

De minister van Volkshuisvesting,
Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 22 mei 2008
KENMERK CGM/080522-02
ONDERWERP Advies: klinische studie naar Allovectin-7 in melanoma

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van de adviesvraag betreffende een fase III klinische studie naar de behandeling van huidtumoren met Allovectin-7, die het Universitair Medisch Centrum Groningen en het Academisch Ziekenhuis te Leiden willen uitvoeren, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een klinische studie waarin huidtumoren worden behandeld met het middel Allovectin-7. Het te onderzoeken preparaat bestaat uit gezuiverd plasmide DNA (VCL-1005) gemengd met een synthetisch lipide (DMRIE-DOPE). Het plasmide VCL-1005 bevat genetische informatie die codeert voor een zogenaamd 'Major Histocompatibility' klasse I (MHC-I) molecuul. Dit molecuul bevindt zich op het celoppervlak en stelt het immuunsysteem in staat de aard van de cellen te controleren. In tumoren is deze controle via MHC-I moleculen veelal verstoord, waardoor de tumorcellen niet herkend worden als gevaarlijk. Door injectie van Allovectin-7 in de tumor, zal het plasmide met behulp van het lipide in de tumorcellen worden geloodst, en daar tot expressie worden gebracht. Hiermee beoogt de aanvrager een immununreactie tegen de tumorcellen op te wekken, zodat de huidtumoren door het eigen afweersysteem zullen worden herkend en opgeruimd.

Door de aard van het plasmide en de lokale injectie hiervan in de tumor is de COGEM van mening dat de kans op integratie van het plasmide in het genoom van somatische cellen en van kiembaancellen verwaarloosbaar klein is. Het VCL-1005 bevat virale sequenties van het *Rous sarcoma virus* en het muizen encephalomyocarditis virus. Aangezien deze virussen niet bij de mens voorkomen en het plasmide lokaal wordt toegediend in de tumor, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat virus en plasmide DNA in dezelfde cellen aanwezig zullen zijn. Een recombinatie van virus met plasmide sequenties acht zij derhalve verwaarloosbaar klein. Door de lokale toediening van het plasmide in de tumor is de COGEM tevens van mening dat de kans dat het plasmide door bacteriën opgenomen zal worden en de resulterende genetisch gemodificeerde bacteriën zich in het milieu zullen verspreiden verwaarloosbaar klein is. De COGEM is voor onderhavige klinische studie daarom van mening dat de kans op risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein is.

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, stylized 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

Klinische studie naar Allovectin-7 in melanoma

COGEM advies CGM/080522-02

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke risico's voor mens en milieu van een fase III klinische studie waarin patiënten met terugkerende uitgezaaide huidtumoren worden behandeld met Allovectin-7. Dit preparaat is een mengsel van plasmide DNA en lipiden.

Een belangrijk aspect voor de ontwikkeling van tumoren wordt gevormd door het feit dat de tumorcellen niet opgeruimd worden door het eigen immuunsysteem. Een bekende manier om een mogelijke immunreactie te omzeilen is de vermindering van de expressie van de 'Major Histocompatibility' (MHC) klasse I moleculen. Deze moleculen bevinden zich op het celoppervlak en presenteren mogelijke antigenen aan het immuunsysteem. Hierdoor is het immuunsysteem in staat de aard van deze cellen te controleren. Door de afwezigheid van deze MHC-I moleculen kan de betreffende cel door het immuunsysteem echter niet worden herkend als potentieel gevaarlijk en niet worden vernietigd.

De onderliggende vergunningaanvraag voor een fase III klinische studie is gericht op het activeren van het immuunsysteem, waardoor een immunreactie kan worden opgewekt tegen de tumorcellen. De aanvrager wil hiervoor het preparaat Allovectin-7 injecteren in de tumoren. Dit preparaat bestaat uit het plasmide VCL-1005 gemengd met een synthetisch lipide (DMRIE-DOPE). Het plasmide VCL-1005 bevat de genen voor HLA-B7 en β -2 microglobuline die samen een MHC klasse I molecuul vormen. Het HLA-B7 gen dat codeert voor de zogenaamde zware keten van het MHC-I molecuul is van humane oorsprong terwijl het β 2 microglobuline gen dat codeert voor de zogenaamde lichte keten afkomstig is van de chimpansee. Door middel van DMRIE-DOPE wordt VCL-1005 na een intratumorale injectie van Allovectin-7 de tumorcellen ingeloodst. Hierdoor zal het MHC-I molecuul in de tumorcellen tot expressie worden gebracht en op het celoppervlak worden geëxposeerd, alwaar het tumor antigenen zal presenteren aan het immuunsysteem. Hiermee beoogt de aanvrager een immunrespons tegen de tumorcellen op te wekken, waardoor de huidtumoren door het eigen immuunsysteem opgeruimd kunnen worden. Het HLA-B7 komt in beperkte mate tot expressie in de bevolking. Het gebruik van HLA-B7 in deze klinische studie kan in het HLA-B7 negatieve deel van de bevolking leiden tot een zogenaamde allogene immunrespons, waardoor het anti-tumor effect verder versterkt kan worden (1, 2). Daarnaast worden door het gebruik van het lipide DMRIE/DOPE immunregulatorische cytokinen uitgescheiden, die de immunrespons tegen de tumor nog verder zullen versterken (3).

De aanvrager geeft aan dat Allovectin-7 in de Verenigde Staten al veelvuldig is gebruikt in klinische studies. Er hebben inmiddels meer dan 700 kankerpatiënten deelgenomen aan een

klinische studie met Allovectin-7. Uit deze studies kan worden afgeleid dat de behandeling met Allovectin-7 resulteert in zowel een locale als systemische respons. Bovendien wordt het middel goed verdragen en kan het veilig worden toegediend aan een brede groep van patiënten.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft tweemaal eerder geadviseerd over het gebruik van plasmide DNA in een klinische studie. De eerste maal betrof een genterapieprotocol waarin zogenaamd naakt DNA werd gebruikt voor de aanmaak van de groeifactor VEGF (4). Gezien het feit dat genoemd DNA niet autonoom kon repliceren of integreren in het genoom had de COGEM tegen deze aanvraag geen bezwaar uit het oogpunt van de veiligheid van mens en milieu.

Het tweede advies betrof een algemeen advies over mogelijke integratie en verspreiding van naakt DNA (5). 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 zeer laag. De COGEM achtte de risico's die verbonden zijn aan de toediening van naakt DNA derhalve niet groter 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 was zij van mening dat de kans op integratie 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 over het algemeen klein acht aangezien er geen uitscheiding van het naakte DNA werd waargenomen. Zij plaatste hier een aantal kanttekeningen bij. De verspreidingsrisico's zullen toenemen indien het DNA sequenties bevat waardoor het naakt DNA replicatiecompetent wordt in zoogdiercellen. Bovendien kan de kans op integratie en verspreiding van naakt DNA ook toenemen indien het DNA sequenties bevat die een interactie geven met virussen of virus sequenties. 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 ggo's ontstaan die zich in het milieu kunnen verspreiden. Het vermijden van zogenaamde 'DNA uptake sequences' en het toedienen van het DNA in steriele lichaamsdelen zal deze kans op de opname van DNA door bacteriën verkleinen. Indien het effect van de modificatie geen overlevingsvoordeel voor de bacterie oplevert en resistentie genen vermeden worden, zal het verspreidingsrisico verwaarloosbaar klein zijn. Op basis van bovenstaande overwegingen op gebied van verspreidingsrisico's heeft de COGEM een aantal criteria opgesteld, waarop het gebruik van naakt DNA ingedeeld kan worden in een drietal risicogroepen.

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. In lijn met haar eerdere advies uit 2004 (5) heeft de COGEM zich in haar milieurisicoanalyse daarom gericht op de mogelijke risico's van deze gebeurtenissen.

Elementen van het plasmide VCL-1005

In onderhavige studie wordt gebruik gemaakt van het plasmide VCL-1005. Dit plasmide is een dubbelstrengs DNA molecuul van 4965 basenparen en is afgeleid van het algemeen toegepaste plasmide pBR322. VCL-1005 bevat een fragment van 946 baseparen van pBR322, waarop zich de zogenaamde 'Col E1 ori' bevindt. Deze Col E1 ori is van belang bij de initiatie van DNA replicatie, waardoor het plasmide in *Enterobacteriaceae* vermenigvuldigd kan worden.

Het plasmide codeert voor een drietal genproducten. De eerste twee worden gevormd door de genen voor HLA-B7 en β 2-microglobuline. De expressie van HLA-B7 en β 2-microglobuline staat onder controle van de zogenaamde RSV promotor, een CITE sequentie en de BGH terminator. De RSV promotor is de 3' Long terminal repeat (LTR) van het *Rous sarcoma virus* (RSV). Deze promotor zorgt voor de productie van één lang boodschapper RNA met zowel de HLA-B7 als de β 2-microglobuline coderende sequenties. Beide sequenties worden gescheiden door een zogenaamde 'CITE' sequentie die afkomstig is van het *Murine encephalomyocarditis virus*. Deze Cap-Independent Translational Enhancer (CITE) sequentie verbetert de translatie van het β 2-microglobuline. De BGH terminator is een regulatoire sequentie afkomstig van het zogenaamde 'bovine growth hormone' gen. Deze terminator zorgt onder andere voor de polyadenylering van het boodschapper RNA. Naast HLA-B7 en β 2-microglobuline bevat VCL-1005 ook een gen dat codeert voor het zogenaamde Npt I eiwit. Dit eiwit zorgt voor resistentie tegen de antibiotica kanamycine en neomycine. Het *npt I* gen is afkomstig van het bacteriële transposon Tn903. De initiatie en terminatie van de transcriptie van het *npt I* gen staat onder controle van flankerende bacteriële regulatoire sequenties. Het *npt I* gen in VCL-1005 bevat echter geen sequenties die betrokken zijn bij bacteriële transpositie. Mobilisatie van dit gen door transpositie is hierdoor niet mogelijk.

Overwegingen en advies

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 haar algemene advies over naakt DNA concludeert de COGEM op basis van de aanwezige literatuurgegevens dat bij toediening aan mens of dier, integratie van naakt DNA in het genoom plaats kan vinden (5).

Integratie is echter alleen aangetoond indien er gebruik werd gemaakt van electroporatie om een efficiënte opname van het plasmide DNA in de cel te bewerkstelligen (6). In studies waarin andere, minder efficiënte transductiemethoden zoals die waarbij gebruik gemaakt wordt van cationische lipiden, kon integratie niet worden aangetoond (7-13).

In onderhavige aanvraag wordt het plasmide VCL-1005 lokaal in de tumor geïnjecteerd om de opname van het plasmide zoveel als mogelijk tot de tumorcellen te beperken. De aanvrager geeft aan dat in twee afzonderlijke klinische studies geen plasmide DNA in het bloed van de behandelde patiënten is aangetroffen (2, 14). Vergelijkbaar met de studie in deze aanvraag werd in beide studies een mix van DMRIE-DOPE met VCL-1005 of een voorganger hiervan intratumoraal geïnjecteerd. Er werden op verscheidene tijdstippen na injectie bloedmonsters genomen, maar in geen van de monsters kon het DNA van het plasmide aangetoond worden. Bovendien wordt door de aanvrager aangegeven dat er verscheidene weefsels onderzocht zijn van een patiënt die behandeld is met Allovectin-7. In geen van de weefsels werd er VCL-1005 DNA aangetroffen.

Op basis van deze gegevens en de pre-klinische data over de halfwaardetijd van Allovectin-7 in het bloed (<5 min.) (15) acht de COGEM de kans dat er buiten de tumorcellen nog andere cellen getransduceerd worden erg klein. Indien de injectie onverhoopt buiten de tumorarea plaatsvindt, zal de transductie van somatische cellen toenemen. In het slechtste geval leidt dit tot het ontstaan van nieuwe tumorcellen. Deze cellen zullen door expressie van de MHC-I moleculen vroegtijdig worden herkend en opgeruimd. Ook als dit niet leidt tot het ontstaan van tumorcellen zal er door de expressie van het HLA-B7 gen hoogst waarschijnlijk een allogeen immuunreactie ontstaan tegen de cellen die het plasmide DNA hebben opgenomen. Dit zal in het HLA-B7 negatieve deel van de bevolking leiden tot een actieve verwijdering van iedere cel die het plasmide heeft opgenomen en tot expressie brengt.

Door de sequenties van HLA-B7 en β -2 microglobuline vertoont het plasmide een zeker mate van homologie met het genoom van humane cellen. De integratie frequentie zal als gevolg van homologe recombinatie tussen deze sequentiedomeinen iets toenemen. Ondanks deze homologie is de COGEM van mening dat de integratie frequentie van VCL-1005 in het genoom van somatische cellen lager zal zijn dan de frequentie van spontane gen-inactiverende mutaties (2×10^{-6} spontane mutaties per gen) (5,16). Hierbij baseert de COGEM zich op de gegevens van een studie waarin spierweefsel door middel van electroporatie werd getransduceerd met naakt DNA (6). Ook in het geval van deze relatief efficiënte transductie methode 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 het verspreidingsrisico van het VCL-1005 plasmide als gevolg van integratie in somatische cellen verwaarloosbaar klein is.

Integratie in kiembaancellen

Transductie van kiembaancellen en de daaropvolgende mogelijke integratie van het plasmide VCL-1005 in het genoom van deze cellen kan leiden tot verticale transmissie, waardoor

nakomelingen genetisch gemodificeerd zijn. Verticale transmissie van naakt DNA als gevolg van integratie van kiembaancellen is in de studies die dit onderzocht hebben tot nu toe niet waargenomen (11, 13, 17, 18). In haar algemene advies geeft de COGEM op basis van deze gegevens 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 zwangere mensen (5).

Zoals door de aanvrager is aangegeven, wordt Allovectin-7 intratumoraal geïnjecteerd. Alvorens er sprake kan zijn van een mogelijke transductie van de kiembaancellen dient het plasmide DNA met het bloed naar deze cellen getransporteerd te worden. De aanwezigheid van plasmide DNA in het bloed is onderzocht in twee aparte klinische studies. In deze studies werd VCL-1005 of een vergelijkbaar plasmide in combinatie met DMRIE-DOPE intratumoraal geïnjecteerd (2, 14). In geen van de onderzochte bloedmonsters kon echter plasmide DNA worden aangetoond. Zelfs een bloedmonster dat 5 minuten na injectie van 0,3 mg VCL-1005 werd afgenomen, testte negatief op plasmide DNA.

Op basis van deze gegevens en haar eerdere overweging is de COGEM van mening dat de kans op verticale transmissie van VCL-1005 sequenties 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 een virus, waardoor infectieuze virussen kunnen 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 VCL-1005 bevinden zich twee domeinen die afkomstig zijn van virussen. Dit zijn de zogenaamde LTR van het RSV en de zogenaamde CITE van het muizen encephalomyocarditis virus. Beide domeinen zouden in theorie de kans op een homologe recombinatie tussen het plasmide en het oorspronkelijke virus kunnen bevorderen.

Zoals wordt aangegeven door de aanvrager is het RSV een aviair retrovirus dat van nature kippen infecteert (19). Mensen worden over het algemeen niet geïnfecteerd door RSV doordat de virusdeeltjes in het bloed worden afgebroken door het zogenaamde complement component van het humane afweersysteem (20, 21). Gezien het aviaire gastheerbereik van RSV en het feit dat Allovectin-7 lokaal in de tumor zal worden toegediend, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat beide sequenties in dezelfde cel aanwezig zullen zijn.

Het muizen encephalomyocarditis virus behoort tot de familie van de picornavirussen. Picornavirussen infecteren over het algemeen het maagdarmkanaal en de luchtwegen (22). Ratten en muizen zijn de natuurlijke gastheren van het encephalomyocarditis virus, maar varkens worden ook veelvuldig geïnfecteerd (23). Een infectie van mensen met dit virus wordt nauwelijks waargenomen (24). Met het oog op bovenstaande eigenschappen van het encephalomyocarditis virus en de lokale toediening van Allovectin-7 in de tumor is de

COGEM van mening dat de kans dat dit virus en het plasmide in dezelfde cel aanwezig zijn verwaarloosbaar klein is.

Aangezien het plasmide DNA niet infectieus is of in staat is zich te vermenigvuldigen in zoogdieren is de COGEM bovendien van mening dat ongewilde introductie van Allovectin-7 in het milieu niet zal leiden tot verspreiding naar of binnen soorten die de natuurlijke gastheren zijn van het RSV of encephalomyocarditis virus.

Gezien bovenstaande overwegingen acht de COGEM de kans op verspreidingsrisico's als gevolg van recombinatie van het plasmide VCL-1005 met het genoom van een virus verwaarloosbaar klein.

Opname en verspreiding door micro-organismen

Zoals de COGEM aangaf in een eerder advies, is slechts een veertigtal bacteriesoorten in staat om effectief DNA op te nemen uit de omgeving (5). Hieronder vallen bepaalde bodembacteriën, maar ook enkele humane pathogenen. De opname van recombinant DNA zoals het plasmide VCL-1005, leidt tot het ontstaan van ggo's die zich mogelijk in het milieu kunnen verspreiden. Bovengenoemde opname kan zowel plaatsvinden binnen het lichaam als ook buiten het lichaam als gevolg van shedding of een andere wijze van onbedoelde introductie in het milieu.

In onderhavige aanvraag wordt Allovectin-7 in de steriele omgeving van de tumor geïnjecteerd. Hierdoor acht de COGEM de kans dat het plasmide in de tumor door bacteriën opgenomen kan worden nihil. 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. Met uitzondering van de huid lijkt het niet aannemelijk dat het plasmide DNA via een intratumorale injectie op deze plaatsen terecht zal komen. (2,14). Bovendien bezorgt de opname van het plasmide de bacterie geen groeivoordeel, aangezien de patiënt geen kanamycine of neomycine krijgt toegediend.

De kans dat het plasmide op de huid of anderszins buiten het lichaam in contact komt met bacteriën die het plasmide ook daadwerkelijk opnemen, acht de COGEM uitermate klein. Hierbij merkt de COGEM op dat indien de huid zoals gebruikelijk op de plaats van injectie gedesinfecteerd wordt, de kans verwaarloosbaar klein is dat bacteriën tijdens de toediening in contact komen met het plasmide. Bovendien wordt replicatie van VCL-1005 via de Col E1 *ori* slechts gefaciliteerd binnen bacteriën die behoren tot de familie van de *Enterobacteriaceae*. De COGEM is daarom van mening dat de kans dat er buiten het lichaam door opname van VCL-1005 in een bacterie een ggo ontstaat die in staat is zich in het milieu te handhaven en te verspreiden verwaarloosbaar klein is.

Gezien bovenstaande overwegingen is de COGEM van mening dat de verspreidingsrisico's als gevolg van opname van Allovectin-7 door micro-organismen verwaarloosbaar klein zijn.

Monitoringplan

De aanvrager geeft aan dat er geen monitoring uitgevoerd zal worden. Op basis van de beschikbare shedding data van vergelijkbare studies acht de COGEM de kans dat er in deze studie door de behandelde patiënten DNA uitgescheiden zal worden verwaarloosbaar klein. Bovendien is zij van mening dat in het hypothetische geval van shedding de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zullen zijn. Gezien de verwaarloosbaar kleine kans op verspreidingsrisico's, ziet de COGEM geen directe aanleiding voor monitoring.

Conclusie

De huidige aanvraag betreft een klinische studie naar de behandeling van melanoma huidtumoren met Allovectin-7. Het functionele bestanddeel van dit middel wordt gevormd door het plasmide VCL-1005 dat zorgt voor de expressie van MHC klasse-I moleculen in de tumorcellen waardoor een immuunreactie tegen de tumor wordt opgewekt.

Allovectin-7 wordt lokaal in de tumor toegediend, waardoor hoofdzakelijk tumorcellen worden getransduceerd. Bovendien is er met de toegepaste transductiemethode niet eerder integratie van plasmide DNA in cellen aangetoond. De COGEM is daarom 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 kans verwaarloosbaar klein dat de beschreven fase 3 klinische studie met Allovectin-7 risico's oplevert voor mens en milieu.

Referenties

1. Stopeck AT *et al.* (1997) Phase I study of direct gene transfer of an allogeneic histocompatibility antigen, HLA-B7, in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **15**: 341-349
2. Nabel GJ, *et al.* (1993) Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity and lack of toxicity in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 11307-11
3. Yew NS, *et al.* (2005) Toxicity of cationic lipid-DNA complexes. *Adv. Genet.* **53**: 189-214
4. COGEM (1999) Adviezen BGGO 99/10 en BGGO 99/12. CGM/990927-01
5. COGEM (2004) Advies 'Integratie en verspreiding naakt DNA.' CGM/041223-02
6. 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
7. Nichols WW, *et al.* (1995) Potential DNA vaccine integration into host genome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **772**: 30-39
8. Ledwith BJ, *et al.* (2000) Plasmid DNA vaccines :investigation of integration into host cellular DNA following intramuscular injection in mice. *Intervirology* **43**: 258-272
9. Henke A. (2002) DNA immunization: a new chance in vaccine research? *Med. Microbiol.*

Immunol. **191**: 187-190

10. Kesis TD, *et al.* (1996) Expression of HPV16 E6 or E7 increases integration of foreign DNA. *Oncogene* **13**: 427-431.
11. Manam S *et al.* (2000) Plasmid DNA vaccines: tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. *Intervirology* **43**: 273-281
12. Kannelos T, *et al.* (1999) The safety and longevity of DNA vaccines for fish. *Immunology* **96**: 307-313
13. Kang KK, *et al.* (2003) Safety evaluation of GX-12, a new HIV therapeutic vaccine: investigation of integration into the host genome and expression in the reproductive organs. *Intervirology* **46**: 270-276.
14. Nabel GJ, *et al.* (1996) Immune response in human melanoma after transfer of an allogeneic class I major histocompatibility complex gene with DNA-liposome complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 15388-93
15. Lew D, *et al.* (1995) Cancer gene therapy using plasmid DNA: pharmacokinetic study of DNA following injection in mice. *Hum. Gene Ther.* **6**: 553-564
16. Cole J, *et al.* (1994) Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo. *Mutat. Res.* 304: 33-105
17. Doerfler W, *et al.* (2001) Foreign DNA integration-perturbations of the genome-oncogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **945**: 276-288
18. Parker SE, *et al.* (1999) Plasmid DNA malaria vaccine: tissue distribution and safety studies in mice and rabbits. *Hum. Gene Ther.* **10**: 741-758
19. Bova-Hill C, *et al.* (1991) Genetic analysis of the Rous sarcoma subgroup D env gene: mammal tropism correlates with temperature sensitivity of gp85. *J. Virol.* **65**: 2073-2080
20. Welsh RM Jr., *et al.* (1975) Human serum lyses RNA tumour viruses. *Nature* **257**: 612-614
21. Linial M, *et al.* (2001) Other human and primate retroviruses. In: *Fields virology* 2123-2139
22. Flint SJ, *et al. (eds)* (2004) Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses. **appendix B**: 863-864
23. LaRue R, *et al.* (2003) A wild-type porcine encephalomyocarditis virus containing a short poly(C) tract is pathogenic to mice, pigs and cynomolgus macaques. *J. Virol.* **77**: 9136-9146
24. Paul PS, *et al.* (2003) Exogenous porcine viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **278**: 125-183