

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W. J. Mansveld
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 27 februari 2013
KENMERK CGM/130227-05
ONDERWERP Advies: Moleculaire karakterisering van ggo's voor toepassing in klinische of
veterinaire studies

Geachte mevrouw Mansveld,
Hierbij bied ik u het advies 'Criteria voor de moleculaire karakterisering van ggo's voor medische en veterinaire toepassing' aan.


Samenvatting

In Nederland worden de laatste jaren regelmatig klinische of veterinaire studies gedaan met genetisch gemodificeerde organismen (ggo's). Deze zogenaamde introductie in het milieu van ggo's kan risico's inhouden voor mens en milieu. Om de eventuele milieurisico's in te schatten, moeten de ggo's in voldoende detail gekarakteriseerd zijn. In onderstaand advies zet de COGEM uiteen op welke wijze en tot in welk detail een ggo voor medische of veterinaire toepassing genetisch in kaart gebracht moet worden om de risicobeoordeling uit te kunnen voeren.

Bij de genetische karakterisering onderscheidt de COGEM drie verschillende aspecten. Het eerste aspect betreft de karakterisering van het uitgangsgenoom. De eigenschappen van het uitgangsgenoom vormen de basis van een milieurisicobeoordeling waardoor de bevestiging van de identiteit een belangrijke vereiste vormt. Het tweede aspect betreft de moleculaire karakterisering van de beoogde modificatie. Om het effect van de modificatie op de milieurisico's op een correcte wijze te kunnen bepalen, is het noodzakelijk te weten dat de beoogde wijziging overeenkomstig de verwachting in het ggo is geïmplementeerd. Het derde aspect van de moleculaire karakterisering betreft de eventuele aanwezigheid van mogelijke onbedoelde wijzigingen. Door van nature voorkomende processen kunnen tijdens de productie van een ggo onbedoelde wijzigingen in het genoom plaatsvinden. Deze wijzigingen kunnen de fitness van het uiteindelijke ggo beïnvloeden en daarmee de uitkomst van de milieurisicobeoordeling.

Om inzicht te verkrijgen in bovengenoemde aspecten preferereert de COGEM een sequentieanalyse van het gehele genoom van het ggo. Zij merkt daarbij echter op dat de nucleotidevolgorde niet noodzakelijkerwijs overlegd hoeft te worden. In principe kan worden volstaan met een uiteenzetting van de resultaten van de vergelijking tussen de verwachte en de werkelijke sequentievolgorde en de impact van eventuele afwijkingen. In het advies worden echter ook andere methoden aangereikt waarop bovenstaande aspecten in kaart gebracht kunnen worden.

Als aan de hiervoor genoemde voorwaarden wordt voldaan, is de COGEM van mening dat een ggo voldoende genetisch is gekarakteriseerd om tot een gedegen beoordeling van de milieurisico's te kunnen komen.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en de hieruit voortvloeiende criteria die aan de moleculaire karakterisering van ggo's voor medische en veterinaire toepassing worden gesteld, treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,



Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau GGO
Dr. I. van der Leij, Ministerie IenM

Criteria voor moleculaire karakterisering van ggo's voor medische en veterinaire toepassing

COGEM advies CGM/130227-05

1. Inleiding

Voor de introductie in het milieu van een genetisch gemodificeerd organisme (ggo) moet het ggo in voldoende detail gekarakteriseerd zijn. Deze karakterisering moet een goed beeld geven van de eigenschappen van betreffend ggo en vormt daarmee een belangrijke basis voor de milieurisicobeoordeling. In de praktijk omvat een dergelijke karakterisering zowel een genetische als een fenotypische beschrijving. Deze beschrijvingen zijn additief en zijn beide nodig voor een compleet beeld van de eigenschappen.

Pas de laatste jaren worden met enige regelmaat klinische of veterinaire studies gedaan met ggo's. Hiervoor is in Nederland een milieuvergunning 'introductie in het milieu' nodig. In de afgelopen vijf jaar heeft de COGEM 22 maal geadviseerd over aanvragen voor deze milieuvergunningen. In het merendeel van deze aanvragen werd gebruik gemaakt van een virale vector, maar er zijn ook een aantal aanvragen voor gg-bacteriën en naakt DNA de revue gepasseerd.^{1,2,3,4,5,6,7,8} In 6 van de 22 uitgebrachte adviezen kon de COGEM niet direct positief adviseren over de aanvraag.^{7,9,10,11,12,13} In de meeste gevallen werd dit (mede) veroorzaakt door een gebrekkige genetische karakterisering van het te gebruiken ggo.

Als er onvoldoende gegevens worden aangeleverd om de genetische organisatie van het ggo te kunnen verifiëren, kan de COGEM geen conclusies trekken over de milieurisiko's. In dat geval rest slechts de 'worst case' benadering hetgeen voor een introductie in het milieu zal leiden tot een negatief advies.

Om aanvragers, het ministerie van IenM en andere stakeholders inzicht te geven in de mate en het detail van de benodigde genetische informatie, is onderstaand advies opgesteld. Dit advies concentreert zich op de voorwaarden die de COGEM stelt aan de genetische beschrijving, de zogenaamde moleculaire karakterisering van ggo's die gebruikt worden in klinische en veterinaire studies. Om de helderheid van het advies te waarborgen en omdat de vergunningaanvragen daartoe geen aanleiding geven, gaat het advies niet uitgebreid in op de voorwaarden voor de fenotypische beschrijving van een ggo. In uitzonderlijke gevallen is de interpretatie van de moleculaire karakterisering echter meer dan normaal verbonden met de fenotypische karakterisering van het ggo. In deze situatie wordt naast de eisen aan de moleculaire karakterisering tevens kort ingegaan op de eisen aan de fenotypische karakterisering. De reden voor de verschillende voorwaarden en de wijze waarop een aanvrager aan betreffende voorwaarden kan voldoen, wordt in onderstaand advies nader toegelicht.

2. Overeenkomsten met de moleculaire karakterisering van gg-gewassen

De COGEM heeft veel ervaring met vergunningaanvragen voor de introductie in het milieu van gg-gewassen en de wijze waarop een goed beeld kan worden verkregen van de genetische

samenstelling van deze ggo's. Op basis van deze ervaring heeft de COGEM de voorwaarden die ze aan de moleculaire karakterisering van gg-gewassen stelt in twee verschillende publicaties uiteengezet en toegelicht.^{14,15} Bij de totstandkoming van onderstaand advies zijn zowel de voorwaarden voor de moleculaire karakterisering van gg-gewassen als de richtlijnen die voortvloeien uit de eerdere adviezen over de introductie in het milieu van ggo's voor medische en veterinaire toepassingen als leidraad gebruikt.

Om de milieurisico's van een ggo te kunnen beoordelen, acht de COGEM de identificatie van het uitgangsgenoom een eerste vereiste. Daarnaast is het van belang te weten welke genetische elementen aan het ggo zijn toegevoegd of zijn onttrokken en wat de functie van deze elementen is. Daarom dient de karakterisering een inventarisatie van de beoogde wijzigingen te omvatten. Hierbij is het van belang dat op navolgbare wijze wordt gecontroleerd of de beoogde wijzigingen daadwerkelijk in het genoom van het ggo zijn aangebracht. Een nauwkeurige beschrijving van de wijze waarop de constructie heeft plaatsgevonden, kan hierbij een nuttig referentiekader bieden.

Afhankelijk van het uitgangsgenoom en de manier waarop de modificatie wordt uitgevoerd, is het mogelijk dat naast de geplande wijzigingen ook onbedoelde wijzigingen plaatsvinden. Dit vormt het laatste deel van de karakterisering en omvat mogelijke herschikkingen, deleties of puntmutaties in het genoom van het ggo. Tevens dient in kaart gebracht te worden of er onbedoeld andere stukken DNA, die bij de constructie van het ggo aanwezig zijn in het genoom van het ggo zijn geïntroduceerd.

Bij de moleculaire karakterisering van gg-gewassen acht de COGEM het van belang dat het ggo geanalyseerd wordt op nieuwe openleesramen (fusie-ORFs), die ontstaan ten gevolge van de beoogde modificatie.¹⁵ Een fusie-ORF bestaat voor een deel uit een coderende sequentie van het uitgangsgenoom en voor een deel uit een sequentie van het insert. Het fusie-ORF kan hierbij in een ander leesraam liggen dan het leesraam dat het toegevoegde transgen gebruikt en kan ook, in het geval van een dubbelstrengig genoom, op de tegenoverliggende streng liggen. In theorie kunnen er maximaal twaalf fusie-ORFs ontstaan.

In principe kunnen er ook fusie-ORFs ontstaan als gevolg van een deletie. In dat geval bestaat de fusie-ORF uit sequenties van het uitgangsgenoom die aan weerszijden liggen van de verwijderde regio. Bij een deletie is er sprake van maximaal zes fusie-ORFs. De COGEM merkt hierbij op dat de aanwezige ORFs bij veel virussen slechts in één richting van het genoom worden afgeschreven. Hierdoor wordt het aantal fusie-ORFs dat daadwerkelijk aanleiding kan geven tot nieuwe eiwitten gehalveerd.

In theorie kunnen de fusie-ORFs leiden tot de synthese van eiwitten met onbekende eigenschappen. De kans dat zulke fusie-ORFs tot een functioneel eiwit leiden, acht zij echter zeer klein. De COGEM merkt op dat bij de eiwitsynthese een grote hoeveelheid zogenaamde 'defective ribosomal products' (DRiPs) worden gevormd.^{16,17} Deze DRiPs zijn abnormale of niet-functionele polypeptideketens, die zeer snel worden afgebroken en als antigene determinant worden aangewend. De COGEM acht het waarschijnlijk dat de fusie-ORFs, als abnormale polypeptiden eenzelfde lot beschoren is als deze DRiPs. Tevens merkt zij op dat de ggo's die voor een medische of veterinaire toepassing worden gebruikt meestal biologisch ingeperkt zijn. Zelfs

als een fusie-ORF een nadelig effect op zou leveren, blijft het door de biologische inperking van het ggo veelal beperkt tot de vrijwilliger of het proefdier. Deze risico's vallen onder andere wetgeving dan de milieuwetgeving en vallen daardoor buiten het bestek van dit advies. De risico's voor proefdier of vrijwilliger worden onder andere beoordeeld door (medische) ethische toetsingscommissies. Indien er sprake is van biologisch niet-ingeperkte systemen kan de COGEM echter niet geheel uitsluiten dat een fusie-ORF tot een milieurisico leidt.

Anders dan bij de ontwikkeling van gg-gewassen vindt de modificatie van bacteriën of virussen veelal op een gerichte wijze plaats. Er wordt van te voren bepaald op welke plek in het genoom de modificatie aangebracht wordt. Hierdoor kan in het ontwerp al rekening worden gehouden met de fusie-ORF. Indien er gebruik wordt gemaakt van biologisch niet-ingeperkte ggo's adviseert de COGEM in het kader van de moleculaire karakterisering de mogelijke fusie-ORFs in kaart te brengen en op basis van bioinformatische analyse te voorspellen of deze fusie-ORFs schadelijk kunnen zijn.

Alle geplande en ongeplande wijzigingen die de de COGEM van belang acht om met zekerheid vast te kunnen stellen of het ggo overeenkomt met zijn theoretische omschrijving worden in het volgende hoofdstuk uiteengezet.

3. Voorwaarden aan moleculaire karakterisering van ggo's voor medische of veterinaire toepassing

Mede door de ervaring met vergunningaanvragen voor introductie in het milieu van gg-virussen en gg-bacteriën zijn de onderstaande criteria algemeen van toepassing op zowel gg-virussen als gg-bacteriën, tenzij anders wordt vermeld. De COGEM merkt hierbij op dat als een studie gebruik maakt van een ggo dat gebaseerd is op een ander micro-organisme, zoals bijvoorbeeld een gist, de criteria nog niet zijn vastgesteld. Zij adviseert echter in deze situatie onderstaande criteria voorlopig als leidraad te hanteren. Ook in het geval van een medische of veterinaire studie met zogenaamd naakt DNA is de COGEM van mening dat het advies als richtlijn gebruikt kan worden.

3.1 Identificatie van het uitgangsgenoom

Het organisme waarin de beoogde genetische modificaties worden aangebracht, vormt de basis van een ggo. Kennis van de eigenschappen van dit zogenaamde uitgangsgenoom (of acceptororganisme) vormt daarom een essentieel startpunt voor de milieurisicoanalyse van een ggo en het is evident dat relevante wetenschappelijke informatie over deze eigenschappen niet in de vergunningaanvraag mogen ontbreken.

Met het oog op de impact van het uitgangsgenoom op het beoogde ggo is de COGEM van mening dat de identiteit van het uitgangsgenoom gedetailleerd moet worden vastgesteld. Dit vormt het eerste onderdeel van de moleculaire karakterisering.

In het geval van virussen is de COGEM van mening dat de identiteit hiervan geverifieerd moet worden op basis van een sequentieanalyse van het genoom. De aanvrager dient hierbij aan te geven op basis van welke kenmerken de identiteit van het uitgangsgenoom is vastgesteld. De

nadruk ligt dus op het resultaat van de bioinformatische analyse. Het overleggen van de sequentievolvergordde is hiervoor niet noodzakelijk.

Voor bacteriën kan eenzelfde aanpak worden gevolgd. Gezien de wijze waarop bacteriën normaliter fenotypisch worden getypeerd, acht de COGEM het ook afdoende als de sequentieanalyse zich beperkt tot een kenmerkend deel/kenmerkende delen van het genoom van betreffende bacteriestam. Zij merkt hierbij op dat in dit geval naast de moleculaire karakterisering ook aanvullende fenotypische karakterisering noodzakelijk is om tot een volledige identificatieverificatie te kunnen komen.

3.2 Beoogde modificatie van uitgangsgenoom.

Op basis van de ggo's waarover de COGEM de afgelopen jaren heeft geadviseerd, zijn verschillende soorten modificaties te onderscheiden. Het betreft onder andere de insertie van een heterologe of homologe sequentie in het genoom van het uitgangsgenoom, de deletie van delen van het genoom van het uitgangsgenoom of een combinatie van beiden. Daarnaast kan de modificatie ook een of meerdere (punt)mutaties in bestaande sequenties behelzen. Om een inschatting te kunnen maken van de invloed van deze modificaties op de mogelijke milieurisico's, is het uiteraard van belang te weten welke functie het insert heeft in het donor-organisme of wat de functie is van betreffende sequentie in het acceptororganisme. Deze informatie is noodzakelijk om de impact te kunnen bepalen van de betreffende wijziging op de eigenschappen van het ggo en de daaruit voortvloeiende milieurisico's.

De criteria voor de moleculaire karakterisering worden hieronder voor ieder type modificatie apart weergegeven en toegelicht. Indien er sprake is van een combinatie van (verschillende) modificaties dient de moleculaire karakterisering uiteraard te voldoen aan de voorwaarden voor beide wijzigingen. De COGEM wijst er daarbij op dat een nauwkeurige beschrijving van de wijze waarop het betreffende ggo is geconstrueerd een belangrijk referentiekader biedt voor de moleculaire karakterisering. Hiervoor kan zowel een beschrijving van het plasmide DNA dat voor het aanbrengen van de modificatie is gebruikt, als ook een beschrijving van de coderende sequentie die is gebruikt om de insertie, deletie of puntmutatie te bewerkstelligen met, indien van toepassing, de daarin aanwezige regulatoire sequenties, als zeer nuttig worden aangemerkt.

3.2.1 Toevoeging van heterologe of homologe sequenties

Genetische modificatie wordt vaak gebruikt om aan een micro-organisme een nieuwe eigenschap toe te voegen. In de meeste gevallen wordt hiervoor een compleet transgen al dan niet voorzien van regulatoire elementen aan het genoom van een uitgangsgenoom toegevoegd.^{3,9,10,11,12,13,18,19,20,21,22} Het is echter ook mogelijk dat er coderende elementen aan een reeds aanwezig gen worden toegevoegd, waardoor een fusie-eiwit ontstaat. Deze situatie deed zich bijvoorbeeld voor bij de klinische studie met een conditioneel replicerende adenovirusvector voor hersentumoren.^{23,24}

Om de milieurisico's van het ggo te kunnen beoordelen, moet bekend zijn welke genen of sequenties aan het genoom van het gebruikte uitgangsgenoom zijn toegevoegd. Afhankelijk van

de wijze waarop het ggo wordt geconstrueerd, is het mogelijk dat er meerdere kopieën van de betreffende sequentie in het genoom van het ggo ingebouwd zijn. Deze kopieën kunnen zowel in tandem op dezelfde insertieplaats als ook verspreid door het genoom ingebouwd worden. Aangezien dit van invloed is op het expressiepatroon van de sequentie, is informatie hierover, tezamen met de functie van de sequentie van belang voor een goede inschatting van de milieurisico's.

De COGEM is derhalve van mening dat vastgesteld dient te worden op welke locatie en welke oriëntatie het insert is geïntegreerd en hoeveel kopieën van het insert aanwezig zijn. Om hier inzicht in te krijgen is de COGEM van mening dat de insertie volledig gesequenced dient te worden. Deze sequentieanalyse dient het insert met eventueel gebruikte recombinatiesequenties te omvatten en dient aan weerszijden van het insert enkele tientallen nucleotiden door te lopen in het genoom van het acceptororganisme. Naast sequentieanalyse kan ter ondersteuning ook gebruik worden gemaakt van Southernblot analyse om aan genoemde criteria te voldoen. De nucleotidenvolgorde van insert en genoemde flankerende regionen dient in de aanvraag opgenomen te worden. Indien de nucleotidenvolgorde afwijkt van de verwachte sequentie verwacht de COGEM dat de impact van deze afwijkingen op de eventuele milieurisico's in de aanvraag wordt toegelicht.

3.2.2 Deletie of disruptie van gen(en) uit genoom van het uitgangsgenorganisme

In de praktijk kan de synthese van een bepaald eiwit van een organisme worden voorkomen door het betreffende gen dat dit eiwit codeert (gedeeltelijk) te verwijderen of het leesraam van dit gen te doorbreken door een stuk nieuw genetisch materiaal in te voegen.^{6,7,8,23,24,25} Indien in het uiteindelijke ggo geen additionele sequentie (meer) aanwezig is, wordt gesproken van zogenaamde schone deletiemutanten.

Om de deletie of disruptie van het beoogde gen en de wijze waarop dit in de praktijk heeft plaatsgevonden te kunnen verifiëren, is de COGEM van mening dat de sequentie van de betreffende regio in het ggo geanalyseerd dient te worden. De sequentie, inclusief eventueel gebruikte recombinatiesequenties, dient zich uit te strekken tot in de flankerende regio's die uniek zijn voor het uitgangsgenorganisme en dus niet aanwezig zijn in de voor de modificatie gebruikte transfervector. Om de impact van de wijziging op de eventuele milieurisico's te kunnen beoordelen is een beschrijving van de functie van het geïnactiveerde gen hierbij gewenst. Conform voorgaande paragraaf dient de nucleotidevolgorde van de regio met betreffende deletie of disruptie door de aanvrager overlegd te worden en moet in geval van afwijkingen in gegaan worden op het mogelijke effect van deze afwijkingen.

3.2.3 (Punt)mutaties van gen(en) van het uitgangsgenorganisme

De beoogde wijziging kan ook bestaan uit een of meerdere puntmutaties in een gen van interesse. Om de impact van de wijziging op de eventuele milieurisico's te kunnen beoordelen is een beschrijving van de oorspronkelijk en de nieuwe functie van het aangepaste gen van belang.

Om de mutaties in het gen van interesse en de wijze waarop dit in de praktijk heeft plaatsgevonden te kunnen verifiëren, is de COGEM van mening dat de sequentie van de

betreffende regio in het ggo geanalyseerd dient te worden. Net als geldt voor een deletie dient de sequentie, inclusief eventueel gebruikte recombinatiesequenties, zich uit te strekken tot in de flankerende regio's die uniek zijn voor het uitgangsgenoom en dus niet aanwezig zijn in de voor de modificatie gebruikte transfervector. Ook voor dit type wijziging moet de nucleotidevolgorde van de regio met betreffende mutatie(s) overlegd worden en moet in geval van onbedoelde afwijkingen ingegaan worden op het mogelijke effect van deze afwijkingen.

3.3 Onbedoelde wijzigingen in genoom van ggo

Gedurende de constructie en productie van het ggo is het mogelijk dat door van nature voorkomende processen naast de geplande genetische wijzigingen ook onbedoelde genetische wijzigingen plaatsvinden. Afhankelijk van het type wijziging kan dit de fitness van het uiteindelijke ggo beïnvloeden en daarmee de uitkomst van de milieurisicobeoordeling. De COGEM is derhalve van mening dat de moleculaire karakterisering van een ggo ook helderheid moet verschaffen over de aanwezigheid van mogelijke onbedoelde wijzigingen. De COGEM onderscheidt hierbij twee verschillende onbedoelde wijzigingen: 1. *introductie van onbedoelde heterologe DNA sequenties* en 2. *genetische variatie ten opzichte van het uitgangsgenoom*. Onder deze tweede wijziging worden herschikkingen, deleties of puntmutaties verstaan die van nature optreden. De wijze waarop deze wijzigingen in kaart kunnen worden gebracht en de eventuele impact op de milieurisicobeoordeling, wordt hieronder voor iedere wijziging afzonderlijk weergegeven.

3.3.1 Onbedoelde aanwezigheid van heterologe DNA sequenties

Bij de constructie van ggo's wordt veelal gebruik gemaakt van een transfervector die naast de sequentie om de beoogde wijziging te creëren ook bestaat uit zogenaamd backbone DNA. Dit backbone DNA bevat bijvoorbeeld elementen die nodig zijn voor de productie van de transfervector in bacteriën, zoals een zogenaamd 'origin of replication' (ori) en een antibioticum resistentiegen. Mede afhankelijk van de manier waarop het ggo wordt gemaakt, is het mogelijk dat (een deel van) het backbone DNA in het genoom van het ggo terecht komt. Daarnaast kan de transfervector, als gevolg van het productieproces in *E. coli* vervuild zijn met *E. coli* DNA fragmenten. Het is hierdoor niet uit te sluiten dat het ggo delen van *E. coli* DNA bevat. Op soortgelijke wijze kan contaminatie van een ggo optreden als tijdens het proces gebruik is gemaakt van zogenaamd carrier DNA zoals zalm-sperma DNA.

Deze en soortgelijke onbedoelde contaminaties kunnen van invloed zijn op de eigenschappen van het ggo. Om te kunnen bepalen of deze eigenschappen in de milieurisicobeoordeling meegenomen moeten worden, is het van belang te weten of en zo ja, welke sequenties in het ggo terecht zijn gekomen en wat de functie is van betreffende sequenties in het donororganisme.

De COGEM is daarom van mening dat uit de moleculaire karakterisering van het ggo moet blijken of onbedoelde heterologe sequenties in het ggo aanwezig zijn. Dit kan worden gedaan door controle van het restrictiepatroon met een aantal restrictie-enzymen en/of een aantal Southernblot analyses, maar het is ook mogelijk om de sequentie van het volledige genoom van het ggo in kaart te brengen en de sequentie te controleren op de aanwezigheid van additionele

sequenties. De aanvraag moet een beschrijving bevatten van de wijze waarop de alignment met de verwachte sequentie is uitgevoerd en de resultaten weergeven die deze analyse heeft opgeleverd evenals de mogelijke impact van de additionele sequenties op de eigenschappen van het ggo. Aangezien de COGEM voor de beoordeling van de milieurisico's in deze situatie geïnteresseerd is in de functie en de impact van onbedoeld geïnsereerde, heterologe DNA sequenties en niet in de sequentie zelf, hoeft de volledige sequentie in het kader van de moleculaire karakterisering niet overlegd te worden.

3.3.2 Genetische variatie in gg-virussen.

Afhankelijk van het type virus komen wijzigingen in het genoom van nature in meer of mindere mate voor. In het geval van puntmutaties kan dit in de meeste gevallen tot de natuurlijke sequentievariatie gerekend worden. Deze natuurlijke variatie wordt reeds meegenomen in de biologische karakterisering van een virussoort. De COGEM is van mening dat de puntmutaties die gedurende de constructie en productie van gg-virussen kunnen ontstaan, hoogstwaarschijnlijk binnen de bandbreedte van deze natuurlijke variatie vallen. Zij kan echter niet uitsluiten dat (een combinatie van) puntmutaties van invloed (is) zijn op de eigenschappen van het ggo.

De huidige wetenschappelijke kennis is op dit moment ontoereikend om een gedegen voorspelling te doen van het effect van iedere puntmutatie. De COGEM is daarom van mening dat het in kaart brengen van puntmutaties, als onderdeel van de moleculaire karakterisering, op dit moment niet van toegevoegde waarde is voor de milieurisicoanalyse. De COGEM benadrukt hierbij dat eventueel aanwezige puntmutaties die relevante eigenschappen veranderen, zullen worden opgemerkt bij de fenotypische karakterisering tijdens bijvoorbeeld de uitgebreide pre-klinische onderzoeksfase en via deze weg in de milieurisicoanalyse opgenomen worden.

Door uitwisseling van genoomsegmenten of door recombinatie is het ook mogelijk dat de genetische variatie grote delen van het genoom betreft. Voor de constructie en productie van gg-virussen wordt gebruik gemaakt van gastheercellen. In de situatie dat relevante gerelateerde virussen in deze cellen aanwezig zijn of door (on)bedoelde aanwezigheid van delen van het virale genoom is uitwisseling van virale sequenties tijdens de productie van het gg-virus niet altijd uit te sluiten. Een dergelijke mogelijke uitwisseling is van invloed op de eigenschappen van het virus en dient bij de milieurisicobeoordeling betrokken te worden.

Gezien de mogelijke invloed op de eigenschappen is de COGEM van mening dat het genoom van het gg-virus geanalyseerd dient te worden op uitwisselingen, herschikkingen en/of deleties. Dit kan gedaan worden met behulp van Southernblot analyses met dusdanig oplossend vermogen dat eventuele wijzigingen gedetecteerd kunnen worden. Dit kan ook worden bereikt door het genoom van het ggo te sequencen en de verkregen sequentie te vergelijken met de verwachte nucleotidevolgorde van het gg-virus. Ook hier acht de COGEM inzicht in de wijze waarop de alignment is uitgevoerd, door bijvoorbeeld een grafische presentatie en een inschatting van de impact van eventuele wijzigingen van belang. Als aan deze voorwaarden wordt voldaan heeft de COGEM de nucleotidevolgorde zelf niet nodig voor de milieurisicobeoordeling en hoeft deze niet overlegd te worden. Daarnaast wijst de COGEM hier op de waarde van ondersteunende fenotypische karakterisering.

3.3.3 Genetische variatie in gg-bacteriën

Uitwisseling van genetische informatie is een veelvoorkomend proces in bacteriën. Hierdoor wordt nieuw DNA in het genoom van een bacterie opgenomen en wordt bestaand DNA afgestoten. Deze processen kunnen ook optreden bij de productie van gg-bacteriën. Zoals te doen gebruikelijk wordt bij de productie van gg-bacteriën gebruik gemaakt van een reinstrijk en wordt in de productiefaciliteit contact met andere soorten bacteriën voorkómen. Hierdoor wordt de mogelijkheid dat nieuw (bacterieel) DNA in het ggo wordt geïntroduceerd geminimaliseerd en blijft een eventuele wijziging van de genomische organisatie beperkt tot de verwijdering van delen van het genoom of herschikkingen van de eigen genetische informatie.

Tot op heden zijn in medische studies alleen apathogene bacteriën of pathogene bacteriën waaruit de virulentiefactoren zijn verwijderd, toegepast. Als de gg-bacteriën in deze categorie vallen, ontbreken pathogene eigenschappen waardoor de COGEM de kans verwaarloosbaar klein acht dat herschikkingen en deleties een ‘gain of function’ op zullen leveren. Voor deze categorie van gg-bacteriën is zij dan ook van mening dat inzicht in herschikkingen of deleties van het gehele genoom van gg-bacteriën niet van invloed is op de milieurisicoanalyse. Een uitgebreide analyse van het genoom op deleties en herschikkingen acht de COGEM dan ook niet nodig voor de moleculaire karakterisering van deze gg-bacteriën.

Het is echter ook mogelijk dat gg-bacteriën worden toegepast waarvan de functie van de virulentiefactoren is verstoord door een disruptie van de corresponderende coderende sequentie door middel van bijvoorbeeld een insertie van een (korte) sequentie. De COGEM acht het niet uitgesloten dat door herschikkingen en/of deleties een dergelijke aanpassing ongedaan wordt gemaakt. Voor medische toepassingen met genetisch gemodificeerde pathogene bacteriën waarvan de virulentiefactoren op deze wijze onschadelijk zijn gemaakt, acht de COGEM naast een fenotypische karakterisering, een moleculaire inventarisatie op herschikkingen of deleties ter plekke van de uitgeschakelde genen daarom wel nodig.

Hiervoor kan gebruik gemaakt worden van Southernblot analyses met voldoende oplossend vermogen om eventuele wijzigingen te kunnen detecteren. De herschikkingen of deleties kunnen ook in kaart gebracht worden door een sequentieanalyse van betreffende regio. Hierbij acht de COGEM het afdoende als het resultaat wordt gegeven van de vergelijking tussen de verkregen sequentie en de verwachte nucleotidevolgorde en indien van toepassing een inschatting van de impact van eventuele wijzigingen.

3.4 Conclusie

De COGEM acht een gedegen moleculaire karakterisering essentieel voor de milieurisicobeoordeling van de introductie in het milieu van ggo's. In bovenstaande paragrafen is uitgelicht welke aspecten zij hierbij van belang acht en wordt tevens aangegeven op welke wijze de aanvrager hier inzicht in kan geven. De COGEM merkt hierbij op dat de gesuggereerde methoden zijn toegespitst op ieder aspect van de moleculaire karakterisering afzonderlijk.

Vanuit het geheel van de gestelde voorwaarden bezien, wijst de COGEM erop dat met de nucleotidevolgorde van het gehele genoom van het ggo antwoord gegeven kan worden op alle

genoemde aspecten die de COGEM van belang acht voor de moleculaire karakterisering. Gezien de state-of-the-art van de huidige sequentieanalyse-technieken, de kracht van het bewijsmateriaal en de kosteneffectieve wijze waarop tegenwoordig de nucleotidevolgorde van een organisme verkregen kan worden, is de COGEM daarom van mening dat de analyse van de nucleotidevolgorde van het gehele genoom de voorkeur verdient.

De COGEM benadrukt het belang van de vergelijking van de verkregen nucleotidevolgorde met de verwachte sequentie in relatie tot bovengenoemde onbeoogde wijzigingen en een beschrijving van de impact die eventuele afwijkingen (kunnen) hebben op de eigenschappen van het ggo. Zij acht het hierbij niet noodzakelijk dat de gehele nucleotidevolgorde wordt overlegd. Er kan worden volstaan met de sequentievolvergde van de regio waarin de beoogde wijzigingen zijn aangebracht. Het staat de aanvrager echter vrij om meer delen van de sequentievolvergde te overleggen om bepaalde conclusies te kunnen onderbouwen.

4. Voorwaarden aan moleculaire karakterisering van nog te construeren ggo's

Een klinische of veterinaire studie kan uitgevoerd worden met een beperkt aantal ggo's die van tevoren reeds geconstrueerd en gekarakteriseerd zijn. Juridisch gezien is het echter ook mogelijk dat een vergunning wordt verleend voor een reeks van ggo's waarvan een aantal varianten nog niet zijn gecreëerd of gekarakteriseerd. De aanvrager wordt daarbij gehouden aan de in de vergunning beschreven ggo's en mag alleen gebruik maken van die ggo's waarvan de moleculaire karakterisering voldoet aan de in de vergunning opgegeven specificaties.

De COGEM kan haar milieurisicobeoordeling ook uitvoeren op basis van een gedetailleerde theoretische beschrijving van het genoom van het ggo. Zij wijst er daarbij op dat ieder ggo vóór gebruik in een klinische of veterinaire studie uiteraard wel gekarakteriseerd dient te worden en moleculair overeen moet komen met de in de vergunning opgenomen genetische beschrijving. Ook in deze situatie is de COGEM van mening dat de eerder genoemde voorwaarden als leidraad voor de moleculaire karakterisering gehanteerd dienen te worden.

Zij merkt hierbij op dat het van wezenlijk belang is te kunnen beoordelen op welke wijze de aanvrager aan de gestelde voorwaarden zal voldoen. Zij adviseert daarom de moleculaire karakterisering van in ieder geval één voor de groep van de te creëren ggo's representatief ggo volgens de criteria uit te voeren en de gegevens hiervan in de aanvraag op te nemen. Op basis van deze gegevens kan de COGEM beoordelen of de moleculaire karakterisering van de nog te creëren of produceren ggo's aan de eisen zullen voldoen en voldoende informatie biedt om conclusies te kunnen trekken over de genetische samenstelling. Als aan de eisen wordt voldaan en het ggo is gelijk aan het theoretisch beschreven ggo dan kan het ggo in de studie worden gebruikt.

Dit betekent dat in de praktijk voorkomende afwijkingen van de beoogde wijzigingen of de aanwezigheid van onbedoelde wijzigingen niet in de milieurisicobeoordeling zijn meegewogen. Het gebruik van een ggo dat op het beschreven ggo lijkt maar genetisch niet gelijk is, is dus niet vergund en vereist minimaal een wijziging van de vergunning of een nieuwe poging het ggo correct te construeren.

Als wordt voldaan aan bovenstaande voorwaarden is de COGEM van mening dat de veiligheid voor mens en milieu ook kan worden gewaarborgd als een vergunning wordt afgegeven waarvoor

een deel van de ggo's nog niet moleculair gekarakteriseerd is. De correcte analyse en de beoordeling van de moleculaire samenstelling van de andere ggo's acht de COGEM hierbij de verantwoordelijkheid van de aanvrager.

5. Samenvatting

Samengevat, is de COGEM van mening dat de moleculaire karakterisering van een ggo dat voor klinische of veterinaire studie in het milieu wordt geïntroduceerd aan de volgende criteria moet voldoen:

Identificatie van het uitgangsgenoom

- De identiteit van het uitgangsgenoom dient vastgesteld te zijn. Dit kan op basis van enkele specifieke kenmerken in de sequentievolgorde van het genoom van betreffend uitgangsgenoom.

Karakterisering van beoogde modificatie

- Indien sequenties aan een micro-organisme worden toegevoegd, moet bekend zijn welke elementen in het ggo zijn geïntroduceerd, evenals het aantal aanwezige kopieën van de insertiecassette, de exacte locatie en de functie van deze elementen.
- Indien een of meerdere genen uit het genoom van het micro-organisme worden verwijderd of het ORF van deze genen wordt onderbroken, moet bekend zijn welke elementen niet meer tot expressie komen, wat de exacte locatie van de wijziging is en wat de functie van deze elementen is.
- Indien de wijziging een of meerdere puntmutaties betreft moet exact bekend zijn welke mutaties aangebracht worden en moeten zowel de oorspronkelijke als nieuwe eigenschappen van betreffend gen aangegeven worden.
- Bovengenoemde wijzigingen moeten volledig gekarakteriseerd zijn door middel van sequentiebepaling. Deze sequentiebepaling omvat de regio van de beoogde wijziging inclusief eventueel gebruikte recombinatiesequenties en moet zich uitstrekken tot in de flankerende sequenties van het genoom van het uitgangsgenoom.
- Indien de betreffende ggo's biologisch niet-ingeperkt zijn, moeten, als extra veiligheid, de fusie-ORFs in kaart worden gebracht en, waar mogelijk, hun eventuele functie worden beschreven.

Karakterisering van onbedoelde wijzigingen in genoom van ggo:

- Het ggo moet geanalyseerd worden op de eventuele aanwezigheid van onbedoelde heterologe sequenties. Dit kan op basis van een controle van het restrictiepatroon, een uitgebreide Southernblot analyse of een sequentieanalyse van het volledige genoom van het ggo.
- Het genoom van gg-virussen dient gecontroleerd te worden op deleties en/of herschikkingen en de impact van onverwachte wijzigingen moet worden toegelicht. De genomische organisatie kan afdoende in kaart worden gebracht met een aantal Southernblot analyses of

een vergelijking van de in theorie verwachte en de in de praktijk verkregen nucleotidevolgorde van het ggo.

- Net als voor gg-virussen dient het genoom van gg-bacteriën gecontroleerd te worden op deleties en/of herschikkingen en moet de impact van onverwachte wijzigingen worden toegelicht. Dit is echter niet nodig als het gg-bacteriën betreft die gebaseerd zijn op apathogene bacteriestammen of pathogene bacteriestammen waaruit de coderende sequenties van de virulentiefactoren zijn verwijderd.

In de situatie dat de vergunningaanvraag ook ggo's betreft die nog niet geconstrueerd of geproduceerd zijn, voegt de COGEM daar de volgende voorwaarden aan toe.

- De vergunningaanvraag dient de moleculaire karakterisering van minimaal één representatief ggo voor de te creëren groep ggo's te bevatten die voldoet aan bovenstaande voorwaarden.
- De wijze waarop de overige ggo's worden geconstrueerd dient uitvoerig beschreven te worden.
- De exacte genetische organisatie cq. de moleculaire blauwdruk van de nog te construeren ggo's dient te worden aangeleverd. De aanvraag bevat een gedegen beschrijving van de methoden die gebruikt zullen worden om betreffend ggo moleculair te karakteriseren inclusief technische specificaties, gevoeligheid en robuustheid van de methoden.
- De specificaties waaraan het ggo in deze tests moet voldoen dienen helder te zijn verwoord.
- De methoden en specificaties zijn gebruikt voor de moleculaire karakterisering van eerder genoemde reeds gekarakteriseerde ggo.

6. Referenties

- 1 COGEM (2008). Klinische studie naar Allovectin-7 in melanoma (CGM/080522-02)
- 2 COGEM (2008). Behandeling van kritische lidmaat ischemie met het plasmide NV1FGF (CGM/080729-01)
- 3 COGEM (2008). Fase 2a klinische studie met *L. lactis* stam AG011 tegen matige ulceratieve colitis (CGM/080821-01)
- 4 COGEM (2008). Vaccinatie tegen melanoma door tatoeage met pDERMATT (CGM/080929-06)
- 5 COGEM (2010). Vaccinatie van honden met naakt DNA (CGM/101013-02)
- 6 COGEM (2010). Introductie in het milieu van *Rhodococcus equi* vaccinstam (CGM/100708-01)
- 7 COGEM (2011). Introductie in het milieu van *Pasteurella multocida* en *Mannheimia haemolytica* deletiemutanten (CGM/110804-01)
- 8 COGEM (2012). Aanvullende informatie over veterinaire studie met *Pasteurella multocida* en *Mannheimia haemolytica* deletiemutanten (CGM/120416-01)
- 9 COGEM (2011). Klinische studie met retroviraal getransduceerde humane T-lymfocyten (CGM/110831-01)
- 10 COGEM (2011). Klinische studie met een *Semliki forest virus* vaccin tegen baarmoederhalskanker (CGM/111222-02)

- 11 COGEM (2012). Introductie in het milieu van een recombinant herpesvirus vaccin tegen laryngotracheïtis en de ziekte van Marek (CGM/120611-01)
- 12 COGEM (2012). Klinische studie met genetisch gemodificeerd Modified vaccinia virus Ankara vaccin dat codeert voor het Hemagglutinine van *Influenza A virus* (CGM/120625-01)
- 13 COGEM (2012). Aanvullende informatie betreffende een kippenvaccin tegen infectieuze laryngotracheïtis en de ziekte van Marek (CGM/120718-01)
- 14 COGEM (2008). Aanpassing van advies over de indeling van veldwerkzaamheden met genetisch gemodificeerde planten (CGM/081125-02)
- 15 COGEM (2008). Heroverweging criteria voor de moleculaire karakterisering bij markttoelatingen van gg-gewassen (CGM/081219-01)
- 16 Bulik S *et al.* (2005). Quantifying the contribution of defective ribosomal products to antigen production: a model-based computational analysis. *J Immunol* 175:7957-64
- 17 Dolan BP *et al.* (2010). Defective ribosomal products are the major source of antigenic peptides endogenously generated from Influenza A virus neuraminidase. *J Immunol* 184:1419-24
- 18 COGEM (2008). (CGM/081106-01)
- 19 COGEM (2011). Klinische studie met retroviraal getransduceerde humane Tlymfocyten in leukemiepatiënten (CGM/110913-01)
- 20 COGEM (2011). Aanvullende informatie over de klinische studie met retroviraal getransduceerde humane T-lymfocyten (CGM/111012-03)
- 21 COGEM (2012). Aanvullende informatie voor klinische studie met gg-MVA-HA vaccin CGM/120928-01)
- 22 COGEM (2012). Aanvullende informatie betreffende de moleculaire karakterisering van recombinant kippenvaccin Innovax-ILT (CGM/121024-01)
- 23 COGEM (2009). Klinische studie met een conditioneel-replicerende adenovirale vector (CGM/090429-04)
- 24 COGEM (2009). Aanvullende informatie over een klinische studie met conditioneel-replicerende adenovirussen (CGM/091021-02)
- 25 COGEM (2012). Klinische studie met een conditioneel-replicerende adenovirale vector als aanvullende behandeling van prostaatkanker (CGM/120710-01)