

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Milieu  
Mevrouw W.J. Mansveld  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 03 juni 2013  
**KENMERK** CGM/130603-04  
**ONDERWERP** Advies: Klinische studie met naakt DNA tegen plaveiselcelcarcinoom veroorzaakt door *Human papillomavirus*


Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van de aanvraag voor een klinische studie getiteld 'Intradermale vaccinatie met naakt DNA coderend voor het fusie-eiwit van domein-1 van tetanus toxin fragment C en een 'shuffled' versie van het humane papilloma virus (HPV)-16 E7 oncoproteïne voor het induceren van E7 specifieke T cel immuniteit in progressieve plaveiselcelcarcinoom patiënten' (IM-MV 13-002), ingediend door het Nederlands Kanker Instituut te Amsterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een klinische studie waarin patiënten met huidkanker (plaveiselcelcarcinoom) worden gevaccineerd met naakt DNA. Het naakt DNA zal bestaan uit een plasmide dat codeert voor een eiwit dat bestaat uit twee delen. Het eerste deel zorgt voor een specifieke afweerreactie tegen met *Human papillomavirus* 16 (HPV-16) geïnfecteerde kankercellen. Het andere deel versterkt de afweerreactie. Het plasmide zal door middel van tatoeage in de opperhuid worden ingebracht, waar huidcellen het plasmide opnemen en het eiwit tot expressie zullen brengen. Hierdoor wordt het immuunsysteem geactiveerd en kunnen kankercellen die door HPV-16 zijn geïnfecteerd, 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, evenals de kans op transmissie naar kiembaancellen, verwaarloosbaar klein is. Het plasmide bevat twee virale sequenties. Gezien de eigenschappen van de virussen en eerdere ervaringen, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat het plasmide met een wildtype 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 verhoogde fitness. Op basis van de beschreven studie kan de COGEM niet geheel uitsluiten dat het plasmide door bacteriën wordt opgenomen. De opname van het plasmide levert de bacteriën echter geen groeivoordeel op. Het antibioticumresistentiegen dat zich op het plasmide bevindt wordt algemeen aangetroffen in de natuur. Indien de injectieplaats vooraf en achteraf wordt gedesinfecteerd en schoongemaakt, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat er genetisch gemodificeerde bacteriën ontstaan die zich in het milieu zullen verspreiden en een schadelijk effect hebben op mens of milieu. De COGEM acht monitoring van groot belang voor het vergroten van de kennis over shedding. De COGEM is voor deze klinische studie 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,



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

# **Klinische studie met naakt DNA tegen plaveiselcelcarcinoom veroorzaakt door *Human papillomavirus***

## **COGEM advies CGM/130603-04**

### **Inleiding**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke risico's voor mens en milieu van een fase I/II klinische studie waarin patiënten met progressief plaveiselcelcarcinoom worden gevaccineerd met een plasmide (als naakt DNA), dat codeert voor een fusie-eiwit van een tetanus toxinefragment en een gehusselde versie van het E7 oncoproteïne van *Human papillomavirus* 16 (HPV-16). De aanvraag is ingediend door het Nederlands Kanker Instituut (NKI) te Amsterdam.

Het plaveiselcelcarcinoom is een agressieve vorm van huidkanker, die snel groeit en uitzaait. 15% van de gevallen van huidkanker betreffen plaveiselcelcarcinoom. Plaveiselcelcarcinoom kan geassocieerd zijn met infectie door het HPV. De aanvrager beoogt met het vaccin een nieuwe therapie te ontwikkelen tegen plaveiselcelcarcinoom dat geïnduceerd is door HPV.

### ***Plasmide pVAX1-TTFC-E7SH***

Om een afweerreactie tegen plaveiselcelcarcinoom op te wekken, wil de aanvrager het plasmide pVAX1-TTFC-E7SH gebruiken. Dit plasmide codeert voor een fusie-eiwit dat bestaat uit het domein 1 van het tetanus toxine fragment C (TTFC) en een gehusselde ('*shuffled*') versie van het HPV-16 E7 oncoproteïne. Expressie van het fusie-eiwit moet leiden tot een immuunrespons in de patiënt, gericht tegen door HPV geïnfecteerde tumorcellen. Voor inductie van tumorcellen is de continue expressie van de virale oncogenen E6 en E7 nodig.<sup>1</sup> Om de functie van E7 als oncogen uit te schakelen in het vaccin, is de sequentie van het HPV-16 E7 eiwit op meerdere plaatsen geknipt en in een afwijkende volgorde weer aan elkaar gekloneerd. Hierdoor wordt er geen functioneel eiwit geproduceerd, maar presenteert het gehusselde HPV-16 E7 wel de epitopen die van belang zijn voor het opwekken van een immuunreactie. Het niet-toxische domein-1 van TTFC bevat epitopen die van belang zijn voor het induceren van een helper-T-celrespons. Deze activering van helper-T-cellen zullen de cytotoxische T-celrespons tegen HPV E7 versterken.

De expressie van het fusie-eiwit staat onder controle van een CMV promoter en een BGH polyadenylering signaal. Naast de coderende sequentie voor het fusie-eiwit bevat het plasmide ook een kanamycineresistentiegen (*aph* of *nptII*) dat afkomstig is uit *E. coli* en een ColE1 ori voor replicatie.

### ***Opzet studie***

In de studie wil de aanvrager het vaccin testen op toxiciteit en werkzaamheid in patiënten met een progressief plaveiselcelcarcinoom. Hiervoor wordt het naakt DNA in de opperhuid getatoeëerd. Op drie momenten binnen één week wordt een totaal van 6 mg plasmide toegediend. Na 4 weken wordt de procedure herhaald.

### **Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft meerdere malen geadviseerd over het gebruik van plasmide DNA in klinische studies. In 2008 heeft de COGEM positief geadviseerd over tatoeage van melanoompatiënten met pDERMATT, een klinische studie die ook door het NKI is aangevraagd.<sup>2</sup> pDERMATT codeert voor een fusie-eiwit van het tetanus toxine fragment C en een klein fragment van het melanoomgeassocieerde antigeen MART-1. pDERMATT en het plasmide uit de huidige aanvraag hebben beide plasmide pVAX1 als basis, aangevuld met de sequentie van het tetanustoxinefragment (het eerste deel van het fusie-eiwit). De plasmiden verschillen alleen in de sequentie voor het tweede deel van het fusie-eiwit.

De COGEM kon destijds niet geheel uitsluiten dat het plasmide door bacteriën op de huid zou worden opgenomen. Echter, de opname van het plasmide levert de bacteriën geen groeivoordeel op, en het antibioticumresistentiegen *aph* dat op het plasmide ligt, wordt algemeen aangetroffen in de natuur. De COGEM was daarom van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is dat er gg-bacteriën ontstaan die zich in het milieu zullen verspreiden en een schadelijk effect hebben op mens of milieu.

Uitgaande van de mogelijke verspreidingsrisico's van naakt DNA heeft de COGEM in 2004 een aantal criteria opgesteld, op basis waarvan het gebruik van naakt DNA ingedeeld kan worden in een drietal risicogroepen.<sup>3</sup> In 2008 heeft de COGEM pDERMATT ingedeeld in de groep van niet-replicatiecompetente plasmiden met een bewezen verwaarloosbaar klein verspreidingsrisico.

De afgelopen jaren heeft de COGEM meerdere malen geadviseerd over de algemene milieurisico's van het gebruik van naakt DNA in klinische studies, in het kader van mogelijke deregulering van aanvragen hiervoor.<sup>3,4,5,6</sup> Door het hanteren van criteria waaraan de vector moet voldoen en van voorschriften voor de uitvoering, wordt volgens de COGEM de kans op verspreiding van naakt DNA via micro-organismen verwaarloosbaar klein. Hierbij heeft zij aangegeven dat de milieurisico's bij gebruik van de CMV promotor (of de *Human herpesvirus 5* promotor) verwaarloosbaar klein zijn.<sup>4</sup> Een ander criterium is dat er geen antibioticumresistentiegenen in de vector aanwezig zijn die resistentie bieden tegen algemeen gebruikte antibiotica. De gestelde voorschriften zijn als volgt:

- het naakt DNA wordt niet toegediend in de geslachtsklieren;
- de toedieningsplaats is vooraf adequaat gedesinfecteerd;
- de toedieningsplaats wordt achteraf gereinigd.

### **Milieurisicobeoordeling naakt DNA**

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

Omdat naakt DNA geen eigenschappen van een levend organisme of virus heeft, kan er hierbij 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 richt zich in haar milieurisicoanalyse op de mogelijke risico's van deze gebeurtenissen.

## **Overweging en advies**

pVAX-TTFC-E7SH is gebaseerd op dezelfde backbone als pDERMATT. In 2008 heeft de COGEM pDERMATT ingedeeld in de groep van niet-replicatiecompetente plasmiden met een bewezen verwaarloosbaar klein verspreidingsrisico. De COGEM is daarom van mening dat pVAX-TTFC-E7SH ook ingedeeld moet worden in deze groep van plasmiden met zeer kleine milieurisico's.

### *Systemische verspreiding in patiënt*

In onderhavige aanvraag wordt plasmide pVAX-TTFC-E7SH met behulp van een tatoeagetechniek 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 zeer klein dat het DNA de bloedbaan zal bereiken.

De COGEM heeft geen reden om aan te nemen dat de halfwaardetijd van pVAX-TTFC-E7SH verschilt van die van andere plasmiden. Op basis van de gegevens van eerdere klinische studies met plasmide DNA gaat zij er daarom vanuit dat de halfwaardetijd van pVAX-TTFC-E7SH in humaan bloed enkele minuten zal bedragen.<sup>7</sup> De kans op systemische verspreiding van pVAX-TTFC-E7SH acht de COGEM verwaarloosbaar klein.

### *Integratie in somatische cellen*

Plasmide DNA dat is opgenomen door cellen en in de celkern terecht is gekomen, kan mogelijk integreren in het genoom. Integratie kan willekeurig optreden of op een specifieke plaats als gevolg van homologe recombinatie. Omdat het gebruikte plasmide geen sequentieovereenkomst vertoont met het genoom van humane cellen, zal er geen integratie door homologe recombinatie op een specifieke plaats in het humane genoom plaatsvinden.

Gebaseerd op eerdere overwegingen is de COGEM van mening dat de willekeurige integratiefrequentie van pVAX-TTFC-E7SH in het genoom van somatische cellen lager zal zijn dan de frequentie van spontane gen-inactiverende mutaties ( $2 \times 10^{-6}$  spontane mutaties per gen).<sup>3,8</sup> Hierbij baseert de COGEM zich op de gegevens van een studie waarin spierweefsel door middel van electroporatie werd getransduceerd met naakt DNA.<sup>9</sup> Ook in het geval van deze relatief efficiënte transductiemethode 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 eerdere adviezen 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.<sup>3,5,6</sup> In onderhavige studie wordt het naakt DNA in de bovenste lagen van de huid getatoeëerd. De COGEM is daarom van mening dat de kans op verticale transmissie van pVAX-TTFC-E7SH 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. In het plasmide pVAX-TTFC-E7SH zijn twee elementen uit virussen afkomstig; de 'immediate early' promotor van CMV en de gehusselde versie van het HPV-E7 gen.

De CMV promotor zou in theorie de kans op een homologe recombinatie tussen het plasmide en hCMV virus kunnen bevorderen. De CMV promotor is in talloze klinische studies toegepast en kent een lange geschiedenis van veilig gebruik. Zoals in eerdere COGEM adviezen is aangegeven, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van het gebruik van de CMV promotor verwaarloosbaar klein.<sup>3,4</sup>

De gehusselde versie van het HPV-E7 gen is gebaseerd op vier fragmenten (a tot d) die samen de wildtype HPV-16 E7 sequentie vormen. De fragmenten zijn zo gekozen, dat sequenties van drie bindingsmotieven onderbroken zijn. Het langste fragment is 315 basenparen. De fragmenten zijn in de volgorde a, d, c, b in het gehusselde gen gekloneerd. Voorafgaand aan de sequentie is een Kozak motief toegevoegd om de translatie van het fusie-eiwit te verbeteren. Aan het einde van de sequentie zijn korte sequenties met de drie bindingsmotieven toegevoegd, om de epitopen te behouden voor de gewenste immuunrespons. Aangezien in de gehusselde E7 sequentie nog homologie bestaat met het wildtype genoom van HPV-16, is er in theorie homologe recombinatie van deze fragmenten mogelijk.

Homologe recombinatie van het gehusselde E7 gen met een wildtype E7 genoom zal slechts leiden tot uitwisseling van gelijke sequenties, die in gehusselde volgorde hoogstwaarschijnlijk tot attenuatie van het recombinante virus zullen leiden. Voor zover bij de COGEM bekend zijn er geen HPV E7 varianten in de natuur aangetroffen, die een andere volgorde hebben dan het wildtype E7. In het onwaarschijnlijke geval dat homologe recombinatie optreedt, verwacht de COGEM niet dat dit tot een verhoogde fitness zal leiden.

De aanvrager wil het plasmide pVAX-TTFC-E7SH met behulp van tatoeage lokaal in de opperhuid brengen. In deze huidlaag wordt het plasmide hoofdzakelijk opgenomen en tot expressie gebracht door keratinocyten.<sup>10</sup> Humaan CMV en HPV16 komen beide echter niet in de huid voor en infecteren geen keratinocyten. Met het oog op het gastheerbereik van de twee virussen en de lokale toediening van het plasmide, is de COGEM van mening dat de kans dat een van deze virussen en het plasmide in dezelfde cel aanwezig zullen zijn, verwaarloosbaar klein is.

Gezien bovenstaande overwegingen acht de COGEM de kans op verspreiding als gevolg van recombinatie van het plasmide pVAX-TTFC-E7SH met het genoom van een virus verwaarloosbaar klein.

### *Transformerende eigenschappen van HPV-16 E7 eiwit*

De continue expressie van de virale oncogenen E6 en E7 is nodig voor de inductie en het aanhouden van een kwaadaardig fenotype van geïnfecteerde cellen. Daarom heeft de aanvrager getracht de transformerende functie van HPV-16 E7 uit te schakelen door de sequentie van het E7 eiwit te husselen. Zoals aangegeven komt het plasmide hoofdzakelijk in keratinocyten tot expressie.<sup>10</sup> In een *in vivo* assay is aangetoond dat het gehusselde HPV-16 E7 eiwit geen transformerende eigenschappen meer vertoont in NIH 3T3 fibroblasten en humane voorhuid keratinocyten.<sup>1</sup> Er is hierbij gekeken naar transformatie van de fibroblasten en de inactivatie van pRb en p53 in humane keratinocyten. Vergelijkbare studies vonden dezelfde resultaten.<sup>11,12</sup> De COGEM is van mening dat door het gebrek aan correcte vouwing van het gehusselde E7 eiwit de transformerende eigenschappen verloren zijn, en het gehusselde HPV-16 E7 daarom geen transformerende eigenschappen meer bezit.

### *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.<sup>3</sup> 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 pVAX-TTFC-E7SH op de huid aangebracht, alvorens het in de bovenste lagen van de huid wordt getatoeëerd. Gezien de goed gedefinieerde lokale 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.

Er zou theoretisch shedding kunnen optreden van cellen die het plasmide hebben opgenomen 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.<sup>13</sup> 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.

Om de opname van het DNA door bacteriën te minimaliseren adviseert 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* (ook wel *aph(3')-II* of *nptII*) gen dat kanamycine- en neomycineresistentie 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. Kanamycine- en neomycineresistentie 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 opname van het plasmide zal de bacterie in deze studie geen groeivoordeel opleveren, als de patiënt niet wordt behandeld met kanamycine of neomycine. De aanvrager geeft aan dat de patiënt geen kanamycine krijgt toegediend. De COGEM adviseert om geen aminoglycosiden aan de patiënt toe te dienen tijdens de studie. De COGEM is onder deze voorwaarde van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is dat in het hypothetische geval van een opname van het plasmide pVAX-TTFC-E7SH 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 pVAX-TTFC-E7SH een gg-bacterie ontstaat die in staat is zich in het milieu te handhaven, te verspreiden en schade aan te richten.

#### *Monitoringsplan*

De toediening van DNA in de opperhuid door middel van tatoeage is een relatief nieuwe techniek, waarover geen shedding gegevens zijn gepubliceerd. De aanvrager geeft aan dat er bloedmonsters 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.<sup>7</sup> 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.<sup>7</sup>

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 daarom 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 bloedmonsters niet worden geanalyseerd.

De COGEM is van mening dat de kans op risico's voor mens en milieu ten gevolge van shedding verwaarloosbaar klein zullen zijn. Desondanks is de COGEM van mening dat monitoring van groot belang is voor het vergroten van de kennis over shedding. Aanvullende monitoring van bloed of huidschilfers kan nuttige informatie opleveren die gebruikt kan worden bij toekomstige aanvragen.



## Conclusie

De huidige aanvraag betreft een klinische studie waarin patiënten met huidkanker worden gevaccineerd tegen plaveiselcelcarcinoom met het plasmide pVAX-TTFC-E7SH. Door de opzet van de 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 het plasmide of plasmidesequenties opnemen en zich verspreiden in het milieu verwaarloosbaar klein. Indien de aanvrager de toedieningsplaats voorafgaand aan de tatoeage desinfecteert en achteraf reinigt, acht de COGEM de kans dat bacteriën het plasmide of plasmidesequenties opnemen en zich verspreiden in het milieu verwaarloosbaar klein. De COGEM is van mening dat monitoring van shedding van plasmide DNA van groot belang is voor het vergroten van de kennis hierover, hoewel zij de risico's van shedding voor mens en milieu van deze studie verwaarloosbaar klein acht.

Concluderend acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de voorgenomen fase 1 klinische studie met pVAX-TTFC-E7SH risico's oplevert voor mens en milieu.

## Referenties

1. Henken FE *et al.* (2012). Preclinical safety evaluation of DNA vaccines encoding modified HPV16 E6 and E7. *Vaccine* 30:4259-4266
2. COGEM (2008). Vaccinatie tegen melanoma door tatoeage met pDERMATT. Advies CGM/080929-06
3. COGEM (2004). Integratie en verspreiding naakt DNA. Advies CGM/041223-02
4. COGEM (2012). Toepassing virale sequenties bij klinische studies met naakt DNA ten behoeve van vereenvoudigde vergunningverlening. Advies CGM/120919-01
5. COGEM (2012). Vereenvoudiging procedure voor verlening vergunningen van klinische studies met naakt DNA. Advies CGM/120927-01
6. COGEM (2010). Vereenvoudigde procedure voor deel van klinische genterapie studies met naakt DNA. Advies CGM/101026-06
7. COGEM (2008). Behandeling van CLI met het plasmide NV1FGF. Advies CGM/080729-01
8. Cole J *et al.* (1994) Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo. *Mutat. Res.* 304: 33-105
9. 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
10. Berg van den JH *et al.* (2009) Optimization of intradermal vaccination by DNA tattooing in human skin. *Hum Gene Ther.* 20:181-189
11. Ohlschläger P *et al.* (2006). An improved rearranged Human Papillomavirus Type 16 E7 DNA vaccine candidate (HPV-16 E7SH) induces an E7 wildtype-specific T cell response *Vaccine* 24: 2880–2893
12. Osen W *et al.* (2001). A DNA vaccine based on a shuffled E7 oncogene of the human papillomavirus type 16 (HPV 16) induces E7-specific cytotoxic T cells but lacks transforming activity. *Vaccine* 19: 4276–4286
13. Koster MI (2009). Making an epidermis. *Ann N Y Acad Sci.* 1170: 7–10