

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

DATUM 27 september 2012
KENMERK CGM/120927-01
ONDERWERP Advies: Vereenvoudiging procedure voor verlening vergunningen van klinische studies met naakt DNA

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van het verzoek van uw ministerie om advies over de ontwikkeling van een vereenvoudigde procedure voor de vergunningverlening voor 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 bepaalde klinische studies met naakt DNA. Het uitgangspunt voor de vereenvoudigde procedure is dat verspreiding van het naakte DNA en eventuele ontstane genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) wordt voorkomen. Hierdoor worden de milieurisico's verwaarloosbaar klein. In dit advies evalueert COGEM de milieurisicoanalyse voor de vereenvoudigde vergunningverleningsprocedure.

Wereldwijd zijn er inmiddels enkele 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 toegepast. Voor zover de COGEM heeft kunnen nagaan is nog nooit gerapporteerd dat hierbij schadelijke effecten optraden.

Door het hanteren van voorschriften, zoals ontsmetting van de toedieningsplaats, en criteria waaraan de naakt DNA-vector moet voldoen, zoals de afwezigheid van virale sequenties, wordt volgens de COGEM de kans op verspreiding van naakt DNA via (micro-)organismen verwaarloosbaar klein.

Indien het naakte DNA voldoet aan de gestelde criteria, en bij het opvolgen van de gestelde voorschriften, acht de COGEM de milieurisico's bij klinische studies met naakt DNA verwaarloosbaar klein, onafhankelijk van de gebruikte sequenties. Bij de vereenvoudigde procedure kan daarom volstaan worden met een algemene milieurisicoanalyse. Klinische studies met naakt DNA-vectoren waarbij niet aan alle vereiste voorschriften en criteria kan worden voldaan, dienen de normale vergunningverleningsprocedure te volgen. Hierbij is een casusgewijze milieurisicoanalyse aan de orde.



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

Hoogachtend,

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

Vereenvoudiging procedure voor verlening vergunningen van klinische studies met naakt DNA

COGEM advies CGM/120927-01

Inleiding

Het ministerie van Infrastructuur en Milieu (IenM) bereidt momenteel een nieuwe vergunningverleningsprocedure voor genterapiestudies met naakt DNA voor. Studies waarbij de milieurisico's minimaal zijn, kunnen in aanmerking komen voor een vereenvoudigde procedure. Het ministerie van IenM heeft de voorwaarden waaraan het naakte DNA moet voldoen, ter beoordeling aan de COGEM voorgelegd aan de hand van een tweetal adviesvragen. De eerste vraag is beantwoord in een recent advies, waarin is besproken welke virale sequenties in het naakte DNA zijn toegestaan.¹ In dit advies zal de COGEM ter beantwoording van de tweede vraag de milieurisicoanalyse voor de vereenvoudigde vergunningverleningsprocedure in zijn geheel evalueren.

Vereenvoudigde vergunningverleningsprocedure

Bij klinische studies met naakt DNA wordt in een dierlijke of menselijke cel DNA ingebracht, dat niet is omhuld door een eiwitmantel, met als doel een ziekte te voorkomen of te behandelen. Voor het uitvoeren van studies met naakt DNA is een vergunning voor werkzaamheden met genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) vereist. Een onderdeel van de vergunningverleningsprocedure bestaat uit het uitvoeren van een milieurisicoanalyse. Bij de milieurisicoanalyse wordt onder meer gekeken of het DNA ook in andere organismen opgenomen kan worden en tot expressie kan komen. Op deze wijze zou een ggo kunnen ontstaan en zou mogelijk verspreiding van deze ggo's en (fragmenten van) de naakte DNA-vector 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.^{2,3} Op basis van deze adviezen heeft het ministerie van IenM een vereenvoudigde vergunningverleningsprocedure uitgewerkt.

In de gangbare milieurisicoanalyse worden eerst de mogelijke nadelige effecten van een ggo, de kans op deze effecten en de ernst van deze effecten op mens en milieu in kaart gebracht. Als laatste stap wordt geïnventariseerd of eventuele risico's met managementmaatregelen geminimaliseerd kunnen worden. In het voorstel van het ministerie van IenM wordt deze laatste stap als uitgangspunt genomen. Voorkoming van verspreiding van het DNA in het milieu en het voorkomen van het ontstaan van ggo's staan centraal. Door het voorkomen van verspreiding met behulp van passende maatregelen, zijn eventuele milieurisico's automatisch verwaarloosbaar klein.

Om te waarborgen dat verspreiding van het naakte DNA naar het milieu wordt voorkomen, omvat het voorstel maatregelen in de vorm van voorschriften en criteria waaraan het naakte DNA moet voldoen, voordat de klinische studie uitgevoerd mag worden. Omdat de verdere aard van de

sequenties die op het DNA liggen niet van invloed is op de uitkomst van de risicoanalyse, kan volgens het ministerie worden volstaan met een algemene milieurisicoanalyse. In dit advies zal de COGEM de voorgestelde milieurisicoanalyse en de voorwaarden en criteria die opgesteld zijn ter voorkoming van verspreiding van het naakte DNA in het milieu beoordelen.

Voorschriften en criteria

De voorschriften en criteria voor de vereenvoudigde procedure zoals het ministerie deze voorstelt zijn gebaseerd op de eerdere COGEM adviezen over dit onderwerp. Deze betreffen de volgende criteria voor de te gebruiken DNA sequenties:

1. Het naakt DNA bevat geen sequenties die afkomstig zijn, of afgeleid zijn, van een voor eukaryoten infectieus virus, met uitzondering van:
 - a. een *Human herpesvirus 5* promotor, of een *Rous sarcoma virus* promotor
 - b. een polyadenyleringssignaal
 - c. een nucleaire targeting sequentie
2. Het naakt DNA bevat geen sequenties die bacteriën resistentie bieden tegen algemeen gebruikte antibiotica, met uitzondering van een *nptII* gen.

En de volgende voorschriften:

3. Het naakt nucleïnezuur wordt niet toegediend in de geslachtsklieren.
4. De toedieningsplaats wordt direct voorafgaand aan de toediening adequaat gedesinfecteerd.
5. Na de toediening wordt de toedieningsplaats gereinigd van eventueel aanwezig DNA.

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 bij therapeutische toepassingen als gentherapie en DNA-vaccinatie. Naar aanleiding van haar bevindingen adviseerde zij de procedure voor de vergunningverlening 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.²

In 2010 heeft de COGEM laten onderzoeken welke klinische gentherapie studies met naakt DNA voor een vereenvoudigde vergunningverleningsprocedure in aanmerking zouden kunnen komen.⁴ De COGEM adviseerde, gebaseerd op de bevindingen van het onderzoeksrapport en de overwegingen in het advies van 2004, het drietraps-vergunningverleningsmodel van 2004 te vereenvoudigen tot een tweetraps-vergunningverleningsmodel.³ 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 onder meer geen virale sequenties bevatten.

Enkele, in dit advies eerder genoemde, virale sequenties zijn hier echter van uitgezonderd. In haar advies van september 2012 onderbouwt de COGEM dat deze sequenties uitgezonderd

kunnen worden op basis van een lange historie van veilig gebruik.¹ De COGEM acht de milieurisico's van de aanwezigheid van deze sequenties in het naakte DNA verwaarloosbaar klein, zodat plasmiden met deze sequenties gebruikt mogen worden in de vereenvoudigde vergunningprocedure voor naakt DNA.

Overweging en advies

Wereldwijd zijn er inmiddels enkele 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 optraden. Omdat het uitgangspunt van de vereenvoudigde procedure het voorkomen van verspreiding betreft, zal hieronder ingegaan worden op de mogelijke verspreidingsroutes en hoe verspreiding van ontstane ggo's kan worden voorkomen.

Verspreiding van het naakte DNA

In haar eerdere adviezen heeft de COGEM geconcludeerd dat het risico van verspreiding van DNA in het milieu afwezig is, indien niet-replicatiecompetente DNA-vectoren worden gebruikt.² In laboratoria wordt dagelijks gewerkt met grote hoeveelheden opgezuiverd, vaak genetisch gemodificeerd, DNA. Er zijn bij de COGEM hiervan geen nadelige gevolgen voor het milieu bekend. Verspreiding van het naakte DNA zelf vanaf de injectieplaats, na injectie of tatoeage, kan worden voorkomen door reiniging van de injectieplaats. Daarnaast wordt naakt DNA in het lichaam snel afgebroken in het bloed, en alleen kleine fragmenten kunnen de nieren passeren en via de urine in het milieu terechtkomen. Uitscheiding van naakt DNA is niet waargenomen in klinische trials. Indien uitscheiding toch op zou treden, zal dit minimaal zijn.⁴ Bovendien ziet de COGEM geen risico's voor het milieu van het aanwezig zijn van (fragmenten van) naakt DNA in excreties van de proefpersoon.

Verspreidingsroutes ontstane ggo's

Bij het toedienen van naakt DNA kunnen humane cellen, bacteriën, virussen en/of andere (micro-) organismen aanwezig zijn in of op de proefpersoon. Het is niet uit te sluiten dat deze cellen of (micro-) organismen het naakt DNA-plasmide in hun cel(len) opnemen en mogelijk integreren in hun genoom. Hierdoor worden deze cellen en/of (micro-) organismen tot ggo's getransformeerd. In de voorgestelde milieurisicoanalyse is het uitgangspunt dat verspreiding van deze ggo's naar het milieu moet worden voorkomen. Per route zal hieronder worden besproken hoe verspreiding van naakt DNA via dat type cellen of (micro-) organismen kan worden voorkomen.

Verspreiding via virussen

Als een cel dat het naakte DNA heeft opgenomen gelijktijdig een virus bevat, zou naakt DNA mogelijk gedeeltelijk of geheel in het genoom van een virus kunnen worden geïntegreerd via recombinatie. Om de kans op verspreiding via virussen te minimaliseren, mogen virale sequenties daarom niet in het naakte DNA gebruikt worden. Hiervan zijn enkele sequenties uitgezonderd

waar veel ervaring mee is opgebouwd. De onderbouwing voor deze uitzonderingen wordt nader toegelicht in het recente COGEM advies hierover.¹

Verspreiding via humane cellen

Het doel van de toediening van naakt DNA in de proefpersoon is opname van het DNA door het doelweefsel, waarna het naakte DNA eventueel integreert in het genoom en tot expressie komt. Getransformeerde humane cellen zouden vrij kunnen komen in het milieu. Humane cellen kunnen echter buiten de mens niet autonoom overleven, laat staan delen. Door het ontbreken van een celwand zijn humane cellen zeer gevoelig voor bijvoorbeeld uitdrogen en osmotische druk. Om te voorkomen dat sequenties uit naakt DNA in kiembaancellen integreren en zo naar de volgende generatie overerven, mag het naakte DNA niet in de geslachtsklieren worden toegediend.

De COGEM wijst erop dat de volgende situaties geen verhoogde kans op verspreiding naar het milieu met zich meebrengen:

- integratie van het naakte DNA in het genoom van humane cellen;
- zelfstandige (episomale) replicatie van het plasmide in humane cellen;
- mogelijke genen in het naakte DNA die coderen voor oncogene, toxische of andere eigenschappen met een negatief effect op de proefpersoon.

Deze gebeurtenissen en sequenties zullen niet leiden tot verdere verspreiding van getransformeerde humane cellen naar het milieu, omdat humane cellen niet buiten de mens kunnen overleven en toediening van naakt DNA niet in de geslachtsklieren plaats mag vinden. De effecten van sequenties in het naakte DNA op de proefpersoon liggen bij elke genterapiestudie ter beoordeling voor aan de CCMO.

Verspreiding via bacteriën

Het lichaam van een mens bevat vele transiënte en residente bacteriën, vooral op de huid en in het maagdarmkanaal. Bacteriën in de transiënte en residente flora zouden het naakte DNA kunnen opnemen als dit wordt geïnjecteerd in de huid of getatoeëerd. Omdat bacteriën autonoom kunnen repliceren, zou verspreiding van recombinante bacteriën naar het milieu kunnen plaatsvinden.

In laboratoria wordt dagelijks gewerkt met grote hoeveelheden opgezuiverd en vaak genetisch gemodificeerd DNA. Veel laboratoriummedewerkers dragen hierbij geen handschoenen en nemen geen speciale voorzorgsmaatregelen ter verwijdering van de huidflora. Voor zover bekend zijn hier nog nooit milieurisico's uit voortgekomen.

Het ministerie stelt, om verspreiding via bacteriën te voorkomen, voor om de toedieningsplaats direct voorafgaand aan de toediening adequaat te desinfecteren, en na de toediening te reinigen van DNA. Voor adequate desinfectie van de injectieplaats raadt de COGEM een op alcohol gebaseerd desinfectans aan. Het is bewezen dat deze middelen praktisch 100% effectief zijn tegen bacteriën in de huid, en de residente huidflora met meerdere logs reduceren.⁵

Voor opname van het DNA door bacteriën is contact met het naakte DNA nodig. Desinfectie van de huid zal de plaatselijke huidflora praktisch geheel doden. De kans op contact met bacteriën wordt hierdoor zeer klein. Het is niet uit te sluiten dat na ontsmetting een bepaald percentage van

voornamelijk de residente huidflora, dat zich mede in diepere huidlagen, talgklieren en haarzakjes bevindt, overblijft.

Indien een bacterie toch in contact komt met het DNA, zou opname plaats kunnen vinden. In het algemeen is de kans op opname van plasmide DNA door bacteriën zeer laag vanwege de grootte en negatieve lading van het naakt DNA-plasmide.³ Echter, bepaalde bacteriën zijn van nature in staat om DNA effectief op te nemen. Sequenties die opname bevorderen (zogenaamde DUS sequenties) vergroten de kans op opname van het naakte DNA bij bepaalde bacteriën zoals *Pasteurellaceae*.

Indien in uitzonderlijke gevallen toch opname door bacteriën plaatsvindt, zal het plasmide niet gehandhaafd blijven wanneer dit de bacterie geen groeivoordeel oplevert. Het *nptII* antibioticumresistentiegen, dat een veelgebruikte marker is in naakt DNA-vectoren en resistentie biedt tegen kanamycine en neomycine, komt wijdverbreid voor onder bacteriën in de natuur.⁶ Verspreiding van dit gen in de natuur geeft volgens de COGEM geen milieurisico, en *nptII* kan daarom gebruikt worden in naakt-DNA vectoren. Echter, om selectieve druk op bacteriën in de huid om een plasmide met *nptII* op te nemen te voorkomen, adviseert de COGEM als extra voorzorgsmaatregel dat kanamycine en neomycine niet gebruikt mogen worden op de toedieningsplaats in de huid tijdens de klinische studie.

De COGEM concludeert dat de waarschijnlijkheid van het achtereenvolgens optreden van de verschillende stappen die kunnen leiden tot verspreiding van het naakte DNA via bacteriën naar het milieu, bij het opvolgen van de voorschriften, verwaarloosbaar klein is.

Verspreiding via andere (micro-)organismen

Andere (micro-)organismen die voorkomen in of op het menselijke lichaam, zoals parasieten, mijten en schimmels, zouden in aanraking kunnen komen met het toegediende naakte DNA. Door desinfectie van de injectieplaats zullen praktisch alle (micro-)organismen rond de toedieningsplaats zijn gedood. Opname van DNA door deze organismen is onwaarschijnlijk, en het is niet te verwachten dat het organisme het DNA zal behouden indien het DNA toch opgenomen zou zijn.

Verspreiding naar derden via een prikaccident

Een risico voor verspreiding van het naakte DNA naar derden vormt een prikaccident. Als een derde wordt geprikt, zijn de mogelijke verspreidingsroutes van het naakte DNA dezelfde als bij de proefpersoon. Daarom adviseert de COGEM, ter voorkoming van verdere verspreiding van het naakte DNA of eventuele ontstane ggo's uit een derde persoon, de injectieplaats te desinfecteren en te reinigen van DNA. De kans dat door een prikaccident kiembaancellen worden getransformeerd, acht de COGEM minimaal.

Conclusie betreffende algemene milieurisicoanalyse naakt DNA

Uit het bovenstaande blijkt volgens de COGEM dat, indien het naakte DNA voldoet aan de gestelde criteria en bij het opvolgen van de gestelde voorschriften, de milieurisicoanalyse bij deze klinische studies met naakt DNA steeds tot de conclusie leidt dat de milieurisico's

verwaarloosbaar klein zijn. Deze uitkomst van de milieurisicoanalyse is onafhankelijk van de gebruikte sequenties in het naakte DNA, mits virale sequenties afwezig zijn (met uitzondering van enkele sequenties zoals geformuleerd in het eerdere advies).

Hierbij moet opgemerkt worden dat de COGEM de risico's van klinische studies beoordeelt voor het milieu en derden, en niet voor de proefpersoon. Eventuele nadelige effecten van de behandeling van een proefpersoon met naakt DNA liggen bij elke klinische studie ter beoordeling voor aan de CCMO.

Veterinaire studies met naakt DNA

De milieurisicobeoordeling die hierboven wordt beschreven, acht de COGEM ook van toepassing op veterinaire studies met warmbloedige zoogdieren en vogels. Hierbij is een aandachtspunt dat de huid van dieren bedekt kan zijn met een vacht, veren, en dergelijke. Dit kan de voorgeschreven ontsmetting van de huid bemoeilijken.

Toedieningswijzen

In het voorstel van het ministerie worden directe injectie in het lichaam en tatoeage toegestaan, waarbij de vorming van aërosolen moet worden vermeden. Directe injectie in het lichaam omvat injectie in organen zoals spieren, het hart en de huid, en injectie in de bloedbaan. Naast tatoeage kan toediening met behulp van een 'gene gun' worden toegestaan. Andere toedieningswijzen kunnen mogelijk ook gebruikt worden, na het in kaart brengen van verspreidingsroutes van het naakte DNA en eventuele ontstane ggo's.

Conclusie

Onder hantering van de bovengenoemde voorschriften en criteria acht de COGEM de risico's voor het milieu van klinische studies met naakt DNA die via een vereenvoudigde procedure wordt vergund, verwaarloosbaar klein. Klinische studies met naakt DNA-vectoren waarbij niet aan alle vereiste voorschriften en criteria kan worden voldaan, dienen de normale vergunningverleningsprocedure te volgen. Hierbij is een casusgewijze milieurisicoanalyse aan de orde.

Referenties

1. COGEM (2012). Advies toepassing virale sequenties bij klinische studies met naakt DNA ten behoeve van vereenvoudigde vergunningverlening. Advies CGM/120919-01
2. COGEM (2004). Integratie en verspreiding van naakt DNA. Advies CGM/041223-02
3. COGEM (2010). Vereenvoudigde procedure voor deel van klinische gentherapie studies met naakt DNA. Advies CGM/101026-06
4. Van den Berg JH & Haanen JBAG (2010). Gene therapy with naked DNA: potential steps towards deregulation. COGEM onderzoeksrapport CGM/2010-06
5. Widmer et al. (2010). Surgical hand preparation: state-of-the-art. J. Hosp. Infect. 74: 112-122

6. Smalla K *et al.* (1993) Prevalence of nptII and Tn5 in kanamycin-resistant bacteria from different environments. FEMS Microbiol. Ecol. 13, 47-58