

Aan de minister van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke  
Ordering en Milieubeheer  
Mevrouw J.C. Huizinga-Heringa  
POSTBUS 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 13 oktober 2010  
**KENMERK** CGM/101013-02  
**ONDERWERP** Advies vaccinatie van honden met naakt DNA

Geachte mevrouw Huizinga-Heringa,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM 10-002 met de titel 'Vaccinatie met naakt nucleïnezuur coderend voor xenogenetisch humaan tyrosinase voor de inductie van specifieke afweer tegen melanoma cellen bij de hond' van de Universiteit Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

### **Samenvatting**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een studie waarin honden met uitgezaaid en uitbehandeld melanoom gevaccineerd worden met het plasmide pING/Tyrosinase. Dit vaccin is sinds 2009 op de Amerikaanse markt verkrijgbaar en sinds die tijd zijn er ongeveer 6000 honden met het vaccin behandeld.

Het plasmide pING/Tyrosinase bevat een gen dat codeert voor menselijk tyrosinase. Dit enzym is betrokken bij de vorming van het huidpigment melanine en komt, behalve in gezonde huidcellen, ook tot expressie in kwaadaardige melanomen. Door honden te vaccineren met menselijk tyrosinase wordt een afweerreactie opgewekt tegen het honden tyrosinase. Hierdoor is het afweersysteem in staat om kwaadaardige melanoomcellen te herkennen en te verwijderen.

De aanvrager is voornemens het vaccin via een naaldvrij injectiesysteem in de spierlaag aan de hond toe te dienen. De COGEM is van mening dat de kans op integratie van het plasmide in het genoom van cellen van behandelde honden verwaarloosbaar klein is.

Het plasmide pING/Tyrosinase bevat enkele virale sequenties van het humane *Herpesvirus 5* virus (HHV-5). Gezien de eigenschappen van HHV-5 en eerdere ervaringen acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat het plasmide met HHV-5 zal recombineren. Bovendien is de COGEM van mening dat een mogelijke homologe recombinatie in deze situatie niet zal leiden tot een virus met nieuwe eigenschappen.

In het hypothetische geval dat het plasmide door een bacterie wordt opgenomen, zal dit in de ogen van de COGEM geen schadelijk effect opleveren voor mens of milieu.

Samengevat is de COGEM voor deze studie van mening dat de 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 loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

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

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

# Vaccinatie van honden met naakt DNA

## COGEM advies CGM/101013-02

### Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke risico's voor mens en milieu van een studie waarin honden met uitgezaaid en uitbehandeld melanoom worden gevaccineerd met het plasmide pING/Tyrosinase. Het primaire doel van de studie is om de klinische effectiviteit van een behandeling met het plasmide DNA te evalueren.

Het vaccin dat de aanvrager wil gebruiken wordt geproduceerd door Merial en is sinds 2009 op de Amerikaanse markt verkrijgbaar. Volgens de aanvrager zijn sinds de introductie van het vaccin ongeveer 6000 honden behandeld in de VS.

### Kwaadaardig melanoom bij honden

Kwaadaardig melanoom is een redelijk frequent voorkomende spontane en agressieve tumor bij de hond. De prognose van de ziekte is mede afhankelijk van het klinisch stadium van de tumor, waarbij de World Health Organisation (WHO) vier niveaus onderscheidt. Niveau I en II tumoren zijn respectievelijk kleiner dan 2 tot 4 centimeter in diameter. Bij deze tumoren worden geen uitzaaiingen aangetroffen. Niveau III en IV tumoren zijn groter dan vier centimeter in diameter en kunnen uitzaaien naar de lymfeknopen, lever, longen en nieren.<sup>1,2</sup>

Honden met kwaadaardige melanomen worden meestal behandeld met agressieve lokale behandelingen, zoals chirurgie en radiotherapie. Maar ondanks deze behandelingen worden er vaak uitzaaiingen op afstand gevonden.<sup>1,2</sup>

In de VS is in de afgelopen jaren, wat betreft levensduur, vooruitgang geboekt bij honden met uitgezaaid melanoom door deze te vaccineren met een plasmide dat humaan tyrosinase tot expressie brengt.<sup>1,2,3</sup> Dit enzym katalyseert de omzetting van tyrosine naar het huidpigment melanine in melanocyten. Door honden te vaccineren met humaan tyrosinase wordt een afweerreactie opgewekt tegen endogeen honden tyrosinase. Hierdoor is het afweersysteem in staat om kwaadaardige melanoomcellen te herkennen en te verwijderen.

### Voorgenomen werkzaamheden

Het plasmide pING/Tyrosinase zal transdermaal/intramusculair toegediend worden middels het naaldvrije Biojector2000 systeem. Dit injectiesysteem bevat een kleine opening aan de injectiezijde waar de injectievloeistof onder CO<sub>2</sub> druk doorheen wordt gespoten. De diameter van deze opening is kleiner dan dat van een menselijke haar. De combinatie van een hoge druk en kleine diameter zorgt ervoor dat de vloeistof de huid kan penetreren zonder dat hier een naald voor nodig is.<sup>4</sup>

De honden ontvangen met twee wekelijkse intervallen een transdermale/intramusculaire injectie met 500µg plasmide DNA tot een maximum van 4 injecties. Daarna volgt nog, afhankelijk van het ziekteverloop bij de hond, een boosterinjectie met intervallen van 6 maanden tot een

maximum van 4 keer. Toediening van het vaccin vindt plaats in een dierverblijf dat voldoet aan DM-II inrichtingseisen.

### **Eerdere COGEM adviezen**

De COGEM heeft vijfmaal geadviseerd over het gebruik van plasmide DNA (naakt DNA) in klinische studies bij mensen.

Een van deze vier adviezen betrof een algemeen advies over mogelijke integratie en verspreiding van naakt DNA.<sup>5</sup> 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 dermate laag dat de COGEM de risico's die verbonden zijn aan de toediening van naakt DNA niet groter acht 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 virussequenties. 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 lichaamsholten 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, acht de COGEM het verspreidingsrisico verwaarloosbaar klein.

Naast het algemene advies heeft de COGEM viermaal geadviseerd over een specifiek genterapieprotocol. Het eerste advies betrof een aanvraag waarin plasmide DNA werd gebruikt voor de aanmaak van de groeifactor VEGF.<sup>6</sup> Het tweede betrof een klinische studie met Allovectin-7 voor de behandeling van melanoma.<sup>7</sup> Het derde advies betrof de behandeling van kritische lidmaatschemie met het plasmide NV1FGF.<sup>8</sup> Het laatste advies betrof een behandeling van melanoma met behulp van het plasmide pDERMATT.<sup>9</sup> De COGEM achtte de kans op integratie van betreffende plasmiden in deze studies verwaarloosbaar klein. Tevens achtte zij de kans op recombinatie van de plasmide sequenties met virussequenties en opname van de plasmiden door bacteriën verwaarloosbaar klein. Op grond van deze redenen had de COGEM geen bezwaar tegen de aanvragen.

### **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 daarom gericht op de mogelijke risico's van deze gebeurtenissen.

### **Elementen van het plasmide pING/Tyrosinase**

In de onderhavige studie wordt gebruik gemaakt van het plasmide pING/Tyrosinase. Dit plasmide is een dubbelstrengs, covalent gesloten circulair DNA molecuul van 6408 basenparen. Het plasmide bevat een ColE1 *origin of replication* die ervoor zorgt dat het plasmide in bacteriën van de familie *Enterobacteriaceae* kan repliceren en gehandhaafd blijft. In het plasmide bevindt zich het gen dat codeert voor het humane eiwit tyrosinase. Tevens is in het plasmide het *npt1* gen afkomstig van *E. coli* gekloneerd. Het *npt1* gen codeert voor een eiwit dat zorgt voor resistentie tegen de antibiotica kanamycine en neomycine. Het plasmide bevat geen genen die coderen voor transformerende of oncogene eigenschappen.

Expressie van het humaan tyrosinase staat onder controle van een humaan Cytomegalovirus (hierna *Human herpesvirus 5* of HHV-5<sup>10</sup>) *immediate early promotersequentie*. Deze promotor initieert de transcriptie van het tyrosinase eiwit. Naast deze promotorsequentie is er een exon 1 en een intron A sequentie van HHV-5 in het plasmide aanwezig. Deze sequenties zijn gericht op betere expressie van tyrosinase in gevaccineerde cellen. De HHV-5 sequenties in het plasmide pING/Tyrosinase zijn identiek aan de wild-type HHV-5 sequenties.

### **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, waarmee het gebruik van naakt DNA ingedeeld kan worden in een drietal risicogroepen.<sup>5</sup> Met het oog op de eigenschappen van pING/Tyrosinase (niet-replicatiecompetent en afwezigheid van verspreidingsrisico) is de COGEM van mening dat pING/Tyrosinase ingedeeld kan worden in de groep van plasmiden met de laagste milieurisico's en acht daarom de daarvoor geldende overwegingen van toepassing op onderhavige studie.

#### *Integratie in somatische cellen*

Plasmide DNA dat is opgenomen door cellen en in de celkern terecht is gekomen, kan mogelijk integreren in het genoom. De COGEM is van mening, op basis van hierna genoemde argumenten, dat de integratiefrequentie van pING/Tyrosinase 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>5,11</sup> Hierbij baseert de COGEM zich op de gegevens van een studie

waarin spierweefsel door middel van electroporatie werd getransduceerd met naakt DNA.<sup>12</sup> Ook in het geval van deze relatief efficiënte transduciemethode bleef de integratiefrequentie van het naakte DNA onder de basislijn van spontane gen-inactiverende mutaties. De COGEM is van mening dat het door aanvrager gebruikte Biojector2000 systeem de integratiefrequentie ten opzichte van de eerder genoemde electroporatietechniek niet zal bevorderen, omdat dit systeem niet efficiënter is. Op basis van deze overweging is de COGEM van mening dat de kans op integratie in somatische cellen niet hoger is dan de frequentie van spontane gen-inactiverende mutaties. In het onwaarschijnlijke geval dat er recombinatie optreedt tussen de sequentie van het humaan tyrosinase en het hondentyrosinase levert dit geen milieurisico op, omdat cellen met een dergelijke recombinatie niet uitgescheiden zullen worden.

#### *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 plasmide DNA niet direct in de gonaden wordt geïnjecteerd en niet wordt toegediend aan zwangeren.<sup>5</sup> De relatief eenvoudigste manier om naakt DNA in contact te laten komen met kiembaancellen (buiten directe injectie in de gonaden om) is door naakt DNA direct in de bloedbaan te injecteren. Echter, naakt DNA staat na toediening aan het bloed bloot aan onder meer nucleasen en fagocyterende cellen die het DNA afbreken. Naakt DNA dat niet wordt afgebroken moet vervolgens de kiembaancellen binnendringen om de celkern bereiken. Ook binnen de cel staat het naakt DNA bloot aan nucleasen. Het risico op kiembaantransmissie zal daarom bij injectie van naakt DNA in de bloedbaan veel lager zijn dan bij directe injectie in de gonaden.<sup>5</sup>

In onderhavige studie wordt het naakt DNA transdermaal/intramusculair toegediend. In lijn met het algemene advies is de COGEM daarom van mening dat de kans op verticale transmissie van pING/Tyrosinase 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.

Expressie van het humaan tyrosinase staat onder controle van een HHV-5 *immediate early promoter* sequentie. Naast deze promotorsequentie is er een HHV-5 exon 1 en een HHV-5 intronsequentie in het plasmide aanwezig. In theorie zou (homologe) recombinatie kunnen optreden met een wildtype HHV-5 indien een hondencel tegelijkertijd met het plasmide en HHV-5 geïnfecteerd is. Echter, HHV-5 is een virus waarvan het gastheerbereik beperkt is tot de mens. Het is niet aannemelijk dat HHV-5 honden kan infecteren en zich vervolgens in de hond kan vermenigvuldigen. Het is verder zeer onwaarschijnlijk dat een interactie tussen de HHV-5 sequenties en andere virussen in de hond kan plaatsvinden door het gebrek aan homologie met

deze virussen. De promotor van het enige herpesvirus dat beschreven is in de hond (*Canine herpes virus*) vertoont slechts 46% homologie met de HHV-5 promotor.

Gezien het feit dat HHV-5 geen honden infecteert, is de kans dat het virus en het plasmide in dezelfde cel aanwezig zullen zijn verwaarloosbaar klein. In het zeer onwaarschijnlijke geval dat homologe recombinatie zou optreden tussen de HHV-5 sequenties en wildtype HHV-5 aanwezig in de hond, zal dit resulteren in uitwisseling van dezelfde virusonderdelen. 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 pING/Tyrosinase met 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.<sup>5</sup> Hieronder vallen bepaalde bodembacteriën, maar ook enkele humane pathogenen. Daarnaast kunnen enkele soorten DNA opnemen afhankelijk van zogenaamde 'DNA uptake sequences' (DUS). Het vermijden van zogenaamde 'DNA uptake sequences' en het toedienen van het DNA in steriele lichaamsholten, zoals in spieren, zal deze kans op de opname van DNA door bacteriën verkleinen.<sup>5</sup>

In onderhavige aanvraag wordt pING/Tyrosinase transdermaal/intramusculair toegediend. Gezien de wijze van toediening is het pING/Tyrosinase plasmide alleen tijdelijk aanwezig in spiercellen en mogelijk enkele huidcellen op de plaats van injectie. De aanvrager geeft aan dat na vaccinatie wordt gecontroleerd op de aanwezigheid van plasmide oplossing op of rond het dier. Volgens de aanvrager wordt niet-opgenomen, op de huid aanwezige plasmide DNA verwijderd, gedecontamineerd en als biologisch afval behandeld. De COGEM merkt op dat de aanvrager niet aangeeft welke methode hiervoor wordt gehanteerd. De COGEM adviseert de injectieplek met behulp van een desinfectans af te nemen. Hierdoor worden eventueel op de huid aanwezige bacteriën, die in theorie DNA opgenomen kunnen hebben, afgedood.

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 humaan tyrosinase ook een *nptI* gen afkomstig van in het milieu aanwezige *E. coli* bacteriën. *NptI* codeert voor een eiwit dat zorgt voor resistentie tegen de antibiotica kanamycine en neomycine.

De COGEM wijst er op dat kanamycine door de World Health Organisation wordt geclassificeerd als 2<sup>e</sup>-lijns antibioticum voor de behandeling van multidrug-resistente tuberculose. De COGEM heeft in 1998 geadviseerd over de veiligheid van het gebruik van het *nptII* antibioticaresistentiegen in genetisch gemodificeerde planten. *NptII* zorgt, net als *nptI*, voor resistentie tegen de antibiotica kanamycine en neomycine.<sup>13</sup> Mede gebaseerd op het feit dat *nptII* wijdverspreid in de natuur voorkomt, concludeerde de COGEM dat gebruik van dit resistentiegen in planten een verwaarloosbaar klein risico vormde voor het milieu. Dit is in lijn met de mening

van de EFSA.<sup>14</sup> Zoals eerder beschreven is het *nptI* gen afkomstig van in het milieu aanwezige *E. coli* bacteriën. In onderhavige studie levert opname van het plasmide de bacterie geen groeivoordeel op, aangezien behandelde honden geen kanamycine of neomycine krijgen toegediend. De COGEM is gezien het bovenstaande van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is, dat in het hypothetische geval van een opname van het plasmide pING/Tyrosinase door bacteriën, dit een schadelijk effect zou opleveren voor mens of milieu.

### *Monitoring*

Het pING/Tyrosinase wordt middels een biojector2000 systeem transdermaal/intramusculair aan de hond toegediend. Dit toegediende plasmide zou op diverse manieren uitgescheiden kunnen worden en in het milieu terecht kunnen komen. Bijvoorbeeld via bloed, urine of het dagelijkse verlies van hoorncellen of huidschilfers uit de bovenste laag van de huid. Echter, op basis van de wijze van toediening en de eigenschappen van het plasmide (niet-replicatiecompetent, geen transformerende en oncogene eigenschappen), acht de COGEM de kans op shedding verwaarloosbaar klein. In het onwaarschijnlijke geval dat er shedding optreedt, acht de COGEM de kans op risico's voor mens en milieu ten gevolge van deze shedding verwaarloosbaar klein. Daarom ziet zij geen directe aanleiding voor monitoring. Wel kan monitoring nuttige informatie kan opleveren voor het beoordelen van toekomstige aanvragen.

### **Conclusie**

De huidige aanvraag betreft een klinische studie waarin honden met uitgezaaid en uitbehandeld melanoom worden gevaccineerd met het plasmide pING/Tyrosinase. De COGEM is 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 risico's voor mens en milieu, bij de voorgenomen studie en de daarbij voorgenomen veiligheidsmaatregelen, verwaarloosbaar klein.

### **Referenties**

<sup>1</sup> Bergman P.J. *et al* (2003). Long-term survival of dogs with advanced malignant melanoma after DNA vaccination with xenogeneic human tyrosinase: a phase I clinical trial. *Clin Cancer Res* 9: 1284-1290

<sup>2</sup> Bergman PJ *et al* (2006). Development of a xenogeneic DNA vaccine program for canine malignant melanoma at the Animal Medical Center. *Vaccine* 24: 4582 - 4585

<sup>3</sup> Liao JC *et al* (2006) Vaccination with human tyrosinase DNA induces antibody responses in dogs with advanced melanoma. *Cancer Immun* 21;6: 8

<sup>4</sup> Bioject needle-free injection systems. [www.bioject.com/technology.html](http://www.bioject.com/technology.html)

<sup>5</sup> COGEM (2004). Integratie en verspreiding naakt DNA. COGEM advies CGM/041223-02

<sup>6</sup> COGEM (2001). The treatment with the intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia (CLI), a double blind phase III study. COGEM advies CGM 010917-04



- <sup>7</sup> COGEM (2008). Klinische studie naar allovectin-7 in melanoma. COGEM advies CGM/080522-02
- <sup>8</sup> COGEM (2008). Behandeling van kritische lidmaat ischemie met het plasmide NV1FGF. COGEM advies CGM/080729-01
- <sup>9</sup> COGEM (2008). Vaccinatie tegen melanoma door tatoeage met pDERMATT. COGEM advies CGM/080929-06
- <sup>10</sup> Fauquet et al. (2005). Genus Cytomegalovirus. In: Virus taxonomy, Eight report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, San Diego
- <sup>11</sup> Cole J, et al. (1994) Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo. *Mutat. Res.* 304: 33-105
- <sup>12</sup> 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
- <sup>13</sup> COGEM (1998). Standpunt van de COGEM ten aanzien van de toelaatbaarheid van het toepassen van antibioticumresistentiegenen in transgene planten. Advies CGM/980929-06
- <sup>14</sup> European Food Safety Authority (2009). Statement of EFSA on the consolidated presentation of opinions on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants (EFSA-Q-2009-00589 and EFSA-Q-2009-00593). *The EFSA Journal* 1108: 1-8