



Milieurisicoanalyse bij de aanvraag IM 10-002

Datum: 25 augustus 2010

De milieurisicoanalyse is onder verantwoordelijkheid van het Ministerie van Volkshuisvesting Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer 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). Voor studies met dieren geldt dat het welzijn van de dieren en de hiermee verband houdende ethische overwegingen getoetst wordt door de Commissie Biotechnologie bij Dieren (CBD).

De milieurisicoanalyse 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 milieurisicoanalyse van het dossier zoals deze volgt uit de kenmerken van de GGO's en de voorgestelde wijze van introductie.

Deel 2 geeft de milieurisicoanalyse 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 uitgangsorganisme. Dit kan tot gevolg hebben dat het tropisme en het gastheerbereik van het uitgangsorganisme 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 geïnficeerd 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 milieurisicoanalyse 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.



Milieurisicoanalyse behorend bij aanvraag IM 10-002

Titel aanvraag: Vaccinatie met naakt nucleïnezuur coderend voor xenogenetisch humaan tyrosinase voor de inductie van specifieke afweer tegen melanoma cellen bij de hond.

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 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 vector

1. De vector is een recombinant DNA plasmide bestaande uit het plasmide pING ('backbone' vector) met daarin gekloneerd de sequentie coderend voor het humaan tyrosinase eiwit (pING/Tyrosinase) (B4.2).
2. De vector pING/Tyrosinase is een dubbelstrengs, covalent gesloten circulair DNA molecuul van 6408 basenparen (B4.2, B4.3).
3. Het pING/Tyrosinase plasmide kan zichzelf niet repliceren (F.1).
4. Het uitgangsplasmide pING bevat een ColE1 origin of replication (ori), de promotor sequentie van het humaan cytomegalovirus (HCMV) immediate early (IE) gene, een 'multiple cloning site', een kanamycine resistentie gen afkomstig van *Escherichia coli* en een transcriptionele terminator/polyA sequentie (B4.2, B4.3, aanvullende informatie).
5. De aanwezige ColE1 ori is afkomstig van het ColE1 plasmide uit *E. coli* en zorgt ervoor dat het plasmide alleen in bacteriën van de familie Enterobacteriaceae kan repliceren en gehandhaafd blijft (B4.2, B4.3).
6. In de toegepaste HCMV IE promotor zijn 8 open leesramen aanwezig waarvan het het langste codeert voor een eiwit van 152 aminozuren (aanvullende informatie).
7. Het kanamycine resistentie gen is het npt-I gen dat afkomstig is uit *E. coli*. Het kanamycine resistentie gen kan niet worden afgeschreven vanaf de HCMV promotor (aanvullende informatie).
8. Het product van het kanamycine resistentie gen (aminoglycoside 3'-phosphotransferase) kan uitsluitend in bacteriën tot expressie komen en zorgt voor resistentie tegen kanamycine en neomycine (aanvullende informatie).*

B. De genetische modificatie:

9. De vector pING/Tyrosinase is gegenereerd door het kloneren van sequenties die coderen voor humaan tyrosinase eiwit in de 'multiple cloning site' van de vector (A2.2, A3.29, A3.30)
10. De expressie van humaan tyrosinase staat onder controle van de HCMV IE promotor (B4.1).
11. Het tyrosinase enzym katalyseert de omzetting van tyrosine naar het huidpigment melanine in huidcellen. Door expressie van xenogenetisch tyrosinase afkomstig van de mens in de hond wordt een specifieke afweerreactie van het immuunsysteem tegen maligne melanoomcellen opgewekt (F.2).
12. Productie van humaan tyrosinase bij de mens zal, mede gezien de ervaring met het toedienen van homologe tyrosinase aan de muis, niet leiden tot een immunreactie door de homologe aard van het tyrosinase (F.2).



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

Coderende sequenties gebruikt voor genetische modificatie	Herkomst	Plaats in de vector	Aanwezigheid in proefdier
CMV IE promoter (promoter, exon 1 en intron A van CMV IE gen)	Cytomegalovirus	Vóór tyrosinase sequentie en achter ORI	Zorgt voor genexpressie van humaan tyrosinase
Tyrosinase	Humaan	Tussen CMV IE promoter en Kanamycine resistentie gen	Codeert voor het humaan tyrosinase eiwit
Kanamycine cassette	<i>E. coli</i> Tn903	Tussen tyrosinase sequentie en ORI	Codeert voor aminoglycoside 3'-phosphotransferase

C. Het GGO:

13. Doordat het pING/Tyrosinase plasmide een humaan cytomegalovirus (HCMV) promoter bezit, zou in theorie homologe recombinatie kunnen optreden met een wildtype CMV indien een hondencel tegelijkertijd met het plasmide en CMV geïnfecteerd is.*
14. HCMV is een herpesvirus waarvan het gastheerbereik beperkt is tot de mens. Infectie met HCMV vindt voornamelijk via de orale en seksuele route plaats, waardoor met name epitheelcellen geïnfecteerd zullen worden (B4.1, aanvullende informatie).*
15. Het is zeer onwaarschijnlijk dat HCMV honden kan infecteren en zich vervolgens in de hond kan vermenigvuldigen. In het zeer onwaarschijnlijke geval dat (homologe) recombinatie zou optreden tussen de HCMV promoter sequentie in het plasmide en wild type HCMV aanwezig in de hond zal dit resulteren in uitwisseling van de promoter sequenties waardoor het ontstane virus identiek zal zijn aan wild type CMV, of zal dit leiden tot een sterk verzwakt virus dat zich niet kan vermenigvuldigen door de negatieve impact van de recombinatie op de expressie van immediate early eiwit van HCMV (aanvullende informatie).*
16. Een honden cytomegalovirus is nog nooit beschreven. In afwezigheid van een dergelijk virus kan geen recombinatie met de HCMV promoter in pING/Tyrosinase plaatsvinden (B4.1, aanvullende informatie).
17. Het is zeer onwaarschijnlijk dat een interactie tussen de HCMV promoter en andere virussen in de hond kan plaatsvinden door het gebrek aan homologie met deze virussen. De promoter van het enige herpes virus dat is beschreven in de hond (CHV) vertoont slechts 46% homologie met de HCMV promoter (aanvullende informatie).
18. Infecties met CMV in mensen verlopen meestal zonder klinische symptomen. In immuungecompromiteerde mensen, zoals pasgeborenen en transplantatiepatiënten, kan CMV infectie ernstige problemen veroorzaken, waaronder retinitis, hepatitis en colitis.*
19. Gezien de transdermale/intramusculaire wijze van toediening is het waarschijnlijk dat het plasmide pING/Tyrosinase alleen tijdelijk aanwezig is in spiercellen en enige huidcellen van de hond op de plaats van injectie (B4.1, E.1, F.1).
20. Indien het plasmide in het bloed of in de darm terecht komt dan zal het vrije plasmide DNA door nucleases worden afgebroken (F.1).
21. Opname van plasmide DNA door bacteriën is een inefficiënt proces. Slechts een gering deel van de bacteriesoorten is van nature instaat (competent) om DNA op te nemen onder bepaalde condities. Genen in bacteriën die zorgen voor competentie komen vaak maar tijdelijk tot



expressie en worden sterk gecontroleerd door milieu omstandigheden. Indien bacteriën het plasmide hebben opgenomen is replicatie en handhaving van het plasmide alleen mogelijk in bepaalde soorten bacteriën.*

22. Voor replicatie van het pING/Tyrosinase plasmide via de ColE1 ori regio is een specifiek replicatiecomplex noodzakelijk dat uitsluitend in enterobacteria voorkomt en dat onder andere bestaat uit de gastheerewitten Polymerase I, RNA polymerase en RNase H.*
23. Replicatie van plasmiden met ColE1 ori buiten deze beperkte groep van darmbacteriën is nooit geobserveerd (F.2).*
24. Enterobacteriën komen normaal gesproken uitsluitend in de darm voor. Indien deze bacteriën wel op bijvoorbeeld de huid of in spierweefsel zouden voorkomen dan levert de opname van het plasmide geen enkel groeivoordeel op voor deze bacteriën.*

D. Milieugerelateerde gegevens afkomstig uit eerdere experimenten

25. Diverse klinische studies zijn uitgevoerd met het pING/Tyrosinase plasmide waarbij ongeveer 6000 honden zijn gevaccineerd. Hierbij zijn geen gevallen van recombinatie met wildtype HCMV of andere Herpes virussen gerapporteerd (C.1, aanvullende informatie).
26. De HCMV-IE promotor is reeds veelvuldig toegepast in gen-therapie of DNA vaccinatie studies, zonder dat negatieve effecten op het milieu en/of gevallen van recombinatie met wildtype HCMV of andere Herpes virussen zijn beschreven (aanvullende informatie).
27. Het blijkt uit deze klinische studies onder andere dat een specifieke anti-tyrosinase immuunreactie wordt opgewekt en dat de vaccinatie veilig is voor de hond. (C.1)

E. Patiënt of proefdiergebonden aspecten:

28. Doelstelling van de behandeling met pING/Tyrosinase is om honden met melanoma te vaccineren om zodoende een melanoom specifieke afweer in het lichaam op te wekken. Vergunning wordt aangevraagd voor opslag, het toedienen van het vaccin en monsternamen (A.1, A.3.).
29. Het plasmide pING/Tyrosinase zal transdermaal/intramusculair toegediend worden via een naaldvrij Biojector200 systeem onder CO₂ druk (E.3)
30. De dieren ontvangen met 2 wekelijkse intervallen een immunisatie met 500 microgram plasmide DNA tot een maximum van 4 injecties. Daarna volgt nog, afhankelijk van het ziekteverloop bij de hond, een booster injectie met intervallen van 6 maanden tot een maximum van 4 keer (E.2, aanvullende informatie).
31. Gedurende 5 jaar zullen maximaal 50 honden behandeld worden (E.1, aanvullende informatie).
32. De toediening zal plaatsvinden in een dierenstal die voldoet aan de DM-II inrichtingseisen (E.3, G.4).

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

33. Na afloop van iedere toediening zal het dier worden ontslagen en medisch worden gevolgd (A.3).
34. Bloedmonsters die binnen 24 uur na vaccinatie worden afgenomen zullen op aanwezigheid van plasmide DNA worden gecontroleerd op een laboratorium dat voldoet aan de ML-I inrichtingseisen onder vergunning IG 99-057 (E.4, G.6, aanvullende informatie).
35. Aanwezigheid van het plasmide pING/Tyrosinase in circulerende cellen wordt niet verwacht (E.4).
36. Detectie van het GGO vindt plaats middels standaard PCR techniek op humaan tyrosinase (H.1).
37. Toediening vindt plaats in een geïsoleerde ruimte waarbij geen contact met andere dieren kan plaatsvinden (E.5, G.3).
38. Tijdens de toediening worden door het personeel beschermende kleding en handschoenen gedragen (F.2, G.4).
39. Dier eigenaren zullen tijdens de behandeling niet aanwezig zijn in de ruimte (G.6).



40. Na vaccinatie wordt gecontroleerd op de aanwezigheid van plasmide oplossing op of rond het dier (G.4).
41. Eventueel vrij gekomen plasmide in de omgeving, inclusief mogelijke vloeistof die achterblijft op de huid van de hond zal worden afgenomen, gedecontamineerd en als biologisch afval worden afgevoerd (E.3).
42. Alle bij de injectie betrokken middelen zullen als biologisch afval worden afgevoerd of worden geautoclaveerd alvorens opnieuw gebruikt te worden (H.3).
43. Eventueel in het verblijf in de DM-II ruimte geproduceerde excreta worden eveneens als biologisch afval afgevoerd (H.3).

G. Productie en Batch

44. De studie wordt uitgevoerd in het dierenverblijf van de kliniek voor Gezelschapsdieren van de Universiteit Utrecht, te Utrecht (A.27)
45. De productie van het plasmide vindt plaats door Merial Inc., Verenigde Staten (D.1)
46. De identiteit, zuiverheid en kwaliteit van het pING/Tyrosinase plasmide en de afwezigheid van bacteriële verontreiniging is met diverse algemeen geaccepteerde testen aangetoond (D.3, aanvullende informatie).



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 sequenties humaan tyrosinase, het kanamycine resistentiegen en de regulerende sequenties (de HCMV IE promoter sequentie) en de pING backbone met ColE1 ori:

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 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 het GGO kan sprake zijn indien het GGO na toediening aan een patiënt of proefdier, langer dan het oorspronkelijke ouderorganisme in een actieve vorm aanwezig kan blijven, en er vervolgens shedding kan plaatsvinden 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 oorspronkelijke ouderorganisme, of tot uitbreiding van de ziekte naar nieuwe gastheren.</p> <p>De vraag is of het plasmide DNA als gevolg van de aanwezige</p>	<p>Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden, en de waarschijnlijkheid van het schadelijke effect.</p> <p>De CMV promoter sequentie in het plasmide pING/Tyrosinase is afgeleid van de promoter van het humaan Cytomegalovirus (HCMV). Dit DNA virus behoort tot de <i>Herpesviridae</i>. Het gastheerbereik van HCMV is beperkt tot de mens. Een honden cytomegalovirus is nog nooit beschreven. In afwezigheid van dergelijke virussen in de hond kan geen recombinatie met de HCMV promoter in pING/Tyrosinase plaatsvinden. Bovendien is het zeer onwaarschijnlijk dat een interactie tussen de HCMV promoter en andere virussen in de hond kan plaatsvinden door het gebrek aan homologie met deze virussen. In eerdere studies die zijn uitgevoerd met het pING/Tyrosinase plasmide of andere plasmiden met de HCMV promoter zijn nooit gevallen van recombinatie gerapporteerd. In het onwaarschijnlijke geval dat een cel in de te behandelen honden tegelijkertijd geïnfecteerd is met CMV en het plasmide, kan middels homologe recombinatie sequentie-uitwisseling plaatsvinden waardoor een recombinant virus kan ontstaan. De CMV promoter sequentie in het pING/Tyrosinase plasmide is echter identiek aan de wild type humaan CMV promoter. Bij homologe recombinatie zal daardoor enkel uitwisseling van promoter sequenties plaatsvinden, waardoor het ontstane recombinante virus identiek is aan het uitgangsvirus. De kans</p>	<p>Het risico van een verhoogde persistentie en invasiviteit bij toepassing van het plasmide pING/Tyrosinase is verwaarloosbaar klein.</p>



<p>sequenties of cellen die getransformeerd zijn met het plasmide DNA een dusdanig selectief voordeel ten aanzien van persistentie en invasiviteit verkrijgen dat er nadelige effecten voor mens en milieu kunnen optreden.</p> <p>Het plasmide pING/Tyrosinase is een gesloten circulair DNA 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 verhoogde persistentie of invasiviteit van de niet-virale vector is daarom niet aan de orde.</p> <p>Toegediend plasmide DNA kan echter in de hond terechtkomen in lichaamscellen. De hond draagt dan een aantal genetisch gemodificeerde cellen. In deze cellen is het theoretisch mogelijk dat het plasmide pING/Tyrosinase een interactie aangaat met aanwezige virussen of virale sequenties, met name HCMV, waardoor een genetisch gemodificeerd virus ontstaat dat in een actief overdraagbare vorm in het milieu kan terechtkomen.</p>	<p>dat een cel tegelijkertijd geïnfecteerd is met CMV en pING/Tyrosinase plasmide, en dat vervolgens homologe recombinatie tussen beide optreedt waardoor nieuwe virussen ontstaan, is verwaarloosbaar klein.</p> <p>In uitzonderlijke gevallen kan het pING/Tyrosinase plasmide in contact komen met bacteriën. Opname van plasmide DNA door bacteriën is een inefficiënt proces. Slechts een gering deel van de bacteriesoorten is van nature instaat (competent) om DNA op te nemen onder bepaalde condities. Genen in bacteriën die zorgen voor competentie komen vaak maar tijdelijk tot expressie en worden sterk gecontroleerd door milieu omstandigheden. De kans dat het plasmide DNA in contact komt met bacteriën die vervolgens het plasmide opnemen is zeer klein. Indien bacteriën het plasmide hebben opgenomen is replicatie en handhaving van het plasmide alleen mogelijk in bepaalde soorten bacteriën. Het plasmide bezit een 'Origin of Replication', welke een ColE1-type origine is van een plasmide afkomstig uit enterobacteria. Voor replicatie van het plasmide via de ColE1 ori regio is organisatie van diverse gastheerewitten in een specifiek replicatiecomplex noodzakelijk dat voor zover bekend alleen in enterobacteria (<i>Escherichia</i> en <i>Samonella</i>) voorkomt. Deze enterobacteria (darmbacteriën) komen normaal gesproken niet voor in spierweefsel of in/op de menselijke huid. Indien plasmide DNA in het bloed of via het bloed in de darm terechtkomt zal het worden afgebroken door nucleases. In het onwaarschijnlijke geval dat het plasmide in contact komt met bacteriën uit de darm, dan levert de opname van het plasmide geen enkel groeivoordeel op voor deze bacteriën en zal dit leiden tot verlies van het plasmide. Op grond van bovengenoemde argumenten, is de waarschijnlijkheid dat het plasmide DNA, nadat het in contact is gekomen met een bacterie, ook daadwerkelijk opgenomen wordt door een bacterie die tevens het plasmide kan handhaven en repliceren, en verder verspreiden in het milieu, verwaarloosbaar klein.</p> <p>Het optreden van kiembaanoverdracht (verticale transmissie) is onwaarschijnlijk. Gezien de wijze van toediening is het plasmide DNA transient aanwezig in spiercellen en mogelijk enige huidcellen op de plaats van injectie. Plasmide DNA dat in het bloed of via het bloed in de darm terechtkomt zal worden afgebroken door nucleases. De kans op verspreiding naar de kiembaan is bijzonder klein en daardoor ook de kans op kiembaantransmissie van het pING/Tyrosinase plasmide. In het onwaarschijnlijke geval dat het plasmide opgenomen wordt door kiembaancellen zal dit niet leiden tot kiembaanoverdracht, aangezien het plasmide niet in eukaryotische cellen gehandhaafd blijft.</p> <p>Het kanamycine resistentiegen in het plasmide</p>	
--	---	--



	<p>pING/Tyrosinase kan alleen tot expressie komen in bacteriën. De mogelijke gevolgen van overdracht van het kanamycine resistentiegen is niet aan de orde aangezien de kans dat het plasmide pING/Tyrosinase door bacteriën wordt opgenomen en gehandhaafd blijft verwaarloosbaar klein is.</p> <p>Het enzym tyrosinase katalyseert de omzetting van tyrosine naar het huidpigment melanine in huidcellen. Door expressie van voor de hond xenogenetisch tyrosinase afkomstig van de mens in de hond wordt een specifieke afweerreactie van het immuunsysteem tegen maligne melanoomcellen opgewekt, die veilig is gebleken voor de hond. Door de homologe aard van het tyrosinase zal productie van tyrosinase bij de mens niet leiden tot het optreden van een immunreactie. Het effect van expressie van humaan tyrosinase is bovendien niet aan de orde aangezien de kans dat het plasmide pING/Tyrosinase leidt tot het ontstaan van een GGO dat in een actieve overdraagbare vorm in het milieu kan terechtkomen verwaarloosbaar klein is.</p>	
B. Selectieve voordelen		
<p>Voor de milieurisicoanalyse van een GGO toegepast in medisch of veterinaire 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>De vraag is of het plasmide DNA als gevolg van de aanwezige sequenties of cellen die getransformeerd zijn met het plasmide DNA een dusdanig selectief voordeel kan verkrijgen.</p>	<p>Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden, en de waarschijnlijkheid van het schadelijke effect.</p> <p>Het plasmide pING/Tyrosinase is een gesloten circulair DNA 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 de niet-virale vector is daarom niet aan de orde.</p> <p>Toegediend plasmide DNA kan in de hond terechtkomen in lichaamscellen, waardoor een aantal genetisch gemodificeerde cellen ontstaat. De beschouwing van mogelijke gebeurtenissen die vervolgens zouden kunnen optreden zijn beschreven onder onderdeel A.</p>	<p>Het risico van een verhoogd selectief voordeel bij toepassing van het plasmide pING/Tyrosinase 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 naar andere virussen of bacteriën. Die kans is op de eerste plaats afhankelijk van de aanwezigheid van een verwant virus binnen het zelfde celcompartiment waarin de vector 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>Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden, en de waarschijnlijkheid van het schadelijke effect.</p> <p>Het plasmide pING/Tyrosinase is een gesloten circulair DNA 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 genoverdracht op andere soorten van de niet-virale vector is daarom niet aan de orde.</p> <p>Toegediend plasmide DNA kan in de hond terechtkomen in lichaamscellen, waardoor een aantal genetisch gemodificeerde cellen ontstaat. De beschouwing van mogelijke gebeurtenissen die vervolgens zouden kunnen optreden zijn beschreven onder</p>	<p>Het risico van genoverdracht op andere soorten en de kans dat hierdoor selectieve voor- of nadelen op deze soorten worden overgedragen bij toepassing van het plasmide pING/Tyrosinase is verwaarloosbaar klein.</p>



<p>De vraag is of de sequenties in het plasmide 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 tyrosinase vervolgens een interactie heeft met de virale of bacteriële levenscyclus.</p>	onderdeel A.	
D. Effecten op doel en niet doel populaties		
<p>Effecten op de honden 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 hond vallen onder de medische verantwoordelijkheid van de behandelend dierenarts.</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 hond. 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 hond. 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 plasmide DNA of de cellen die getransformeerd zijn met het plasmide DNA 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>Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden, en de waarschijnlijkheid van het schadelijke effect.</p> <p>Het plasmide pING/Tyrosinase is een gesloten circulair DNA 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 de niet-virale vector is daarom niet aan de orde.</p> <p>Toegediend plasmide DNA kan in de hond terechtkomen in lichaamscellen, waardoor een aantal genetisch gemodificeerde cellen ontstaat. De beschouwing van mogelijke gebeurtenissen die vervolgens zouden kunnen optreden zijn beschreven onder onderdeel A.</p>	<p>Het risico van effecten op doel en niet-doel populaties bij toepassing van het plasmide pING/Tyrosinase is verwaarloosbaar klein.</p>



E. Mogelijke effecten op menselijke gezondheid		
<p>Aspecten gerelateerd aan de pathogeniteit van het GGO zijn reeds aan de orde geweest in onderdeel A. Aspecten gerelateerd aan toxiciteit of allergeniteit en andere gezondheidsgerelateerde effecten zijn onder D behandeld. Daarbij worden de eventuele toxische en allergene effecten van het GGO beoordeeld op mensen in de omgeving van de hond. 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 de sequenties in het plasmide DNA of de cellen die getransformeerd zijn met het plasmide DNA kunnen hebben op de gezondheid van de mens.</p>	<p>Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden, en de waarschijnlijkheid van het schadelijke effect.</p> <p>Het plasmide pING/Tyrosinase is een gesloten circulair DNA 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 menselijke gezondheid van de niet-virale vector is daarom niet aan de orde.</p> <p>Toegediend plasmide DNA kan in de hond terechtkomen in lichaamscellen, waardoor een aantal genetisch gemodificeerde cellen ontstaat. De beschouwing van mogelijke gebeurtenissen die vervolgens zouden kunnen optreden zijn beschreven onder onderdeel A.</p>	<p>Het risico van effecten op de menselijke gezondheid bij toepassing van het plasmide pING/Tyrosinase 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 genen kunnen leiden tot gezondheidsschade voor mens of dier.</p> <p>In onderhavige aanvraag is geen sprake van consumptie.</p>	<p>Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden, en de waarschijnlijkheid van het schadelijke effect.</p> <p>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 het plasmide pING/Tyrosinase is 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 welke effecten de sequenties in het plasmide DNA of de cellen die getransformeerd zijn met het plasmide DNA kunnen hebben op andere microbiële populaties in mens, dier of het milieu.</p> <p>Expressie van de tyrosinase sequentie kan alleen plaatsvinden in levende cellen van de gastheer, de hond.</p>	<p>Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden, en de waarschijnlijkheid van het schadelijke effect.</p> <p>Het plasmide pING/Tyrosinase is een gesloten circulair DNA 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 effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu van de niet-virale vector is daarom niet aan de orde.</p> <p>Toegediend plasmide DNA kan in de hond terechtkomen in lichaamscellen, waardoor een aantal genetisch gemodificeerde cellen ontstaat. De beschouwing van mogelijke gebeurtenissen die vervolgens zouden kunnen optreden zijn beschreven onder onderdeel A.</p>	<p>Het risico van effecten op microbiële populaties in mens, dier of milieu bij toepassing van het plasmide pING/Tyrosinase 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 de expressie van de sequenties in het plasmide DNA of de cellen die getransformeerd zijn met het plasmide DNA zullen leiden tot veranderingen in de medische praktijk.</p>	<p>Evaluatie van mogelijke gevolgen, indien ze optreden, en de waarschijnlijkheid van het schadelijke effect.</p> <p>Het plasmide pING/Tyrosinase is een gesloten circulair DNA molecuul zonder eigenschappen van een levend organisme of virus en kan als zodanig niet worden gezien als een GGO. De experimenten zouden kunnen leiden tot wijziging van de behandeling van melanoom bij honden. Hieraan zijn echter geen nadelige gevolgen verboden voor het milieu.</p> <p>Toegediend plasmide DNA kan in de hond terechtkomen in lichaamscellen, waardoor een aantal genetisch gemodificeerde cellen ontstaat. De beschouwing van mogelijke gebeurtenissen die vervolgens zouden kunnen optreden zijn beschreven onder onderdeel A.</p>	<p>Het risico van nadelige effecten op de medische of veterinaire praktijk bij toepassing van het plasmide pING/Tyrosinase is verwaarloosbaar klein.</p>



DEEL 3. BEPALING VAN HET ALGEGHELE RISICO VAN HET GGO

Hieronder wordt de milieurisicoanalyse uitgevoerd van de voorgestelde introductie van het pING/Tyrosinase plasmide DNA met daarin gekloneerd de sequenties humaan tyrosinase, het kanamycine resistentiegen en de regulerende sequenties (HCMV IE promoter sequentie). 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
<p>Er zijn geen potentiële significante risico's geïdentificeerd in relatie tot de toepassing van het tyrosinase gen in het DNA plasmide pING/Tyrosinase. In de risico schatting is telkens meegewogen dat het plasmide pING/Tyrosinase een gesloten circulair DNA molecuul is zonder eigenschappen van een levend organisme of virus en dat plasmide DNA als zodanig niet gezien kan worden als een GGO.</p> <p>Toegediend plasmide DNA kan in de hond terechtkomen in lichaamscellen. Hierdoor draagt de hond een aantal genetisch gemodificeerde cellen. In deze cellen is het theoretisch mogelijk dat het plasmide pING/Tyrosinase een interactie aangaat met aanwezige virussen of virale sequenties waardoor een genetisch gemodificeerd virus ontstaat dat in een actieve overdraagbare vorm in het milieu kan terechtkomen. Daarnaast kan het plasmide pING/Tyrosinase in een overdraagbare vorm in milieu terechtkomen door opname in bacteriën die replicatie van het plasmide kunnen faciliteren.</p> <p>Het risico dat het plasmide DNA in de hond een interactie aan kan gaan met in de hond aanwezige virussen of in een overdraagbare vorm vrijkomt in het milieu is gezien de beschouwing van deze gebeurtenissen onder onderdeel A verwaarloosbaar klein.</p>	<p>Aangezien de geconstateerde risico's geschat worden op verwaarloosbaar klein, is risicomanagement uit oogpunt van milieuveiligheid niet noodzakelijk.</p>	<p>Verwaarloosbaar klein</p>