



## Milieurisicobeoordeling behorend bij aanvragen voor een introductie in het milieuvergunning voor overige doeleinden vergunning voor veterinaire toepassingen van naakt DNA.

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

Kenmerkend voor aanvragen voor veterinaire toepassingen van naakt DNA is dat geen ggo's worden toegediend aan het proefdier, maar zogenaamd "naakt DNA"; er is pas een kans op het ontstaan van ggo's in het lichaam van het proefdier nadat deze het DNA heeft toegediend gekregen. Het eventuele ontstaan van ggo's is een direct gevolg van deze toediening.

#### A. Het ouderorganisme

1. Het ouderorganisme van het bij de toepassing ontstane ggo is de dierlijke lichaamscel waarin het toegediende DNA wordt opgenomen.
2. Voor de MRB is het slechts van belang om onderscheid te maken tussen twee typen cellen waarin het DNA kan worden opgenomen: afhankelijk van de toedieningswijze kan het gaan om somatische cellen en/of om cellen die behoren tot de kiembaan.
3. Uitsluitend kiembaancellen kunnen aanleiding geven tot verticale transmissie van genetisch materiaal naar nakomelingen.

#### B. De genetische modificatie:

4. De genetische modificatie wordt bewerkstelligd door toediening van naakt DNA, dat geen onderdeel uitmaakt van een organisme, daaronder mede begrepen een virus of virale vector. Het naakte DNA kan ieder gewenste samenstelling hebben, zolang voldaan wordt aan de eisen die worden gesteld in de punten 5 – 13.
5. Het naakte DNA bevat geen sequenties die bacteriën resistentie bieden tegen antibiotica, met uitzondering van een eventueel aanwezig antibioticum-resistentie gen uitsluitend tegen kanamycine of neomycine.
6. Het naakte DNA bevat geen sequenties die afkomstig zijn, of afgeleid zijn, van een voor eukaryoten infectieus virus, met uitzondering van een eventueel aanwezige CMV-promotor, een RSV-promotor, een SV40 polyadenyleringssignaal en/of een SV40 nucleaire 'targeting' sequentie.
7. De CMV promotorr is de *Human cytomegalovirus* (HCMV, HHV-5) *major immediate-early protein* gene promotor met een sequentie van maximale lengte zoals deze is vastgelegd in de Nucleotide Database van het National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>, 1 juli 2013) (Genbank Accessie nummer M60321).
8. HCMV is een DNA virus dat behoort tot de *Herpesviridae*. HCMV (HHV-5) is het prototype virus van de *humane betaherpesvirus* familie waartoe ook *humaan herpesvirus 6* (HHV-6) en HHV-7 behoren. *Betaherpesvirussen* vertonen strikte gastheerspecificiteit: de virussen kunnen uitsluitend de gastheersoort infecteren waaruit ze zijn geïsoleerd<sup>1</sup>. *Herpesviridae* die significante homologie vertonen met de humane *Herpesviridae* komen bij dieren alleen voor bij niet-humane primaten.
9. De RSV promotor is de *Rous sarcoma virus* (Schmidt-Ruppin) promotor met een sequentie van maximale lengte zoals deze is vastgelegd in de Nucleotide Database van het NCBI (Genbank Accessie nummer J02025.1).

<sup>1</sup> Literatuur: Staras SA, *et al.* (2006) Clin Infect Dis. Nov 1;43(9):1143-51; Lilja AE and Mason PW. (2012) Vaccine. Nov 19;30(49):6980-90; Sinzger C *et al.* (2008) Curr Top Microbiol Immunol.;325:63-83; Reeves M and Sinclair J. (2008) Curr Top Microbiol Immunol.;325:297-313; Jarvis MA and Nelson JA. (2007) J Virol. Mar;81(5):2095-101; Bronzini M. *et al.* (2012) J Virol. Jun;86(12):6875-88; Spaete RR and Mocarski ES. (1987) Proc Natl Acad Sci U S A. Oct;84(20):7213-7



10. Het *Rous Sarcoma Virus* (RSV), waarvan de RSV promotor is afgeleid, is een type C aviaire retrovirus dat van nature kippen infecteert. Een RSV infectie bij dieren, met uitzondering van de kip, leidt niet tot een productieve infectie vanwege de inactivatie van type C retrovirussen door serum. Deze inactivatie treedt op door activatie van het klassieke complement systeem. Tevens spelen antilichamen een rol die gericht zijn tegen specifieke koolhydraat antigenen aanwezig in glycoproteïnes en glycolipiden zoals die zich bevinden in de envelop van allerlei virale deeltjes geproduceerd door zoogdiercellen<sup>2</sup>.
11. Het SV40 polyadenyleringssignaal is een sequentie van het *Simian virus 40* (SV40) met een maximale lengte van rond de 200-300 basenparen. Een polyadenyleringssignaal zorgt ervoor dat er een poly-A staart aan het mRNA wordt gezet om het mRNA te stabiliseren. Het motief dat herkend wordt op het mRNA is meestal AAUAAA, maar er bestaan alternatieve motieven. Het motief wordt herkend door de cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF), waarna er een splitsing volgt van het mRNA ongeveer 30 basen 'downstream' van het polyA signaal. Alle in eukaryoten tot expressie komende sequenties bezitten een polyA signaal<sup>3</sup>.
12. De SV40 nuclear targeting sequentie is een sequentie van gemiddeld 100 bp van het *Simian virus 40* (SV40). Een nucleair targeting sequentie in het DNA dat via een niet-virale methode in de cel is gebracht, kan ervoor zorgen dat er een binding is met peptiden die een 'nuclear localization signal' (NLS) bevatten, waardoor transport van het DNA naar de celkern bevordert wordt. Een van de sequenties die toegepast worden is een sequentie van het *Simian virus 40* (SV40)<sup>3</sup>.
13. SV40 is een virus dat van nature voorkomt bij apen. In apen is een infectie met het virus asymptomatisch. Natuurlijke infecties van SV40 bij mensen worden beschouwd als een zeldzame gebeurtenis, die beperkt blijft tot mensen die in contact komen met geïnfecteerde apen<sup>3,4</sup>.

### C. Het GGO:

14. De genetisch gemodificeerde dierlijke cel bevat het in onderdeel B beschreven gekarakteriseerde DNA. De verwachting is dat de genen die op dit DNA aanwezig zijn tot expressie zullen komen op basis van de regulatoire elementen die daartoe op het DNA zijn aangebracht.
15. Dierlijke cellen kunnen buiten het lichaam van het proefdier komen, maar kunnen zich daar onder milieumomstandigheden, zonder dat er bijzondere voorzorgen worden genomen voor hun instandhouding, niet handhaven en zullen direct na vrijkomen worden geïnactiveerd. Dit is eveneens het geval voor genetisch gemodificeerde dierlijke cellen die in het lichaam van het proefdier zijn ontstaan. De genetische modificaties hebben geen invloed op de overleving van deze cellen in het milieu.
16. Indien het naakte DNA virale sequenties bevat (een CMV-promotor, een RSV-promotor, een SV40 polyadenyleringssignaal en/of een SV40 nucleaire 'targeting' sequentie) kan daardoor homologe recombinatie optreden met wildtype virussen indien een cel tegelijkertijd het naakte DNA bevat en met een virus geïnfecteerd is. De vorming van recombinante virussen kan optreden door homologe recombinatie tussen de aanwezige virale sequenties en wildtype virussen. De mate van sequentiehomologie tussen de virale sequentie en een virus is mede bepalend voor de kans op het optreden van recombinatie.

---

<sup>2</sup> Literatuur: Bova-Hill C *et al.* (1991) *J. Virol.* 65: 2073-2080; Welsh RM *et al.* (1975) *Nature* 257(5527):612-4; Linial, M., and R. A. Weiss. (2001). p. 2123-2139. in D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa; Takeuchi *et al.* (1997) *J Virol.* 71(8):6174-8.

<sup>3</sup> Referenties: Van den Berg JH & Haanen JBAG (2010). Gene therapy with naked DNA: potential steps towards deregulation. COGEM onderzoeksrapport CGM/2010-06; COGEM adviezen CGM/041223-02, CGM/101026-06, CGM/120919-01 en CGM/ 120927-01.

<sup>4</sup> Literatuur: Horváth LB. (1965) *Acta Microbiol Acad Sci Hung.* 12(2):201-5; Shah KV. (1966) *Proc Soc Exp Biol Med.* Jan;121(1):303-7; Martini F, *et al.* (2007) *Infect Agent Cancer.* Jul 9;2:13; Vanchiere JA, *et al.* (2005) *J Med Virol.* Mar;75(3):447-54; Minor P, *et al.* (2003) *Virology.* Sep 15;314(1):403-9; <http://www.cancer.gov/newscenter/newsfromnci/2004/sv40> (1 juli 2013)



#### **D. Milieugerelateerde gegevens afkomstig uit eerdere experimenten**

17. Zowel in Nederland als in het buitenland is een groot aantal experimenten bekend waarbij naakt DNA is toegediend aan proefpersonen en proefdieren
18. Uit deze experimenten blijkt dat eigenschappen die op het toegediende DNA gecodeerd liggen, tot expressie komen in het lichaam van het proefdier. Hieruit kan worden afgeleid dat het toegediende DNA wordt opgenomen in lichaamscellen; er wordt vanuit gegaan dat er hierbij genetisch gemodificeerde cellen kunnen en zullen ontstaan.
19. Uit eerdere studies<sup>1</sup> zijn geen gegevens bekend waaruit zou blijken dat er vanuit een proefdier, waaraan naakt DNA is toegediend, verspreiding van het toegediende naakte DNA in het milieu optreedt; nadelige effecten als gevolg van shedding van toegediend naakt DNA zijn nog nooit beschreven.
20. Verticale transmissie van naakt DNA vormt uitsluitend een risico indien het DNA direct in de geslachtsklieren wordt geïnjecteerd. Uit experimentele gegevens in proefdieren blijkt dat indien het naakte DNA na toediening buiten de geslachtsklieren de circulatie bereikt het snel wordt afgebroken in het bloed. In proefdieren (muizen en varkens) en proefpersonen blijkt dat injectie van naakt DNA buiten de geslachtsklieren niet leidt tot kiembaantransmissie<sup>1</sup>. Door toediening buiten de geslachtsklieren en afbraak in de circulatie wordt blootstelling van kiembaancellen aan het DNA afdoende voorkomen, en wordt opname van DNA door kiembaancellen effectief voorkomen.

#### **E. Proefdier gebonden aspecten:**

21. De toedieningswijze betreft tatoeage of directe injectie in de huid of dwarsgestreepte spieren.
22. Het naakte DNA wordt niet geïnjecteerd in de geslachtsklieren.
23. Er is geen sprake van consumptie van het proefdier, waaraan naakt DNA is toegediend, en alle daarvan afgeleide producten indien deze voor diervoeder of humane consumptie bestemd zijn.

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

24. Voorafgaand aan de toediening van het naakte DNA wordt de toedieningsplaats adequaat ontsmet met een op alcohol gebaseerd desinfectans.
25. Na afloop van de toediening wordt de toedieningsplaats gereinigd met steriel water of een steriele zoutoplossing, om eventueel nog aanwezig DNA te verwijderen. Daarna wordt de toedieningsplaats op steriele wijze droog gemaakt.
26. Algemene veterinaire hygiënische maatregelen worden in acht genomen tijdens de toediening van het naakte DNA, tijdens eventuele monsternames bij het proefdier, bij eventuele bewerking van monsters die in het kader van de studie plaatsvindt en bij de verwerking van afval.
27. Tijdens de veterinaire studie mogen kanamycine en neomycine niet gebruikt worden op de toedieningsplaats indien het naakte DNA een antibioticum-resistentie gen tegen uitsluitend kanamycine of neomycine bevat.

#### **G. Productie en Batch**

28. De productie van de batch vindt niet plaats onder de aangevraagde werkzaamheden. Alle productiehandelingen met het naakte DNA vinden plaats volgens current Good Manufacturing Practice (cGMP).
29. De te gebruiken batch voldoet aan de volgende criteria:
  - (a) Tijdens de productie zal de batch onderhevig zijn aan diverse algemeen aanvaarde kwaliteitstesten, om identiteit, zuiverheid en steriliteit van het product te waarborgen.
  - (b) Naast het beschreven DNA preparaat wordt aan de batch geen ander nucleïnezuur, daaronder mede begrepen oligonucleotiden, van welke aard dan ook toegevoegd.



- (c) De batch is vrij van verontreinigend DNA en is vrij van organismen, daaronder mede begrepen al dan niet replicatie competente virussen.
- (d) De batch zal worden verworpen indien niet aan de gestelde kwaliteitscontroles wordt voldaan.



## DEEL 2. MILIEURISICOBEOORDELING VAN DE AANGEVRAAGDE WERKZAAMHEDEN

Tabel 2.1 milieurisicobeoordeling van de toediening van naakt DNA voor veterinaire toepassingen:

<b>Bepaling van eigenschappen die schadelijke effecten kunnen hebben</b> <i>(Identificatie en toelichting "oorzaak-gevolg" relaties)</i>	<b>Evaluatie van de mogelijke gevolgen van elk schadelijk effect, indien dit optreedt, en evaluatie van de waarschijnlijkheid van het optreden</b> <i>(rekening houdend met de wijze van introductie en het introductie milieu)</i>	<b>Schatting van het risico dat aan de betreffende eigenschap van het GGO verbonden is</b>
<b>A. Persistentie en invasiviteit</b>		
<p>Het naakte DNA preparaat wordt toegediend met een dosis die gebruikelijk is in veterinaire protocollen. Na toediening aan een proefdier zal het naakte DNA enige tijd aanwezig blijven in het lichaam. Afhankelijk van de omstandigheden kan dit een periode beslaan van enige weken tot maanden. Gedurende deze periode kunnen de volgende interacties van het naakte DNA met andere organismen optreden:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Na toediening van het naakte DNA preparaat kunnen in de proefdier genetisch gemodificeerde lichaamscellen ontstaan die kunnen vrijkomen uit het lichaam en zich in het milieu kunnen verspreiden. Daarnaast bestaat de mogelijkheid dat het naakte DNA zelf vrijkomt in het milieu en in contact komen met andere eukaryote cellen.</li><li>2. Indien het naakte DNA in contact komt met kiembaancellen, dan kunnen er genetisch gemodificeerde kiembaancellen ontstaan.</li><li>3. Het toegediende naakt DNA kan mogelijk in zijn geheel of gedeeltelijk worden geïntegreerd in een genoom van een virus, bijvoorbeeld door recombinatie.</li><li>4. Het naakte DNA kan tijdens of na de toediening in contact komen met bacteriën. Dit zal hoofdzakelijk kunnen gebeuren op de toedieningsplaats. In deze bacteriën kan het DNA gehandhaafd blijven als plasmide of door integratie in het genoom. Het kan zich verspreiden in het milieu doordat verspreiding van de bacteriën plaatsvindt, of door horizontale genoverdracht naar andere bacteriën.</li></ol>	<p><b>Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden, en de waarschijnlijkheid van het schadelijke effect.</b> De gevolgen die kunnen optreden zijn afhankelijk van de eigenschappen die op het naakte DNA gecodeerd worden. Onder omstandigheden zou het bijvoorbeeld kunnen gaan om de productie van toxische eiwitten, of van eiwitten die de homeostase in het lichaam beïnvloeden. Omdat het gaat om veterinaire toepassingen van naakt DNA, kan er vanuit worden gegaan dat de expressie van dergelijke eiwitten in een proefdier gewenst kan zijn. Expressie is ongewenst in dieren die niet aan de proef deelnemen.</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. De kans op verspreiding van het toegediende naakte DNA door shedding is zeer laag. De achtergrond hiervan is: indien door directe injectie in het lichaam toegediend DNA de circulatie bereikt wordt het snel afgebroken in het bloed. In het lichaam zal het DNA worden blootgesteld aan nucleasen die een groot gedeelte van het DNA afbreken. Alleen kleine DNA fragmenten kunnen de nieren passeren en via de urine in het milieu terecht komen. In het ergste geval zal na toediening een kleine hoeveelheid van het naakte DNA vanuit het proefdier vrijkomen in het milieu. Het is onwaarschijnlijk dat het toegediende DNA in relevante hoeveelheden vrijkomt uit de patiënt, op een manier waardoor anderen in contact komen met het DNA, zodanig dat het opgenomen kan worden in lichaamscellen. Het DNA zal bovendien ook in het milieu worden blootgesteld aan afbraak, onder andere door nucleasen. De kans dat het toegediende naakte DNA in contact komt met andere eukaryote cellen en wordt opgenomen is daarom zeer onwaarschijnlijk. Lichaamszellen van het proefdier, die het toegediende DNA hebben opgenomen, kunnen vrijkomen in het milieu.</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Het risico dat genetisch gemodificeerde lichaamscellen vrijkomen in het milieu en vervolgens kunnen persisteren of dat het naakte DNA vrijkomt in het milieu en wordt opgenomen in eukaryote cellen, is verwaarloosbaar klein.</li><li>2. Gezien de toedieningswijze buiten de geslachtsklieren is het risico dat genetisch gemodificeerde kiembaancellen ontstaan verwaarloosbaar klein.</li><li>3. Er zijn geen virale sequenties in het naakte DNA aanwezig, met uitzondering van een CMV-promotor, een RSV-promotor, een SV40 polyadenyleringssignaal en/of een SV40 nucleaire 'targeting' sequentie, die kunnen leiden tot recombinatie of andere interacties met virussen, waardoor milieurisico's zouden kunnen ontstaan. Het risico dat naakt DNA zonder virale sequenties, met uitzondering van de hierboven genoemde sequenties, wordt ingebouwd in een virus en hierdoor naar derden wordt verspreid is verwaarloosbaar klein.</li></ol> <p><u>CMV-promotor</u> De mogelijkheid van recombinatie tussen de HCMV promotor en herpesvirussen die voorkomen in niet-humane primaten kan niet volledig worden uitgesloten. De risico's dat, door toepassing van de HCMV promotor in andere proefdieren, vorming van recombinante HCMV virussen optreedt en het daarmee gepaard gaande verspreidingsrisico zijn verwaarloosbaar klein.</p> <p><u>RSV-promotor</u> De mogelijkheid van recombinatie tussen de RSV promotor en virussen in kippen kan niet volledig worden uitgesloten. De risico's dat, door toepassing van de RSV promotor in andere</p>



	<p>Vrijgekomen cellen hebben, onder milieumstandigheden, zonder dat er bijzondere voorzorgen worden genomen voor hun instandhouding, geen overlevingskansen.</p> <p>2. Het DNA wordt niet direct ingespoten in de geslachtsklieren. Uit experimentele gegevens in proefpersonen en proefdieren blijkt dat verticale transmissie van naakt DNA uitsluitend kan voorkomen indien naakt DNA direct in de geslachtsklieren wordt geïnjecteerd. Indien het naakte DNA na toediening buiten de geslachtsklieren de circulatie bereikt wordt het snel afgebroken in het bloed. Door toediening buiten de geslachtsklieren en afbraak in de circulatie wordt blootstelling van kiembaancellen aan het DNA dus afdoende voorkomen, en wordt opname van DNA door kiembaancellen effectief voorkomen.</p> <p>3. Een voorwaarde voor gehele of gedeeltelijke integratie van het naakte DNA in het genoom van een virus is dat een cel tegelijkertijd zowel het toegediende naakte DNA moet bevatten als geïnfecteerd moet zijn met het betreffende virus. Wanneer het toegediende DNA deel uitmaakt van een virus kan het ingebouwd worden in een viruspartikel en verspreid worden door dit virus. De overdrachtsmogelijkheden van het DNA worden wanneer het deel uitmaakt van een virus aanzienlijk groter, aangezien het nu door een virusdeeltje kan worden meegenomen en door middel van infectie in een andere gastheer van dezelfde soort terecht kan komen via infectie. Deze mogelijkheid van verspreiding van het DNA wordt hier effectief tegengegaan door ervoor te zorgen dat het naakte DNA geen sequenties draagt van virale oorsprong (hierbij worden sequenties van zowel DNA als RNA virussen in beschouwing genomen), of die zijn afgeleid van dergelijke virale sequenties. Een uitzondering hierop is de aanwezigheid in het naakte DNA van een CMV-promotor, een RSV-promotor, een SV40 polyadenyleringssignaal of een SV40 nucleaire 'targeting' sequentie).</p> <p><u>CMV-promotor</u> Indien het naakte DNA een CMV promotor bezit, kan daardoor homologe recombinatie optreden met een wildtype CMV of met andere homologe virussen indien een cel tegelijkertijd het naakte DNA bevat en met een dergelijk virus geïnfecteerd is. De vorming van recombinant CMV virus door homologe recombinatie tussen HCMV en een gelineariseerd DNA is onder experimentele omstandigheden in humane fibroblasten bewerkstelligd. In de literatuur is een recombinant beschreven waarbij deze methode is toegepast. Het gaat daarbij om een lacZ gen dat in het HCMV genoom is geïntroduceerd tussen de regulatoire sequenties van één van de twee kopieën van het major <math>\beta</math> gen van HCMV, resulterend in expressie van het lacZ gen. Recombinatie werd bewerkstelligd met behulp van 5' en</p>	<p>proefdieren, vorming van recombinante virussen optreedt en het daarmee gepaard gaande verspreidingsrisico zijn verwaarloosbaar klein.</p> <p><u>SV40 polyadenyleringssignaal</u> De mogelijkheid van recombinatie tussen het SV40 polyadenyleringssignaal en wildtype SV40 in niet-humane primaten kan echter niet volledig worden uitgesloten. De risico's dat, door toepassing van de SV40 polyadenyleringssignaal in andere proefdieren, vorming van recombinante virussen optreedt en het daarmee gepaard gaande verspreidingsrisico zijn verwaarloosbaar klein.</p> <p><u>SV40 nucleaire 'targeting' sequentie</u> De mogelijkheid van recombinatie tussen de SV40 nucleaire 'targeting' sequentie en wildtype SV40 in niet-humane primaten kan echter niet volledig worden uitgesloten. De risico's dat, door toepassing van de SV40 nucleaire 'targeting' sequentie in andere proefdieren, vorming van recombinante virussen optreedt en het daarmee gepaard gaande verspreidingsrisico zijn verwaarloosbaar klein.</p> <p>4. Er is een geringe kans dat het naakte DNA zich verspreidt in het milieu door opname in bacteriën. Dit risico moet op afdoende wijze worden voorkomen.</p>
--	---	---



3' homologe gebieden van respectievelijk 800 bp en 1600 basenparen. De groeikarakteristieken van het recombinante virus waren in humane fibroblasten identiek aan het oudervirus, waarbij wel instabiliteit van de lacZ insertie werd waargenomen. Op basis van deze informatie is het niet zonder meer uitgesloten dat ook in een lichaamscel een recombinatie gebeurtenis optreedt, waardoor een replicatie competent recombinant virus kan ontstaan, als die lichaamscel het toegediende DNA met HCMV sequenties bevat en tegelijkertijd geïnfecteerd raakt met het HCMV virus.

Het gastheerbereik van HCMV is beperkt tot de mens. HCMV komt in het algemeen niet voor in dieren. De kans op het optreden van homologe recombinatie tussen HCMV en naakt DNA met een HCMV promotor in dieren en de kans dat hierdoor nieuwe genetisch gemodificeerde virussen is derhalve verwaarloosbaar klein. Uit een blast search blijkt dat er echter significante homologie bestaat tussen de HCMV promotor en een beperkt aantal animale herpesvirussen. Voor fragment 979-1474 van de HCMV promotor is er een homologie van 78% met een chimpansee herpes virus 2 stam (BLAST score 285). Kortere fragmenten de HCMV promotor hebben een grotere homologie met dit fragment. Het langste fragment met een 100% homologie (bp 810-848) is 39 basenparen lang (BLAST score 73.1). Voor kortere fragmenten van de HCMV promotor wordt ook homologie met steeds dezelfde sequenties uit andere primate herpesvirussen gevonden, bijvoorbeeld uit makaken en rhesus apen (78% homologie voor bp 1077-1292, BLAST score 165; 95% homologie voor een bp 808-849, lengte van 42 basenparen, BLAST score 67.6). Er kan daarom niet volledig worden uitgesloten dat deze homologie leidt tot recombinatie tussen de CMV promotor en herpesvirussen die voorkomen in niet-humane primaten.

RSV-promotor

Indien het naakte DNA een RSV promotor bezit, kan daardoor homologe recombinatie optreden met een wildtype RSV of met andere homologe virussen indien een cel tegelijkertijd het naakte DNA bevat en met een dergelijk virus geïnfecteerd is. De natuurlijke gastheer van RSV is de kip (*Gallus gallus domesticus*). Aangezien RSV in het algemeen niet voorkomt in andere dieren, is de kans op het optreden van homologe recombinatie tussen het naakte DNA met een RSV promotor en RSV en het ontstaan van nieuwe genetisch gemodificeerde virussen verwaarloosbaar klein. De kans op het optreden van recombinatie met andere voorkomende retrovirussen is verwaarloosbaar klein. Immers, een sequentievergelijking tussen de RSV promotor en mammalian type C retroviruses geeft alleen een zeer lage homologie met een xenotropic MuLV-related virus integration site. Over een lengte van slechts 28 nucleotiden van de RSV promotor (bp 95-68) is een homologie van 24 basenparen (86%) aanwezig met een zeer



	<p>lage BLAST score van 33.7. Er bestaat alleen een kans op recombinatie tussen de RSV promotor en het RSV virus of verwante aviaire retrovirussen in de kip. Tussen de RSV promotor en het <i>avian leukosis virus</i> (ALSV) is een sequentiehomologie van 68%. Het ALSV komt alleen voor in kippen. Er kan daarom niet volledig worden uitgesloten dat deze homologie leidt tot recombinatie tussen de RSV promotor en virussen in kippen.</p> <p><u>SV40 polyadenyleringssignaal</u> Indien het naakte DNA een SV40 polyadenyleringssignaal bezit, kan daardoor homologe recombinatie optreden met een wildtype SV40 of met andere homologe virussen indien een cel tegelijkertijd het naakte DNA bevat en met een dergelijk virus geïnfecteerd is. De SV40 early of late gene polyA signaal sequenties die in plasmiden worden toegepast hebben een lengte van rond de 200-300 basenparen. Het naakte DNA met een SV40 polyadenyleringssignaal zal na toediening in het lichaam de bloedbaan kunnen bereiken. In de bloedbaan wordt naakt DNA echter snel afgebroken. De halfwaardetijd is in de orde van enkele minuten als gevolg van de aanwezigheid van onder meer nucleasen en fagocyterende cellen. Alleen indien het naakte DNA met een SV40 polyadenyleringssignaal en wildtype SV40 tegelijkertijd in eenzelfde cel aanwezig zijn, zou er door middel van recombinatie een genetisch gemodificeerd virus kunnen ontstaan. Verwacht mag worden dat de homologie tussen een SV40 polyadenyleringssignaal en wildtype SV40 slechts in geringe mate zal bijdrage tot recombinatie. Met uitzondering van niet-humane primaten is het onwaarschijnlijk dat recombinatie tussen een SV40 polyadenyleringssignaal in naakt DNA en SV40 in dieren optreedt aangezien SV40 infecties bij dieren, met uitzondering van niet-humane primaten, zelden voorkomen. Aangezien SV40 van nature voorkomt in niet-humane primaten kan niet volledig worden uitgesloten dat recombinatie optreedt tussen het SV40 polyadenyleringssignaal en wildtype SV40 in niet-humane primaten. Mede gezien de lange historie van veilig gebruik is de COGEM (CGM/120919-01) van mening dat voor toepassingen van een SV40 polyadenyleringssignaal in naakt DNA in dieren, met uitzondering van niet-humane primaten, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.</p> <p><u>SV40 nucleaire 'targeting' sequentie</u> Indien het naakte DNA een SV40 nucleaire 'targeting' sequentie bezit, kan daardoor homologe recombinatie optreden met een wildtype SV40 of met andere homologe virussen indien een cel tegelijkertijd het naakte DNA bevat en met een dergelijk virus geïnfecteerd is. Een van de sequenties die toegepast worden is een sequentie van gemiddeld 100 bp van SV40. Zoals uit de bovengenoemde</p>	
--	---	--





	<p>redenatie van een polyadenyleringssignaal met een SV40 fragment blijkt, is de kans op recombinatie met een wildtype SV40 virus onwaarschijnlijk. Verwacht mag worden dat de homologie tussen wildtype SV40 en een nucleaire 'targeting' sequentie van SV40 slechts in geringe mate zal bijdrage tot recombinatie, en daarom slechts in een geringe, verwaarloosbare mate zal bijdragen aan het verspreidingsrisico. Aangezien SV40 van nature voorkomt in niet-humane primaten kan niet volledig worden uitgesloten dat recombinatie optreedt tussen een SV40 nucleaire 'targeting' sequentie en wildtype SV40 in niet-humane primaten. Mede gezien de lange historie van veilig gebruik is de COGEM (CGM/120919-01) van mening dat voor toepassingen van een nucleaire 'targeting' sequentie van SV40 in naakt DNA in dieren, met uitzondering van niet-humane primaten, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn</p> <p>4. Er is een zeer geringe kans op opname van naakt DNA door bacteriën, wat kan leiden tot expressie van op het DNA gecodeerde sequenties. Daarbij kunnen sequenties, met name antibioticaresistentiegenen, die de preventieve of therapeutische werking van antibiotica aantasten van belang zijn in het kader van de veiligheid van mens en milieu.</p>	
<b>B. Selectieve voordelen</b>		
<p>Voor de milieurisicobeoordeling van naakt DNA toegepast in 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. De vraag is of het naakte DNA als gevolg van de aanwezige sequenties of cellen die het naakte DNA hebben opgenomen een dusdanig selectief voordeel kan verkrijgen.</p>	<p><b>Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden, en de waarschijnlijkheid van het schadelijke effect.</b></p> <p>Naakt DNA is een molecuul zonder eigenschappen van een levend organisme of virus en kan als zodanig niet worden gezien als een GGO. De mogelijke gevolgen en de waarschijnlijkheid van een verhoogd selectief voordeel van naakt DNA is daarom niet aan de orde. Toegediend naakt DNA kan in het proefdier terechtkomen in lichaamscellen, waardoor een aantal genetisch gemodificeerde cellen ontstaat. Verder bestaat de mogelijkheid dat het naakte DNA in zijn geheel of gedeeltelijk worden geïntegreerd in een genoom van een virus, bijvoorbeeld door recombinatie, of in contact komt met bacteriën. De beschouwing van mogelijke gebeurtenissen die vervolgens zouden kunnen optreden zijn beschreven onder onderdeel A. Zoals onder A beschreven is ook hier de verspreidingsroute via bacteriën of door recombinatie met virussen de enige relevante gebeurtenissen.</p>	<p>Er is een geringe kans dat het naakte DNA zich verspreidt in het milieu door opname in bacteriën of door recombinatie met virussen. Dit risico moet op afdoende wijze worden voorkomen.</p>
<b>C. Kans op genoverdracht op andere soorten en de kans dat hierdoor selectieve voor- of nadelen op deze soorten worden overgedragen</b>		
<p>Genoverdracht op andere soorten kan plaatsvinden door (homologe) recombinatie. Op de eerste plaats wordt in beschouwing genomen of er overdracht plaats kan vinden naar andere virussen of bacteriën. Die kans is op de eerste plaats</p>	<p><b>Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden, en de waarschijnlijkheid van het schadelijke effect.</b></p> <p>Er bestaat de mogelijkheid dat het naakte DNA in contact komt</p>	<p>Er is een geringe kans dat het naakte DNA zich verspreidt in het milieu door opname in bacteriën of door recombinatie met virussen. Dit risico moet op afdoende wijze worden voorkomen.</p>



<p>afhankelijk van de aanwezigheid van een verwant virus binnen het zelfde celcompartiment waarin het naakte DNA zich bevindt.</p> <p>Vervolgens is de kans op recombinatie en de eigenschappen van het gevormde product afhankelijk van de genetische opbouw van het naakte DNA. Van een mogelijk gevormde recombinant moet vervolgens worden nagegaan in hoeverre hieruit selectieve voor- of nadelen voortvloeien.</p> <p>De vraag is dus of de sequenties in het naakte DNA kunnen worden overgedragen naar andere virussen of bacteriën en of dit vervolgens voor deze virussen of bacteriën kan leiden tot een selectief voor- of nadeel. Selectieve voor- of nadelen kunnen alleen optreden als de expressie van op het naakte DNA aanwezige sequenties vervolgens een interactie heeft met de virale of bacteriële levenscyclus.</p>	<p>met bacteriën. De beschouwing van mogelijke gebeurtenissen die vervolgens zouden kunnen optreden zijn beschreven onder onderdeel A.</p> <p>Zoals reeds onder A besproken is kan niet volledig uitgesloten worden dat het naakte DNA met de genoemde virale sequenties in zijn geheel of gedeeltelijk worden geïntegreerd in een genoom van een virus, bijvoorbeeld door recombinatie.</p>	
<b>D. Effecten op doel- en niet-doelpopulaties</b>		
<p>De effecten op de proefdieren die aan de studie deelnemen (doelpopulatie) vallen onder de verantwoordelijkheid van de behandelende dierenarts.</p> <p>Effecten op niet-doelpopulaties zullen alleen op kunnen treden indien er sprake is van verspreiding van het naakte DNA in de omgeving van het proefdier. In dit onderdeel worden de eventuele effecten van het naakte DNA beoordeeld op mensen en dieren in de omgeving van het proefdier. Bij de beoordeling moet rekening worden gehouden met de te verwachten blootstellingsweg en mate van blootstelling.</p> <p>De vraag is welke effecten de sequenties in het naakte DNA of de cellen die het naakte DNA hebben opgenomen kunnen hebben in de niet-doelpopulaties. Met effecten worden alle mogelijke (schadelijke en niet-schadelijke, zoals onder andere toxische en allergene) effecten bedoeld met uitzondering van gezondheidseffecten. Gezondheidseffecten worden onder onderdeel E besproken.</p>	<p><b>Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden, en de waarschijnlijkheid van het schadelijke effect.</b></p> <p>Naakt DNA is een molecuul zonder eigenschappen van een levend organisme of virus en kan als zodanig niet worden gezien als een GGO. De mogelijke gevolgen en de waarschijnlijkheid van een effecten op doel en niet-doel populaties van naakt DNA is daarom niet aan de orde.</p> <p>Toegediend naakt DNA kan in het proefdier terechtkomen in lichaamscellen, waardoor een aantal genetisch gemodificeerde cellen ontstaat. Verder bestaat de mogelijkheid dat het naakte DNA in zijn geheel of gedeeltelijk worden geïntegreerd in een genoom van een virus, bijvoorbeeld door recombinatie, of in contact komt met bacteriën. De beschouwing van mogelijke gebeurtenissen die vervolgens zouden kunnen optreden zijn beschreven onder onderdeel A. Zoals onder A beschreven is ook hier de verspreidingsroute via bacteriën of door recombinatie met virussen de enige relevante gebeurtenissen.</p>	<p>Er is een geringe kans dat het naakte DNA zich verspreidt in het milieu door opname in bacteriën of door recombinatie met virussen. Dit risico moet op afdoende wijze worden voorkomen.</p>
<b>E. Mogelijke effecten op dierlijke gezondheid</b>		
<p>De vraag is welke effecten de sequenties in het naakte DNA of de cellen die het naakte DNA hebben opgenomen kunnen hebben op de gezondheid van dieren met uitzondering van het proefdier. Bij de beoordeling moet rekening worden gehouden met de te verwachten blootstellingsweg en mate van blootstelling.</p>	<p><b>Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden, en de waarschijnlijkheid van het schadelijke effect.</b></p> <p>Naakt DNA is een molecuul zonder eigenschappen van een levend organisme of virus en kan als zodanig niet worden gezien als een GGO. De mogelijke gevolgen en de waarschijnlijkheid van een effecten op de dierlijke gezondheid van naakt DNA is daarom niet aan de orde. Toegediend naakt DNA kan in het proefdier terechtkomen in lichaamscellen, waardoor een aantal genetisch gemodificeerde cellen ontstaat. Verder bestaat de mogelijkheid dat het naakte DNA in zijn geheel of gedeeltelijk worden geïntegreerd in een genoom van</p>	<p>Er is een geringe kans dat het naakte DNA zich verspreidt in het milieu door opname in bacteriën of door recombinatie met virussen. Dit risico moet op afdoende wijze worden voorkomen.</p>



	<p>een virus, bijvoorbeeld door recombinatie, of in contact komt met bacteriën. De beschouwing van mogelijke gebeurtenissen die vervolgens zouden kunnen optreden zijn beschreven onder onderdeel A. Zoals onder A beschreven is ook hier de verspreidingsroute via bacteriën of door recombinatie met virussen de enige relevante gebeurtenissen.</p>	
<p><b>F. Mogelijke effecten op de menselijke en diergezondheid ten gevolge van consumptie</b></p>		
<p>Er is geen sprake van consumptie van het proefdier, waaraan naakt DNA is toegediend, en alle daarvan afgeleide producten indien deze voor diervoeder of humane consumptie bestemd zijn.</p>	<p><b>Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden, en de waarschijnlijkheid van het schadelijke effect.</b> Er is geen sprake van consumptie, gevolgen ten gevolge van consumptie worden daarom buiten beschouwing gelaten.</p>	<p>Het risico van mogelijke effecten op menselijke en diergezondheid ten gevolge van consumptie van naakt DNA is niet van toepassing.</p>
<p><b>G. Effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu</b></p>		
<p>In het algemeen wordt hieronder verstaan de negatieve effecten die GGO's kunnen hebben op (micro-) organismen die voorkomen als commensalen, of die verantwoordelijk zijn voor kringlopen van nutriënten of afbraak van organisch materiaal. De vraag is welke effecten de sequenties in het naakte DNA of de cellen die getransformeerd zijn met het naakte DNA kunnen hebben op andere microbiële populaties in mens, dier of het milieu.</p>	<p><b>Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden, en de waarschijnlijkheid van het schadelijke effect.</b> Zoals reeds onder A beschreven kan het naakte DNA tijdens of na de toediening in contact komen met bacteriën. Dit zal hoofdzakelijk kunnen gebeuren op de toedieningsplaats. Er is een zeer geringe kans op opname van naakt DNA door bacteriën, wat kan leiden tot expressie van op het DNA gecodeerde genen. Daarbij kunnen vooral antibioticum resistentiegenen van belang zijn, waarvan het in het algemeen niet wenselijk wordt geacht dat deze zich in het milieu verspreiden.</p>	<p>Er is een geringe kans dat het naakte DNA zich verspreidt in het milieu door opname in bacteriën. Dit risico moet op afdoende wijze worden voorkomen.</p>
<p><b>H. Het in gevaar brengen van preventieve of therapeutische medische en veterinaire behandelingen</b></p>		
<p>Het gaat hier om de vraag of de preventieve of therapeutische werking van bijvoorbeeld antibiotica aangetast kan worden door de behandeling.</p>	<p><b>Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden, en de waarschijnlijkheid van het schadelijke effect.</b> Indien het DNA een of meerdere antibioticaresistentiegenen bevat, die in prokaryoten tot expressie kunnen komen, dan bestaat de kans dat deze genen worden overgedragen op bacteriën (zie onderdeel A).</p>	<p>Er is een geringe kans dat het DNA zich verspreidt in het milieu door opname in bacteriën of door recombinatie met virussen. Dit risico moet op afdoende wijze worden voorkomen.</p>



### DEEL 3. BEPALING VAN HET ALGEGELE RISICO VAN DE TOEPASSING VAN NAAKT DNA

<b>Schatting van het risico dat aan de toepassing is verbonden</b>	<b>Strategieën voor risicobeheer bij de doelbewuste introductie van de GGO's.</b>	<b>Bepaling van het algehele risico van het GGO</b>
<p>Er is een zeker risico geconstateerd dat verbonden is aan verspreiding van het naakte DNA in het milieu ten gevolge van opname in bacteriën en mogelijke recombinitie met virussen.</p>	<p>Het geconstateerde risico van opname van naakt DNA door bacteriën kan worden verlaagd door de kans dat dit plaatsvindt te verkleinen op de plek waar de kans op een dergelijke opname het grootst is: op de huid, op de plaats waar de toediening plaats vindt. Opname van DNA door bacteriën kan effectief worden tegengegaan door de toedieningsplaats te desinfecteren met een op alcohol gebaseerd desinfectans, waardoor op de huid aanwezige bacteriën worden afgedood, en door na de toediening eventueel nog op de huid aanwezig DNA weg te wassen met steriel water of een steriele zoutoplossing.</p> <p>Indien het naakte DNA een antibioticum-resistentie gen tegen uitsluitend kanamycine of neomycine bevat, dient selectieve druk op bacteriën in de huid, die een plasmide met dit antibioticum-resistentie gen op hebben genomen, voorkomen te worden door kanamycine en neomycine niet te gebruiken tijdens de veterinaire studie.</p> <p>Het geconstateerde mogelijke risico van recombinitie tussen wildtype virussen en naakt DNA met een CMV-promotor, een RSV-promotor, een SV40 polyadenyleringssignaal en/of een SV40 nucleaire 'targeting' sequentie, kan worden verlaagd door de kans op recombinitie te verkleinen. Door de volgende voorwaarden te stellen aan de genoemde virale sequenties wordt deze kans verkleind:</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. een CMV-promotor, toegepast bij dieren met uitsluiting van niet-humane primaten;</li><li>2. een RSV-promotor, toegepast bij dieren met uitsluiting van kippen;</li><li>3. een SV40 polyadenyleringssignaal, toegepast bij dieren met uitsluiting van niet-humane primaten;</li><li>4. een SV40 nucleaire 'targeting' sequentie, toegepast bij dieren met uitsluiting van niet-humane primaten.</li></ol>	<p>Het algehele risico is, onder toepassing van de aanvullende voorschriften en voorwaarden, verwaarloosbaar klein.</p>



## DEEL 4. CONCLUSIES VAN MOGELIJKE MILIEUEFFECTEN

Conform Bijlage II, onder D1 van de Richtlijn 2001/18/EC worden hieronder een aantal punten opgesomd die, waar passend, een conclusie geven over de mogelijke milieueffecten zoals weergegeven in Deel 2 en 3.

**1. Waarschijnlijkheid dat het GGO in natuurlijke habitats persistent en invasief wordt onder de omstandigheden van de voorgestelde introductie(s).**

De waarschijnlijkheid dat het naakt nucleïnezuur persistent en invasief wordt is verwaarloosbaar klein, omdat het naakte DNA niet zal leiden tot het ontstaan van een GGO dat zelf persistente of invasieve eigenschappen heeft. De kans op transmissie van het naakte DNA door bacteriën, het ontstaan van recombinante virussen, of transmissie van het plasmide via de kiembaan is verwaarloosbaar klein.

**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 naakt nucleïnezuur is verwaarloosbaar klein, omdat het naakte DNA niet zal leiden tot het ontstaan van een GGO dat zelf selectieve voordelen of nadelen heeft. De kans op transmissie van het plasmide door bacteriën, het ontstaan van recombinante virussen, of transmissie van het naakte DNA via de kiembaan is verwaarloosbaar klein.

**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 waarschijnlijkheid van overdracht op andere soorten bij toepassing van het naakt nucleïnezuur is verwaarloosbaar klein, omdat het naakte DNA niet zal leiden tot het ontstaan van een GGO dat zelf in een actieve overdraagbare vorm in het milieu terecht komt. De kans op transmissie van het plasmide door bacteriën, het ontstaan van recombinante virussen, of transmissie van het naakte DNA via de kiembaan is verwaarloosbaar klein.

**4. Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde milieueffecten van de directe en indirecte interacties tussen het GGO en niet-doelwitorganismen.**

De waarschijnlijkheid van milieueffecten op doelwitorganismen bij toepassing van het naakt nucleïnezuur is verwaarloosbaar klein, omdat het naakte DNA niet zal leiden tot het ontstaan van een GGO dat in een actieve overdraagbare vorm in het milieu terecht komt. De cellen in het proefdier die genetisch gemodificeerd worden door opname van het plasmide DNA zijn op zichzelf, buiten het proefdier, niet levensvatbaar en zullen niet in het milieu overleven. De kans dat transmissie van het naakte DNA door bacteriën, het ontstaan van recombinante virussen, of transmissie van het plasmide via de kiembaan optreedt, is verwaarloosbaar klein.



- 5. Mogelijke onmiddellijke en/of vertraagde effecten op de menselijke gezondheid van mogelijke directe en indirecte interacties tussen het GGO en personen die werken met, in contact komen met of in de nabijheid komen van de GGO-introductie(s).**  
De waarschijnlijkheid van effecten op menselijke gezondheid bij toepassing van het naakt nucleïnezuur is verwaarloosbaar klein, omdat het naakte DNA niet zal leiden tot het ontstaan van een GGO dat zelf nadelige effecten op de menselijke gezondheid teweegbrengt. De kans dat transmissie van het naakte DNA door bacteriën, het ontstaan van recombinante virussen, of transmissie van het plasmide via de kiembaan optreedt, is verwaarloosbaar klein.
- 6. 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.**  
Er is geen sprake van consumptie. Effecten op de voeder/voedselketen als gevolg van consumptie zijn dan ook niet aan de orde.
- 7. Mogelijke verandering in de staande medische praktijk.**  
De waarschijnlijkheid van verandering in de staande medische praktijk effecten bij toepassing van het naakt nucleïnezuur is verwaarloosbaar klein, omdat het naakte DNA niet zal leiden tot het ontstaan van een GGO dat zelf invloed heeft op de staande medische praktijk. De kans dat transmissie van het plasmide door bacteriën, het ontstaan van recombinante virussen, of transmissie van het plasmide via de kiembaan optreedt, is verwaarloosbaar klein.

### **Samenvatting**

De waarschijnlijkheid dat de aangevraagde werkzaamheden met naakt DNA dat aan de eisen voldoet van Deel 1, onder B5 tot en met B13, van deze milieurisicobeoordelingstabel bij dieren zullen leiden tot schadelijke milieueffecten, wordt verwaarloosbaar klein geacht.