

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
dhr. J.J. Atsma
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 26 oktober 2010
KENMERK CGM/101026-06
ONDERWERP Advies: Genterapie met naakt DNA

Geachte heer Atsma,

Hierbij bied ik u het onderzoeksrapport "Gene therapy with naked DNA: Potential steps towards deregulation" (CGM 2010-06) aan. Naar aanleiding van dit onderzoek deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

Het ministerie van VROM heeft eerder laten weten een vereenvoudigde vergunningsverleningsprocedure voor te bereiden voor de introductie in het milieu van bepaalde categorieën van genetisch gemodificeerde organismen. Naar aanleiding van deze ontwikkeling heeft de COGEM laten onderzoeken welke klinische genterapie studies met zogenaamd 'naakt DNA' voor een vereenvoudigde procedure in aanmerking zouden kunnen komen. In dergelijke studies krijgen patiënten DNA toegediend dat niet verpakt is in een zogenaamde eiwitmantel, zoals bij virussen het geval is. Deze vorm van genterapie wordt daarom ook wel aangeduid als niet-virale genterapie.

In het onderzoeksrapport wordt inzicht gegeven in de reeds uitgevoerde klinische studies en in de nieuwe ontwikkelingen binnen dit vakgebied die mogelijk in toekomstige klinische studies getest zullen worden. Daarop aansluitend wordt in het rapport uitvoerig stil gestaan bij de mogelijke milieurisico's die aan deze klinische studies zijn verbonden. De onderzoekers geven aan dat de milieurisico's van klinische studies met naakt DNA in veel gevallen verwaarloosbaar klein zijn. In een beperkt aantal gevallen ontbreken echter de wetenschappelijke gegevens om dit te onderbouwen. De onderzoekers zijn voor deze gevallen van mening dat een milieurisicoanalyse uitgevoerd moet blijven worden.

Gebaseerd op de bevindingen in dit onderzoeksrapport en haar overwegingen in een eerder advies over dit onderwerp, adviseert de COGEM voor klinische studies met naakt DNA twee verschillende vergunningsverleningsprocedures te hanteren. Om vast te kunnen stellen of een klinische studie volgens een vereenvoudigde procedure of volgens de huidig geldende procedure behandeld dient te worden, heeft de COGEM op basis van onder andere de aard van het toe te dienen DNA een aantal criteria opgesteld. In het geval van de vereenvoudigde vergunningsverleningsprocedure acht de COGEM een meldingsplicht afdoende om de veiligheid voor mens en milieu te waarborgen.



Het onderzoeksrapport en de door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlagen.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large 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

Vereenvoudigde procedure voor deel van klinische genterapie studies met naakt DNA

COGEM advies CGM/101026-06

Inleiding

In 2008 heeft het ministerie van VROM aangekondigd (SAS/2008028686) dat er een vereenvoudigde vergunningsverleningsprocedure komt voor de doelbewuste introductie in het milieu van ggo's. Hierbij is aangegeven dat onder andere klinische studies met plasmide DNA, ook wel naakt DNA genoemd, voor deze procedure in aanmerking zouden kunnen komen. Met het oog op deze ontwikkeling heeft de COGEM een onderzoeksproject laten uitvoeren om een overzicht te krijgen over de huidige en toekomstige vectoren en vectorsystemen binnen het veld van genterapie met naakt DNA en de mogelijke milieurisico's die aan het gebruik van de verschillende vectoren in klinische studies verbonden zijn. Dit onderzoek is uitgevoerd door dr. J.H. van den Berg en prof. dr. J.B.A.G., Haanen van het Nederlands Kanker Instituut te Amsterdam.

Het COGEM advies uit 2004

Naast genterapie en vaccinatie met vectoren die afgeleid zijn van virussen, de zogenaamde virale vectoren, wordt er ook al jaren onderzoek gedaan naar niet-virale vectoren. Deze vectoren die zonder de hulp van een virusdeeltje in de doelwitcellen van de patiënt worden gebracht, worden veelal aangeduid met de term naakt DNA of plasmide DNA.

In 2004 heeft de COGEM de milieurisico's die verbonden zijn aan het gebruik van plasmide DNA in mens of dier beschreven. In het betreffende advies wordt in detail ingegaan op de kans op integratie van plasmide DNA in het genoom van de gastheer, de kans op uitscheiding van het DNA in het milieu en de daaropvolgende mogelijke opname door andere organismen als mens, dier of bacteriën. Naar aanleiding van haar bevindingen heeft de COGEM toentertijd geadviseerd de procedure voor de vergunningsverlening voor klinische studies met plasmide DNA in een aantal gevallen te vereenvoudigen.

Dit voorstel was gebaseerd op een indeling van plasmide DNA in drie risicogroepen. De eerste risicogroep bevatte de replicatiecompetente plasmiden. Voor deze groep adviseerde de COGEM om aan de huidige vergunningsprocedure voor de introductie in het milieu van ggo's vast te blijven houden. De tweede risicogroep bevatte de niet-replicatiecompetente plasmiden, die recombinatie bevorderende, integratie bevorderende, transformerende, oncogene of nog niet eerder beoordeelde eigenschappen bevatten. Voor deze risicogroep pleitte de COGEM voor een vereenvoudigde vergunningsprocedure. De derde risicogroep bevatte niet-replicatiecompetente plasmiden met een bewezen verwaarloosbaar klein verspreidingsrisico. De COGEM achtte voor klinische studies met deze plasmiden meldingsplicht afdoende.

Inhoud van het rapport

In het onderzoeksrapport wordt een overzicht gegeven over de vectoren die in klinische studies zijn getest en wordt ingegaan op de informatie die klinische en preklinische studies hebben opgeleverd over de mogelijke milieurisico's. Daarnaast wordt inzicht verschaft in de nieuwe ontwikkelingen binnen de niet-virale gentherapie. In de afgelopen jaren heeft het onderzoek in dit veld zich met name gericht op het verhogen van de efficiëntie. Hierdoor hebben de belangrijkste ontwikkelingen betrekking op het optimaliseren van de expressie van het gen van interesse en het verbeteren van de opname van het plasmide DNA in de doelwitcellen door betere synthetische dragers en nieuwe toedieningstechnieken.

De uitvoerders zijn van mening dat het risico van verspreiding van DNA in het milieu beperkt is. Ten eerste wordt de kans op uitscheiding van het ingebrachte DNA door de uitvoerders als zeer klein in geschat. Het DNA wordt na toediening snel afgebroken en alleen kleine fragmenten kunnen de nieren passeren en via de urine in het milieu terecht komen. Opgemerkt wordt dat de kans op introductie in het milieu toeneemt door nieuwe toedieningsmethoden zoals DNA-tatoeage, waarbij het DNA voor toediening op de huid wordt aangebracht. De uitvoerders stellen dat de kans dat plasmiden door bijvoorbeeld bacteriën worden opgenomen klein is. Bovendien zal, indien opname toch plaatsvindt, het plasmide niet gehandhaafd blijven wanneer dit de bacterie geen groeivoordeel oplevert.

In het rapport wordt ook uitgebreid stilgestaan bij de mogelijke integratie van het plasmide in het genoom van humane cellen. De kans op een integratie en op mogelijke nadelige gevolgen hiervan zijn met name aanwezig voor de patiënt. Om het mogelijke effect van een integratie in het juiste perspectief te kunnen plaatsen, wordt de mate van de integratie afgezet tegen de frequentie van spontane gen-inactiverende mutaties. Deze frequentie is mede afhankelijk van externe factoren als roken en zonlicht en bedraagt gemiddeld 2×10^{-6} gen-inactiverende mutaties per gen. In de tot nu toe uitgevoerde (pre)klinische studies blijkt de frequentie van integratie minimaal enkele orden lager te zijn dan de frequentie van deze spontane mutaties in het humane genoom. De 'Food and Drug Administration' (FDA) van de Verenigde Staten beoordeelt een vaccinatie met plasmide DNA als veilig voor de patiënt als de integratiefrequentie niet hoger is dan de frequentie van spontane gen-inactiverende mutaties. Gezien de eerder genoemde zeer kleine kans op uitscheiding van plasmide DNA en de kleine kans op opname hiervan door derden zijn de uitvoerders van mening dat de kans op integratie in het genoom van derden veel kleiner is dan de kans op integratie in de patiënt. En zoals hierboven aangegeven, wordt de kans op integratie in de patiënt door de FDA reeds als veilig bestempeld.

Op grond van hun analyse zijn de onderzoekers van mening dat de milieurisico's van toekomstige klinische studies met plasmiden en technieken die thans in ontwikkeling zijn, over het algemeen verwaarloosbaar klein zullen zijn.

Echter, klinische studies met vectoren die zijn toegerust met biologische systemen om de import in de celkern, integratie in het genoom van de gastheercel of (episomale) replicatie te verhogen vallen hier niet onder. Daarnaast wordt in het rapport gesteld, dat antibiotica-resistentiegenen of

groeibevorderende eiwitten of plasmiden die virale sequenties bevatten, mogelijk een milieurisico met zich mee brengen. In het geval dat bovengenoemde elementen in een vector voorkomen, achten de uitvoerders de milieurisico's weliswaar klein, maar door een gebrek aan wetenschappelijk bewijs kunnen deze risico's niet uitgesloten worden. Een milieurisicoanalyse blijft in deze gevallen nodig om de mogelijke milieurisico's van een specifieke studie in te kunnen schatten.

In het rapport wordt derhalve gepleit om voor klinische studies met plasmiden die bovenstaande biologische systemen bezitten, de huidige procedure te handhaven. Voor klinische studies met plasmiden waarin de genoemde elementen niet aanwezig zijn, wordt geconcludeerd dat de milieurisico's dusdanig klein zijn, dat voor deze klinische studies de veiligheid voor mens en milieu afdoende is gewaarborgd met een meldingsplicht.

Advies

De COGEM stemt in met de conclusies en aanbevelingen van dit onderzoeksrapport. In lijn met het voorstel van de onderzoekers adviseert zij voor klinische studies met plasmide DNA twee verschillende procedures voor de vergunningverlening te hanteren. De COGEM is van mening dat de huidige procedure gehandhaafd dient te blijven in het geval van klinische studies met plasmiden waarmee nog geen ervaring is opgedaan en die bepaalde elementen bevatten die mogelijk een milieurisico zouden kunnen inhouden (categorie A). Daarentegen kan voor klinische studies met plasmiden die geen elementen bevatten die mogelijk milieurisico's inhouden of met plasmiden waarvoor in eerdere klinische studies geen milieurisico's aan het licht zijn gekomen een vereenvoudigde procedure gehanteerd worden (categorie B).

Categorie A

Voor de klinische studies met plasmide DNA waarvan een mogelijk milieurisico niet geheel uitgesloten kan worden, acht de COGEM het noodzakelijk dat een milieurisicoanalyse uitgevoerd blijft worden. Zij adviseert dergelijke studies vooralsnog onder de huidige vergunningsprocedure te laten vallen. In onderstaande tabel wordt aangegeven welke elementen of sequenties volgens de COGEM mogelijk een milieurisico inhouden.

In lijn met haar eerdere advies over dit onderwerp wijst de COGEM erop dat er binnen deze categorie twee groepen van plasmiden te onderscheiden zijn: een groep van plasmiden met een reële kans op milieurisico's (groep I) en een groep van plasmiden met een zeer beperkte kans op milieurisico's (groep II). In het theoretische geval dat een plasmide van groep II wordt uitgescheiden en wordt opgenomen door derden kan de COGEM een mogelijk milieurisico van deze plasmiden niet geheel uitsluiten en is zij van mening dat een milieurisicoanalyse nodig blijft.

Hoewel de COGEM op basis van dit onderscheid in 2004 een driedelig vergunningsverleningsprocedure heeft geadviseerd, is zij van mening dat een tweedeling waarschijnlijk een eenvoudiger te hanteren en duidelijker systeem oplevert. Conform het voorstel van de onderzoekers adviseert zij daarom de klinische studies met de groep I en groep II plasmiden van categorie A op een gelijke wijze te beoordelen.

Categorie B

Wereldwijd zijn er inmiddels enkele honderden klinische studies uitgevoerd met plasmide DNA. Er is hierdoor veel praktijkervaring opgedaan met de toediening van plasmide DNA in mensen. Voor zover de COGEM heeft kunnen nagaan, zijn er tot op heden geen milieurisico's gerapporteerd ten gevolge van deze klinische studies. Bovendien worden vele van deze plasmiden al jarenlang gebruikt in pre-klinische studies zonder dat dit heeft geleid tot schadelijke milieueffecten. De COGEM adviseert de vergunningaanvragen met plasmiden die geen sequenties bevatten die potentiële milieurisico's opleveren volgens een vereenvoudigde procedure te beoordelen. Een vereenvoudigde procedure kan ook gehanteerd worden indien de betreffende plasmiden (samengesteld zijn uit plasmiden die) al eerder in klinische studies zijn gebruikt en waarbij geen milieurisico's zijn waargenomen. Een samenvatting van de elementen waarvoor de COGEM de risico's voor mens en milieu bij gebruik in toekomstige klinische studies verwaarloosbaar klein acht, staan weergegeven in onderstaande tabel onder categorie B. De COGEM is van mening dat bij de klinische studies met dergelijke plasmiden een meldingsplicht volstaat.

Tabel: Indeling en kenmerken van klinische studies met plasmide DNA

Categorie-aanduiding vergunnings-procedure	Eigenschappen van klinische studie	Groeps indeling uit advies 2004 ¹
A	<ul style="list-style-type: none">- plasmide DNA is (episomaal) replicatiecompetent in zoogdiercellen;- plasmide DNA kan onderdeel gaan uitmaken van virussen, bijvoorbeeld door de aanwezigheid van virale inpaksignalen (o.a. Ψ);- plasmide DNA kan efficiënt opgenomen worden door bacteriën, bijvoorbeeld door aanwezigheid van bacteriële DNA opname sequenties (DUS), zoals de specifieke <i>Neisseria</i> DUS 5'-GCCGTCTGAA-3' en de <i>Haemophilus influenzae</i> DUS 5'-AAGTGCGGT-3';- plasmide DNA bevat sequenties die bacteriën resistentie bieden tegen algemeen gebruikte antibiotica of die coderen voor groei-bevorderende eiwitten;- directe injectie van plasmide DNA in de geslachtsklieren.	I
	<ul style="list-style-type: none">- plasmide DNA bevat virale sequenties, met uitzondering van de CMV en RSV promoter en een polyadenylerings-sigitaal;- plasmide DNA bevat sequenties die homologe recombinatie van het plasmide (of delen hiervan) met het genoom kunnen bevorderen, zoals het recombinatiesigitaal van het <i>Hepatitis B virus</i>, retrovirale LTR, VDJ-recombinatie signaalsequenties, Alu elementen en hypervariabele minisatelliet sequenties;- plasmide DNA codeert voor eiwitten die integratie van het plasmide DNA (of delen hiervan) in het genoom kunnen bevorderen of veroorzaken. Hiertoe behoren ondermeer bacteriofaag integrases, intact	II

	<p>HPV E6 + E7 en transposases zoals Sleeping beauty of Piggybac;</p> <ul style="list-style-type: none"> - plasmide DNA bevat eiwit-coderende sequenties die transformerende, oncogene of toxische eigenschappen hebben. 	
B	<ul style="list-style-type: none"> - het plasmide wordt <u>niet</u> direct in de geslachtsklieren geïnjecteerd; - plasmide DNA kan een 'origin of replication' (ori) bevatten afkomstig van de plasmiden pBR322, pUC (ColE1 ori), of p15A (pACYC-serie plasmiden); - plasmide DNA bevat geen antibiotica-resistentiegenen met uitzondering van een in prokaryoten actief kanamycine-resistentiegen; - plasmide DNA kan een in eukaryotische cellen functionele CMV, RSV synthetische promotor, polyadenyleringssignaal of nucleaire targeting sequentie bevatten; - plasmide bevat <u>geen</u> van de onder categorie A genoemde elementen, zoals sequenties die coderen voor een eiwit dat transformerende, oncogene of toxische eigenschappen heeft.² 	III

¹ risicogroepen. I: kans op milieurisico reëel. II: beperkte kans op milieurisico. III: milieurisico is verwaarloosbaar klein

² onder andere in klinische studies is de milieuveiligheid voor een aantal inserts reeds afdoende aangetoond. Het betreft bijvoorbeeld: de vasculair endotheel groeifactor (VEGF), de hepatocyte groeifactor (HGF), de fibroblast groeifactor type 1 (FGF1) het melanoom geassocieerde epitope (MART-1), een niet-functionele mutant van het HPV16 E7 eiwit, het prostaat specifiek antigeen (PSA), het prostaat specifiek membraan antigeen (PSMA), het prostaatzuur fosfatase (PAP), het gp100 melanoma melanocyte differentiatie antigeen, het oppervlakte antigeen van Hepatitis B, de prM en E eiwitten van het West-Nijl virus, het glycoproteïne van het 'infectious hematopoietic necrosis virus', Interleukine 12, HLA-A2, HLA-B13, HLA-B7, H2-K, β 2 microglobuline, GM-CSF, groeihormoon vrijmakend hormoon (GHRH), het tetanus toxine fragment-c (TTFC), het humane Maxi-K kanaal (aanwezig op gladde spieren), het humaan tyrosinase of het muize tyrosinase.