn. Met de virusdeeltjes worden cellen van de proefpersoon dan wel de donor *ex vivo* getransduceerd waarna het virale vectorgenoom stabiel geïntegreerd wordt in het genomisch DNA van de cel.

### *Virulentie en stabiliteit van het ggo*

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

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

## **1.4 Werkzaamheden**

### *Productie*

De productie van de genetisch gemodificeerde retrovirale dan wel lentivirale partikels en de genetisch gemodificeerde humane cellen maakt geen onderdeel uit van de aanvraag. De genetisch gemodificeerde retrovirale dan wel lentivirale partikels en de genetisch gemodificeerde humane cellen zijn geproduceerd onder (*current*) *Good Manufacturing Practice* (GMP) dan wel onder de principes van (*current*) GMP.

Het productieproces is van dusdanige aard dat er geen residuele infectieuze retrovirale dan wel lentivirale partikels aanwezig zijn in het medisch product dat aan de proefpersoon wordt toegediend. Tevens is er geen replicatiecompetent retrovirus dan wel replicatiecompetent lentivirus aanwezig in het medisch product dat aan de proefpersoon wordt toegediend.

### *Transport*

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

### *Opslag*

De genetisch gemodificeerde humane cellen worden opgeslagen in een gesloten, breukvaste, lekdichte dubbele houder in een ruimte met beperkte toegang. Monsters afkomstig van de proefpersonen die de genetisch gemodificeerde humane cellen kunnen bevatten, worden opgeslagen conform de opslag van reguliere patiëntenmonsters.

### *Preparatie en toediening*

Preparatie en toediening van de genetisch gemodificeerde humane cellen vinden plaats conform standaard ziekenhuishygiënische maatregelen.

### *Monsterafname en verwerking*

Afnemen van monsters van de proefpersonen die de genetisch gemodificeerde humane cellen kunnen bevatten en verwerking van die monsters vinden plaats conform standaard ziekenhuishygiënische maatregelen. Monsters afkomstig van proefpersonen uit studies waarbij humane cellen getransduceerd met retrovirale vectoren worden toegepast, die de genetisch gemodificeerde humane cellen kunnen bevatten, worden niet in kweek gebracht.

### *Afvalverwerking en besmet materiaal*

Afval dat de genetisch gemodificeerde humane cellen bevat dan wel in aanraking is geweest met de genetisch gemodificeerde humane cellen gedurende preparatie en toediening, wordt afgevoerd als specifiek ziekenhuisafval dan wel als afval dat ggo's bevat. Afval van monsters, monsterafname en van verwerking van monsters afkomstig van de proefpersonen die de genetisch gemodificeerde humane



cellen kunnen bevatten, wordt afgevoerd als specifiek ziekenhuisafval dan wel als afval dat ggo's bevat.

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

### **1.5 Interactie met het milieu**

De getransduceerde cellen kunnen buiten de gastheer (de proefpersoon) niet overleven. In de getransduceerde cellen is de virale vector stabiel geïntegreerd.

## **2. MILIEURISICOBEOORDELING**

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

### **2.1 Algemeen**

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

### **2.2 Het ggo**

#### *De genetisch gemodificeerde cellen*

Het ggo bestaat uit humane cellen welke getransduceerd zijn met een replicatiedeficiënte retrovirale dan wel replicatiedeficiënte lentivirale vector.

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

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

Na transductie van de cel zal de virale vector in het gastheergenoom integreren. Hierdoor bestaat de kans op ontregeling van genen betrokken bij proliferatie waardoor tumoren kunnen ontstaan. Mogelijke schadelijke effecten die zouden kunnen optreden door expressie van de genproducten zoals aanwezig in de expressiecassette, zullen afhankelijk zijn van de eigenschappen van de specifieke inserties.

#### *Schadelijke effecten gerelateerd aan recombinatie met of complementatie van virale sequenties uit het geïntegreerde construct*

De virale vector kan in theorie recombineren indien een retrovirus of lentivirus in dezelfde cel aanwezig is als de vector. Hierdoor is er een theoretische kans op het ontstaan van recombinant, replicatiecompetent virus en verspreiding naar derden en niet-doelwitorganismen, waarbij mogelijke schadelijke effecten die dientengevolge zouden kunnen optreden afhankelijk zullen zijn van de eigenschappen van de gevormde deeltjes.

De verloren functies van de virale vector kunnen in theorie gecompenseerd worden indien een retrovirus of lentivirus in dezelfde cel aanwezig is als de vector. De expressie-producten van het wildtype virus kunnen in dat geval gebruikt worden door de vector, wat de replicatiedeficiënte vector de mogelijkheid biedt te repliceren en andere cellen te infecteren. Hierdoor is er een theoretische kans op verspreiding naar derden en niet-doelwitorganismen, waarbij mogelijke schadelijke effecten die dientengevolge zouden kunnen optreden afhankelijk zullen zijn van de eigenschappen van de gevormde deeltjes.



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

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

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

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

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

### *Waarschijnlijkheid van de kans op mobilisatie van of recombinatie met de virale vector met andere virussen*

Het is zeer onwaarschijnlijk dat in de getransduceerde cellen recombinatie optreedt tussen de retrovirale dan wel lentivirale vector en humane retrovirussen die mogelijk in de cellen aanwezig kunnen zijn, aangezien de mate van homologie tussen deze virussen gereduceerd is door deleties en mutaties in de virale vector. Tevens is de waarschijnlijkheid dat de verloren functies van de virale vector gecompenseerd worden, indien een retrovirus dan wel lentivirus in dezelfde cel aanwezig is als de virale vector, verwaarloosbaar klein.

Tot op heden is er geen bewijs gevonden dat muizen gamma-retrovirussen infecties in mensen kunnen veroorzaken. Het niet uitsluiten van proefpersonen dan wel donoren met een HTLV infectie bij *ex vivo* toepassingen met retrovirale dan wel lentivirale vectoren heeft geen invloed op de milieurisicobeoordeling. HIV positieve proefpersonen en HIV positieve donoren zijn uitgesloten van studies waarbij lentivirale vectoren worden toegepast. Daarnaast is de lentivirale transfervector SIN. Dit houdt in dat uit de vector een deel van de 3' LTR, het zogenaamde U3 domein, verwijderd is. Hierdoor wordt, in het geval van een infectie van de getransduceerde cel met een wildtype lentivirus, de kans op mobilisatie van de vector uit het genoom van de gastheer aanzienlijk gereduceerd.

In theorie is er ook een mogelijkheid tot het ontstaan van replicatiecompetent virus door recombinatie van de virale vector met humane endogene retrovirale (HERV) sequenties. HERV sequenties zijn aanwezig in het humane genoom. Door accumulatie van vele inactiverende mutaties coderen deze sequenties niet voor replicatiecompetente HERVs. Voor recombinatie tussen de virale vector en HERV sequenties is de aanwezigheid van sequentiehomologie noodzakelijk. Aangezien er beperkte sequentiehomologie aanwezig is en de virale vector slechts een gedeelte van het virale genoom bevat, is het onwaarschijnlijk dat recombinatie met HERV sequenties zal plaatsvinden.

De kans dat er recombinatie dan wel complementatie optreedt in de proefpersoon dan wel in derden is op grond van de bovenstaande overwegingen verwaarloosbaar klein.

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

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

## **2.6 Maatregelen voor risicobeheer**

Er zijn vanuit milieurisico oogpunt geen maatregelen voor risicobeheer noodzakelijk.

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

In bijlage II, onder D1, van de Richtlijn 2001/18 wordt een aantal punten opgesomd die, waar passend,



dienen als basis voor de conclusies over de mogelijke milieueffecten van de voorgenomen introductie van de ggo's in het milieu. Voor de volledigheid van de risicobeoordeling worden al deze punten hieronder opgesomd met hun bijbehorende conclusies.

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

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

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

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

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

De voor de vervaardiging gebruikte virale vector is stabiel geïntegreerd in het cellulaire genoom en zal niet als residueel deeltje aanwezig zijn. Daarnaast is er geen replicatiecompetent retrovirus dan wel replicatiecompetent lentivirus aanwezig in het medisch product dat aan de proefpersoon wordt toegediend. De kans dat er recombinatie dan wel complementatie optreedt in de proefpersoon dan wel in derden is verwaarloosbaar klein.

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

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

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

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

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

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



---

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

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

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

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

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

Toepassing van het ggo zal niet leiden tot veranderingen in de medische praktijk die nadelige effecten hebben op mens en milieu. Het doel van de studie(s) is om nieuwe medische therapieën te ontwikkelen. Hier zijn geen nadelige gevolgen voor mens of milieu aan verbonden.