



Direktoratet for naturforvaltning
Postboks 5672 Sluppen
7485 Trondheim

Tromsø 20.05.2010

Regulering av DNA-vaksinerte dyr.

Terje Traavik, Dr. philos
Forsknings sjef, GenØk-Senter for biosikkerhet
Professor i genøkologi, Institutt for farmasi, Universitetet i Tromsø

Det henvises til henvendelsen fra Direktoratet for naturforvaltning (DN) av 08.03.2010. DN har fått i oppdrag fra Miljøverndepartementet (MD) å foreta en vurdering av hvorvidt et DNA-vaksinert dyr skal defineres som en genmodifisert organisme (GMO).

DN anmoder GenØk om en vurdering av biosikkerhetsmessige spørsmål knyttet til i) sannsynligheten for integrasjon av vaksine-DNA i det vaksinerte dyrets DNA, ii) persistens av ikke-integrert DNA i dyret og miljøet, samt iii) opptak av DNA fra vaksinen av andre organismer enn det vaksinerte. DN ber også om iv) en vurdering av hvordan genteknologilovens hensyn best kan ivaretas dersom et DNA-vaksinert dyr ikke automatisk skal defineres som en genmodifisert organisme.

I det følgende vil jeg først oppsummere noen nyere utviklingstrekk i strategier og anvendelser av DNA vaksiner. Deretter vil jeg bidra med kortfattede diskusjoner og konklusjoner, basert på vitenskapelige publikasjoner, relatert til enkeltpunktene i-iv.

1. "Klassiske" DNA vaksiner, og nyere utviklingstrekk i DNA vaksinologien.

- 1.1.** Den klassiske 1990-artikkelen til Wolff et al.(1), åpnet veien for bruk av p (plasmid) DNA som "gen-ferjer" (ekspresjons-vektorer) for gener fra virus, mikroorganismer og kreftceller inn i kroppsceller hos vertebrate organismer. Ved intracellulært protein-uttrykk fra slike gener ville det kunne oppnås immunologiske reaksjoner som beskyttet individene mot infeksjoner med de smittestoffene genene var hentet fra. Dette enkle prinsippet ble oppdaget ved en tilfeldighet, og stred mot et etablert dogme om at "nakent" DNA introdusert i en intakt organisme ville brytes ned umiddelbart, og derfor ikke ha noen biologisk effekt (2).

Gjennom det påfølgende ti-år ble det utviklet en rekke forskjellige DNA vektorer og anvendelsesmåter som i første omgang vakte berettiget oppsikt og optimisme relatert

til forebygging og behandling av infeksjons- og kreftsykdommer hos mennesker så vel som hos husdyr. Men relativt tidlig ble det også reist biosikkerhetsspørsmål relatert til pDNAs innhold av bakterielle replikasjons-fremmede sekvenser og antibiotika resistens gener. Det ble etterlyst forskning angående utilsiktede immunologiske og metabolske effekter, integrering av pDNA i vertscelle-DNA og gameters arvestoff, persistens av intakt eller fragmentert pDNA i vaksinerte organismer, utilsiktede målorganismer eller miljøet for øvrig (oppsummert i 2). Senere har det også vist seg at de "beskyttende" immunreaksjonene i mange tilfeller ble for svake og kortvarige til å gi grunnlag for effektiv sykdoms-forebygging eller bekjempelse (2,3).

Så langt er bare tre pDNA-baserte vaksiner, for veterinært bruk, blitt markedsført. To av dem, mot hhv West Nile virus infeksjon hos hest og malignt melanom hos hund, er godkjent i USA. Den tredje er rettet mot infeksjøs hematopoetisk nekrose-virus hos laks, og godkjent i Canada.

1.2. Nye generasjoner av DNA vektorer

For å minimalisere en del av de påviste og antatte ulempene ved pDNA vektorene er det de siste årene lagt ned betydelig FoU arbeid i utvikling av alternative DNA vektorer. Hovedformålet har, for eksempel, vært å unngå all bruk av bakterielle (plasmid) DNA sekvenser, inklusive replikasjons-relevante sekvenser og antibiotika resistens gener (3). Noen av disse nye vektor-typene, for eksempel dobbeltrådede hårnåls-ODN (oligodeoxynucleotides) (4) og MIDGE (minimalistic immunogenic defined gene expression vector) (5) kan innebære praktiske og immunologiske fordeler. Men ingen av dem eliminerer problemene relatert til integrering i verts-DNA og persistens/overførbarhet i økosystemene.

2. Respons på DNAs biosikkerhets-spørsmål

Forskjeller i distribuering, persistens og integrasjon av pDNA kan tilskrives et uttall av ikke-standardiserte variabler som pDNAs sekvenser og øvrige egenskaper, vaksinasjonsrute og antall revaksinasjoner, pDNA dose, samt dyreart, innvlet/utvlet stamme, alder, kjønn etc. Det er derfor meget vanskelig å foreta detaljerte sammenligninger av resultater oppnådd i forskjellige studier.

2.1. Opptak av vaksine DNA av andre organismer enn det vaksinerte individ

Opptak av pDNA i ikke-intenderte organismer kan skje ved for eksempel i) utilsiktet spredning eller utsetting (for eksempel til bekjempelse av smittereservoarer i frittlevende dyr) av vaksinen selv, ii) lokalisering til og utskillelse til omgivelsene av pDNA fra vaksinerte dyrs slimhinner, urin og faeces, og iii) overføring av pDNA til konsumenter (deriblant mennesker og rovdyr) og nedbrytere av organisk materiale i økosystemene.

2.1.1. *Forskjellige vaksine-ruter kan gi forskjellige spredningsruter.*

Intramuskulær eller intradermal injeksjon er de to vanligste måtene å administrere pDNA vaksiner på. Men for noen arter kan også subkutan,

intraperitoneal, intravenøs eller intranodal (direkte i lymfeknuter) injeksjon være aktuelle alternativer. For noen pDNA typer i noen dyrearter er det vist at det oppnås effektiv, beskyttende immunitet etter installering på slimhinner i luftveier, mage-tarm-kanal eller genitalia. Begrepet "nakent DNA" anvendes når pDNA er direkte suspendert i en vandig, fysiologisk løsning. Men pDNA kan også brukes som vaksine etter kompleksdannelse med liposomer, og pakking i viruspartikler eller bakterieceller (se referanse 3 for kort sammenfatning). Både kvantitative og kvalitative immun-responser kan være forskjellige for samme pDNA tilført samme dyreart langs forskjellige innføringsruter eller pakket forskjellig (3). Men det som er minst like viktig er at disse variablene (dyreart, tilførselsrute, pDNA type og kontekst) kan påvirke spredningsveier og målorganer i organismen, og dermed også mulighetene for utskillelse av vaksine DNA fra organismen til det omgivende økosystem med kontaktmuligheter til andre individer og arter (2,3,8). Det minnes i denne forbindelse om at opptak av pDNA fra mage-tarm kanalen og andre slimhinner er et akseptert, generelt prinsipp i våre dager, mens det for 10-15 år tilbake var kontroversielt og heftig debattert (2, 9).

2.1.2. Opptak av pDNA i organismens forskjellige celletyper.

Det minnes om at den befruktede eggcelle med sitt ene DNA genom gir opphav til ca. 250 morfologisk og fysiologisk sett forskjellige celletyper i en gjennomsnitts pattedyrorganisme. De forskjellige celletypene har forskjellige overflate-receptorer og intracellulære transportveier/-midler som kan påvirke muligheten for opptak, transport til kjernen og integrasjon i cellens DNA i generell forstand. Det er i tillegg klart at både DNA sekvenser og DNA metylering kan påvirke mulighetene for opptak på spesifikt vis (2,3,8,9). Det er således i dag umulig a priori å forutse sprednings- og opptaksprosessene for et gitt pDNA innen organismen i en gitt dyreart.

2.1.3. Utskillelse av pDNA fra det vaksinerte dyr.

De meget få studiene som undersøker utskillelse av pDNA fra den vaksinerte organisme har gitt motstridende resultater. Et typisk pDNA konstruert injisert intramuskulært på mus førte til utskillelse av pDNA i urin og faeces (10). I urin kunne pDNA påvises allerede 10 minutter etter injeksjonen, og signalet økte i intensitet i løpet av den første uken etter injeksjon. I faeces var signalet meget svakt etter 10 minutter, men økte i intensitet etter 1 time.

Etter injeksjon av pDNA i flere fiske-arter er det vist re-lokalisering fra injeksjonsstedet til en rekke organer, deriblant nyrer og gjeller (for nylig sammenfatning, se referanse 8). Men så langt vi kjenner til er det ikke utført studier som avklarer utskillelse av pDNA til miljøet fra vaksinert fisk.

2.2. Persistens av ikke-integrert DNA i dyret og miljøet

2.2.1. Persistens i det pDNA-vaksinerte dyr

Det er vanskelig å trekke generelle konklusjoner pga divergens i pDNA, modeller, deteksjonsmetoder etc. mellom forskjellige studier. De fleste studier er basert på intramuskulær injeksjon av pDNA. Det generelle bildet er da at ca. 90% av injisert pDNA kan påvises på injeksjonsstedet, mens ca. 10% er spredt i organismen. Persistens på injeksjonsstedet varierer sterkt, og ofte har forskerne undervurdert persistenstiden og avsluttet forsøk for tidlig (3). Vi snakker altså i de fleste tilfellene om minimumsverdier. Men pDNA har vist seg å persistere på injeksjonsstedet hos mus i mer enn 2 år, og minst 28 dager hos rotter, minst 54 dager hos sau, minst 70 dager hos gullfisk, minst 90 dager hos regnbueørret, minst 535 dager (!) hos atlantisk laks, minst 10 uker hos kalkun og minst 4 uker hos grisunger (helt fersk sammenfatning i referanse 3).

Etter intramuskulær injeksjon kan pDNA påvises i blodbanene, og deretter i indre organer over varierende tidsrom. De vanligst testede cellene/organene er blod, lever, nyrer, lunger, lymfeknuter som drenerer injeksjonsområdet, tilsvarende muskel på motsatt side og gonadene. Blod-hjerne og blod-gonade barrierene synes ikke å forhindre pDNA invasjon, siden en rekke studier påviser pDNA i både hjernevev, ovarier og testikler etter intramuskulær injeksjon av mus (helt fersk sammenfatning i referanse 3). Transport av pDNA ved både immunkompetente celler, blod og lymfe kan bidra til spredning i organismen.

Etter intramuskulær injeksjon av mus er pDNA påvist i en rekke organer (muskler, lymfeknuter, beinmarg, milt, lever, lunger, nyrer, thymus) ved forsøk avsluttet etter 6 måneder (11). Hos Atlantisk laks ble det påvist intakte pDNA molekyler i nyrer, milt, hjerte, gjeller, fremre/bakre tarm, lever, muskler og blod opptil 535 dager etter intramuskulær injeksjon (12).

2.2.2. *Persistens av pDNA i miljøet.*

På tross av de allesteds nærværende DNA-degraderende enzymer (endo- og exonucleaser) har pDNA og andre typer DNA forbløffende lange persistenstidsrom, opptil tusener av år, under biotiske og abiotiske miljøbetingelser. Dette er jo nettopp grunnlaget for bruk av DNA deteksjonsmetoder innen for eksempel rettsmedisin, arkeologi, paleontologi og evolusjonsstudier. Hvor lenge et pDNA kan persistere i et gitt miljø er avhengig av både pDNAs sekvenser og øvrige egenskaper og en rekke varierende, kjente og ukjente, miljøparametre (9,13). Forekomst av pDNA kan teoretisk sett føre til transfeksjon og HGT (horisontal genoverføring) til både jordbunns- og tarmbakterier. Det bør ikke glemmes at en rekke av de vaksine-aktuelle pDNA vektorene inneholder antibiotika-resistens gener. En publisert studie fra 2004 illustrerer at de innledende pDNA HGT-overføringene som har ført til klinisk problematisk bakteriell antibiotikaresistens kan ha skjedd med frekvenser som ligger langt under deteksjonsminimum for våre mest sensitive deteksjonsteknikker (14)

Bruk av pDNA vaksiner innen akvakultur krever spesielle føre-var betraktninger (15). I akvatiske økosystemer kan pDNA spres over store områder, distanser og

phyla som et resultat av relativ mangel på fysiske og fysiologiske barrierer. Også i akvatiske økosystemer er DNA mye mer resistent mot nedbryting enn det som inntil nylig var etablert sannhet (14,15).

2.3. Sannsynligheten for integrasjon av vaksine-DNA i det vaksinerte dyrets DNA

Det ble relativt tidlig formulert arbeidshypoteser om negative biologiske effekter relatert til integrasjon av hele, eller deler av, pDNA molekyler i vaksinerte individers kromosomer. Hypotesene dreide seg i noen tilfeller om spesifikk insersjonsmutagenese med aktivering av onkogen og inaktivering av tumor suppressor gener (6). Andre påpekte mulighetene for generelle påvirkninger av vertscelle-genomets gen-uttrykk ved innliming av nye promotor/enhancer/dehancer motiver. Innlimte DNA fragmenter ned til 5-10 basepars lengde kan tilføre slike funksjonelle motiver, og de kan påvirke uttrykket til gener over relativt lange avstander, både oppstrøms og nedstrøms fra innlimingsstedet (2,3). Hypoteser om nye proteiner basert på hybrider (chimerer) mellom vaksine- og vertscelle-gener, samt endrede åpne leserammer (OPRs) ble også lansert (2,3,7).

Det finnes fremdeles ytterst få forskningsrapporter som har søkt avklaring på selve integrasjonsproblematikken, og enda færre dedikert til de refererte hypotetiske effektene av integrering (se ferske sammenfatninger i referansene 3 og 8). Noen av de studiene som er gjennomført har konkludert med at pDNA integrasjon skjer med en uhyre lav frekvens, fordi man ikke i de anvendte dyremodeller og med de anvendte pDNA, eksponeringsprotokoller og deteksjonsmetoder jevnlig kunne påvise integrasjon (3,7,8). Flere av arbeidene i denne kategorien er imidlertid beheftet med klare svakheter bl.a. relatert til deteksjonsmetodene som i mange tilfeller ikke er sensitive nok, og heller ikke skjeller godt nok mellom kromosomale og ekstra-kromosomale mål-sekvenser (3). For øyeblikket er den rådende oppfatning at både det biologiske grunnlaget for, de molekylære forutsetningene for, og de kort- og langsiktige konsekvensene av, helmolekylær eller fragmentert pDNA integrering savner kunnskapsgrunnlaget som muliggjør robuste risikovurderinger (3, 8).

3. Vurderinger og konklusjoner i henhold til Genteknologiloven

DNA vaksinasjon er et elegant og enkelt konsept. Det gir mulige bidrag til bærekraftig utvikling på en rekke felter. Det gjøres forskningsmessige anstrengelser for å kunne forstå virkningsgrunnlaget for DNA vaksiner bedre, og for å utvikle alternative strategier til å forbedre vaksinens effektivitet. Biosikkerheten til DNA vaksiner representerer imidlertid et vedvarende problem, spesielt relatert til persistens av pDNA i den vaksinerte organismens celler, og til integrasjon av pDNA i mottagerorganismens kromosomer. Noen mulige konsekvenser av slike hendelser er summarisk beskrevet i dette notatet. Avslutningsvis har jeg følgende kommentarer å fremføre:

3.1. Jeg er på grunnlag av ovenstående litteratur-gjennomgang og -diskusjon fortsatt enig i Bioteknologinemndas hovedkonklusjon fra 2003 («Regulering av DNA-vaksiner og genterapi til dyr» til MD av 26.02.2003):

«Bioteknologinemnda ønsker at begrepet ”genmodifisert organisme” ikke skal utvannes og går derfor inn for at anvendelse av DNA-vaksiner og genterapi på dyr som hovedregel ikke skal regnes som genmodifisering. Nemnda ønsker imidlertid å beholde muligheten for at det kan utøves skjønn i en sak-til-sak-vurdering og vil derfor anbefale at det ikke stilles et absolutt krav til arvbarhet for at dyret skal kunne kalles genmodifisert....”

- 3.2. Dersom det ved anvendelse av en bestemt pDNA vaksine i en aktuell art forekommer integrasjon av pDNA sekvenser i de vaksinerte individenes arvestoff, må disse etter min mening klassifiseres som GMOs, spesielt dersom dette også angår gonadene.** I henhold til Genteknologiloven er vurderingsgrunnlaget en føre-var basert betraktning, og relevante undersøkelser, av hvorvidt det kan utelukkes at DNA integrering skjer/har skjedd. Det er altså ikke tilstrekkelig at det ikke er påvist integrering dersom det er grunn til å tro at manglende påvisning skyldes inadequate påvisningsmetoder. I sammenheng med pDNA må dette avklares på en sak-til-sak-basis relatert til den aktuelle pDNA/dyreart kombinasjon. Dette er en svært vanskelig problemstilling, fordi:
- 3.2.1. Det er et presserende behov for forskning relatert til DNA/verts/vevs/celle egenskaper som beforder DNA integrasjon
 - 3.2.2. Det er et presserende behov for utvikling av teknikker for sikker påvisning av integrerte sekvenser.
 - 3.2.3. De metodene som anvendes nå kan på ingen måte utelukke at integrasjon har funnet sted. De er PCR-baserte, og de forutsetter at det ikke har skjedd endringer i de sekvensene som er ”ankerfester” for oppformering av integrert mål-DNA. Men dette trenger langt fra å være tilfelle, og det finnes både hos undertegnede og i litteraturen (se for eksempel referanse 3) ideer til sikrere og mer sensitiv deteksjon av integrert DNA.
- 3.3. Dersom ekstrakromosomalt pDNA persisterer på injeksjonssted og i vaksinerte individers organer over lengre tid, må slike individer betraktes og behandles som GMOs for det tidsrommet hvor de er bærere.**
- 3.3.1. Det finnes ingen publiserte studier av eventuell overføring av pDNA til neste ledd i en næringskjede hvor vaksinerte individer inngår.
 - 3.3.2. Det finnes ingen studier av skjebnen/effekter av pDNA utskilt i sekreter, ekskretter og ekskrementer fra vaksinerte individer.
- 3.4. Det er vanskelig å forstå at pDNA vaksiner som inneholder antibiotika resistens gener ikke skal underkastes samme moratorium som GM planter med tilsvarende transgener.**
- 3.5. Akvatiske økosystemer representerer spesielle biosikkerhets-problemer i relasjon til pDNA vaksiner, og slike vaksiner kan meget raskt bli aktuelle innen norsk akvakultur. Dette pålegger norske myndigheter og produsenter et ansvar for, og gir muligheter for å opparbeide forskningsbasert spisskompetanse på,**



biosikkerhet forbundet med pDNA vaksiner til oppdretts-arter. Hva med et norsk Veritas for akvakultur- og biprospekterings-trygghet?

Litteraturhenvisninger

1. Wolff, JA et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247: 1465-1468, 1990.
2. Traavik T. An orphan in science: Environmental risks of genetically engineered vaccines. Research Report for DN 1999-6, Directorate for Nature Management, Trondheim, 1999 (ISBN 82-7072-351-7)
3. Faurez F et al. Biosafety of DNA vaccines: New generation of DNA vectors and current knowledge on the fate of plasmids after injection. *Vaccine*, 2010, Article in press, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.03.040
4. Hirata K et al. Design of PCR-amplified DNA fragments for in vivo gene delivery: size-dependency on stability and transgene expression. *J Pharm Sci* 96: 2251-2261, 2007
5. Zheng C et al. Effect of different nuclear localization sequences on the immune responses induced by a MIDGE vector encoding herpesvirus-1 glycoprotein D. *Vaccine* 24: 4625-4629, 2006
6. Nichols WW et al. Potential DNA vaccine integration into host cell chromosome. *Ann NY Acad Sci* 772: 30-39, 1995
7. Gravier R et al. In vivo tissue distribution and kinetics of a pseudorabies virus plasmid DNA vaccine after intramuscular injection in swine. *Vaccine* 25: 6930-6938, 2007
8. Tonheim TC et al. What happens to the DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunol* 25: 1-18, 2008
9. Nordgård L. Survival and uptake of feed-derived DNA in the mammalian intestinal tract. PhD thesis. University of Tromsø and GenØk-Centre for Biosafety, 2009 (ISBN 978-82-7589-246-9)
10. Zhang HY et al. Tissue distribution of a plasmid DNA containing epitopes of foot-and-mouth disease virus in mice. *Vaccine* 23: 5632-5640
11. Coelhi-Castelo AA et al. Tissue distribution of plasmid DNA encoding Hsp65 gene is dependent on the dose administered through intramuscular delivery. *Genet Vaccines Ther* 4: 1, 2006
12. Tonheim TC et al. Detection of supercoiled plasmid DNA and luciferase expression in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) 535 days after injection. *Fish & Shellfish Immunol* 23: 867-876, 2007
13. Traavik T. Too early may be too late. Research report for Directorate of Nature Management No 1999-1, ISBN 82-7072-304-5, Trondheim, Norway, 1999 (ISBN 82-7072-304-5)
14. Heinemann JA and Traavik T. Problems in monitoring horizontal gene transfer in field trials of transgenic plants. *Nature Biotechnology* 22:1105-1109, 2004



15. Myhr AI and Dalmo RA. Introduction of genetic engineering in aquaculture: ecological and ethical implications for science and governance. *Aquaculture* 250: 542-554