

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

DATUM 29 september 2008
KENMERK CGM/080929-06
ONDERWERP Advies: Vaccinatie tegen melanoma door tatoeage met pDERMATT

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van de adviesvraag betreffende een fase I klinische studie naar de vaccinatie tegen huidtumoren met het plasmide pDERMATT, die het Nederlands Kanker Instituut te Amsterdam wil uitvoeren, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een klinische studie waarin patiënten met huidkanker (melanoom) worden gevaccineerd met het plasmide pDERMATT.

Het plasmide pDERMATT bevat genetische informatie die codeert voor een eiwit dat uit twee onderdelen bestaat. Het ene deel zorgt voor een specifieke afweerreactie tegen de kankercellen. Het andere deel versterkt deze afweerreactie. Om bovengenoemd eiwit tot expressie te brengen wordt het plasmide door middel van tatoeage in de opperhuid gebracht. De aanvrager hoopt dat dit resulteert in een afweerreactie tegen de melanoomcellen en het eigen immuunsysteem dusdanig activeert dat de melanoomcellen worden opgeruimd.

Als gevolg van de aard van het plasmide en de lokale toediening in de opperhuid 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 plasmide pDERMATT bevat een virale sequentie van het humane *Cytomegalovirus* (CMV). Gezien de eigenschappen van dit virus en eerdere ervaringen acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat het plasmide met een virus zal recombineren. Bovendien acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat een mogelijke homologe recombinatie in deze situatie zal leiden tot een virus met nieuwe eigenschappen.

In beschreven studie kan de COGEM niet geheel uitsluiten dat het plasmide door bacteriën wordt opgenomen. De opname van pDERMATT levert de bacteriën echter geen groeivoordeel op. Bovendien wordt het antibioticumresistentiegen dat zich op pDERMATT bevindt algemeen aangetroffen in de natuur. De COGEM is daarom van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is dat er genetisch gemodificeerde bacteriën ontstaan die zich in het milieu zullen verspreiden en een schadelijk effect hebben op mens of milieu.

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 that ends in a small hook.

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

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

Vaccinatie tegen melanoma door tatoeage met pDERMATT

COGEM advies CGM/080929-06

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke risico's voor mens en milieu van een fase I klinische studie waarin melanoompatiënten worden gevaccineerd met het plasmide pDERMATT.

Het melanoom is een agressieve vorm van huidkanker, die indien het is uitgezaaid zeer moeilijk te behandelen is. Door vaccinatie van de patiënt tracht de aanvrager in een vroegtijdig stadium van de ziekte een sterke afweerreactie te genereren tegen de melanoomcellen waardoor nieuwe uitzaaiingen kunnen worden voorkomen en de tumor eventueel kan worden opgeruimd door het eigen afweersysteem.

Om een afweerreactie tegen melanoomcellen op te wekken wil de aanvrager het plasmide pDERMATT gebruiken. Dit plasmide codeert voor een fusie-eiwit dat bestaat uit het domein 1 van het tetanus toxine fragment C (TTFC) en een klein fragment van het melanoom geassocieerde antigen MART-1 (1). Het betreffende fragment van MART-1 is negen aminozuren groot en bindt met hoge affiniteit aan HLA-A2 moleculen, waardoor een cytotoxische T-celreactie tegen MART-1 wordt opgewekt (2, 3). Het domein-1 van TTFC bevat epitopen die van belang zijn voor het induceren van een helper T celrespons (4, 5, 6). Deze activering van helper T cellen zal de cytotoxische T celrespons tegen MART-1 versterken. Met behulp van tatoeagetechnieken wordt het plasmide DNA in de opperhuid van de patiënten gebracht. De opperhuid vormt een goede locatie voor vaccinatie, aangezien er veel antigeen presenterende cellen aanwezig zijn (7).

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft viermaal eerder geadviseerd over het gebruik van plasmide DNA (naakt DNA) in klinische studies.

Een van deze vier adviezen betrof een algemeen advies over mogelijke integratie en verspreiding van naakt DNA (8). 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 in 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.

Naast het algemene advies heeft de COGEM driemaal geadviseerd over een specifiek gentherapieprotocol. In de eerste aanvraag werd plasmide DNA gebruikt voor de aanmaak van de groeifactor VEGF (9). Het tweede betrof een klinische studie met Allovectin-7 voor de behandeling van melanoma (10). Het laatste advies betrof de behandeling van kritische lidmaat ischemie met het plasmide NV1FGF (11). Gezien het feit dat de COGEM de kans op replicatie of integratie van betreffende plasmiden in deze studies verwaarloosbaar klein achtte, had zij tegen de aanvragen geen bezwaar.

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 mogelijk 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 pDERMATT

In onderhavige studie wordt gebruik gemaakt van het plasmide pDERMATT. Dit plasmide is een dubbelstrengs DNA molecuul van 3771 basenparen en is afgeleid van het commercieel verkrijgbare plasmide pVAX1 (1). Het plasmide pDERMATT codeert voor een fusie-eiwit dat bestaat uit het domein 1 van het tetanus toxine fragment C (TTFC) en een negen aminozuren groot fragment van het melanoom geassocieerde antigeen MART-1. De expressie

van bovengenoemd fusie-eiwit staat onder controle van de zogenaamde CMV promoter en het BGH polyadenyleringssignaal. De CMV promoter is de 'immediate early' promoter van het humane *Cytomegalovirus* (CMV). Deze promoter initieert de transcriptie van het fusie-eiwit. Het polyadenyleringssignaal is een regulatoire sequentie afkomstig van het 'Bovine Growth Hormone' (BGH) gen. Het zorgt voor de efficiënte terminatie van de transcriptie van het fusie-eiwit en de daaropvolgende polyadenylering van het transcript. Naast de coderende sequentie voor het fusie-eiwit bevat pDERMATT ook een kanamycineresistentiegen (APH) dat afkomstig is uit *E. coli*. De initiatie van de transcriptie van APH staat onder controle van bacteriële regulatoire sequenties. Tevens is een Col E1 *ori* aanwezig. De Col E1 *ori* is van belang bij de initiatie van DNA replicatie, waardoor het plasmide in *Enterobacteriaceae* vermenigvuldigd kan worden.

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 (8). Met het oog op de eigenschappen van pDERMATT is de COGEM van mening dat pDERMATT 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.

Systemische verspreiding in patiënt

In onderhavige aanvraag wordt pDERMATT met behulp van een tatoeage techniek in de bovenste lagen van de huid gebracht. In dit deel van de huid bevinden zich geen bloedvaten. Aangezien het DNA op een vastgestelde diepte in de huid wordt getatoeëerd, is de kans zeer klein dat het DNA in het deel van de huid terecht komt, waar bloedvaten aanwezig zijn. De COGEM acht de kans derhalve zeer klein dat het DNA de bloedbaan zal bereiken.

De COGEM is van mening dat de halfwaarde tijd van pDERMATT niet veel zal verschillen van die van andere plasmiden. Op basis van de gegevens van eerdere klinische studies met plasmide DNA gaat zij er daarom vanuit dat de halfwaarde tijd van pDERMATT in humaan bloed enkele minuten zal bedragen (11). De kans op systemische verspreiding van pDERMATT acht de COGEM derhalve verwaarloosbaar klein.

Integratie in somatische cellen

Plasmide DNA dat is opgenomen door cellen en in de celkern terecht is gekomen, kan mogelijk integreëren in het genoom. Integratie kan willekeurig optreden of op een specifieke plaats als gevolg van homologe recombinatie.

De enige homologie die het gebruikte plasmide pDERMATT heeft met het genoom van humane cellen is gelegen in de coderende sequentie voor het MART-1 fragment. Dit fragment is dusdanig klein dat de COGEM van mening is dat integratie van het plasmide als gevolg van homologe recombinatie in deze studie geen rol speelt. Gebaseerd op eerdere overwegingen is de COGEM daarom van mening dat de integratiefrequentie van pDERMATT in het genoom

van somatische cellen lager zal zijn dan de frequentie van spontane gen-inactiverende mutaties (2×10^{-6} spontane mutaties per gen) (8, 12). Hierbij baseert de COGEM zich op de gegevens van een studie waarin spierweefsel door middel van electroporatie werd getransduceerd met naakt DNA (13). 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 zwangeren (8).

In onderhavige studie wordt het naakt DNA in de bovenste lagen van de huid getatoeëerd. In lijn met het algemene advies is de COGEM derhalve van mening dat de kans op verticale transmissie van pDERMATT 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. Theoretisch kunnen hierdoor 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.

De 'immediate early' promotor van CMV is het enige element van het plasmide pDERMATT dat uit een virus afkomstig is. Dit domein zou in theorie de kans op een homologe recombinatie tussen het plasmide en hCMV kunnen bevorderen. De CMV promotor is in talloze klinische studies toegepast en kent een lange geschiedenis van veilig gebruik. 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 (8).

De aanvrager wil het plasmide pDERMATT met behulp van tatoeage lokaal in de opperhuid brengen. In deze huidlaag wordt het plasmide met name opgenomen door keratinocyten (7). Het humaan CMV komt echter niet in de huid voor en kan geen keratinocyten infecteren. Met het oog op het gastheerbereik van dit virus en de lokale toediening van het plasmide is de COGEM van mening dat de kans dat dit virus en het plasmide in dezelfde cel aanwezig zullen zijn verwaarloosbaar klein is. Daar voegt zij aan toe 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.

Gezien bovenstaande overwegingen acht de COGEM de kans op verspreidingsrisico's als gevolg van recombinatie van het plasmide pDERMATT 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. De COGEM heeft in een eerder advies aangegeven, dat een veertigtal bacteriesoorten in staat is om effectief DNA op te nemen uit de omgeving (8). Hieronder vallen bepaalde bodembacteriën, maar ook enkele humane pathogenen. Humane bacteriën worden aangetroffen in de darmen, de oren, de ogen, de neus, de keel en de mond en op de huid en de ogen.

In onderhavige aanvraag wordt pDERMATT op de huid aangebracht, alvorens het in de bovenste lagen van de huid wordt getatoeëerd. Gezien de goed gedefinieerde locale toediening is de COGEM van mening dat het DNA zich zal beperken tot bovenste lagen van de huid.

De aanvrager geeft niet aan of de huid voor en/of na de tatoeage wordt gedesinfecteerd of anderszins wordt behandeld om mogelijk contact tussen plasmide en bacteriën te voorkomen. De kans dat het plasmide op de huid in contact komt met bacteriën die het plasmide ook daadwerkelijk opnemen acht de COGEM klein, maar kan zij door het ontbreken van bovenstaande informatie niet uitsluiten. Om de opname van het DNA door bacteriën te minimaliseren suggereert de COGEM de huid, voordat het DNA wordt aangebracht, te desinfecteren met ethanol. De kans op opname kan nog verder geminimaliseerd worden door de huid na de tatoeage te wassen of te spoelen met voldoende water of af te dekken met een pleister. Als genoemde voorschriften worden toegepast, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat bacteriën het plasmide DNA zullen opnemen.

Naast de eventuele kans op een opname van DNA is het ook van belang de eventuele gevolgen van een dergelijke opname in ogenschouw te nemen. Het plasmide bevat naast de coderende sequentie voor het fusie-eiwit ook het APH gen dat kanamycineresistentie geeft. Afgezien van het feit dat het fusie-eiwit niet tot expressie kan komen in bacteriën, heeft de COGEM geen reden om aan te nemen dat dit eiwit enig effect zal hebben in bacteriën. Kanamycineresistentie komt wijdverbreid in de natuur voor en kan te allen tijde door bacteriën opgenomen worden. Het gebruikte APH gen is afkomstig uit in het milieu aanwezige *E. coli* bacteriën. De COGEM voegt hier aan toe dat de opname van het plasmide de bacterie in deze studie geen groeivoordeel oplevert, aangezien de patiënt geen kanamycine of neomycine krijgt toegediend. De COGEM is derhalve van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is dat in het hypothetische geval van een opname van het plasmide pDERMATT door bacteriën, dit een schadelijk effect zal opleveren voor mens of milieu.

Op basis van bovenstaande overweging is de COGEM van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is, dat er buiten het lichaam door opname van pDERMATT een gg-bacterie ontstaat die in staat is zich in het milieu te handhaven, te verspreiden en schade aan te richten.

Monitoringplan

De toediening van DNA in de opperhuid door middel van tatoeage is een nieuwe techniek, waarover geen shedding gegevens zijn gepubliceerd. De aanvrager geeft aan dat er bloed en urine monsters verzameld en opgeslagen zullen worden. De aanvrager zal deze monsters echter alleen analyseren, indien daarvoor aanleiding ontstaat.

In klinische studies, waarin het plasmide NV1FGF intramusculair werd geïnjecteerd, wordt er slechts sporadisch DNA aangetroffen in het bloed (11). Bovendien werd aangegeven dat de halfwaardetijd van het gebruikte plasmide DNA niet meer dan enkele minuten bedraagt. Op basis van deze gegevens heeft de COGEM in een eerder advies aangegeven dat de kans verwaarloosbaar klein is dat er na intramusculaire injectie door de behandelde patiënten DNA uitgescheiden zal worden (11).

De COGEM is van mening dat de kans dat het plasmide na tatoeage in de bloedbaan terecht komt kleiner is dan na intramusculaire injectie. De spier is immers een goed doorbloede structuur, terwijl in de opperhuid geen bloedvaten aanwezig zijn. Ook voor onderhavige studie is zij derhalve van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is dat de behandelde patiënten plasmide DNA zullen uitscheiden. In het kader van onderhavige klinische studie, heeft de COGEM daarom geen bezwaar tegen het feit dat bloed en urine monsters niet worden geanalyseerd.

Naast de gebruikelijke mogelijkheden op shedding via bloed en urine zou er theoretisch ook shedding kunnen optreden door het dagelijkse verlies van hoorncellen of huidschilfers uit de bovenste laag van de huid, de zogenaamde hoornlaag. De hoorncellen zijn dode keratinocyten, waaruit de celkernen verdwenen zijn. De COGEM acht de kans daarom zeer klein dat er nog intact plasmide DNA in de hoorncellen aanwezig is. Bovendien is zij van mening dat de kans uitermate klein is dat de opname door micro-organismen van hoorncellen en het daarin eventueel aanwezige plasmide DNA zal leiden tot een ggo. Na opname zal het micro-organisme de hoorncellen inclusief het eventueel aanwezige plasmide DNA immers afbreken. Op basis van eerder genoemde argumenten voegt zij daar aan toe dat, in het geval van een dergelijk ggo, zij de kans verwaarloosbaar klein acht dat betreffend ggo een schadelijk effect zal hebben op mens of milieu.

De COGEM is derhalve van mening dat ten gevolge van shedding de kans op risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zullen zijn. Zij ziet daarom geen directe aanleiding voor monitoring. Desondanks wil ze er wel op wijzen dat aanvullende monitoring van bijvoorbeeld bovengenoemde huidschilfers nuttige informatie kan opleveren die gebruikt kan worden bij toekomstige aanvragen.

Conclusie

De huidige aanvraag betreft een klinische studie waarin patiënten met huidkanker worden gevaccineerd tegen het melanoom met het plasmide pDERMATT. 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 1 klinische studie met pDERMATT, zoals voorgenomen, risico's oplevert voor mens en milieu.

Referenties

1. Quaak SGL *et al.* (2008) GMP production of pDERMATT for vaccination against melanoma in a phase I clinical trial. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* doi:10.1016/j.ejpb.2008.05.002
2. Jaeger E *et al.* (1996) Generation of cytotoxic T-cell responses with synthetic melanoma-associated peptides in vivo: implications for tumor vaccines with melanoma-associated antigens. *Int. J. Cancer* **66**: 162-169
3. Wang F *et al.* (1999) Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin. Cancer Res.* **5**: 2756-2765
4. Rice J *et al.* (2001) DNA fusion vaccine designed to induce cytotoxic T cell responses against defined peptide motifs: implications for cancer vaccines. *J. Immunol.* **167**: 1558-1565
5. Anderson R *et al.* (1996) Immune response in mice following immunization with DNA encoding fragment C of tetanus toxin. *Infect. Immun.* **64**: 3168-3173
6. King CA *et al.* (1998) DNA vaccines with single-chain Fv fused to fragment C of tetanus toxin induce protective immunity against lymphoma and myeloma. *Nature Med.* **4**: 1281-1286
7. Berg van den J *et al.* (2008) Optimization of intradermal vaccination by DNA tattooing in human skin. *Subm. for publ.*
8. COGEM (2004) Advies: 'Integratie en verspreiding naakt DNA.' CGM/041223-02
9. COGEM (1999) Adviezen: BGGO 99/10 en BGGO 99/12 (CGM/990927-01)
10. COGEM (2008) Advies: 'Klinische studie naar Allovectin-7 in melanoma' (CGM/080522-02)
11. COGEM (2008) Advies: 'Behandeling van CLI met het plasmide NV1FGF' (CGM/080729-01)
12. Cole J, *et al.* (1994) Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo. *Mutat. Res.* 304: 33-105
13. 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