

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

**Cogem**  
**postbus 578**  
**3720 AN Bilthoven**

Aan de Staatssecretaris van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening  
en Milieubeheer  
De heer drs. P.L.B.A. van Geel  
Postbus 30945  
2500 GX DEN HAAG

Uw kenmerk  
SAS/2004013924

Uw brief van  
11-02-2004

Kenmerk  
CGM/041223-02

Datum  
23 december 2004

Onderwerp  
Advies 'Integratie en verspreiding naakt DNA'

Geachte heer Van Geel,

Hierbij bied ik u het advies aan over de risico's van naakt DNA bij toepassing in mensen en dieren, naar aanleiding van de adviesvraag (SAS/2004013924) van het ministerie van VROM.

### **Samenvatting**

Vaccinatie met naakt DNA vectoren wekt hoge verwachtingen voor de behandeling van ondermeer infectieziekten en kanker. Naakt DNA is erfelijk materiaal met veelal een therapeutisch gen dat niet in een eiwitmantel verpakt is, zoals bij virussen. Onlangs is discussie ontstaan over de vraag of toepassing van naakt DNA in mens en dier valt onder het Besluit Genetisch Gemodificeerde Organismen (GGO). De COGEM is verzocht in verband hiermee te adviseren over de vraag of naakt DNA in het genoom ingebouwd kan worden en wat de mogelijke verspreidingsrisico's zijn.

De COGEM blijft van mening dat bij toepassing van naakt DNA inbouw in het genoom van cellen in het lichaam kan optreden. De frequentie is zeer laag, waardoor slechts enkele cellen gemodificeerd zullen zijn. Er zijn echter situaties waarbij het verspreidingsrisico dermate gering is dat het huidige vergunningenregime van het Besluit GGO vereenvoudigd kan worden. De verspreidingsrisico's kunnen toenemen indien sequenties aanwezig zijn waardoor het naakt DNA autonoom kan repliceren (replicatiecompetent). Hierdoor kan het naakt DNA zich in het milieu verspreiden. De COGEM onderscheidt drie risicogroepen, waarbij de eerste risicogroep bovengenoemde sequenties bevat die beoordeeld dienen te worden volgens de huidige introductie in het milieu vergunningsprocedure van het Besluit GGO. Daarnaast onderscheidt de COGEM sequenties die niet-replicatiecompetent zijn, maar waarbij een kleine kans aanwezig is dat (nieuwe) infectieuze virussen of ggo's ontstaan als gevolg van recombinatie. Deze sequenties dienen ook beoordeeld te worden, waarbij de COGEM, gezien de beperktere risico's, echter pleit voor een vereenvoudigde vergunningprocedure. Ten slotte onderscheidt de COGEM een derde risicogroep van niet-replicatiecompetente sequenties, waarvan bewezen is dat die geen verspreidingsrisico vormen. Hierbij kan volstaan worden met een meldingsplicht.

Met dit drietraps-vergunningverleningmodel op basis van risicogroepen kan de vergunningsprocedure vereenvoudigd worden zonder dat de veiligheid voor mens en milieu in het geding komt.

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

Tevens is het verslag van de door de COGEM georganiseerde hoorzitting bijgevoegd, waarin de problematiek aan de hand van een discussienota met belanghebbenden besproken is.

Tot slot treft u het onderzoeksrapport "Potential risks connected with the use of genetic vaccins" aan, dat als ondersteunend document heeft gediend bij de totstandkoming van het advies. Het onderzoeksrapport is in opdracht van de COGEM uitgevoerd door dr. T.G. Kimman, RIVM, en zal in aangepaste vorm binnenkort in een wetenschappelijk tijdschrift gepubliceerd worden.

Hoogachtend,



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

cc. Dr. ir. B.P. Loos  
Dr. I. van der Leij

Bijlagen: - COGEM advies "Integratie en verspreiding van naakt DNA"  
- Onderzoeksrapport "Potential risks connected with the use of genetic vaccins"  
- Verslag hoorzitting "naakt DNA"

# **Integratie en verspreiding van naakt DNA**

COGEM advies CGM/041223-02

## **Commissie Genetisch Modificatie (COGEM)**

De COGEM heeft op grond van de Wet Milieubeheer artikel 2.27 tot taak de regering te adviseren over de risicoaspecten van handelingen met genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) en te signaleren over ethische en maatschappelijke aspecten daarvan.



## **INHOUDSOPGAVE**

<b>Samenvatting</b>	<b>3</b>
<b>1. Inleiding</b>	<b>7</b>
1.1 Naakt DNA	7
1.2 Adviesvraag	9
1.3 Opname door de cel	10
1.4 Transport naar celkern	12
1.5 Integratie somatische cellen	13
1.6 Integratie in kiembaancellen	15
1.7 Shedding	16
<b>2. Risico-analyse naakt DNA</b>	<b>17</b>
2.1 Integratie in somatische cellen	17
2.2 Integratie in kiembaancellen	19
2.3 Factoren van invloed op integratie	20
2.4 Verspreidingsrisico	21
2.5 Recombinante virussen	21
2.6 Opname en verspreiding door micro-organismen	22
2.7 Opname door mensen en dieren	23
<b>3. Advies</b>	<b>25</b>
<b>Referenties</b>	<b>29</b>



## Samenvatting

Vaccinatie met DNA vectoren is momenteel in opkomst als een nieuwe manier om (therapeutische) eiwitten toe te dienen voor de behandeling van bijvoorbeeld infectieziekten en kanker. DNA vectoren worden ook wel naakt DNA genoemd omdat het erfelijk materiaal niet verpakt is in een eiwitmantel, zoals bij virussen. Recentelijk is er een discussie ontstaan over de vraag of toepassing van naakt DNA in mens en dier valt onder het Besluit Genetisch Gemodificeerde Organismen (GGO) en over de vermeende risico's voor mens en milieu. Het betreft hier de toediening van naakt DNA aan mensen of dieren, waarbij de toediening bewust gebeurt met de verwachting dat hierdoor een effect bewerkstelligd wordt.

In een eerder advies (CGM/990927-01) heeft de COGEM geconcludeerd dat niet kan worden uitgesloten dat toediening van naakt DNA kan leiden tot integratie in het genoom van mensen of dieren. De COGEM is door het ministerie van VROM gevraagd of er nieuwe wetenschappelijke inzichten zijn met betrekking tot integratie van toegediend naakt DNA in het genoom. Daarbij wordt ook gevraagd wat de mogelijke verspreidingsrisico's van naakt DNA zijn.

Op basis van de huidige beschikbare literatuurgegevens is de COGEM van mening dat integratie van naakt DNA in het genoom van cellen van mensen en dieren met een zeer lage frequentie kan optreden. De frequentie ligt echter beneden de basislijn van gen-inactiverende mutaties die van nature voorkomen in de menselijke cellen. Het effect van de insertie in het genoom van de enkele cellen in een lichaam zal volgens de COGEM zeer klein zijn. De risico's bij toediening van naakt DNA zullen niet groter zijn dan de risico's die verbonden zijn aan het gebruik van 'conventionele' virale of bacteriële vaccins die reeds decennia lang wereldwijd aan miljoenen mensen worden toegediend. De kans op integratie in kiembaancellen is verwaarloosbaar klein, mits naakt DNA niet direct in de gonaden geïnjecteerd wordt.

Uitscheiding of 'shedding' van naakt DNA is tot nu toe niet waargenomen, maar er zijn nauwelijks gegevens voorhanden. De kans op verspreiding van naakt DNA uit mensen of dieren naar andere organismen zal over het algemeen klein zijn. Verspreiding en integratie van naakt DNA is echter mede afhankelijk van de sequentie van het naakt DNA. De verspreidingsrisico's zullen toenemen indien sequenties aanwezig zijn waardoor het naakt DNA replicatiecompetent wordt in zoogdiercellen. De kans op integratie en verspreiding van naakt DNA kan ook toenemen indien bepaalde sequenties in het naakt DNA aanwezig zijn die recombinatie bevorderen en zodoende de vorming van infectieuze virussen of ggo's kunnen veroorzaken. De verspreidingsrisico's kunnen ook toenemen indien sequenties in het naakt DNA aanwezig zijn die de opname van DNA door bacteriën stimuleren.

De COGEM is van mening dat de verspreidingsrisico's van naakt DNA beperkt en afhankelijk van de gebruikte sequenties in het naakt DNA zijn. De COGEM maakt een onderscheid tussen naakt DNA sequenties die replicatiecompetent en die niet-replicatiecompetent zijn in zoogdiercellen. De eerste groep sequenties vormen een uitgesproken verspreidingsrisico, doordat het naakt DNA autonoom kan repliceren. In deze groep vallen ook sequenties waardoor het naakt DNA onderdeel kan gaan uitmaken van virussen, zoals de aanwezigheid van virale inpaksignalen, of waardoor het naakt DNA efficiënt opgenomen kan worden door bacteriën. De COGEM is van mening dat sequenties die behoren tot deze risicogroep, gelet op de aanwezige verspreidingsrisico's, dienen te vallen onder de huidige introductie in het milieu vergunningsprocedure volgens het Besluit GGO (gebaseerd op EU richtlijn 2001/18).

Met betrekking tot de tweede groep sequenties die niet-replicatiecompetent zijn, kunnen twee situaties onderscheiden worden. Tot de eerste situatie behoren bekende sequenties die al eerder beoordeeld zijn en waarvan bekend is dat ze geen verspreidingsrisico vormen. Ten aanzien van deze bekende sequenties pleit de COGEM voor een procedure waarbij enkel meldingsplicht van de werkzaamheden noodzakelijk is. De COGEM is van mening dat monitoring van shedding noodzakelijk is ter vergroting van de kennis en om te controleren of de aannames betreffende 'shedding' juist zijn. De COGEM wijst er voorts op dat adequate controle op de gehanteerde indeling van naakt DNA sequenties plaats dient te vinden ter bescherming van mens en milieu.

Tot de tweede situatie behoren sequenties in het naakt DNA die niet-replicatiecompetent zijn, maar volgens de COGEM beoordeeld dienen te worden omdat ze mogelijk recombinatie kunnen bevorderen. Recombinatie kan mogelijk leiden tot het ontstaan van (nieuwe) infectieuze virussen die zich kunnen verspreiden. Tevens acht de COGEM een beoordeling noodzakelijk voor sequenties met transformerende of oncologische eigenschappen gezien het mogelijke schadelijke effect van deze sequenties. De COGEM pleit ervoor om, in plaats van de huidige introductie in het milieu procedure, een vereenvoudigde vergunningsprocedure te hanteren voor laatstgenoemde sequenties. Hierbij kan gedacht worden aan een procedure die vergelijkbaar is met de procedure die wordt toegepast bij vergunningen voor ingeperkt gebruik. Deze procedure is tevens van toepassing op sequenties die niet-replicatiecompetent zijn, maar nog niet eerder zijn beoordeeld.

Naarmate meer gegevens beschikbaar zullen komen over naakt DNA en de bijbehorende verspreidingsrisico's zal het aantal sequenties dat valt onder de meldingsplicht kunnen toenemen.



Concluderend pleit de COGEM voor een drietraps-vergunningverlening-model voor toepassingen van naakt DNA op basis van de drie risicogroepen. Het drietraps-vergunningverleningmodel bestaat uit de huidige introductie in het milieu vergunningsprocedure, een vereenvoudigde vergunningsprocedure en alleen meldingsplicht. Volgens de COGEM kan met dit drietrapsmodel de vergunningsprocedure vereenvoudigd worden zonder dat de risico's voor mens en milieu in het geding komen.

### **Drietraps-vergunningverleningmodel voor naakt DNA toepassingen<sup>1</sup>**

Kenmerk	Risicogroep	Beoordeling
Replicatiecompetent	I	Introductie in het milieu vergunningprocedure conform huidig Besluit GGO
Niet-replicatiecompetent; Mogelijk recombinatie bevorderend of met transformerende of oncologische eigenschappen, dan wel nog niet eerder beoordeelde eigenschappen	II	Vereenvoudigde vergunningprocedure, bijvoorbeeld zoals bij ingeperkt gebruik
Niet-replicatiecompetent; Afwezigheid verspreidingsrisico bewezen	III	Meldingsplicht met monitoring van shedding

<sup>1</sup> Zie voor details tabel I, pagina 27 in het advies



## 1. Inleiding

Vaccinatie met DNA vectoren is momenteel in opkomst als een nieuwe manier om (therapeutische) eiwitten toe te dienen voor de behandeling van bijvoorbeeld infectieziekten en kanker. DNA vectoren worden ook wel 'naakt DNA' genoemd, omdat het erfelijk materiaal niet verpakt is in een eiwitmantel, zoals bij virussen. Indien inbouw (integratie) van toegediend naakt DNA in het genoom van organismen optreedt, leidt dit tot een verandering van het genetisch materiaal (genetische modificatie). De COGEM heeft in het verleden gesteld dat niet kan worden uitgesloten dat bij toepassingen met naakt DNA integratie kan optreden in het genoom van mensen of dieren, en heeft destijds gesteld dat er daarom in alle gevallen van uitgegaan moet worden dat genetisch gemodificeerde organismen kunnen ontstaan (CGM/990927-01). Naast mogelijke integratie in het genoom kan toegediend naakt DNA ook vrij komen uit behandelde mensen of dieren. Het naakt DNA kan zich vervolgens verspreiden waardoor mogelijk milieurisico's kunnen ontstaan.

De COGEM is door het ministerie van VROM gevraagd te adviseren of de commissie, op basis van de huidige wetenschappelijke literatuur, nog steeds van mening is dat er een kans bestaat dat integratie van naakt DNA kan optreden en wat de mogelijke verspreidingsrisico's van naakt DNA zijn. De adviesvraag betreft hier de toediening van naakt DNA aan mensen of dieren, waarbij de toediening bewust gebeurt met de verwachting dat hierdoor een effect bewerkstelligd wordt.

Het onderhavige advies is tot stand gekomen op basis van literatuuronderzoek en raadplegingen in de Commissie. Tevens heeft een hoorzitting plaatsgevonden op 6 december 2004, waarin de problematiek aan de hand van een discussienota met belanghebbenden is besproken.

### 1.1 Naakt DNA

Toediening van erfelijk materiaal aan mensen of dieren voor vaccinatie of genterapie kan plaatsvinden met behulp van naakt DNA of met genetisch gemodificeerde virussen. Verschillende virussen kunnen hiervoor als vector gebruikt worden, waaronder adenovirussen, retrovirussen, adeno-associated virussen (AAV) en herpes simplexvirussen (HSV). (1). Genetisch gemodificeerde virussen zijn uitermate geschikt voor het bewerkstelligen van effectieve genexpressie om (therapeutische) eiwitten te produceren. Het gebruik van virussen brengt echter een aantal nadelen met zich mee, aangezien virale sequenties aanwezig kunnen zijn die mogelijk kankerverwekkend zijn of

aanleiding kunnen geven tot ongewenste recombinaties met reeds in de patiënt aanwezige virussen (2-4).

Naast genetisch gemodificeerde virussen worden in toenemende mate ook DNA vectoren gebruikt (5; 6). De voordelen van naakt DNA zijn dat het relatief eenvoudig en snel te produceren is, stabiel is en dat het naakt DNA door cellen opgenomen en vertaald kan worden in eiwit (7-9). De opname van naakt DNA is echter minder efficiënt in vergelijking met virussen. Naakt DNA wordt veelal gebruikt als vaccin met als doel een afweerreactie op te wekken tegen ziekteverwekkers of tegen kankercellen. De hoeveelheid geproduceerd eiwit dat door naakt DNA gecodeerd wordt, is voldoende om het afweersysteem te activeren. Mede hierdoor staat naakt DNA met name in de belangstelling voor onderzoek naar tumorgeassocieerde eiwitten die het immuunsysteem stimuleren tegen tumoren (8; 10; 11). Daarnaast kunnen ook ziekten behandeld worden via therapeutische eiwitten die na toediening van naakt DNA tot expressie gebracht worden. In de literatuur verschijnen steeds meer studies waarin op basis van naakt DNA therapieën ontwikkeld worden tegen bijvoorbeeld het *Human immunodeficiency virus* (HIV), Hepatitis C, malaria en andere infectieziekten (5; 7; 12-16).

Bij behandelingen zal gestreefd worden naar een maximaal (therapeutisch) effect. Om dit te bewerkstelligen zal in het algemeen een aanzienlijke hoeveelheid eiwit geproduceerd dienen te worden. Hoe meer intact naakt DNA in de cel gebracht wordt, des te meer eiwit geproduceerd kan worden. De meeste protocollen zijn er daarom op gericht om zoveel mogelijk naakt DNA in de cel te brengen. De opname van naakt DNA door cellen en de efficiëntie van het beoogde effect van het naakt DNA is overigens niet alleen afhankelijk van de hoeveelheid toegediend naakt DNA, maar ook van andere factoren, waaronder de sequentievolgorde van het naakt DNA en de toedieningswijze.

Alvorens het naakt DNA in cellen vertaald kan worden in eiwit, dient een aantal barrières genomen te worden zoals het celmembraan en het kernmembraan van de cel (17; 18). Het transport van het DNA naar de celkern vormt een grote barrière voordat het naakt DNA tot expressie kan komen (18). De hoeveelheid intact naakt DNA in een cel is in het algemeen bepalend voor de hoeveelheid die in de celkern terecht kan komen. Zodra naakt DNA zich in de celkern bevindt, kan er een interactie plaatsvinden met het genoom van de mens of (proef)dier. Hierdoor is een kans aanwezig dat het naakt DNA in het genoom geïntegreerd wordt.

Tevens bestaat de theoretische mogelijkheid dat door aanwezigheid van virale sequenties in het naakt DNA (nieuwe) infectieuze virussen ontstaan als gevolg van complementatie of recombinatie tussen het virale genoom en het naakt DNA. Hierdoor kunnen de ontstane virussen vrijkomen in het milieu en andere mensen of dieren infecteren. Daarnaast kan naakt DNA door het lichaam

uitgescheiden worden (shedding) en in het milieu terecht komen. Het naakt DNA kan vervolgens door andere organismen opgenomen worden, waarna integratie in het genoom kan optreden.

## 1.2 Adviesvraag

De adviesvraag van het ministerie van VROM is tot stand gekomen naar aanleiding van de problematiek die ontstaan is over de vraag of toepassing van naakt DNA valt onder het Besluit GGO (19). Hierbij worden onder andere een eerder COGEM advies (CGM/990927-01) en publicaties genoemd met betrekking tot integratie van naakt DNA in het genoom en het ontstaan van ggo's (20-22). De adviesvraag van het ministerie van VROM is hieronder in cursief geciteerd.

*In een eerder advies (CGM/990927-01) heeft de COGEM gesteld dat 'niet [kan] worden uitgesloten dat (een deel) het toegediende DNA wordt geïntegreerd in het genoom van cellen van de patiënt, bijvoorbeeld door middel van recombinatie. De COGEM gaat er daarom in alle gevallen waarin naakt DNA wordt toegediend aan mensen, of aan proefdieren, van uit dat daarbij genetisch gemodificeerde organismen kunnen ontstaan.' Dit is in overeenstemming met gegevens in de literatuur (21; 22), die op zijn minst suggereren dat vreemd DNA in somatische cellen wordt opgenomen en vervolgens kan worden geïntegreerd in het genoom; in zwangere proefdieren bereikt het via de bloedbaan ook de somatische cellen van een foetus.*

*Vraag:*

*1. Zijn er sinds het eerdere advies nieuwe wetenschappelijke gegevens en/of inzichten naar voren zijn gekomen op grond waarvan de hierboven genoemde conclusies dat er bij de genoemde toepassingen van naakt DNA een kans bestaat dat daarbij genetisch gemodificeerde organismen ontstaan zoals bedoeld in het Besluit genetisch gemodificeerde organismen moeten worden herzien?*

*Indien u van mening bent dat uw eerdere advies op dat punt geen bijstelling behoeft, leg ik u de volgende vragen voor.*

*Toediening van naakt DNA aan de mens of aan proefdieren leidt dus potentieel tot het ontstaan van een mens of dier met een aantal genetisch gemodificeerde, meest waarschijnlijk somatische, cellen. De vraag die vervolgens gesteld moet worden is in hoeverre er in deze situatie sprake is van risico's voor mens en*

*milieu. In haar advies CGM/990927-01 stelt de COGEM dat er alleen sprake is van een risico voor mens of milieu, als het toegediende DNA zich vanuit de proefpersoon/het proefdier kan verspreiden naar andere mensen of dieren. Naakt DNA op zich vormt in dit opzicht geen risico, want zo zegt het advies 'om de [...] beoogde effecten te bewerkstelligen, moet het DNA door middel van een injectie worden toegediend. De kans dat een ggo ontstaat is ook alleen aanwezig als het DNA langs die weg wordt toegediend. Dat betekent dat er in deze protocollen geen verspreidingsrisico is van de behandelde patiënt naar de omgeving.'*

*Bij toepassingen van naakt DNA zou er wel sprake kunnen zijn van een verspreidingsrisico als het DNA sequenties bevat van, met name, virale herkomst, die door interactie met in het dier of de mens aanwezige virussen of virale sequenties zouden kunnen leiden tot de vorming van (nieuwe) infectieuze virussen, die door shedding in het milieu kunnen komen.*

*Vragen:*

- 2. Kunnen er criteria worden opgesteld voor de (typen van) sequenties die door hun aanwezigheid in naakt DNA dat wordt toegediend aan proefpersonen, dan wel proefdieren, die langs de hierboven aangegeven weg kunnen leiden tot de vorming van infectieuze virussen die door shedding in het milieu kunnen komen?*
- 3. Kan, ook als de eerste vraag niet in zijn algemeenheid beantwoord kan worden, worden aangegeven welke (virale) sequenties in het algemeen niet tot de bedoelde sequenties behoren? Voor promotoren zoals de CMV promotor is in het verleden bijvoorbeeld in adviezen van de COGEM aangegeven dat de aanwezigheid daarvan in virale vectoren voor gentherapie, geen verspreidingsrisico meebrengt. Wij nemen aan dat deze conclusie ook geldt voor hun aanwezigheid in naakt DNA.*
- 4. Is het juist dat naakt DNA constructen die de onder 1 genoemde sequenties niet bevatten, of die uitsluitend sequenties bevatten die voldoen aan de criteria onder 2, vallen onder het advies CGM/990927-01, en geen verspreidingsrisico vormen?*

### **1.3 Opname naakt DNA door de cel**

Toediening van naakt DNA aan mensen of dieren kan op verschillende manieren plaatsvinden (23). De meest gebruikte methode is door injectie van naakt DNA in spierweefsel, de huid of de bloedbaan (9). Voordat de cellen het naakt DNA kunnen opnemen, wordt een groot gedeelte afgebroken door DNA

afbrekende enzymen die in het lichaam aanwezig zijn. Ook nadat het naakt DNA de cel binnengedrongen is, staat het bloot aan degradatie. De halfwaardetijd van naakt DNA in het cytoplasma van de cel is ongeveer 50 tot 90 minuten (17; 18). De efficiëntie van opname door cellen en expressie van naakt DNA is laag in vergelijking met bijvoorbeeld virale vaccins. Met verschillende technieken wordt getracht om zoveel mogelijk naakt DNA de cel in te brengen om een zo hoog mogelijke expressie te bewerkstelligen. Hierdoor zal in het algemeen het beoogde (therapeutische) effect van het naakt DNA toenemen. Door een hoge opname efficiëntie zal de hoeveelheid naakt DNA in cellen en celkernen toenemen, waardoor de kans op integratie in het genoom hoger wordt. In deze en volgende paragrafen zijn de gangbare technieken voor DNA toediening, opname door de cel en transport naar de celkern in kaart gebracht.

Naakt DNA wordt veelal in spieren geïnjecteerd, omdat de eiwitproductie in spiercellen zeer effectief is waardoor bijvoorbeeld immuunstimulatoire eiwitten in relatief grote hoeveelheden geproduceerd kunnen worden. Naakt DNA kan ook succesvol geïnjecteerd worden in lever, hart, hersenen en nieren (9; 18). De opname van het naakt DNA door cellen is relatief inefficiënt. Dit heeft te maken met het feit dat zowel het DNA als de buitenkant van de cel negatief geladen zijn, waardoor de opname als gevolg van de afstotende krachten bemoeilijkt wordt. In spieren wordt minder dan 1% van de toegediende dosis opgenomen, waarbij alleen de cellen die dicht bij de injectieplaats liggen DNA opnemen. De efficiëntie van opname en genexpressie kan verhoogd worden door spiercellen te behandelen met hypertoonische sucrose of door moleculen in te spuiten die spierregeneratie induceren, zoals bupivacaine (24). In de literatuur is beschreven dat geïnjecteerd DNA in muizenspieren stabiel tot expressie kan komen gedurende tenminste negentien maanden (5).

Naakt DNA kan ook in de bloedbaan geïnjecteerd worden, maar zal hier snel gedegradeerd worden door nucleasen en fagocyterende cellen (18). De halfwaardetijd wordt geschat op minder dan vijf minuten (25). Het voordeel van injectie in de bloedbaan is dat een groot aantal organen en weefsels bereikt wordt, mits grote hoeveelheden DNA wordt geïnjecteerd. Het mechanisme achter de opname van het DNA door de cel is niet geheel duidelijk, maar waarschijnlijk is fysische druk de drijvende kracht. Een andere theorie is dat naakt DNA de cel kan binnenkomen via een receptor op het celoppervlak (26).

Naast injectie kan ook gebruik gemaakt worden van een zogenaamd 'gene gun' waarbij weefsel of cellen 'beschoten' worden met goudbolletjes die gecoat zijn met DNA (18; 23). De diepte van de penetratie van het DNA in het weefsel is echter zeer beperkt. Het naakt DNA kan in de cellen direct in het cytoplasma, en zelfs in de celkern, terechtkomen, waardoor enzymatische degradatie in het

lysosoom voorkomen wordt. De *in vivo* toepassing van deze techniek geeft in spieren een lage expressie van het toegediende naakt DNA (18). Uit de resultaten van deze studie blijkt dat de duur van de expressie kan variëren van enkele dagen tot twee maanden. In spierweefsel blijft het naakt DNA merkbaar langer beschermd tegen afbraak dan in bijvoorbeeld de bloedbaan.

Lipoplexen zijn complexen van naakt DNA en positief geladen lipiden die gebruikt worden om DNA in cellen te brengen (18; 23). Doordat de lipiden kunnen versmelten met de celmembraan komt het DNA vrij in het cytoplasma. Studies tonen aan dat naakt DNA op deze wijze *in vivo* lokaal toegediend kan worden aan longen, hersenen, bloedvaten en huid. Lipoplexen zijn toegepast in klinische studies voor de behandeling van ondermeer kanker en cystic fibrosis (15; 18). Een andere vorm van lipoplexen zijn polyplexen (18; 23). Dit zijn grote positief geladen polymeren die effectiever zijn voor DNA overdracht dan lipoplexen. Hieronder vallen onder andere poly-L-lysine, polyethyleenimine en chitosan. Polyplexen zijn *in vivo* gebruikt voor genoverdracht in hersenen, nieren en longen via toediening in de bloedbaan of neus (18; 27).

Over het algemeen is de efficiëntie van DNA overdracht met de hierboven beschreven technieken relatief laag vergeleken met de efficiëntie die gehaald wordt met genetisch gemodificeerde virussen (18; 23). Door naakt DNA middels elektroporatie toe te dienen kan overdracht en uiteindelijk de genexpressie drastisch verhoogd worden tot een factor duizend in vergelijking met gewone DNA injectie (20; 23; 28; 29). Bij elektroporatie worden de cellen in het weefsel permeabel gemaakt door elektrische pulsen waardoor het geïnjecteerde DNA makkelijker kan binnendringen (29). De techniek wordt gebruikt om DNA te injecteren in diverse weefsels waaronder huid, lever en spieren (23; 30). De efficiëntie van elektroporatie kan verder verhoogd worden door gebruik te maken van intramusculaire injectie met hyaluronidase (30). Dit enzym breekt een hechtingscomponent af dat zich tussen de cellen bevindt (extracellulaire matrix), waardoor de viscositeit in het spierweefsel tijdelijk lager wordt en het spierweefsel dus toegankelijker is (31).

#### **1.4 Transport naar celkern**

Opgenomen naakt DNA in een cel is niet stabiel als gevolg van de aanwezigheid van DNA afbrekende enzymen (nucleasen) (17). Naakt DNA dat door endocytose door de cel is opgenomen komt terecht in lysosomen, waarin ook nucleasen zitten (18). Door naakt DNA te vergezellen van peptiden die lysosomen kunnen laten desintegreren kan de transfectie-efficiëntie sterk verhoogd worden (32).



Het transport van naakt DNA naar de nucleus is een inefficiënt proces en kan verhoogd worden door gebruik te maken van het cellulaire kerntransport mechanisme (18; 33). Naakt DNA dat gebonden is aan synthetische peptiden die het 'nuclear localization signal' (NLS) bevatten, kunnen de import in de celkern bevorderen (33). Een toename van de hoeveelheid naakt DNA in de celkern is ook waargenomen indien sequenties van de SV40 'enhancer/promoter' regio in het naakt DNA aanwezig zijn (34-36). Gesuggereerd wordt dat de SV40 'enhancer' kan binden aan cellulaire eiwitten met NSL sequenties en zodoende naar de celkern getransporteerd wordt (36). Andere virale sequenties, waaronder sequenties van de promoter van het humane *cytomegalovirus* (CMV) of de *Rous sarcoma virus* (RSV) 'long terminal repeats' (LTR), blijken geen invloed te hebben op het transport van naakt DNA naar de celkern (36; 37).

## 1.5 Integratie in somatische cellen

Toegediend naakt DNA dat opgenomen is door de cel en in de celkern terecht gekomen is, kan mogelijkwerwijs integreren in het genoom. Naakt DNA kan opgenomen worden door geslachtscellen (kiembaancellen) of niet-geslachtscellen (somatische cellen). Bij integratie in kiembaancellen zou dit tot gevolg hebben dat eventuele nakomelingen ook genetisch gemodificeerd zijn. Integratie van naakt DNA kan in principe op elke plek in het genoom plaatsvinden. Dit kunnen gebieden zijn waar geen coderende sequenties aanwezig zijn, maar die wel invloed zouden kunnen uitoefenen op coderende sequenties. Het naakt DNA kan echter ook in een gen terecht komen met als gevolg dat het gen geïnactiveerd of ontregeld wordt. Ook het ontstaan van tumoren wordt genoemd als mogelijk gevolg van integratie in coderende, maar ook in niet-coderende sequenties. Integratie kan willekeurig optreden of op een specifieke plaats als gevolg van homologe recombinatie. De kans op integratie via homologe recombinatie neemt toe naarmate meer sequenties in het naakt DNA aanwezig zijn die homoloog zijn aan sequenties in het genoom.

In de wetenschappelijke literatuur is een beperkt aantal studies bekend waarin integratie van naakt DNA in somatische cellen onderzocht is. In de meeste studies kan geen integratie van naakt DNA in het genoom aangetoond worden. Eén van de eerste studies waarin een mogelijk verband tussen toediening van naakt DNA en integratie in het genoom is waargenomen dateert uit 1991 (38). In deze studie is naakt DNA, met daarin de sequenties voor het humane oncogen T24 H-*ras*, toegediend op de beschadigde huid van muizen. In veel gevallen ontstonden hierdoor huidtumoren. In deze tumorcellen kwam het humane

oncogen van het naakt DNA tot expressie, waarbij sterke aanwijzingen waren dat het gen in het genoom geïntegreerd was.

In latere studies is integratie van naakt DNA verder onderzocht. In een laboratoriumonderzoek uit 1995 is een DNA vaccin dat codeert voor een influenzagen ingespoten in spierweefsel van muizen (39). Dezelfde onderzoeksgroep heeft later ook de integratie in het genoom van muizen onderzocht van plasmiden coderend voor andere genen, waaronder het HIV *gag* gen (40). In beide studies kon het toegediende naakt DNA gedetecteerd worden in de behandelde spier. Daarbij was het naakt DNA in de celkern bij het genoom (extrachromosomaal) aanwezig. Op basis van de gevoeligheid van de methode om integratie in het genoom te detecteren werd gesteld dat minder dan 1 tot 8 integraties per 150.000 cellen hadden plaatsgevonden (39-41). Op grond van de verkregen resultaten kon niet worden geconcludeerd dat naakt DNA na intramusculaire injectie integreert in het genoom.

In een andere studie is naakt DNA met daarin het gen voor het humane *papilloma virus* type 16 E7 geïnjecteerd in muizen. Hoewel van dit gen *in vitro* bekend is dat het integratie van DNA in het genoom kan bevorderen, kon de toegediende sequentie niet in het genoom van de muizen gedetecteerd worden (42; 43).

Tevens is integratie in het genoom onderzocht van een malaria DNA vaccin dat in spierweefsel van muizen geïnjecteerd is. Uit het spierweefsel werd 30 en 60 dagen na injectie DNA geïsoleerd. Op beide tijdstippen konden 3 tot 30 kopieën van het naakt DNA per 150.000 cellen gedetecteerd worden dat geassocieerd was met het genomisch DNA. Niet bekend is of het naakt DNA extrachromosomaal aanwezig of geïntegreerd in het genoom was.

In goudvissen is de integratie van naakt DNA met een CMV promotor en een reporter gen (*lacZ*) onderzocht. Het naakt DNA werd intramusculair toegediend en kon niet geïntegreerd in het genoom van diverse organen teruggevonden worden (44).

Tenslotte is in een HIV-vaccinatie studie met ratten de integratie van naakt DNA tot 45 dagen na injectie gevolgd (45). Het vaccin werd wekelijks intramusculair toegediend in een dosis van 400 µg naakt DNA per rat gedurende vier weken. Op alle meetpunten kon integratie van vaccinsequenties in het genoom niet gedetecteerd worden (45). Voor al deze studies geldt dat de detectiegrens de bepalende factor is of integratie kan worden gedetecteerd of niet.

In tegenstelling tot bovengenoemde studies waarbij geen integratie in het genoom waargenomen werd, is onlangs aangetoond dat verbeterde technieken om DNA toe te dienen tot gevolg kan hebben dat toegediende sequenties in het genoom integreren (20). Met een elektroporatietechniek is naakt DNA aan muizen toegediend, waarbij vervolgens vier afzonderlijke integraties zijn

waargenomen. De integraties waren willekeurig, waarbij twee van de vier geïntegreerd waren in het niet-coderende gebied (intron) van een gen (20).

Een andere studie heeft *in vitro* de opname (fagocytose) van de bacterie *Listeria monocytogenes* door macrofaagachtige cellen bestudeerd. Een DNA vector die aanwezig was in de bacterie kon in het genoom van deze cellen van het immuunsysteem gedetecteerd worden. De frequentie van integratie in deze macrofaagachtige cellen was  $10^{-7}$  (46). Hieruit blijkt dat integratie in het genoom van macrofaagachtige cellen optreedt van DNA vectoren die aanwezig zijn in gefagocyteerde bacteriën. Deze laatste twee studies tonen voor het eerst aan dat integratie op een zeer laag niveau voorkomt (20; 40; 46).

## 1.6 Integratie in kiembaancellen

Uit de vorige paragraaf blijkt dat integratie van naakt DNA in het genoom van somatische cellen op een zeer laag niveau kan plaatsvinden. Integratie in kiembaancellen, oftewel geslachtscellen, is in nog minder studies onderzocht dan integratie van naakt DNA in somatische cellen. Integratie in kiembaancellen kan leiden tot verticale transmissie waardoor nakomelingen genetisch gemodificeerd zijn. Echter, voor zover onderzocht zijn er thans geen aanwijzingen waaruit blijkt dat integratie van naakt DNA in de kiembaancellen optreedt.

In een studie waarbij muizen naakt DNA met het humane *papilloma virus* type 16 E7 gen toegediend kregen was tot zeven dagen na injectie het toegediende DNA terug te vinden in de gonaden. Het naakt DNA was extrachromosaal aanwezig en was niet meer op latere tijdstippen te detecteren (43). Ondanks de aanwezigheid van het gen dat *in vitro* integratie kan stimuleren, kon het toegediende naakt DNA wel in kiembaancellen worden aangetoond, maar werd geen integratie in het genoom waargenomen (42).

Na intraveneuze toediening van een malaria DNA vaccin in muizen was het toegediende DNA in alle onderzochte weefsels terug te vinden. Uitgezonderd waren de gonaden en hersenen waarin geen naakt DNA gedetecteerd kon worden (47). Het lijkt dus zeer onwaarschijnlijk dat in deze studie integratie van naakt DNA in de kiembaancellen opgetreden is.

In een andere studie is een DNA vaccin (GX-12) tegen HIV in ratten geïnjecteerd (45). In alle meetpunten tot 45 dagen na intramusculaire injectie kon het vaccin in de gonaden gedetecteerd worden. Integratie kon niet aangetoond worden en ook expressie leek niet op te treden in de geslachtsorganen.

## 1.7 Shedding

Aan mensen of dieren toegediend naakt DNA kan op diverse manieren uitgescheiden worden ('shedding') en in het milieu terecht komen. Naakt DNA kan een interactie aangaan met in de mens of dier aanwezige virussen of virale sequenties. Hierdoor kunnen mogelijk (nieuwe) infectieuze virussen gevormd worden die zich in het milieu kunnen verspreiden. Tevens kan het naakt DNA replicatiecompetent zijn waardoor het in de cel kan vermenigvuldigen en verspreiden. Daarnaast kan toegediend naakt DNA dat niet-replicatiecompetent is ook uit mensen of dieren vrijkomen en zich in het milieu verspreiden naar andere organismen. In en buiten het lichaam kunnen bacteriën en parasieten naakt DNA opnemen, waardoor ggo's kunnen ontstaan.

Erg weinig is bekend over 'shedding' van toegediend naakt DNA in mensen of dieren. Slechts één studie heeft dit onderzocht en hier werd geen 'shedding' van toegediend naakt DNA waargenomen (48). In de betreffende klinische studie zijn ischemie patiënten behandeld met een plasmide coderend voor de fibroblast groeifactor type 1. Het naakt DNA werd intramusculair toegediend aan 51 patiënten. In de urine van al deze patiënten kon geen naakt DNA gedetecteerd worden (48). Uitscheiding van naakt DNA lijkt dus niet op te treden na injectie van naakt DNA in spieren. In de literatuur zijn echter geen andere studies aanwezig waarin 'shedding' van naakt DNA is onderzocht. Hierdoor kan geen gefundeerde uitspraak gedaan worden of 'shedding' van naakt DNA wel of niet plaatsvindt.

## 2. Risico-analyse naakt DNA

Alvorens een risico-analyse uitgevoerd kan worden met betrekking tot toepassing van naakt DNA is het verhelderend om het begrip risico nader te definiëren. Risico is het product van het schadelijke effect dat optreedt en de kans dat het gebeurt. Hierbij is het schadelijk effect de negatieve invloed die het genproduct of het ggo heeft op het milieu. De kans is de frequenties waarbij dit optreedt, maar ook de mate van verspreiding.

In dit hoofdstuk wordt ten eerste ingegaan op de betekenis en de gevolgen van integratie van naakt DNA in somatische cellen. Tevens zal de kans op genetische modificatie van kiembaancellen (verticale transmissie) aan bod komen, en zullen factoren belicht worden die van invloed kunnen zijn op integratie van naakt DNA in het genoom van mensen en dieren. De risico's van integratie van naakt DNA in de patiënt maken geen onderdeel uit van de adviestaak van de COGEM. Echter een verhoogde kans op integratie kan mogelijk leiden tot het ontstaan van recombinante virussen als gevolg van recombinitie tussen het naakt DNA en in het genoom aanwezige virale sequenties. Toegediend naakt DNA zou mogelijk ook uit de patiënt vrij kunnen komen en mensen in de omgeving van de patiënt kunnen besmetten. Hierdoor bestaat de mogelijkheid dat het naakt DNA in het genoom van de besmette mensen integreert en zodoende een mogelijk risico met zich meebrengt. De verspreiding van naakt DNA uit mensen of dieren wordt in de hiernavolgende delen van dit hoofdstuk nader geanalyseerd.

### 2.1 Integratie in somatisch cellen

De veiligheid van naakt DNA is in verscheidene preklinische en klinische studies onderzocht, waarbij met name de immunologische effecten en toxiciteit aan de orde komen (6; 8; 49-51). Zoals in het vorige hoofdstuk reeds is vermeld, wordt slechts in een beperkt aantal studies specifiek de integratie van naakt DNA in het genoom bestudeerd (39-45). Vier afzonderlijke willekeurige integraties in het genoom konden worden waargenomen in een studie waarin naakt DNA door middel van elektroporatie aan spierweefsel werd toegediend (20). In het geïnjecteerde spierweefsel werden ongeveer 1000 kopieën van het naakt DNA per 150.000 genoomkopieën gedetecteerd die geassocieerd waren met het genomisch DNA (20). Indien al het naakt DNA geïntegreerd zou zijn in het genoom, zou omgerekend het aantal integratie per gen ongeveer  $2,7 \times 10^{-7}$

bedragen<sup>1</sup>. Dit is echter nog steeds lager dan de geschatte  $2 \times 10^{-6}$  gen-inactiverende mutaties per gen die spontaan in cellen optreden (52; 53). Deze spontane mutaties zijn berekend op basis van sequentiegegevens van tenminste drie genen van enkele honderden vrijwilligers (52). Het effect van integratie van DNA in niet-coderende gebieden op genen is naar verwachting kleiner dan het effect van integratie in genregulatie- en eiwitcoderende sequenties (genen). Hierbij kan een gen geïnactiveerd of juist geactiveerd worden, waardoor de regulatie van celdeling verstoord zou kunnen worden dat mogelijk kan leiden tot tumorvorming (6).

De kans op tumorvorming kan verkleind worden door promotor of enhancer sequenties uit het naakt DNA te verwijderen die mogelijk de expressie van cellulaire oncogenen kunnen veranderen (54). Tevens kan gebruik gemaakt worden van zogenaamde 'zelfmoord' vectoren, die overigens een verwaarloosbare verspreidingskans hebben. Dergelijke naakt DNA constructen zorgen voor expressie van het transgen, waarna een ander mechanisme de gastheercel vernietigd (55; 56). Doordat de cel gedood wordt door de 'zelfmoord' vector zal de kans op tumorvorming verminderen. De kans op tumorvorming is ook onderzocht bij virale vaccins die aan mensen toegediend worden. In dergelijke vaccins is vaak residu cellulair DNA aanwezig dat afkomstig is van de productiecellen. Het cellulair DNA in virale vaccins blijkt niet in staat te zijn om tumoren bij de gevaccineerde personen te vormen (57).

Op basis van de aanwezige literatuurgegevens concludeert de COGEM dat bij toediening aan mens en dier, integratie van naakt DNA in het genoom plaats kan vinden. Slechts enkele cellen zullen echter gemodificeerd zijn. Indien de efficiëntie van toediening en opname door de cel hoog is, zoals in het geval van elektroporatie, zullen er meer integratiegebeurtenissen plaatsvinden. Hierbij dient aangetekend te worden dat de integratiefrequentie en de potentieel hieruit volgende gen-inactiverende mutaties echter lager is dan de natuurlijke basislijn van gen-inactiverende achtergrondmutaties in de humane populatie. Gezien het bovengenoemde lijken de risico's voor mens en milieu zeer klein. Bij een sterke toename van de integratiefrequentie, zoals in paragraaf 2.3 beschreven wordt, kan de frequentie boven de basislijn van natuurlijke integraties uitkomen waardoor de risico's van integratie toenemen.

De samenstelling van het naakt DNA en het transgen zijn daarbij ook van invloed op het effect van de integratie. Indien bijvoorbeeld naakt DNA integreert dat codeert voor een eiwit dat tumorvorming induceert zal het effect

---

<sup>1</sup> In het spierweefsel werden 1000 kopieën naakt DNA per 150.000 genoomkopieën gedetecteerd (20). Indien al het naakt DNA geïntegreerd zou zijn in het genoom, dan is de integratiefrequentie  $6,7 \times 10^{-3}$  (1000 kopieën / 150.000 genoomkopieën). Met het ontrafelen van het humane genoom is bekend geworden dat de mens ongeveer 20.000 tot 25.000 genen bezit (83). Met de hypothetische integratiefrequentie van  $6,7 \times 10^{-3}$  zou het aantal integraties per gen bij 25.000 genen ongeveer  $2,7 \times 10^{-7}$  ( $6,7 \times 10^{-3}$  integraties / 25.000 genen) zijn.

groot zijn. Daarentegen zijn de risico's van de aanwezigheid van bijvoorbeeld de Vasculaire Endotheliale Groei Factor-2 (VEGF-2) of een kanamycine-resistentiegen in naakt DNA nagenoeg nihil (CGM/990927-01). Aangezien de efficiëntie van naakt DNA toediening met verbeterde technieken in de toekomst waarschijnlijk verder verhoogd wordt, is het volgens de COGEM aannemelijk dat met die technieken hogere integratiefrequenties bereikt zullen worden.

## 2.2 Integratie in kiembaancellen

Zoals uit het bovengenoemde blijkt, kan integratie van naakt DNA in somatische cellen van de patiënt of het proefdier op een zeer laag niveau plaatsvinden. Verticale transmissie van naakt DNA als gevolg van integratie in kiembaancellen is in de weinige studies die dit onderzocht hebben tot nu toe niet waargenomen (21; 43; 45; 47). De relatief eenvoudigste manier om naakt DNA in contact te laten komen met kiembaancellen, buiten directie injectie in de gonaden, is door het naakt DNA in de bloedbaan te injecteren. Echter, voordat het naakt DNA de kern van de kiembaancellen bereikt dienen vele hindernissen genomen te worden. Als gevolg van de aanwezigheid van onder meer nucleasen en fagocyterende cellen in de bloedbaan is de halfwaardetijd van naakt DNA ongeveer vijf minuten (18; 25). DNA dat de cel binnendringt zal vervolgens blootstaan aan andere nucleasen die het DNA afbreken (18). Het risico op kiembaantransmissie zal derhalve bij injectie van naakt DNA in de bloedbaan veel lager zijn dan bij directe injectie in de gonaden.

Verticale transmissie van naakt DNA is alleen waargenomen in zwangere muizen waarbij het transgen in de somatische cellen van de foetus en pasgeboren muizen gedetecteerd kon worden na orale toediening van naakt DNA (21; 22; 48; 58). Naakt DNA is dus in staat om via de placenta in foetussen terecht komen. Er is echter geen bewijs van mogelijke kiembaantransmissie van geconsumeerd of oraal toegediend naakt DNA (21; 22).

De COGEM acht derhalve de kans op verticale transmissie van naakt DNA verwaarloosbaar klein, mits het naakt DNA niet direct in de gonaden wordt geïnjecteerd<sup>2</sup> en niet wordt toegediend aan zwangere mensen of dieren.

---

<sup>2</sup> Volgens de Embryowet is het verboden om het genetisch materiaal van de kern van menselijke kiembaancellen waarmee een zwangerschap tot stand zal worden gebracht, opzettelijk te wijzigen.

### 2.3 Factoren van invloed op integratie

De frequentie van integratie van naakt DNA in het genoom is afhankelijk van een groot aantal variabelen. Van invloed zijn onder andere de sequentievolgorde van het naakt DNA, de route van toediening, de hoeveelheid toegediend naakt DNA, de wijze van toediening en het celtype dat blootgesteld wordt aan het naakt DNA. Zo verhoogt elektroporatie de efficiëntie van opname door de cel (20). Om de opname van naakt DNA te verhogen worden met name spiercellen met agentia behandeld, waardoor de kans op integratie in het genoom toeneemt (24; 29). Het gebruik van lipoplexen leidt ook tot een efficiëntere opname van het naakt DNA door cellen (18; 23; 27).

In de celkern kan het naakt DNA willekeurig of specifiek in het genoom integreren. Specifieke integratie treedt vaak op indien sequenties in het naakt DNA aanwezig zijn die integratie op een bepaalde plek bevorderen. Daarnaast speelt de aanwezigheid van homologe sequenties in het naakt DNA ten opzichte van het genoom een rol bij de integratie, doordat hierdoor recombinatie kan optreden. In het algemeen kan gesteld worden dat hoe meer homologie tussen sequenties aanwezig is, des te groter de kans op recombinatie is. Indien het naakt DNA lichaamseigen sequenties bevat, zoals cytokinegenen of andere immunologisch relevante genen, is de kans op recombinatie en dus integratie groter in vergelijking met lichaamsvreemde sequenties. Tevens kunnen ook zeer korte sequenties recombinatie en integratie bevorderen, zoals de VDJ ('Variable, Diverse, Joining' segmenten) -recombinatie signaalsequentie, welke betrokken is bij de ontwikkeling van unieke receptoren in immunologische cellen (59; 60). Homologe recombinatie wordt ook gestimuleerd door korte repeterende sequenties, zoals *Alu* elementen en hypervariabele minisatelliet sequenties (61; 62). Tevens kan de kans op integratie toenemen indien in het naakt DNA virale sequenties aanwezig zijn (53). Sequenties van het *Hepatitis B virus* en het E7 gen van het humane *Papilloma virus*, die coderen voor recombinatie signalen kunnen evenals bacteriofaag integrases en retrovirale LTR's integratie bevorderen (42; 63-65). Daarentegen blijkt dat een CMV promoter in het naakt DNA nauwelijks van invloed is op integratie (44).

De COGEM wijst erop dat een hoge expressie van het naakt DNA in de celkern om een optimaal therapeutisch effect te bewerkstelligen, als nadeel heeft dat de kans op integratie van naakt DNA toeneemt. De kans op homologe recombinatie en integratie zal volgens de COGEM toenemen indien lichaamseigen sequenties in het naakt DNA aanwezig zijn.



## 2.4 Verspreidingsrisico

Erg weinig is bekend over uitscheiding of shedding van naakt DNA toegediend in mensen of dieren (48). Hierdoor kan geen gefundeerde uitspraak gedaan worden of 'shedding' van naakt DNA wel of niet plaatsvindt. Met betrekking tot het verspreidingsrisico van naakt DNA wordt vaak de kans genoemd dat het toegediende naakt DNA een interactie aangaat met in het dier of mens aanwezige virussen of virale sequenties, waardoor mogelijk (nieuwe) infectieuze virussen gevormd worden. Ook als gevolg van de aanwezigheid van replicatieve sequenties kan het naakt DNA replicatiecompetent zijn of worden, waardoor het zich autonoom kan verspreiden in het milieu. Het vrijkomen uit mensen of dieren van toegediend naakt DNA en het vervolgens verspreiden naar andere organismen zal tevens in de volgende paragrafen behandeld worden. Geïnjecteerd naakt DNA zal waarschijnlijk een lager verspreidingsrisico met zich meebrengen dan wanneer het naakt DNA oraal of nasaal wordt toegediend. Door bijvoorbeeld hoesten en niezen kan het toegediend naakt DNA mogelijk direct vrijkomen in het milieu. Het risico voor het milieu van verspreiding is echter afhankelijk van zowel het effect als de mate van verspreiding van het genetisch materiaal.

## 2.5 Recombinante virussen

Eén van de risico's van naakt DNA die genoemd worden, is het ontstaan van infectieuze virussen met mogelijk nieuwe eigenschappen, als gevolg van interactie van het naakt DNA met virussen of virale sequenties. De vorming van nieuwe virussen is mogelijk wanneer recombinatie optreedt tussen het virale genoom en homologe sequenties in het naakt DNA. De afwezigheid van virale sequenties, zoals retrovirale LTR's, in het naakt DNA verkleinen de kans op de vorming van nieuwe infectieuze virussen. Daarnaast bestaat er de mogelijkheid dat eventueel aanwezige virale sequenties in het naakt DNA complementierend kunnen optreden voor de activering van virussen. Dit houdt in dat de virale sequenties in het naakt DNA coderen voor eiwitten die nodig zijn om latente of niet complete virussen in een cel te activeren waardoor volwaardige virussen ontstaan. Een voorwaarde voor deze scenario's is dat zowel het virus of de virussequentie als het naakt DNA in dezelfde cel aanwezig zijn. De kans op een dergelijke gebeurtenis is echter klein.

Het risico op integratie en het ontstaan van nieuwe virussen dient tevens afgezet te worden tegen een basislijn van de risico's van bijvoorbeeld vaccinatie met verzwakte virussen en bacteriën, zoals het mazelenvaccin, poliovaccin, Bacillus Calmette Guérin (BCG) vaccin, en het recent geregistreerde genetisch

gemodificeerd choleravaccin (66; 67). Virale vaccins zijn evenals naakt DNA in staat om tot in de kern van cellen door te dringen. Het BCG vaccin is reeds aan grote aantallen personen toegediend zonder dat daarbij ernstige bijeffecten zijn opgetreden voor mens en milieu (66). Indien de aanwezigheid van virale sequenties in het naakt DNA voorkomen wordt, lijkt de kans dat door toediening van naakt DNA nieuwe genetisch gemodificeerde virussen ontstaan of dat in de cel aanwezige virussen door complementatie geactiveerd en uitgescheiden worden, zeer klein.

## 2.6 Opname en verspreiding door micro-organismen

Als verspreidingsrisico wordt aangedragen dat naakt DNA door bacteriën binnen of buiten het lichaam wordt opgenomen, waardoor ggo's ontstaan die impact hebben op het milieu en zich kunnen verspreiden. In het lichaam is het maagdarmkanaal de meest waarschijnlijke plaats waar naakt DNA opgenomen kan worden door de aanwezige bacteriën, zoals de darmflora. Het naakt DNA staat in het maagdarmkanaal bloot aan ondermeer zuren en DNA afbrekende enzymen. Hierdoor zal een gedeelte al afgebroken zijn voordat het in contact kan komen met maagdarmbacteriën. Indien naakt DNA uitgescheiden wordt, de kans hierop lijkt gering, zal het merendeel van het naakt DNA in het milieu afgebroken worden. De mate van afbraak is van verschillende factoren afhankelijk, waaronder ultraviolette straling in de lucht, de mineralensamenstelling, zuurgraad, temperatuur en vochtgehalte van de bodem (68; 69). Desondanks tonen diverse onderzoeken de aanwezigheid in de bodem aan van grote stukken 'intact' DNA afkomstig van dode planten (68-70).

Uit laboratoriumexperimenten blijkt dat meer dan veertig bacteriesoorten van nature in staat zijn om DNA effectief op te nemen (71). Hieronder vallen bepaalde bodembacteriën, zoals *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas stutzeri*, maar ook humane pathogenen, zoals *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitis*, *Streptococcus pneumoniae* en de maagbacterie *Helicobacter pylori* (72-74). Daarnaast kunnen enkele soorten DNA opnemen afhankelijk van zogenaamde 'DNA uptake sequences' (DUS). Dit zijn korte sequenties van enkele basenparen in het DNA (bijvoorbeeld de specifieke *Neisseria* DUS 5'-GCCGTCTGAA-3' en de *H. influenzae* DUS 5'-AAGTGCGGT-3') (72; 74-78). Door het vermijden van dergelijke DUS in het naakt DNA kan de kans op opname van het DNA door bepaalde bacteriën verkleind worden. Daarbij zal de kans op opname door bacteriën kleiner zijn indien naakt DNA in steriele lichaamsholten, zoals in spieren, wordt toegediend in tegenstelling tot bijvoorbeeld orale toediening.

Zowel de verspreiding als het effect van het ggo spelen een rol bij het vaststellen van de risico's voor mens en milieu. Oraal toegediende  $10^{11}$  recombinante *Escherichia coli* bacteriën met een verworven ampicilline-resistentie konden tot slechts twee dagen na toediening in de uitwerpselen van ratten gedetecteerd worden (71). Het aantal bacteriën in en buiten het lichaam dat in aanraking zal komen met naakt DNA waarna integratie optreedt, zal echter beduidend lager zijn dan het aantal genoemd in bovenvermelde studie. Daarbij is de kans dat genetisch gemodificeerde maagdarmbacteriën in het lichaam overleven niet groot als gevolg van kolonisatieresistentie. Tevens is de kans op verspreiding van een relatief klein aantal genetisch gemodificeerde maagdarmbacteriën in het milieu minimaal gezien de minder optimale omstandigheden buiten het lichaam (71; 79; 80). Deze argumenten zijn ook van toepassing op de verspreidingskansen van genetisch gemodificeerde bacteriën buiten het lichaam, zoals bodembacteriën. Indien het effect van de modificatie geen overlevingsvoordeel voor de bacterie oplevert, zeker indien resistentiegenen in het naakt DNA vermeden worden, dan zullen de verspreidingsrisico's verwaarloosbaar klein zijn.

## 2.7 Opname door mensen en dieren

In het dagelijks leven worden vele producten geconsumeerd, zoals groente, fruit en vlees. In voedsel zitten niet alleen eiwitten, mineralen en vitaminen, maar ook DNA. Dit betekent dat mensen en dieren van oudsher frequent bepaalde hoeveelheden DNA oraal opnemen zonder dat daarbij aantoonbaar enige nadelige effecten zijn opgetreden. De hoeveelheid uitgescheiden naakt DNA dat mogelijk via de mond opgenomen wordt zal minimaal zijn vergeleken met de hoeveelheden DNA dat in 'regulier' voedsel zit. In een klinische fase I studie is een hoeveelheid tot 16 mg naakt DNA aan patiënten toegediend (48). Dit is veel minder DNA dan bijvoorbeeld in een stuk vlees zit<sup>3</sup>. Uit het bovengenoemde blijkt dat de hoeveelheid DNA dat het lichaam binnenkomt in de vorm van voedsel veel hoger is dan de hoeveelheid toegediend naakt DNA. Hierdoor zal het effect van uitgescheiden naakt DNA dat oraal opgenomen wordt, welke

<sup>3</sup> Het humane haploïde genoom bevat ongeveer  $2,91 \times 10^9$  basenparen (bp), waarbij het molecuulgewicht van een basenpaar gemiddeld 660 g/mol bedraagt (83). De hoeveelheid DNA in een cel is derhalve  $(2,91 \times 10^9 \text{ bp} \times 2 \text{ chromosomen} \times 660 \text{ g/mol}) / 6,02 \times 10^{23} / \text{mol}$  is  $6,38 \times 10^{-6} \mu\text{g/cel}$ , zodat in 150.000 cellen ongeveer 1  $\mu\text{g}$  DNA zit ( $150.000 \text{ cellen} \times 6,38 \times 10^{-6} \mu\text{g/cel}$ ). Het aantal cellen dat gelijk staat aan 16 mg naakt DNA dat gebruikt is in een klinische fase I studie is  $16 \text{ mg} \times 150.000 \text{ cellen}/\mu\text{g}$  is  $2,4 \times 10^9$  cellen (48). Een tumor van  $1 \text{ cm}^3$  bevat tussen de  $10^8$  tot  $10^{10}$  cellen en met een beenmergtransplantatie worden tussen de  $2 \times 10^9$  en  $4 \times 10^{10}$  cellen per patiënt van 80 kg ingebracht. In een stuk vlees van 100 gram met een dichtheid van  $1 \text{ g/cm}^3$ , zal ruw geschat ongeveer  $(10^8 \text{ cellen/cm}^3 \times 100 \text{ cm}^3) / 150.000 \text{ cellen}/\mu\text{g}$  is 66 mg DNA zitten, en in 250 gram tomaten zit gemiddeld 3 mg DNA (84).

slechts een fractie van de toegediende hoeveelheid is, verwaarloosbaar klein zijn.

Opname van naakt DNA door consumptie van naakt DNA of gevaccineerde dieren is in verschillende studies onderzocht. In het maagdarmsstelsel wordt het meeste DNA snel afgebroken in kleinere fragmenten van 200 tot 400 basenparen. De lengte van deze fragmenten is kleiner dan de gemiddelde grootte van een gen, waardoor dergelijke DNA stukjes niet meer vertaald kunnen worden in eiwit (22; 81). Ondanks de aanwezigheid van DNA afbrekende enzymen en het zure milieu in de maag is de degradatie van geconsumeerd DNA niet volledig. Onder laboratoriumomstandigheden is naakt DNA dat gevoerd is aan muizen (totaal 400-800 µg) teruggevonden in verschillende organen (21; 58; 82). Bovendien was in zwangere muizen het oraal toegediend naakt DNA aanwezig in de celkern van enkele somatische cellen in verschillende organen van de foetussen en pasgeboren muizen (22). Een grote hoeveelheid geconsumeerd naakt DNA kan dus in verschillende organen terechtkomen en kan via de placenta door foetussen opgenomen worden.

Naakt DNA kan uit de patiënt of het (proef)dier in het milieu terechtkomen en vervolgens door mensen of dieren in de omgeving opgenomen worden en mogelijk integreren in het genoom. De kans dat naakt DNA uitgescheiden wordt, vervolgens terechtkomt in het maagdarmsstelsel van mensen of dieren en daarna integreert in het genoom lijkt gezien het bovenstaande echter verwaarloosbaar klein. Er zullen hoogstwaarschijnlijk slechts enkele cellen genetisch gemodificeerd zijn, indien het naakt DNA toch integreert in het genoom. Het effect van de integratie is mede afhankelijk van het transgen, maar zal verwaarloosbaar klein zijn.

### 3. Advies

De COGEM is van mening dat bij toepassing van naakt DNA bij mens en dier integratie kan optreden van het naakt DNA, of een deel hiervan, in het genoom van cellen. Het aantal cellen waarbij integratie optreedt zal echter zeer laag zijn. De kans op integratie in kiembaancellen is verwaarloosbaar klein, hoewel directe injectie van naakt DNA in de gonaden deze kans zou kunnen vergroten.

De frequentie van integratie ligt ver beneden de natuurlijke basislijn van gen-inactiverende mutaties in de humane populatie. Aangezien slechts enkele cellen in een lichaam gemodificeerd zullen worden als gevolg van integratie van toegediend naakt DNA zullen de risico's van integratie zeer klein zijn. De COGEM merkt voorts op dat de risico's van naakt DNA niet groter zullen zijn dan de risico's die verbonden zijn aan het gebruik van 'conventionele' virale of bacteriële vaccins die reeds decennia lang wereldwijd aan miljoenen mensen worden toegediend.

Uitscheiding van toegediend naakt DNA is nauwelijks onderzocht, maar tot nu toe niet waargenomen. De kans op verspreiding van naakt DNA uit mensen of dieren naar andere organismen zal over het algemeen klein zijn. Verspreiding en integratie van naakt DNA is echter mede afhankelijk van de sequentie van het naakt DNA. De verspreidingsrisico's zullen toenemen indien sequenties aanwezig zijn waardoor het naakt DNA replicatiecompetent wordt. De kans op integratie en verspreiding van naakt DNA kan ook toenemen indien bepaalde sequenties in het naakt DNA aanwezig zijn die recombinatie met aanwezige virussen of delen van virussen kunnen bevorderen waardoor infectieuze virussen of ggo's gevormd kunnen worden. Tevens kan verspreiding van naakt DNA in het milieu optreden indien sequenties in het naakt DNA aanwezig zijn die opname door bacteriën bevorderen.

De COGEM is van mening dat de verspreidingsrisico's van naakt DNA beperkt en afhankelijk van de gebruikte sequenties in het naakt DNA zijn. De COGEM maakt een onderscheid tussen naakt DNA sequenties die replicatiecompetent en die niet-replicatiecompetent zijn in zoogdiercellen. De eerste groep sequenties vormen een uitgesproken verspreidingsrisico, doordat het naakt DNA autonoom kan repliceren. In deze groep vallen ook sequenties waardoor het naakt DNA onderdeel kan gaan uitmaken van virussen, zoals de aanwezigheid van virale inpaksignalen, of waardoor het naakt DNA efficiënt opgenomen kan worden door bacteriën. De COGEM is van mening dat sequenties die behoren tot deze risicogroep, gelet op de aanwezige verspreidingsrisico's, dienen te vallen onder de huidige introductie in het milieu vergunningsprocedure, die op grond van de EU richtlijn 2001/18 vereist is.

Met betrekking tot de tweede groep sequenties die niet-replicatiecompetent zijn, kunnen twee situaties onderscheiden worden. Tot de eerste situatie behoren bekende sequenties die al eerder beoordeeld zijn en waarvan bekend is dat ze geen verspreidingsrisico vormen. Ten aanzien van deze bekende sequenties pleit de COGEM voor een procedure waarbij enkel meldingsplicht van de werkzaamheden noodzakelijk is. De COGEM is van mening dat monitoring van shedding noodzakelijk is ter vergroting van de kennis, gezien de weinige beschikbare gegevens rond naakt DNA. De COGEM wijst er voorts op dat adequate controle op de gehanteerde indeling van naakt DNA sequenties plaats dient te vinden ter bescherming van mens en milieu.

Tot de tweede situatie behoren sequenties in het naakt DNA die niet-replicatiecompetent zijn, maar volgens de COGEM beoordeeld dienen te worden omdat ze mogelijk recombinatie bevorderen. Recombinatie kan leiden tot het ontstaan van (nieuwe) infectieuze virussen die zich kunnen verspreiden. Tevens acht de COGEM een beoordeling noodzakelijk voor sequenties met transformerende of oncologische eigenschappen gezien het mogelijke schadelijke effect van deze sequenties. De COGEM pleit ervoor om een vereenvoudigde vergunningsprocedure te hanteren voor bovengenoemde sequenties. Deze procedure is anders dan de procedure en risico-analyse, zoals dit op grond van EU richtlijn 2001/18 voor introductie in het milieu toepassingen, vereist is. Hierbij kan gedacht worden aan een procedure die vergelijkbaar is met de procedure die wordt toegepast bij ingeperkt gebruik vergunningen. Deze procedure is tevens van toepassing op sequenties die niet-replicatiecompetent zijn, maar nog niet eerder zijn beoordeeld.

Gezien het beperkt aantal studies met naakt DNA is er momenteel nog weinig bekend van sequenties en naakt DNA plasmiden die geen verspreidingsrisico vormen. Naarmate meer gegevens beschikbaar komen over naakt DNA en de bijbehorende verspreidingsrisico's zal het aantal sequenties waarvoor enkel meldingsplicht noodzakelijk is toenemen..

Samenvattend pleit de COGEM voor een drietraps-vergunningverlening-model voor toepassingen van naakt DNA op basis van de hierboven beschreven drie risicogroepen. De criteria voor deze risicogroepen staan beschreven in tabel I. Het drietraps-vergunningverleningmodel bestaat uit de huidige introductie in het milieu vergunningsprocedure, een vereenvoudigde vergunningsprocedure en alleen meldingsplicht. Volgens de COGEM kan met dit drietrapsmodel de vergunningsprocedure vereenvoudigd worden zonder dat de risico's voor mens en milieu in het geding komen.

**Tabel I - Criteria risicogroepen naakt DNA**

Groep <sup>1</sup>	Criteria sequenties
I	<ul style="list-style-type: none"> <li>- naakt DNA is replicatiecompetent in zoogdiercellen;</li> <li>- naakt DNA kan onderdeel gaan uitmaken van virussen, bijvoorbeeld door de aanwezigheid van virale inpaksignalen (o.a. Ψ);</li> <li>- naakt DNA kan efficiënt opgenomen worden door bacteriën, bijvoorbeeld door aanwezigheid van bacteriële DNA opname sequenties (DUS), zoals de specifieke <i>Neisseria</i> DUS 5'-GCCGTCTGAA-3' en de <i>H. influenzae</i> DUS 5'-AAGTGCGGT-3'.</li> </ul>
II	<ul style="list-style-type: none"> <li>- niet-overdraagbare plasmiden met virale sequenties, met uitzondering van de CMV promoter en een polyadenyleringssignaal;</li> <li>- niet-overdraagbare plasmiden met sequenties met het oogmerk om recombinatie van het naakt DNA (of delen hiervan) met, of integratie van het naakt DNA (of delen hiervan) in, het genoom te bevorderen of te veroorzaken. Hiertoe behoren ondermeer het recombinatiesignaal van het <i>Hepatitis B virus</i>, retrovirale LTR, bacteriofaag integrases, VDJ-recombinatie signaalsequenties, Alu elementen en hypervariabele minisatelliet sequenties;</li> <li>- niet-overdraagbare plasmiden met eiwit-coderende sequenties die transformerende of oncogene eigenschappen hebben</li> </ul>
III	<ul style="list-style-type: none"> <li>- niet-overdraagbare plasmiden, gebaseerd op de 'origin of replication' (ori) aanwezig in ondermeer de plasmiden pBR322, pUC (ColE1 ori), en p15A (pACYC-serie plasmiden) met daarin een in prokaryoten actief kanamycine-resistentiegen;</li> <li>- niet-overdraagbare plasmiden met een in eukaryotische cellen functionele CMV promoter, een polyadenyleringssignaal en het eukaryotische VEGF-2 gen.</li> </ul>

<sup>1</sup> Risicogroep. I: beoordeling volgens de huidige introductie in het milieu procedure. II: beoordeling volgens een vereenvoudigde vergunningsprocedure. III: alleen meldingsplicht noodzakelijk.

## **Beantwoording adviesvragen VROM**

Onderstaand heeft de COGEM, op basis van de in dit advies genoemde overwegingen, puntsgewijs de vragen beantwoord zoals deze vermeld zijn in de brief van het ministerie van VROM.

- Met betrekking tot de eerste vraag is de COGEM van mening dat er geen nieuwe wetenschappelijke gegevens en/of inzichten naar voren zijn gekomen die ervoor pleiten om het standpunt te herzien dat bij toepassing van naakt DNA een kans bestaat dat daarbij ggo's kunnen ontstaan. De COGEM is derhalve nog steeds van mening (CGM/990927-01) dat niet kan worden uitgesloten dat het toegediende DNA of een deel hiervan wordt geïntegreerd in het genoom van cellen van de patiënt, bijvoorbeeld door middel van recombinatie.
- In de tweede vraag heeft het ministerie van VROM gevraagd welke sequenties door hun aanwezigheid in het naakt DNA dat wordt toegediend aan mensen of dieren kunnen leiden tot de vorming van infectieuze virussen of ggo's. De COGEM is van mening dat de sequenties, zoals genoemd in de eerste en tweede risicogroep (tabel I), hiertoe kunnen bijdragen.
- Met betrekking tot de derde vraag is de COGEM van mening dat de aanwezigheid van een CMV promoter of het VEGF-2 gen in het naakt DNA niet van invloed is op de vorming van infectieuze virussen of ggo's die door 'shedding' in het milieu terecht kunnen komen. Hiertoe behoren ook de 'origin of replication' (ori) aanwezig in ondermeer de plasmiden pBR322, pUC en p15A, en het in prokaryoten actieve kanamycine-resistentiegen, zoals hierboven genoemd in de derde risicogroep (tabel I).
- De laatste vraag van het ministerie van VROM heeft betrekking op het verspreidingsrisico van naakt DNA. De COGEM is van mening dat naakt DNA waarin sequenties die de vorming van infectieuze virussen of ggo's kunnen bevorderen afwezig zijn, of uitsluitend CMV promotersequenties bevatten, geen verspreidingsrisico vormt. Zie hiervoor de criteria zoals deze zijn opgesteld in tabel I. Voorts acht de COGEM de kans op kiembaan-transmissie door toediening van naakt DNA aan mensen of dieren verwaarloosbaar klein, mits het naakt DNA niet direct toegediend wordt aan de gonaden. Tevens dienen de personen of dieren waaraan naakt DNA wordt toegediend niet zwanger te zijn.



## Referenties

1. Knipe, M. D. and Howley, P. M. (2001). *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
2. VandenDriessche, T., Collen, D., and Chuah, M. K. (2003). Biosafety of onco-retroviral vectors. *Curr Gene Ther* **3**, blz. 501-15.
3. El-Aneed, A. (2004). An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release* **94**, blz. 1-14.
4. Dobbstein, M. (2003). Viruses in therapy-royal road or dead end? *Virus Res* **92**, blz. 219-21.
5. Alarcon, J. B., Waine, G. W., and McManus, D. P. (1999). DNA vaccines: technology and application as anti-parasite and anti-microbial agents. *Adv Parasitol* **42**, blz. 343-410
6. Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Shiver, J. W., and Liu, M. A. (1997). DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* **15**, blz. 617-48
7. Herweijer, H. and Wolff, J. A. (2003). Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther* **10**, blz. 453-8
8. Gurnathan, S., Klinman, D. M., and Seder, R. A. (2000). DNA vaccines: immunology, application, and optimization\*. *Annu Rev Immunol* **18**, blz. 927-74
9. Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**, blz. 1465-8
10. Berzofsky, J. A., Terabe, M., Oh, S., Belyakov, I. M., Ahlers, J. D., Janik, J. E., and Morris, J. C. (2004). Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest* **113**, blz. 1515-25
11. Stevenson, F. K., Ottensmeier, C. H., Johnson, P., Zhu, D., Buchan, S. L., McCann, K. J., Roddick, J. S., King, A. T., McNicholl, F., Savelyeva, N., and Rice, J. (2004). DNA vaccines to attack cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101 Suppl 2**, blz. 14646-52
12. Estcourt, M. J., McMichael, A. J., and Hanke, T. (2004). DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1. *Immunol Rev* **199**, blz. 144-55
13. Duenas-Carrera, S. (2004). DNA vaccination against hepatitis C. *Curr Opin Mol Ther* **6**, blz. 146-50
14. Stratov, I., DeRose, R., Purcell, D. F., and Kent, S. J. (2004). Vaccines and vaccine strategies against HIV. *Curr Drug Targets* **5**, blz. 71-88
15. Ziady, A. G., Davis, P. B., and Konstan, M. W. (2003). Non-viral gene transfer therapy for cystic fibrosis. *Expert Opin Biol Ther* **3**, blz. 449-58
16. Epstein, J. E., Charoenvit, Y., Kester, K. E., Wang, R., Newcomer, R., Fitzpatrick, S., Richie, T. L., Tornieporth, N., Heppner, D. G., Ockenhouse, C., Majam, V., Holland, C., Abot, E., Ganeshan, H., Berzins, M., Jones, T., Freyberg, C. N., Ng, J., Norman, J., Carucci, D. J., Cohen, J., and Hoffman, S. L. (2004). Safety, tolerability, and antibody responses in humans after sequential immunization with a PfCSP DNA vaccine followed by the recombinant protein vaccine RTS,S/AS02A. *Vaccine* **22**, blz. 1592-603
17. Lechardeur, D. and Lukacs, G. L. (2002). Intracellular barriers to non-viral gene transfer. *Curr Gene Ther* **2**, blz. 183-94

18. Nishikawa, M. and Huang, L. (2001). Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer. *Hum Gene Ther* **12**, blz. 861-70
19. Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze Regeling (1998).
20. Wang, Z., Troilo, P. J., Wang, X., Griffiths, T. G., Pacchione, S. J., Barnum, A. B., Harper, L. B., Pauley, C. J., Niu, Z., Denisova, L., Follmer, T. T., Rizzuto, G., Ciliberto, G., Fattori, E., Monica, N. L., Manam, S., and Ledwith, B. J. (2004). Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation. *Gene Ther* **11**, blz. 711-21
21. Doerfler, W., Hohlweg, U., Muller, K., Remus, R., Heller, H., and Hertz, J. (2001). Foreign DNA integration--perturbations of the genome--oncogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **945**, blz. 276-88
22. Schubbert, R., Hohlweg, U., Renz, D., and Doerfler, W. (1998). On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus. *Mol Gen Genet* **259**, blz. 569-76
23. Niidome, T. and Huang, L. (2002). Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors. *Gene Ther* **9**, blz. 1647-52
24. Danko, I., Fritz, J. D., Jiao, S., Hogan, K., Latendresse, J. S., and Wolff, J. A. (1994). Pharmacological enhancement of in vivo foreign gene expression in muscle. *Gene Ther* **1**, blz. 114-21
25. Kawabata, K., Takakura, Y., and Hashida, M. (1995). The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake. *Pharm Res* **12**, blz. 825-30
26. Budker, V., Budker, T., Zhang, G., Subbotin, V., Loomis, A., and Wolff, J. A. (2000). Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process. *J Gene Med* **2**, blz. 76-88
27. Han, S., Mahato, R. I., Sung, Y. K., and Kim, S. W. (2000). Development of biomaterials for gene therapy. *Mol Ther* **2**, blz. 302-17
28. McMahon, J. M. and Wells, D. J. (2004). Electroporation for gene transfer to skeletal muscles: current status. *BioDrugs* **18**, blz. 155-65
29. Bigey, P., Bureau, M. F., and Scherman, D. (2002). In vivo plasmid DNA electrotransfer. *Curr Opin Biotechnol* **13**, blz. 443-7
30. Molnar, M. J., Gilbert, R., Lu, Y., Liu, A. B., Guo, A., Larochelle, N., Orlopp, K., Lochmuller, H., Petrof, B. J., Nalbantoglu, J., and Karpati, G. (2004). Factors influencing the efficacy, longevity, and safety of electroporation-assisted plasmid-based gene transfer into mouse muscles. *Mol Ther* **10**, blz. 447-55
31. Mennuni, C., Calvaruso, F., Zampaglione, I., Rizzuto, G., Rinaudo, D., Dammasa, E., Ciliberto, G., Fattori, E., and La Monica, N. (2002). Hyaluronidase increases electrogene transfer efficiency in skeletal muscle. *Hum Gene Ther* **13**, blz. 355-65
32. Van Rossenberg, S. M., Sliedregt-Bol, K. M., Meeuwenoord, N. J., Van Berkel, T. J., Van Boom, J. H., Van Der Marel, G. A., and Biessen, E. A. (2002). Targeted lysosome disruptive elements for improvement of parenchymal liver cell-specific gene delivery. *J Biol Chem* **277**, blz. 45803-10
33. Cartier, R. and Reszka, R. (2002). Utilization of synthetic peptides containing nuclear localization signals for nonviral gene transfer systems. *Gene Ther* **9**, blz. 157-67

34. Young, J. L., Benoit, J. N., and Dean, D. A. (2003). Effect of a DNA nuclear targeting sequence on gene transfer and expression of plasmids in the intact vasculature. *Gene Ther* **10**, blz. 1465-70
35. Dean, D. A. (1997). Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. *Exp Cell Res* **230**, blz. 293-302
36. Blomberg, P., Eskandarpour, M., Xia, S., Sylven, C., and Islam, K. B. (2002). Electroporation in combination with a plasmid vector containing SV40 enhancer elements results in increased and persistent gene expression in mouse muscle. *Biochem Biophys Res Commun* **298**, blz. 505-10
37. Dean, D. A., Dean, B. S., Muller, S., and Smith, L. C. (1999). Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Exp Cell Res* **253**, blz. 713-22
38. Burns, P. A., Jack, A., Neilson, F., Haddow, S., and Balmain, A. (1991). Transformation of mouse skin endothelial cells in vivo by direct application of plasmid DNA encoding the human T24 H-ras oncogene. *Oncogene* **6**, blz. 1973-8
39. Nichols, W. W., Ledwith, B. J., Manam, S. V., and Troilo, P. J. (1995). Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann N Y Acad Sci* **772**, blz. 30-9
40. Ledwith, B. J., Manam, S., Troilo, P. J., Barnum, A. B., Pauley, C. J., Griffiths, T. G. 2nd, Harper, L. B., Beare, C. M., Bagdon, W. J., and Nichols, W. W. (2000). Plasmid DNA vaccines: investigation of integration into host cellular DNA following intramuscular injection in mice. *Intervirology* **43**, blz. 258-72
41. Henke, A. (2002). DNA immunization--a new chance in vaccine research? *Med Microbiol Immunol (Berl)* **191**, blz. 187-90
42. Kessiss, T. D., Connolly, D. C., Hedrick, L., and Cho, K. R. (1996). Expression of HPV16 E6 or E7 increases integration of foreign DNA. *Oncogene* **13**, blz. 427-31
43. Manam, S., Ledwith, B. J., Barnum, A. B., Troilo, P. J., Pauley, C. J., Harper, L. B., Griffiths, T. G. 2nd, Niu, Z., Denisova, L., Follmer, T. T., Pacchione, S. J., Wang, Z., Beare, C. M., Bagdon, W. J., and Nichols, W. W. (2000). Plasmid DNA vaccines: tissue distribution and effects of DNA sequence, adjuvants and delivery method on integration into host DNA. *Intervirology* **43**, blz. 273-81
44. Kanellos, T., Sylvester, I. D., Ambali, A. G., Howard, C. R., and Russell, P. H. (1999). The safety and longevity of DNA vaccines for fish. *Immunology* **96**, blz. 307-13
45. Kang, K. K., Choi, S. M., Choi, J. H., Lee, D. S., Kim, C. Y., Ahn, B. O., Kim, B. M., and Kim, W. B. (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**, blz. 270-6
46. Dietrich, G., Bubert, A., Gentschev, I., Sokolovic, Z., Simm, A., Catic, A., Kaufmann, S. H., Hess, J., Szalay, A. A., and Goebel, W. (1998). Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nat Biotechnol* **16**, blz. 181-5
47. Parker, S. E., Borellini, F., Wenk, M. L., Hobart, P., Hoffman, S. L., Hedstrom, R., Le, T., and Norman, J. A. (1999). Plasmid DNA malaria vaccine: tissue distribution and safety studies in mice and rabbits. *Hum Gene Ther* **10**, blz. 741-58

48. Comerota, A. J., Throm, R. C., Miller, K. A., Henry, T., Chronos, N., Laird, J., Sequeira, R., Kent, C. K., Bacchetta, M., Goldman, C., Salenius, J. P., Schmieder, F. A., and Pilsudski, R. (2002). Naked plasmid DNA encoding fibroblast growth factor type 1 for the treatment of end-stage unreconstructible lower extremity ischemia: preliminary results of a phase I trial. *J Vasc Surg* **35**, blz. 930-6
49. Conry, R. M., Curiel, D. T., Strong, T. V., Moore, S. E., Allen, K. O., Barlow, D. L., Shaw, D. R., and LoBuglio, A. F. (2002). Safety and immunogenicity of a DNA vaccine encoding carcinoembryonic antigen and hepatitis B surface antigen in colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* **8**, blz. 2782-7
50. Moorthy, V. S., McConkey, S., Roberts, M., Gothard, P., Arulanantham, N., Degano, P., Schneider, J., Hannan, C., Roy, M., Gilbert, S. C., Peto, T. E., and Hill, A. V. (2003). Safety of DNA and modified vaccinia virus Ankara vaccines against liver-stage *P. falciparum* malaria in non-immune volunteers. *Vaccine* **21**, blz. 1995-2002
51. Mwau, M., Ceber, I., Sutton, J., Chikoti, P., Winstone, N., Wee, E. G., Beattie, T., Chen, Y. H., Dorrell, L., McShane, H., Schmidt, C., Brooks, M., Patel, S., Roberts, J., Conlon, C., Rowland-Jones, S. L., Bwayo, J. J., McMichael, A. J., and Hanke, T. (2004). A human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) clade A vaccine in clinical trials: stimulation of HIV-specific T-cell responses by DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA) vaccines in humans. *J Gen Virol* **85**, blz. 911-9
52. Cole, J. and Skopek, T. R. (1994). International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens. Working paper no. 3. Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo. *Mutat Res* **304**, blz. 33-105
53. Ledwith, B. J., Manam, S., Troilo, P. J., Barnum, A. B., Pauley, C. J., Griffiths, T. G. 2nd, Harper, L. B., Schock, H. B., Zhang, H., Faris, J. E., Way, P. A., Beare, C. M., Bagdon, W. J., and Nichols, W. W. (2000). Plasmid DNA vaccines: assay for integration into host genomic DNA. *Dev Biol (Basel)* **104**, blz. 33-43
54. Williams, D. A. and Baum, C. (2003). Medicine. Gene therapy--new challenges ahead. *Science* **302**, blz. 400-1
55. Xiao, S., Chen, H., Fang, L., Liu, C., Zhang, H., Jiang, Y., and Hong, W. (2004). Comparison of immune responses and protective efficacy of suicidal DNA vaccine and conventional DNA vaccine encoding glycoprotein C of pseudorabies virus in mice. *Vaccine* **22**, blz. 345-51
56. Kohno, A., Emi, N., Kasai, M., Tanimoto, M., and Saito, H. (1998). Semliki Forest virus-based DNA expression vector: transient protein production followed by cell death. *Gene Ther* **5**, blz. 415-8
57. Horaud, F. (1995). Viral vaccines and residual cellular DNA. *Biologicals* **23**, blz. 225-8
58. Schubbert, R., Renz, D., Schmitz, B., and Doerfler, W. (1997). Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, blz. 961-6
59. Weaver, D., Boubnov, N., Wills, Z., Hall, K., and Staunton, J. (1995). V(D)J recombination: double-strand break repair gene products used in the joining mechanism. *Ann N Y Acad Sci* **764**, blz. 99-111
60. Bassing, C. H., Swat, W., and Alt, F. W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* **109 Suppl**, blz. S45-55
61. Wahls, W. P., Wallace, L. J., and Moore, P. D. (1990). Hypervariable minisatellite DNA is a hotspot for homologous recombination in human cells. *Cell* **60**, blz. 95-103

62. Rudiger, N. S., Gregersen, N., and Kielland-Brandt, M. C. (1995). One short well conserved region of Alu-sequences is involved in human gene rearrangements and has homology with prokaryotic chi. *Nucleic Acids Res* **23**, blz. 256-60
63. Aoki, H., Kajino, K., Arakawa, Y., and Hino, O. (1996). Molecular cloning of a rat chromosome putative recombinogenic sequence homologous to the hepatitis B virus encapsidation signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, blz. 7300-4
64. Gregoriadis, G. (1998). Genetic vaccines: strategies for optimization. *Pharm Res* **15**, blz. 661-70
65. Groth, A. C. and Calos, M. P. (2004). Phage integrases: biology and applications. *J Mol Biol* **335**, blz. 667-78
66. Hanson, M. S., Bansal, G. P., Langermann, S., Stover, C. K., and Orme, I. (1995). Efficacy and safety of live recombinant BCG vaccines. *Dev Biol Stand* **84**, blz. 229-36
67. Viret, J. F., Dietrich, G., and Favre, D. (2004). Biosafety aspects of the recombinant live oral *Vibrio cholerae* vaccine strain CVD 103-HgR. *Vaccine* **22**, blz. 2457-69
68. Blum, S. A. E., Lorenz, M. G., and Wackernagel, W. (1997). Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soils. *Systematic and Applied Microbiology* **20**, blz. 513-521
69. de Vries, J., Heine, M., Harms, K., and Wackernagel, W. (2003). Spread of recombinant DNA by roots and pollen of transgenic potato plants, identified by highly specific biomonitoring using natural transformation of an *Acinetobacter* sp. *Appl Environ Microbiol* **69**, blz. 4455-62
70. Gebhard, F. and Smalla, K. (1999). Monitoring field releases of genetically modified sugar beets for persistence of transgenic plant DNA and horizontal gene transfer. *Fems Microbiology Ecology* **28**, blz. 261-272
71. Dalboge, H., Madsen, B., Jorgensen, K. D., and Carlsen, S. (1988). Assessment of risks in connection with use of a recombinant *E. coli* strain for production of human growth hormone. *Dan Med Bull* **35**, blz. 84-91
72. Saunders, N. J., Peden, J. F., and Moxon, E. R. (1999). Absence in *Helicobacter pylori* of an uptake sequence for enhancing uptake of homospesific DNA during transformation. *Microbiology* **145** ( Pt 12), blz. 3523-8
73. Lorenz, M. G. and Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* **58**, blz. 563-602
74. Boyle-Vavra, S. and Seifert, H. S. (1996). Uptake-sequence-independent DNA transformation exists in *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiology* **142** ( Pt 10), blz. 2839-45
75. Wang, Y., Goodman, S. D., Redfield, R. J., and Chen, C. (2002). Natural transformation and DNA uptake signal sequences in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Bacteriol* **184**, blz. 3442-9
76. Elkins, C., Thomas, C. E., Seifert, H. S., and Sparling, P. F. (1991). Species-specific uptake of DNA by gonococci is mediated by a 10-base-pair sequence. *J Bacteriol* **173**, blz. 3911-3
77. Davidsen, T., Rodland, E. A., Lagesen, K., Seeberg, E., Rognes, T., and Tonjum, T. (2004). Biased distribution of DNA uptake sequences towards genome maintenance genes. *Nucleic Acids Res* **32**, blz. 1050-8
78. Bensasson, D., Boore, J. L., and Nielsen, K. M. (2004). Genes without frontiers? *Heredity* **92**, blz. 483-9

79. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Kobayashi, G. S., and Pfaller, M. A. (2002). *Medical Microbiology*. Mosby Inc, St. Louis .
80. Katz, D. E., Coster, T. S., Wolf, M. K., Trespalacios, F. C., Cohen, D., Robins, G., Hartman, A. B., Venkatesan, M. M., Taylor, D. N., and Hale, T. L. (2004). Two studies evaluating the safety and immunogenicity of a live, attenuated *Shigella flexneri* 2a vaccine (SC602) and excretion of vaccine organisms in North American volunteers. *Infect Immun* **72**, blz. 923-30
81. Wilcks, A., van Hoek, A. H., Joosten, R. G., Jacobsen, B. B., and Aarts, H. J. (2004). Persistence of DNA studied in different ex vivo and in vivo rat models simulating the human gut situation. *Food Chem Toxicol* **42**, blz. 493-502
82. Hohlweg, U. and Doerfler, W. (2001). On the fate of plant or other foreign genes upon the uptake in food or after intramuscular injection in mice. *Mol Genet Genomics* **265**, blz. 225-33
83. International Human Genome Sequencing Consortium. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**, blz. 931-45
84. Nap, J. P., Bijvoet, J., and Stiekema, W. J. (1992). Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants. *Transgenic Res* **1**, blz. 239-49