

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 01 september 2015
KENMERK CGM/150901-01
ONDERWERP Advies: Fase I/II klinische studie met naakt DNA vaccin tegen *Humaan papillomavirus* geïnduceerde (pre)maligniteiten

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van de aanvraag voor een klinische studie getiteld 'Intradermale vaccinatie met naakt DNA coderend voor het fusie-eiwit van de carrier sequentie sig-HELP-kdel en een "shuffled" versie van het humane papillomavirus (HPV)-16 E6 of E7 oncoproteïne voor het induceren van E6 en E7 specifieke T-cel immuniteit in HPV-geïnduceerde (pre)maligniteiten', 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 met naakt DNA. Het naakt DNA in de vorm van plasmiden wordt via tatoeage in de opperhuid ingebracht en coderen onder andere voor een gehusselde versie van het E6 of E7 oncoproteïne van HPV-16. Expressie van deze genen in huidcellen moet leiden tot een afweerreactie tegen HPV-geïnduceerde kankercellen.

Vanwege de aard van de plasmiden en de lokale toediening, is de COGEM van mening dat de kans op integratie van (delen van) het plasmide DNA in het genoom van cellen van de patiënt, evenals de kans op verspreiding naar kiembaancellen, verwaarloosbaar klein is.

In de plasmiden zijn enkele virale sequenties aanwezig. Mede gezien eerdere ervaringen met vergelijkbare plasmiden, is de COGEM van mening dat de kans op recombinatie met een wildtype virus verwaarloosbaar klein is. In het theoretische geval er toch recombinatie optreedt, zal dit niet leiden tot een virus met verhoogde fitness.

In de plasmiden is tevens een antibioticumresistentiegen aanwezig. De COGEM acht de kans dat bacteriën het plasmide DNA zullen opnemen verwaarloosbaar klein. In het theoretische geval dat dit wel gebeurt, zijn de risico's hiervan verwaarloosbaar klein, omdat de plasmiden de bacteriën geen groeivoordeel opleveren en het aanwezige antibioticumresistentiegen algemeen in de natuur voorkomt.

Concluderend is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu van deze klinische studie verwaarloosbaar klein zijn.

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

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Fase I/II klinische studie met naakt DNA vaccin tegen *Humaan papillomavirus* geïnduceerde (pre)maligniteiten

COGEM advies CGM/150901-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke risico's voor mens en milieu van een fase I/II klinische studie met naakt DNA. De aanvrager wil de toxiciteit en effectiviteit van twee plasmiden in patiënten met *Human papillomavirus* (HPV) geïnduceerde (pre)maligniteiten onderzoeken. De plasmiden coderen voor een fusie-eiwit van de carrier sequentie sig-help-kdel en een gehusselde (*shuffled*) versie van het E6 of E7 oncoproteïne van HPV-16. De aanvraag is ingediend door het Nederlands Kanker Instituut (NKI) te Amsterdam.

Beschrijving van plasmiden

De aanvrager wil in deze klinische studie de afweerreactie tegen HPV-geïnduceerde (pre)maligniteiten onderzoeken door tatoeage van twee verschillende DNA plasmiden genaamd pUMVC3-sig-help-E6SH-kdel en pUMVC3-sig-help-E7SH-kdel. Beide plasmiden zijn gebaseerd op hetzelfde uitgangsconstruct pUMVC3. Dit is een vier kilobasen groot plasmide met de *immediate early (IE) promoter* van *Cytomegalovirus* (CMV), de CMV IE 5' UTR, het CMV IE intron A, een *multiple cloning site*, het *rabbit beta-globin polyadenylation signal*, een kanamycine-resistentie gen en de pUC *origin of replication*.

In het geval van het plasmide pUMVC3-sig-help-E6SH-kdel is de sequentie coderend voor het fusie-eiwit sig-help-E6SH-kdel in de *multiple cloning site* van pUMCV3 gekloneerd. Dit fusie-eiwit bestaat uit vier verschillende onderdelen. Het sig-deel bestaat uit een 26 aminozuren groot signaalpeptide afkomstig uit het humane groeihormoon (hGH). Dit peptide dirigeert het fusie-eiwit naar het endoplasmatisch reticulum (ER). Het help-deel bestaat uit drie MHC-II helper epitopen. Het betreft een P30 epitoom afkomstig van het tetanus-toxine fragment, een synthetisch pan HLA-DR epitoom (PADRE) en een NEF epitoom afkomstig uit het *Human immunodeficiency virus* (HIV). Deze drie epitopen zijn bedoeld om de immunogeniciteit van het vaccin te versterken. Het derde onderdeel E6SH omvat verschillende regionen van het E6 eiwit van HPV-16 die op afwijkende (niet-natuurlijke) volgorde achterelkaar zijn gezet. Door de afwijkende volgorde heeft het E6SH de oorspronkelijke functionaliteit van E6 verloren, maar worden wel de epitopen tot expressie gebracht die de specifieke afweerreactie opwekken tegen HPV-geïnduceerde maligniteiten. Het laatste onderdeel van het fusie-eiwit is kdel, een peptide dat slechts vier aminozuren groot is. Dit peptide komt voor in verschillende humane eiwitten en zorgt er voor dat het fusie-eiwit in het ER blijft.

Het tweede plasmide pUMVC3-sig-help-E7SH-kdel bevat in plaats van een gehusselde variant van HPV-16 E6 de coderende sequentie voor een gehusselde variant van HPV-16 E7. Afgezien van dit verschil bevat pUMVC3-sig-help-E7SH-kdel dezelfde elementen als het hierboven beschreven plasmide pUMVC3-sig-help-E6SH-kdel.

Opzet van de studie

In de studie wil de aanvrager de toxiciteit en effectiviteit van beide DNA plasmiden als vaccin bestuderen in patiënten met HPV-geïnduceerde (pre)maligniteiten. Hiervoor wordt het DNA in de opperhuid van de bovenarm of been van de proefpersonen getatoeëerd. De aanvrager wil twee verschillende vaccinatieschema's volgen. In het eerste schema worden de proefpersonen drie keer binnen één week gevaccineerd en dit wordt vier weken later herhaald. In het tweede schema worden de proefpersonen in totaal viermaal gevaccineerd met tussenpozen van twee weken. Er zal maximaal 5 mg plasmide DNA per keer worden toegediend aan maximaal 100 proefpersonen.

Eerder COGEM advies

De afgelopen jaren heeft de COGEM meerdere malen geadviseerd over de mogelijke vereenvoudiging van de vergunningverlening voor klinische studies met naakt DNA.^{1,2,3} Door het hanteren van criteria waaraan de vector moet voldoen en het hanteren van enkele voorschriften bij de uitvoering van de studie, is volgens de COGEM de kans op verspreiding van naakt DNA via micro-organismen verwaarloosbaar klein.^{1,2}

De gestelde criteria zijn als volgt:

- het naakt DNA bevat geen sequenties die afkomstig zijn, of afgeleid zijn, van een voor eukaryoten infectieus virus, met uitzondering van:
 - de *Human herpesvirus 5* promotor (ook bekend als de CMV promotor)
 - de *Rous sarcoma virus* promotor
 - een polyadenyleringssignaal
 - een nucleaire 'targeting sequentie.
- Het naakt DNA bevat geen sequenties die bacteriën resistentie bieden tegen algemeen gebruikte antibiotica, met uitzondering van een *nptII* gen.

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.

Indien niet aan de beschreven criteria en voorschriften kan worden voldaan, heeft de COGEM geadviseerd de normale vergunningsverleningsprocedure te blijven volgen met de daarbij behorende casusgewijze milieurisicoanalyse.

De COGEM heeft twee keer eerder geadviseerd over een klinische studie waarbij naakt DNA door middel van tatoeage aan proefpersonen werd toegediend. In 2008 heeft de COGEM positief geadviseerd over de tatoeage van melanoompatiënten met pDERMATT.⁴ Dit plasmide codeert voor een fusie-eiwit van het tetanus toxine fragment C en een klein fragment van het melanoomgeassocieerde antigeen MART-1. In 2013 heeft de COGEM geadviseerd over een klinische studie waarin het plasmide pVAX1-TTFC-E7SH middels tatoeage aan patiënten met plaveiselcarcinoom

werd toegediend.⁵ Ook dit plasmide codeerde voor een fusie-eiwit bestaande uit het domein 1 van het tetanus toxine fragment C en een gehusselde ('*shuffled*') versie van het HPV-16 E7 oncoproteïne. Om de kans te minimaliseren dat bacteriën het plasmide of plasmidesequenties opnemen en zich verspreiden in het milieu, adviseerde de COGEM de toedieningsplaats voorafgaand aan de tatoeage te desinfecteren en achteraf te reinigen. Met deze aanvullende voorschriften achtte de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de voorgenomen klinische studie risico's opleverde voor mens en milieu.

Milieurisicobeoordeling van 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

In 2012 heeft de COGEM geadviseerd om klinische studies met plasmiden voor een vereenvoudigde vergunning in aanmerking te laten komen als de betreffende plasmiden geen elementen bevatten die mogelijke milieurisico's inhouden of als er in eerdere klinische studies met deze plasmiden geen milieurisico's aan het licht zijn gekomen.² In dit advies is tevens inzicht geboden in elementen die wel en niet in deze plasmiden aanwezig mogen zijn.

Gezien de aanwezigheid van verschillende virale sequenties en sequenties die mogelijk transformerende eigenschappen kunnen hebben, kan de COGEM een mogelijk milieurisico ten gevolge van het gebruik van de plasmiden pUMVC3-sig-help-E6SH-kdel en pUMVC3-sig-help-E7SH-kdel op voorhand niet uitsluiten.

Moleculaire karakterisering

Bij de productie van de plasmiden wordt de nucleotidesequentie van het aanwezige plasmide in de Master Cell Bank, in de geproduceerde plasmidenbatch en in het uiteindelijke product bepaald en gecontroleerd. De aanvrager geeft als voorwaarde voor vrijgifte van het te testen product dat de nucleotidesequentie op alle drie momenten geheel overeen dient te komen met de theoretische sequentie.

Transformerende eigenschappen van de HPV-16 E6 en E7 eiwitten

De continue expressie van de virale oncogenen E6 en E7 in geïnfecteerde cellen kan leiden tot het ontstaan van cellen met een kwaadaardig fenotype. De aanvrager heeft getracht de transformerende functie van HPV-16 E6 en E7 uit te schakelen door de sequenties van beide eiwitten te husselen. Zoals aangegeven komt het plasmide hoofdzakelijk in keratinocyten tot expressie.¹² In een *in vitro*

assay is aangetoond dat de eiwitten geen transformerende eigenschappen meer hebben in NIH 3T3 fibroblasten en humane voorhuid keratinocyten.⁶ In vergelijkbare studies met gehusselde E7 sequenties werden dezelfde resultaten gevonden.^{7,8} De COGEM is daarom van mening dat de gehusselde E6 en E7 eiwitten geen transformerende eigenschappen hebben.

Systemische verspreiding in patiënt

In onderhavige aanvraag worden de plasmiden pUMVC3-sig-help-E6SH-kdel en pUMVC3-sig-help-E7SH-kdel met behulp van een tatoeagetechniek in de bovenste lagen van de huid gebracht. In dit deel van de huid bevinden zich geen bloedvaten. Hierdoor 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 derhalve zeer klein dat het DNA de bloedbaan zal bereiken.

De COGEM heeft geen reden om aan te nemen dat de halfwaardetijd van genoemde plasmiden 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 pUMVC3-sig-help-E6SH-kdel en pUMVC3-sig-help-E7SH-kdel in humaan bloed enkele minuten zal bedragen.⁹

In licht van bovengenoemde eigenschappen acht de COGEM de kans op systemische verspreiding van de plasmiden in de patiënt 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. In de gebruikte plasmiden is de coderende sequentie van een signaalpeptide afkomstig uit het humane groeihormoon (hGH) aanwezig. Indien er homologe recombinatie tussen de hGH sequentie uit het plasmide en de hGH sequentie in het genoom van humane cellen plaatsvindt, zal dit hooguit leiden tot uitwisseling van twee identieke DNA sequenties.

Gebaseerd op eerdere overwegingen is de COGEM van mening dat de willekeurige integratiefrequentie van pUMVC3-sig-help-E6SH-kdel en pUMVC3-sig-help-E7SH-kdel in het genoom van somatische cellen lager zal zijn dan de frequentie van spontane gen-inactiverende mutaties (2×10^{-6} spontane mutaties per gen).¹⁰ Hierbij baseert de COGEM zich op de gegevens van een studie waarin spierweefsel door middel van electroporatie werd getransduceerd met naakt DNA.¹¹ Ook in het geval van deze relatief efficiënte transductiemethode bleef de integratiefrequentie van het naakt DNA onder de *baseline* van spontane gen-inactiverende mutaties.

Op basis van bovenstaande overwegingen is de COGEM van mening dat de kans op integratie van (delen) van de plasmiden 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.^{2,3} 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 pUMVC3-sig-help-E6SH-kdel en pUMVC3-sig-help-E7SH-kdel 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 dergelijke nieuwe virussen is mogelijk, indien er recombinatie optreedt tussen het virale genoom en homologe sequenties in het naakt DNA. Hiervoor is het van belang dat het plasmide en de virussequenties beiden in dezelfde cel aanwezig zijn. In de plasmiden pUMVC3-sig-help-E6SH-kdel en pUMVC3-sig-help-E7SH-kdel zijn drie elementen uit virussen afkomstig; de *immediate early promoter* van CMV, een NEF epitoom afkomstig uit HIV en de gehusselde versie van het HPV-16 E6 of E7 gen.

De CMV promotor kan in theorie de kans op een homologe recombinatie tussen het plasmide en het CMV virus 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.^{1,2}

De gebruikte HIV sequentie is slechts 39 basenparen groot. Eventuele uitwisseling van deze korte sequentie via homologe recombinatie zal niet leiden tot insertie van nieuwe sequenties in het betreffende wildtype virus.

De gehusselde versie van het HPV-16 E6 gen is gebaseerd op vijf fragmenten (a tot e) die samen de wildtype HPV-16 E6 sequentie vormen. De gehusselde versie van het HPV-16 E7 gen is gebaseerd op vier fragmenten (a tot d) die samen de wildtype HPV-16 E7 sequentie vormen. De fragmenten zijn in de volgorde a, d, c, b, e (E6) en a, d, c, b (E7) in het gehusselde gen gekloneerd. De fragmenten zijn zo gekozen, dat sequenties van de bindingsmotieven onderbroken zijn. Voorafgaand aan de sequenties is een Kozak-motief toegevoegd om de translatie van het fusie-eiwit te verbeteren. Aan het einde van de gehusselde E6 en E7 sequenties zijn de aminozuursequenties van de E6 en E7 epitopen toegevoegd (tot 18 aminozuren groot) voor de gewenste immuunrespons. Aangezien in de gehusselde E6 en E7 sequenties 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 E6 en E7 gen met een wildtype E6 of E7 genoom zal 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-16 E6 of E7 varianten in de natuur aangetroffen, die een andere volgorde hebben dan het wildtype E6 of E7. In het onwaarschijnlijke geval dat homologe recombinatie optreedt, verwacht de COGEM niet dat dit tot een verhoogde fitness zal leiden.

De aanvrager wil de plasmiden pUMVC3-sig-help-E6SH-kdel en pUMVC3-sig-help-E7SH-kdel met behulp van tatoeage lokaal in de opperhuid brengen. In deze huidlaag wordt het plasmide

hoofdzakelijk opgenomen en tot expressie gebracht door keratinocyten.¹² Humaan CMV, HPV-16 en HIV komen echter niet in de huid voor en infecteren geen keratinocyten. Met het oog op het gastheerbereik van de drie 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 het risico van verspreiding als gevolg van recombinatie van de plasmiden pUMVC3-sig-help-E6SH-kdel en pUMVC3-sig-help-E7SH-kdel met het genoom van 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 mogelijkwerwijs 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.¹³ 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 worden pUMVC3-sig-help-E6SH-kdel en pUMVC3-sig-help-E7SH-kdel op de huid aangebracht, alvorens het in de bovenste lagen van de huid wordt getatoeëerd. De aanvrager geeft aan dat de huid eerst wordt onthaard met behulp van een ontharingcrème en gedesinfecteerd met een op alcohol gebaseerd desinfectans. Na toediening moet de patiënt wachten in de behandelkamer totdat eventueel aanwezig vocht op de huid volledig is ingedroogd om de kans op *shedding* te minimaliseren. Gezien de goed gedefinieerde lokale toediening is de COGEM van mening dat het DNA zich zal beperken tot bovenste lagen van de huid.

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.¹⁴ De COGEM acht de kans 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, omdat de micro-organismen door het desinfectans worden afgedood.

Op basis van bovenstaande gegevens 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 aminoglycoside-3'-O-phosphotransferase (*aph* 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 COGEM is van mening dat de opname van de plasmiden door bacteriën geen groeivoordeel zal opleveren, omdat de patiënten geen kanamycine en neomycine krijgen toegediend.

Op basis van bovenstaande overweging is de COGEM van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is dat er buiten het lichaam door opname van pUMVC3-sig-help-E6SH-kdel en pUMVC3-sig-help-E7SH-kdel een gg-bacterie ontstaat die in staat is zich in het milieu te handhaven, te verspreiden en schade aan te richten.

Advies

De huidige aanvraag betreft een klinische studie waarbij patiënten met naakt DNA worden gevaccineerd om de afweerreactie tegen HPV-geïnduceerde (pre)maligniteiten te onderzoeken. De gebruikte plasmiden coderen voor een fusie-eiwit van de carrier sequentie sig-help-kdel en een gehusselde versie van het E6 of E7 oncoproteïne van HPV-16.

Door de opzet van de studie en de eigenschappen van de te gebruiken plasmiden, is de COGEM van mening dat de kans op integratie van (delen van) het plasmide DNA in somatische cellen of kiembaancellen verwaarloosbaar klein is. Tevens acht de COGEM de kans dat virussen of bacteriën de plasmiden of plasmidesequenties opnemen en zich verspreiden in het milieu verwaarloosbaar klein. Verder acht de COGEM de risico's van *shedding* voor mens en milieu van verwaarloosbaar klein.

Concluderend acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen fase I/II klinische studie met pUMVC3-sig-help-E6SH-kdel en pUMVC3-sig-help-E7SH-kdel verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. COGEM (2012). Toepassing virale sequenties bij klinische studies met naakt DNA ten behoeve van vereenvoudigde vergunningverlening. COGEM advies CGM/120919-01
2. COGEM (2012). Vereenvoudiging procedure voor verlening vergunningen van klinische studies met naakt DNA. COGEM advies CGM/120927-01
3. COGEM (2010). Vereenvoudigde procedure voor deel van klinische gentherapie studies met naakt DNA. COGEM advies CGM/101026-06
4. COGEM (2008). Vaccinatie tegen melanoma door tatoeage met pDERMATT. COGEM advies CGM/080929-06
5. COGEM (2013). Klinische studie met naakt DNA tegen plaveiselcarcinoom veroorzaakt door Human papillomavirus. COGEM advies CGM/130603-04
6. Henken FE *et al.* (2012). Preclinical safety evaluation of DNA vaccines encoding modified HPV16 E6 and E7. Vaccine 13: 4259-4266
7. 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

8. 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
9. COGEM (2008). Behandeling van CLI met het plasmide NV1FGF. COGEM advies CGM/080729-01
10. Cole J *et al.* (1994). Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo. *Mutat Res* 304: 33-105
11. 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
12. Berg van den JH *et al.* (2009). Optimization of intradermal vaccination by DNA tattooing in human skin. *Hum Gene Ther* 20:181-189
13. COGEM (2004). Integratie en verspreiding naakt DNA. COGEM advies CGM/041223-02
14. Koster MI (2009). Making an epidermis. *Ann N Y Acad Sci* 1170: 7–10