

De minister van Volkshuisvesting,  
Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer  
Mevrouw dr. J.M. Cramer  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 29 juli 2008  
**KENMERK** CGM/080729-01  
**ONDERWERP** Advies: Behandeling van CLI met het plasmide NV1FGF

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van de adviesvraag betreffende een fase III klinische studie naar de behandeling van kritische lidmaat ischemie met het plasmide NV1FGF, die het Erasmus Universitair Medisch Centrum te Rotterdam wil uitvoeren, adviseert de COGEM als volgt.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een klinische studie naar de behandeling van kritische lidmaat ischemie (CLI) met het plasmide NV1FGF. CLI patiënten hebben ten gevolge van slagadervernauwing een beperkte bloedtoevoer in (een van) de ledematen. Dit veroorzaakt wonden die moeilijk genezen en kan uiteindelijk leiden tot amputatie van het betreffende lichaamsdeel

Het plasmide NV1FGF bevat genetische informatie die codeert voor een zogenaamde fibroblast groeifactor (FGF). Het FGF is betrokken bij de aanleg van nieuwe bloedvaten. Door expressie van FGF in door CLI getroffen ledematen hoopt de aanvrager dat de bloedcirculatie in deze ledematen zal toenemen, waardoor de wonden kunnen genezen en een mogelijke amputatie voorkomen kan worden.

Als gevolg van de aard van het plasmide en de locale injectie hiervan in de spieren van de kuit of het dijbeen is de COGEM van mening dat de kans op integratie van het plasmide in het genoom van cellen van de patiënt verwaarloosbaar klein is.

Het NV1FGF bevat virale sequenties van het *Cytomegalovirus* (CMV) en het *Simian virus 40* (SV40). Gezien de aard van de virale sequenties, de eigenschappen van beide virussen en eerdere ervaringen acht de COGEM de kans dat een virus met plasmide sequenties zal recombineren verwaarloosbaar klein. Bovendien acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat een mogelijke homologe recombinatie in deze situatie zal leiden tot een virus met nieuwe eigenschappen.

Aangezien NV1FGF intramusculair wordt toegediend, zich niet kan handhaven in bacteriën en de bacteriën geen groeivoordeel oplevert, is de COGEM tevens van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is dat het plasmide door bacteriën opgenomen zal worden en de resulterende genetisch gemodificeerde bacteriën zich in het milieu zullen verspreiden.

De COGEM is voor deze klinische studie daarom van mening dat risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized loop followed by a horizontal line and a small dash.

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

c.c. Drs. H.P. de Wijs  
Dr. I. van der Leij

# Behandeling van kritische lidmaat ischemie met het plasmide NV1FGF

## COGEM advies CGM/080729-01

### Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke risico's voor mens en milieu van een fase III klinische studie waarin patiënten met kritische lidmaat ischemie (CLI) worden behandeld met het plasmide NV1FGF.

Patiënten met CLI hebben last van een vernauwing van bloedvaten in benen of armen, waardoor de bloedtoevoer naar de ledematen wordt belemmerd. Als gevolg van deze verminderde bloedtoevoer kunnen er wonden ontstaan die slecht genezen en uiteindelijk kunnen leiden tot amputatie van het betreffende lidmaat. Een mogelijke oplossing vormt de aanleg van nieuwe bloedvaten, waardoor de bloedcirculatie de vernauwde bloedvaten kan omzeilen en de bloedtoevoer in het lidmaat hersteld wordt.

Bij de aanleg van nieuwe bloedvaten zijn verscheidene groeifactoren betrokken. Een van de groeifactoren is de zogenaamde fibroblast groeifactor (FGF) (1). Om de aanmaak van nieuwe bloedvaten te stimuleren wil de aanvrager het plasmide NV1FGF in de kuit- en dijbeenspier van de patiënt met CLI injecteren. Dit plasmide bevat de coderende sequentie voor FGF. Indien NV1FGF in de spiercellen wordt opgenomen, zal FGF in de spieren worden aangemaakt. Door deze lokale productie van FGF verwacht de aanvrager dat de aanleg van nieuwe bloedvaten lokaal gestimuleerd wordt. Hierdoor kan de doorbloeding van het been normaliseren, de wond genezen en amputatie van het lidmaat voorkomen worden.

In Europa zijn inmiddels 125 patiënten zijn behandeld met het plasmide NV1FGF. Zowel enkelvoudige als meervoudige intramusculaire injecties met in totaal maximaal 16 mg NV1FGF werden door de patiënten goed verdragen. In onderhavige studie is de aanvrager van plan in totaal 16 mg NV1FGF per patiënt te geven via intramusculair injecties.

### Eerder COGEM advies

De COGEM heeft driemaal eerder geadviseerd over het gebruik van plasmide DNA (naakt DNA) in klinische studies. Tweemaal betrof het een specifiek gentherapieprotocol waarin plasmide DNA werd gebruikt voor de aanmaak van de groeifactor VEGF of een zogenaamd 'Major Histocompatibility' klasse I molecuul (2,3). Gezien het feit dat de COGEM de kans op replicatie of integratie van betreffende plasmiden verwaarloosbaar klein achtte, had zij tegen deze aanvragen geen bezwaar.

Een derde advies betrof een algemeen advies over mogelijke integratie en verspreiding van naakt DNA (4). In dit advies geeft de COGEM aan dat zij van mening is dat integratie van naakt DNA in het genoom van cellen van mensen en dieren kan optreden. De frequentie

waarmee dit gebeurt, is echter zeer laag. De COGEM acht de risico's die verbonden zijn aan de toediening van naakt DNA derhalve niet groter dan de risico's die verbonden zijn aan het gebruik van de 'conventionele' virale of bacteriële vaccins die reeds decennia lang wereldwijd aan miljoenen mensen worden toegediend. Bovendien is zij van mening dat de kans op integratie van het plasmide in kiembaancellen verwaarloosbaar klein is indien naakt DNA niet direct in de gonaden geïnjecteerd wordt.

In het advies heeft de COGEM tevens aangegeven dat zij de kans op verspreiding van naakt DNA uit mensen of dieren naar andere organismen over het algemeen klein acht aangezien er geen uitscheiding van het naakte DNA wordt waargenomen.

Zij plaatst hier een aantal kanttekeningen bij. De verspreidingsrisico's zullen toenemen indien het naakt DNA sequenties bevat waardoor het replicatiecompetent wordt in zoogdiercellen. Bovendien kan de kans op integratie en verspreiding van naakt DNA ook toenemen indien het sequenties bevat die een interactie geven met virussen of virus sequenties. Hierdoor neemt de kans toe dat er infectieuze virussen ontstaan met mogelijk nieuwe eigenschappen.

Een ander verspreidingsrisico wordt gevormd door de mogelijkheid dat het naakt DNA door bacteriën binnen of buiten het lichaam wordt opgenomen, waardoor er genetisch gemodificeerde bacteriën ontstaan die zich in het milieu kunnen verspreiden. Het vermijden van zogenaamde 'DNA uptake sequences' en het toedienen van het DNA in steriele lichaamsdelen zal deze kans op de opname van DNA door bacteriën verkleinen. Indien het effect van de modificatie geen overlevingsvoordeel voor de bacterie oplevert en resistentiegenen vermeden worden, zal het verspreidingsrisico verwaarloosbaar klein zijn.

### **Milieurisicoanalyse**

Bij de risicobeoordeling van de introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde organismen (ggo's), zoals die door de COGEM wordt uitgevoerd, worden de effecten beoordeeld die het ggo kan hebben op mens en milieu. Hierbij wordt zowel gekeken naar mogelijke directe als indirecte schadelijke effecten van het ggo.

Zonder eigenschappen van een levend organisme of virus kan er in het geval van naakt DNA niet gesproken worden van een ggo. Door de opname van het DNA in somatische cellen, kiembaancellen, bacteriën of virussen ontstaan er echter ggo's, die mogelijkwjs in het milieu terecht kunnen komen en zich daar kunnen verspreiden. De COGEM heeft zich in haar milieurisicoanalyse derhalve gericht op de mogelijke risico's van deze gebeurtenissen.

#### *Elementen van het plasmide NV1FGF*

In onderhavige studie wordt gebruik gemaakt van het plasmide NV1FGF. Dit plasmide is een dubbelstrengs DNA molecuul van 2420 basenparen en is geconstrueerd door de coderende sequentie voor het humane FGF type 1 in het plasmide pCOR te clonen (5). De expressie van FGF staat onder controle van een humane CMV promotor en een polyadenylerings signaal van *Simian virus 40* (SV40). De gebruikte humane CMV promotor is identiek aan de 'immediate early' promotor van het humane *Cytomegalovirus* en initieert de transcriptie van

FGF. Het polyadenyleringssignaal van SV40 zorgt voor een efficiënte terminatie van de transcriptie van FGF en de daaropvolgende polyadenylering van het transcript.

Het plasmide NV1FGF bezit een aantal specifieke eigenschappen. Ten eerste bevat het een 'Conditional Origin of Replication'. Hierdoor heeft de gastheer de replicatiefactor  $\pi$  nodig voor de replicatie van dit plasmide. Van nature bevindt de coderende sequentie voor  $\pi$  zich op een plasmide dat R6K wordt genoemd. Deze afhankelijkheid van de replicatiefactor  $\pi$  zorgt ervoor dat NV1FGF in een zeer beperkte groep van bacteriën kan repliceren (5).

Daarnaast bevat NV1FGF de coderende sequentie voor een zogenaamde 'amber suppressor tRNA'. Deze amber suppressor stelt *E. coli* bacteriën met een zogenaamde argE amber mutatie in staat om deze mutatie te overkomen. Aangezien deze mutatie de bacterie afhankelijk maakt van arginine, kan selectie op NV1FGF plaatsvinden op basis van deze afhankelijkheid. Voor de propagatie van en selectie op NV1FGF wordt een speciaal ontwikkelde *E. coli* stam XAC-1 pir-116 gebruikt, waarin een dergelijke argE amber mutatie is aangebracht. Het plasmide heeft daarom geen antibioticumresistentiegen, waardoor mogelijke verspreidingsrisico's worden gereduceerd. Als laatste element bevat NV1FGF het *cer* gen. Dit zogenaamde 'ColE1 resolution' fragment zorgt voor het scheiden van de NV1FGF oligomeren die ontstaan tijdens de replicatie van het plasmide. Op deze wijze ontstaat een goed gedefinieerd plasmide dat gebruikt kan worden tijdens de klinische studie.

### **Overwegingen en advies**

Op basis van de mogelijke verspreidingsrisico's van naakt DNA heeft de COGEM in haar algemene advies uit 2004 een aantal criteria opgesteld, waarop het gebruik van naakt DNA ingedeeld kan worden in een drietal risicogroepen (4). Met het oog op de eigenschappen van NV1FGF is de COGEM van mening dat NV1FGF ingedeeld kan worden in de groep van plasmiden met de laagste milieurisico's en acht de daarvoor geldende overwegingen ook van toepassing op onderhavige studie. In onderstaande overweging beperkt zij zich daarom tot zaken die specifiek van toepassing zijn op deze klinische studie.

#### *Integratie in somatische cellen*

Plasmide DNA dat is opgenomen door cellen en in de celkern terecht is gekomen, kan mogelijk integreert in het genoom. Door de aanwezigheid van de coderende sequentie voor humaan FGF vertoont het plasmide NV1FGF een zekere mate van homologie met het genoom van humane cellen. De integratie frequentie door homologe recombinatie zal als gevolg van deze homologie iets toenemen. De COGEM is echter van mening dat de integratie frequentie van NV1FGF in het genoom van somatische cellen nog steeds lager zal zijn dan de frequentie van spontane gen-inactiverende mutaties ( $2 \times 10^{-6}$  spontane mutaties per gen) (4,6). Hierbij baseert de COGEM zich op de gegevens van een studie waarin spierweefsel door middel van electroporatie werd getransduceerd met naakt DNA (7). Ook in het geval van deze relatief efficiënte transductie methode bleef de integratiefrequentie van het naakt DNA onder de basislijn van spontane gen-inactiverende mutaties.

Op basis van bovenstaande overwegingen is de COGEM van mening dat de kans op integratie in somatische cellen verwaarloosbaar klein is.

#### *Integratie in kiembaancellen*

In haar algemene advies geeft de COGEM aan dat zij de kans op verticale transmissie van naakt DNA verwaarloosbaar klein acht indien het naakt DNA niet direct in de gonaden wordt geïnjecteerd en niet wordt toegediend aan zwangere mensen (4).

In onderhavige aanvraag wordt NV1FGF intramusculair geïnjecteerd. Alvorens er sprake kan zijn van een mogelijke transductie van de kiembaancellen dient het plasmide DNA derhalve met het bloed naar de kiembaancellen getransporteerd te worden. De aanvrager meldt dat de aanwezigheid van NV1FGF sequenties in het bloed in verschillende klinische studies is onderzocht. NV1FGF kon slechts incidenteel in een beperkt aantal monsters gedetecteerd worden. Bovendien bleek uit een farmacokinetische analyse van bloedmonsters dat de half-waarde tijd van NV1FGF in humaan bloed vijf tot zes minuten bedraagt. Afgezien van de expressie in de geïnjecteerde spieren is er in pre-klinische studies nooit expressie gevonden van NV1FGF in andere weefsels.

Op basis van deze gegevens en haar eerdere overweging is de COGEM van mening dat de kans op verticale transmissie van NV1FGF sequenties verwaarloosbaar klein is.

#### *Het ontstaan van recombinante virussen*

Een ander mogelijk verspreidingsrisico van naakt DNA vormt de opname van het DNA in het genoom van virussen, die in de patiënten aanwezig kunnen zijn. Hierdoor kunnen infectieuze virussen ontstaan met nieuwe eigenschappen. De vorming van dergelijk nieuwe virussen is mogelijk indien er recombinatie optreedt tussen het virale genoom en homologe sequenties in het naakt DNA. Voor een dergelijke recombinatie is het van belang dat het plasmide en de virussequenties beiden in dezelfde cel aanwezig zijn.

Het plasmide NV1FGF bevat twee elementen die afkomstig zijn van virussen. Dit zijn de 'immediate early' promotor van CMV en het polyadenyleringssignaal van SV40. Beide domeinen zouden in theorie de kans op een homologe recombinatie tussen het plasmide en CMV of SV40 kunnen bevorderen. Zoals aangegeven in het algemene advies uit 2004 is de COGEM van mening dat plasmiden met een CMV promotor ingedeeld kunnen worden in de groep met het laagste verspreidingsrisico (4). Dit is met name gebaseerd op het jarenlange veilige gebruik van deze CMV promotor in klinische studies. Het SV40 is een polyomavirus dat met name rhesusapen infecteert. SV40 infecties in mensen worden zelden aangetroffen en worden hoofdzakelijk waargenomen indien de patiënt een verzwakt afweersysteem heeft (8). Met het oog op het gastheerbereik van dit polyomavirus en de lokale toediening van NV1FGF in de spier is de COGEM van mening dat de kans dat dit virus en het plasmide in dezelfde cel aanwezig zijn verwaarloosbaar klein is. Bovendien merkt zij op dat een homologe recombinatie in deze situatie slechts een uitwisseling van dezelfde virusonderdelen op zal leveren. De kans op een virus met nieuwe eigenschappen acht de COGEM daarom verwaarloosbaar klein.

Aangezien het plasmide DNA niet infectieus is of in staat is zich te vermenigvuldigen in zoogdieren is de COGEM bovendien van mening dat ongewilde introductie van NV1FGF in het milieu niet zal leiden tot verspreiding naar of binnen soorten die de natuurlijke gastheren zijn van SV40.

Gezien bovenstaande overwegingen acht de COGEM de kans op verspreidingsrisico's als gevolg van recombinatie van het plasmide NV1FGF met het genoom van een virus verwaarloosbaar klein.

#### *Opname en verspreiding door micro-organismen*

De opname van recombinant DNA door micro-organismen kan leiden tot het ontstaan van ggo's die zich mogelijk in het milieu kunnen verspreiden. In het geval van een intramusculaire injectie acht de COGEM de kans dat een plasmide in contact komt met bacteriën die het plasmide ook daadwerkelijk opnemen uitermate klein. Bovendien kan het plasmide alleen vermenigvuldigd worden in de gastheer als de betreffende bacterie het  $\pi$  gen bezit en tot expressie brengt. Het  $\pi$  gen is van nature aanwezig op het plasmide R6K dat in theorie in bacteriën kan voorkomen, die ook het NV1FGF kunnen opnemen. De kans dat dit daadwerkelijk optreedt, acht de COGEM echter zeer klein. Dit omdat de opname zeer inefficiënt zal verlopen en de groep bacteriën die het R6K plasmide draagt zeer klein is.

Bovendien zijn bacteriën niet in staat NV1FGF en R6K tegelijkertijd te handhaven door een fenomeen dat wordt omschreven als het incompatibiliteitsprincipe (9,10). Hierdoor zal een van de twee plasmiden verloren gaan en kan NV1FGF zich niet handhaven in het milieu. Hierbij wijst de COGEM tevens op het feit dat de opname van NV1FGF de bacterie geen fitnessvoordeel oplevert. De COGEM is daarom van mening dat de kans dat opname van NV1FGF in een bacterie leidt tot een ggo dat zich in het milieu kan handhaven en kan verspreiden verwaarloosbaar klein is.

Gezien bovenstaande overwegingen is de COGEM van mening dat de verspreidingsrisico's als gevolg van opname van NV1FGF door micro-organismen verwaarloosbaar klein zijn.

#### *Monitoringplan*

De aanvrager geeft aan dat er geen monitoring uitgevoerd zal worden. Op basis van de beschikbare sheddingdata van vergelijkbare studies acht de COGEM de kans dat er in deze studie door de behandelde patiënten DNA uitgescheiden zal worden verwaarloosbaar klein. Bovendien is zij van mening dat in het hypothetische geval van shedding de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zullen zijn. Gezien de verwaarloosbaar kleine kans op verspreidingsrisico's, ziet de COGEM geen directe aanleiding voor monitoring.

## Conclusie

De huidige aanvraag betreft een klinische studie naar de behandeling van CLI met het plasmide NV1FGF. Door de opzet van deze studie en de eigenschappen van het te gebruiken plasmide is de COGEM van mening dat de kans dat het plasmide DNA in somatische cellen of kiembaancellen integreert verwaarloosbaar klein is. Tevens acht de COGEM de kans dat virussen of bacteriën het plasmide of plasmidesequenties opnemen en zich verspreiden in het milieu verwaarloosbaar klein.

Op grond van genoemde overwegingen acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de fase 3 klinische studie met NV1FGF zoals voorgenomen risico's oplevert voor mens en milieu.

## Referenties

1. Murakami M en Simons M (2008) Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. *Curr. Opin. Hematol.* **15**: 215-220
2. COGEM (1999). Adviezen BGGO 99/10 en BGGO 99/12 (CGM/990927-01)
3. COGEM (2008). Advies 'Klinische studie naar Allovectin-7 in melanoma' (CGM/080522-02)
4. COGEM (2004). Advies 'Integratie en verspreiding naakt DNA.' CGM/041223-02
5. Soubrier F *et al.* (1999) pCOR: a new design of plasmid vectors for nonviral gene therapy. *Gene Ther.* **6**: 1482-1488
6. Cole J, *et al.* (1994). Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo. *Mutat. Res.* 304: 33-105
7. Wang Z, *et al.* (2004). Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther.* **1**: 114-121
8. Vilchez RA *et al.* (2006). Molecular and clinical perspectives of polyomaviruses: emerging evidence of importance in non-kidney transplant populations. *Liver Transpl.* **12**: 1457-1463
9. Novick R en Hoppensteadt F. (1978). On plasmid incompatibility *Plasmid* **1**: 421-434
10. Filutowicz M *et al.* (1987). DNA and protein interactions in the regulation of plasmid replication *J. Cell Sci. Suppl.* **7**: 15-31
11. Nikol S, *et al.* (2008). Therapeutic angiogenesis with intramuscular NV1FGF improves amputation-free survival in patients with critical limb ischemia *Mol ther* **16**: 972-978