

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

**DATUM** 19 september 2012  
**KENMERK** CGM/120919-01  
**ONDERWERP** Advies: virale sequenties bij klinische studies met naakt DNA

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding naar het verzoek door uw departement om advies in verband met het ontwikkelen van een vereenvoudigde vergunningverleningsprocedure inzake klinische studies met naakt DNA-vectoren, deelt de COGEM u het volgende mee.

#### **Samenvatting**

Het ministerie van Infrastructuur en Milieu ontwikkelt een vereenvoudigde vergunningverleningsprocedure voor klinische studies met naakt DNA. Om tot een duidelijk onderscheid te komen tussen studies die de huidige en de vereenvoudigde procedure moeten doorlopen, zijn eenduidige criteria noodzakelijk. In deze context is de COGEM gevraagd te adviseren over de aanwezigheid van virale elementen in naakt DNA-vectoren. Bij naakt DNA-vectoren wordt het DNA niet omhuld door een eiwitmantel.

Wereldwijd zijn er inmiddels honderden klinische studies met naakt DNA uitgevoerd. Er is hierdoor veel praktijkervaring opgedaan met de toediening van naakt DNA in mensen en dieren. Ook worden veel naakt DNA-vectoren al jarenlang onder laboratoriumomstandigheden gehanteerd. Voor zover de COGEM heeft kunnen nagaan, is nog nooit gerapporteerd dat hierbij schadelijke effecten zijn opgetreden.

Bij de meeste studies worden de *Human herpesvirus 5* (HHV-5) promoter, de *Rous sarcoma virus* (RSV) promoter, virale polyadenyleringssignalen of virale nucleaire 'target' sequenties toegepast. Veelal zijn de promotoren artificieel aangepast ten einde het expressieniveau van het beoogde gen van interesse te verhogen.

Gezien de lange historie van veilig gebruik, is de COGEM van mening dat voor toepassingen van bovengenoemde virale sequenties in naakt DNA-vectoren, inclusief toekomstige varianten van HHV-5 en RSV promotoren, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn. De COGEM is van mening dat zowel humane als veterinaire studies met naakt DNA-vectoren waarbij deze virale elementen worden toegepast, in aanmerking komen voor een verkorte vergunningverleningsprocedure.



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 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  
Hoofd Bureau GGO

Dr. I. van der Leij  
Ministerie van IenM

# **Advies toepassing virale sequenties bij klinische studies met naakt DNA ten behoeve van vereenvoudigde vergunningverlening**

## **COGEM advies CGM/120919-01**

### **Inleiding**

Bij klinische studies met naakt DNA wordt in een dierlijke of menselijke cel DNA ingebracht, dat niet omhuld is met een eiwitmantel, met als doel een ziekte te voorkomen of te behandelen. Voor het uitvoeren van studies met naakt DNA-vectoren is een GGO-vergunning vereist (GGO staat voor genetisch gemodificeerd organisme). Een onderdeel van de vergunningverleningsprocedure bestaat uit het uitvoeren van een milieurisicoanalyse. Bij de milieurisicoanalyse wordt ondermeer bekeken of er door middel van recombinatie naakt DNA in het genoom van een ander organisme integreert. Op deze wijze zou een recombinant organisme kunnen ontstaan en vervolgens zou verspreiding van de recombinant en de naakt DNA-vector (of fragmenten daarvan) in het milieu kunnen plaatsvinden.

De COGEM heeft er in het verleden op gewezen dat de milieurisico's bij sommige toepassingen van naakt DNA minimaal zijn. Daarom kunnen sommige klinische studies met naakt DNA onder bepaalde voorwaarden in aanmerking komen voor een vereenvoudigde vergunningverleningsprocedure.<sup>1,2</sup> Eén van deze voorwaarden is dat het toe te passen naakt DNA geen virale sequenties mag bevatten om de kans op recombinatie te minimaliseren. Op deze wijze wordt de kans dat eventueel recombinant virus ontstaat en repliceert, beperkt, evenals een mogelijk daarmee gepaard gaand milieurisico.

Aanvullend heeft de COGEM gesteld dat een aantal virale sequenties hiervan uitgezonderd kunnen worden.<sup>2</sup> Indien deze sequenties aanwezig zijn in het naakt DNA preparaat, acht zij eventuele milieurisico's verwaarloosbaar klein. Het betreffen de volgende virale sequenties:

- 'de CMV promoter'
- 'de RSV promoter'
- een polyadenyleringssignaal
- een nucleaire 'targeting' sequentie

Het ministerie van Infrastructuur en Milieu bereidt momenteel een nieuwe vergunningverleningsprocedure voor klinische studies met naakt DNA voor. Hierin zal vastgelegd worden onder welke voorwaarden een studie in aanmerking kan komen voor een vereenvoudigde procedure. Het ministerie heeft deze voorwaarden aan de hand van een tweetal adviesvragen ter beoordeling aan de COGEM voorgelegd.

In dit advies wordt ingegaan op de eerste vraag, namelijk om een toelichting te geven waarom bovengenoemde virale sequenties uitgezonderd kunnen worden en of nog meer virale sequenties voor uitzondering in aanmerking komen. Tevens worden bovengenoemde virale sequenties nader omschreven. In een navolgend advies zal de COGEM aan de hand van de tweede adviesvraag de vereenvoudigde vergunningverleningsprocedure in zijn geheel evalueren.

### **Eerder COGEM advies**

In 2004 heeft de COGEM de milieurisico's beschreven die verbonden zijn aan het gebruik van naakt DNA in mens of dier, met andere woorden de milieurisico's bij therapeutische toepassingen als gentherapie en DNA-vaccinatie. Naar aanleiding van haar bevindingen adviseerde zij de procedure voor de vergunningsverlening voor klinische studies met naakt DNA in een aantal gevallen te vereenvoudigen. Zij pleitte voor een drietraps-vergunningverleningsmodel gebaseerd op een indeling van naakt DNA in drie risicogroepen.<sup>1</sup>

In 2010 heeft de COGEM aan de hand van een onderzoeksrapport laten onderzoeken welke klinische gentherapie studies met 'naakt DNA' voor een vereenvoudigde vergunningverleningsprocedure in aanmerking zouden kunnen komen. Gebaseerd op de bevindingen in dit onderzoeksrapport en haar overwegingen in het advies van 2004, adviseerde de COGEM het drietraps-vergunningverleningsmodel van 2004 te vereenvoudigen tot een tweetraps-vergunningverleningsmodel.<sup>2</sup> In dit model worden toegepaste naakt DNA-vectoren onderverdeeld in twee risicogroepen. Voor de eerste risicogroep adviseert de COGEM om aan de huidige vergunningverleningsprocedure vast te houden. De tweede risicogroep omvat naakt DNA met een bewezen verwaarloosbaar klein verspreidingsrisico. De COGEM acht voor klinische studies waarbij dit naakt DNA wordt toegepast, een meldingsplicht afdoende. Om hiervoor in aanmerking te komen, mag het DNA ondermeer geen virale sequenties bevatten, met uitzondering van de bovengenoemde virale sequenties.

### **Overweging en advies**

Wereldwijd zijn er inmiddels honderden klinische studies met naakt DNA uitgevoerd. Er is hierdoor veel praktijkervaring opgedaan met de toediening van naakt DNA in mensen en dieren. Ook worden veel naakt DNA-vectoren al jarenlang onder laboratoriumomstandigheden gehanteerd. Voor zover de COGEM heeft kunnen nagaan, is nog nooit gerapporteerd dat hierbij recombinant virus is ontstaan en er daardoor schadelijke effecten zijn opgetreden.

Meestal bevat de toegepaste naakt DNA-vector elementen van virale oorsprong zoals de *Human herpesvirus 5* (HHV-5)<sup>3</sup> promoter en hiervan afgeleide promotoren (doorgaans 'de CMV-promoter' genoemd), de *Rous sarcoma virus* (RSV) promoter en hiervan afgeleide promotoren, virale polyadenyleringssignalen, en virale nucleaire 'target' sequenties. Deze toegepaste virale sequenties coderen niet voor eiwitten, maar hebben als functie een effectief transport van de naakt DNA-vector naar de celkern en vervolgens expressie van het beoogde gen van interesse te bewerkstelligen.

Alleen indien de naakt DNA-vector en een wildtype virus tegelijkertijd in eenzelfde lichaamscel aanwezig zijn, zou er door middel van recombinatie gg-virus kunnen ontstaan. Bij zowel mens als dier acht de COGEM de kans hierop klein. Veelal worden bij deze studies HHV-5 en RSV promotoren gebruikt die artificieel zijn aangepast teneinde het expressieniveau van het beoogde gen van interesse te verhogen. Hierdoor is de sequentie-overeenkomst met wildtype virus verminderd, waardoor de kans op het optreden van recombinatie wordt verkleind. Virale polyadenyleringssignalen zijn korte niet-specifieke sequenties wat de mogelijkheid tot het optreden van recombinatie verlaagt. De COGEM merkt daarbij op dat de kans dat eventueel

recombinant HHV-5 of RSV zich in het milieu verspreidt, wordt gelimiteerd doordat HHV-5 en RSV een beperkt gastheerbereik kennen (respectievelijk de mens en de kip).<sup>4,5</sup>

In de studies die zijn uitgevoerd, zijn verschillende varianten van HHV-5 en RSV promotoren gebruikt, teneinde het expressieniveau van het beoogde gen van interesse te verhogen. Ongeacht de sequentievariatie van deze promotoren, polyadenyleringssignalen en nucleaire 'target' sequenties, en ongeacht het feit dat deze sequenties enkel of in enigerlei combinatie zijn toegepast, kennen al deze studies een lange historie van veilig gebruik. De COGEM is daarom van mening dat voor toepassingen van deze virale sequenties, inclusief toekomstige varianten van HHV-5 en RSV promotoren, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn. Zij maakt daarbij geen onderscheid tussen humane en veterinaire toepassingen.

Samengevat is de COGEM van mening dat toepassingen van naakt DNA met bovengenoemde virale sequenties uitgezonderd kunnen worden van een uitgebreide milieurisicoanalyse en in aanmerking komen voor een verkorte vergunningverleningsprocedure.

#### **Referenties**

1. COGEM (2004). Integratie en verspreiding van naakt DNA. COGEM advies CGM/041223-02
2. COGEM (2010). Vereenvoudigde procedure voor deel van klinische genterapie studies met naakt DNA. COGEM advies CGM/101026-06
3. King AMQ *et al.* (editors; 2012). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Elsevier Academic Press
4. Pass RF (2001). Cytomegalovirus. In: Fields Virology. Eds Knipe DM & Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, London
5. Bova-Hill C *et al.* (1991). Genetic analysis of the Rous sarcoma subgroup D env gene: mammal tropism correlates with temperature sensitivity of gp85. *J. Virol.* 65: 2073-2080