

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

**DATUM** 03 juni 2013  
**KENMERK** CGM/130603-03  
**ONDERWERP** Advies: Een fase 2b klinische studie met gg-AAV ter behandeling van patiënten met hartfalen (AMC)

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM 12-006 met de titel 'A phase 2b, double-blind, placebo-controlled, multinational, multicenter, randomized study evaluating the safety and efficacy of intracoronary administration of MYDICAR (AAV1/SERCA2a) in subjects with hearts failure' van het Academisch Medisch Centrum te Amsterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.'

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een fase 2b klinische studie bij patiënten met hartfalen. Onderzoek heeft uitgewezen dat de calciumbalans in hartspiercellen bij hartfalen is verstoord. In deze studie wordt een replicatie-deficiënt genetisch gemodificeerde *Adeno-associated virus* (gg-AAV) vector in de kransslagader van patiënten met hartfalen geïnjecteerd. Door deze vector wordt in het hart een eiwit tot expressie gebracht (SERCA2a) dat de verstoorde calciumbalans in hartspiercellen moet herstellen.

De vector is gebaseerd op een laag pathogeen oudervirus en mist de genen die nodig zijn voor replicatie. Hierdoor kan de gg-vector alleen cellen infecteren, maar zich niet verder verspreiden.

De patiënten mogen binnen 24 uur na de behandeling het ziekenhuis verlaten. De COGEM acht de kans aanwezig dat de vector vanuit de patiënt in het milieu uitgescheiden wordt. De risico's hiervan vindt zij echter verwaarloosbaar klein, omdat de vector apathogeen is en zich niet kan repliceren. Verder acht de COGEM de kans op het ontstaan van een recombinant virus tijdens de productiefase of na toediening in de patiënt verwaarloosbaar klein.

Op basis van bovenstaande gegevens is de COGEM van mening dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met een gg-AAV vector verwaarloosbaar klein zijn.



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

Hoogachtend,

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

c.c.           Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo  
               Dr. I. van der Leij, Ministerie van IenM

# Een fase 2b klinische studie met gg-AAV ter behandeling van patiënten met hartfalen

## COGEM advies CGM/130603-03

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een fase 2b klinische studie bij patiënten met hartfalen. In deze studie wordt een eenmalige dosis van een replicatie-deficiënt genetisch gemodificeerde *Adeno-associated virus* (gg-AAV) vector in de kransslagader van patiënten met hartfalen geïnjecteerd. De recombinante vector bevat een sequentie die codeert voor het zogenoemde '*sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase*' (SERCA2a) eiwit. Dit eiwit speelt een belangrijke rol in de handhaving van de calciumbalans in hartspiercellen. Uit een eerdere fase 2 klinische studie met dezelfde vector bleek dat expressie van het SERCA2a eiwit na introductie van het ggo een positief effect had op het ziekteverloop, waaronder een vermindering van de duur van ziekenhuisopnames.

De werkzaamheden, die in het Academisch Medisch Centrum in Amsterdam plaatsvinden, maken onderdeel uit van een multicenter studie waar ook het Universitair Medisch Centrum Utrecht en het Universitair Medisch Centrum Groningen bij betrokken zijn. In totaal zullen 30 patiënten met hartfalen in de studie worden opgenomen.

De COGEM is door Bureau GGO per locatie om advies gevraagd. Het onderhavige advies is een exacte kopie van de andere adviezen die betrekking hebben op deze multicenter studie.

### 1.1 Hartfalen

Hartfalen is een ziekte die gekenmerkt wordt door een geleidelijke achteruitgang van de pompfunctie van het hart. Hierdoor krijgen cellen, organen en spieren in het lichaam onvoldoende zuurstof en voedingsstoffen en worden afvalstoffen niet goed verwijderd. Dit leidt tot kortademigheid en vermoeidheid. Daarnaast is er vaak sprake van vochtophoping in de longen en de benen. Uiteindelijk overlijdt de patiënt als gevolg van een toenemende verzwakking van het hart of door een gerelateerde aandoening die indirect door het falende hart wordt veroorzaakt, zoals een hartinfarct of een beroerte.<sup>1</sup>

Jaarlijks komen er in Nederland tussen de 28.000 en 44.000 nieuwe patiënten met hartfalen bij. De meeste patiënten zijn zeventig jaar of ouder. De mortaliteit is hoog: binnen vijf jaar na het stellen van de diagnose is meer dan de helft van de patiënten overleden. De behandeling van hartfalen is op dit moment gericht op het bestrijden van de symptomen en het vertragen van de achteruitgang van het hart.<sup>1</sup>

### 1.2 SERCA2a

Een hartslag begint met een actiepotentiaal, die geïnitieerd wordt door de sinusknoop in de wand van de rechter boezem van het hart. Tijdens de systole (samentrekking van de hartkamers) zorgt deze actiepotentiaal voor een lichte influx van calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) in de hartspiercellen via zogenoemde '*L-type Ca<sup>2+</sup> channels (LTCC)*'. Deze  $\text{Ca}^{2+}$  influx triggert vervolgens  $\text{Ca}^{2+}$  afgifte vanuit het sarcoplasmatisch reticulum (SR) via de zogenoemde ryanosine (RyR2) receptoren. De  $\text{Ca}^{2+}$  influx en afgifte leidt tot een

verhoging van de calciumconcentratie in de spiercel en uiteindelijk tot spiercontractie.<sup>2</sup> De spierrelaxatie wordt geïnitieerd door sluiting van de RyR2 receptoren en de heropname van Ca<sup>2+</sup> in het SR via het SERCA2a eiwit.<sup>2</sup>

Onderzoek heeft uitgewezen dat de Ca<sup>2+</sup> balans bij hartfalen is verstoord. Een mogelijke oorzaak hiervan is een verminderde expressie van het SERCA2a eiwit in de hartspiecellen. De verstoorde Ca<sup>2+</sup> balans kan leiden tot systolisch en diastolisch hartfalen.<sup>2</sup> In het eerste geval trekt de hartspier minder krachtig samen, waardoor er minder bloed uit het hart gepompt wordt en in het tweede geval ontspant de hartspier zich niet goed tijdens de rustfase, waardoor de hartkamers zich niet goed vullen met bloed. Beide vormen komen vaak tegelijkertijd voor.<sup>3</sup> Het doel van de onderhavige studie is om de calciumbalans in de hartspiercellen te herstellen door expressie van het SERCA2a eiwit na introductie van het ggo.

### **1.3 Adeno-associated virus**

AAV behoort tot de familie *Parvoviridae* en het genus *Dependovirus*. Het is een enkelstrengs DNA virus met een genoom van circa 4,7 kb. Het genoom codeert voor twee genen, *rep* en *cap*. Het *rep* gen codeert voor eiwitten die een rol spelen bij de virusreplicatie, de expressie van de structurele eiwitten en de integratie van het virusgenoom in het genoom van de gastheer. Het *cap* gen codeert voor de structurele eiwitten, die de virusmantel vormen. De *rep* en *cap* genen worden geflankeerd door twee 'inverted terminal repeats' (ITR's), die betrokken zijn bij DNA-replicatie en integratie van het DNA in een chromosoom van de gastheer. Voor succesvolle replicatie van AAV is co-infectie met een helpervirus nodig, zoals een adenovirus of een herpesvirus.<sup>4,5,6</sup> Als er geen ander virus in de cel aanwezig is, blijft AAV latent in de celkern aanwezig, in afwachting van infectie door een helpervirus.

AAV kan verschillende warmbloedige dieren, inclusief de mens, infecteren.<sup>4</sup> Er zijn verschillende serotypen van AAV bekend die onder andere verschil vertonen in gastheerspecificiteit en weefseltropisme.<sup>5,7</sup> Infecties met AAV komen wereldwijd en frequent voor (80% van de humane populatie is seropositief voor AAV2), maar gaan voor zover bekend niet gepaard met ziekteverschijnselen.<sup>8</sup> Overdracht van het virus vindt waarschijnlijk plaats via de respiratoire of gastro-intestinale route.<sup>4</sup> AAV1 en AAV2 zijn door de COGEM geclassificeerd als klasse 2 pathogenen.<sup>9</sup>

### **1.4 AAV1/SERCA2a**

Het ggo genaamd AAV1/SERCA2a is afgeleid van een humaan *Adeno-associated virus* subtype 2 (AAV2). Deze AAV2 uitgangsvector mist de *rep* en *cap* sequenties, waardoor het virus replicatie-deficiënt is. De ITRs zijn de enige AAV2 sequenties die nog in de vector aanwezig zijn. Tussen deze ITRs is de SERCA2a expressiecassette geplaatst. Deze expressiecassette bevat, naast de SERCA2a sequentie, een humaan *Cytomegalovirus* 'immediate early enhancer/promoter' gevolgd door een chimeer intron afkomstig van het plasmide pCI. Volgens de aanvrager bestaat dit intron uit de 5' donor site van het eerste intron van het humane  $\beta$  globuline gen en de 3' acceptor site van een immunoglobuline 'heavy chain variable region'. De CMV promotor zorgt voor constitutieve expressie van de SERCA2a sequentie en het chimère intron wordt gebruikt om de transcriptie en translatie van het transgen te verbeteren. Voor effectieve translatie van het SERCA2a mRNA transcript wordt een polyadenylatiesignaal gebruikt afkomstig van het 'Bovine growth hormone' (BGHpA).

## 1.5 Productie van het ggo

De productie van de virale vector vindt plaats in de Verenigde Staten onder verantwoordelijkheid van Celladon Corporation. Hiervoor worden HeLa S3 cellen gebruikt die stabiel getransfecteerd zijn met een p-TPK-ABG12 plasmide. Dit plasmide bevat vijf elementen, die hieronder beschreven zijn. Als helper virus wordt een wild-type *Adenovirus* type 5 gebruikt.

### *Elementen p-TPK-ABG12 plasmide*

- AAV1/SERCA2a vector genoom, bestaande uit de CMV promotor, chimeer intron, SERCA2a sequentie, BGH poly A signaal en de AAV2 ITRs.
- Een AAV2-rep/AAV1-cap packaging cassette.
- Een puromycine resistentiegen (Puro<sup>R</sup>) onder controle van een *Simian virus 40* (SV40) promotor.
- Een kanamycine resistentiegen (Npt-II, Kan<sup>R</sup>) onder controle van de *Escherichia coli* transposon Tn5 promotor.
- Een colE1 '*bacterial origin of replication*' (colE1 ori).

De uiteindelijke vector bevat het AAV1/SERCA2a vector genoom en een mantel bestaande uit wild-type AAV1 eiwitten. Hierdoor is het tropisme van de vector beperkt tot spierweefsel, zoals hartspiercellen en skeletspieren.<sup>10</sup>

## 1.6 Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in 2005 geadviseerd over de mogelijke risico's voor mens en milieu van een klinische studie met een *Adeno-associated* virale vector, waarin een gen gekloneerd is dat codeert voor het lipoproteïne lipase (LPL).<sup>11</sup> Om de minimale kans op replicatie en verspreiding van de vector te beperken, was de COGEM van mening dat patiënten met klinische symptomen van een herpes- of adenovirusinfectie van de studie uitgesloten moesten worden. Tevens dienden mannelijke patiënten gebruik te maken van fysieke anticonceptie totdat er na een periode van 75 dagen gedurende drie opeenvolgende testen geen vector-DNA in het sperma kon worden aangetoond. Tot slot adviseerde de COGEM om behandelde patiënten uit te sluiten van donatie van weefsels en cellen voor transplantatie. Met inachtneming van de genoemde voorschriften achtte de COGEM de risico's voor mens en milieu van deze klinische studie verwaarloosbaar klein.

## 2. Opzet van het onderzoek

De klinische studie met AAV1/SERCA2a zal plaatsvinden in het Academisch Medisch Centrum te Amsterdam. Tijdens de studie krijgen 10 patiënten een enkele dosis van  $1 \times 10^{13}$  viruspartikels in de kransslagader gespoten. De toediening van de vector vindt plaats via '*Antegrade Epicardial Coronary Artery Infusion*' (AECAL). Ongeveer 25 minuten voor de injectie krijgen de patiënten een dosis nitroglycerine toegediend om de bloedvaten te verwijden. Dit zal volgens de aanvrager de opname van het ggo in het hart bevorderen. Tijdens de toediening zal gewerkt worden volgens de richtlijn van de Werkgroep Infectiepreventie (WIP) "Veilig werken, Radiodiagnostiek en hartkatheterisatie". Alleen getraind medisch personeel zal de toediening van het ggo uitvoeren.

Het ggo wordt in de ziekenhuisapotheek in een veiligheidskabinet van klasse II voorbereid. Tijdens de preparatie en de toediening van het ggo dragen de medewerkers handschoenen, een veiligheidsbril, maskers en beschermende kleding. De spuiten met het ggo worden in een afgesloten plastic zak in een lekvrije, afgesloten container vervoerd naar het hartkatheterisatielaboratorium waar de injectie van het ggo zal plaatsvinden. De aanvrager geeft aan dat er in het laboratorium wordt gewerkt volgens de richtlijnen die gelden voor BSL-1 en BSL-2 organismen.

Tijdens de toediening wordt de spuit aangesloten op een pomp en verbonden met de infusiebuisjes. Na toediening van het ggo aan de patiënt zullen standaard ziekenhuis hygiënische maatregelen worden genomen. Behandelde patiënten dienen een nacht te verblijven in het ziekenhuis zoals gebruikelijk is voor patiënten die een hartkatheterisatie hebben ondergaan.

Volgens de aanvrager worden er op verschillende tijdstippen bloed en urinemonsters verzameld. De eerste afname vindt dertig dagen vóór de behandeling plaats en vervolgens op dag 0 (vlak voor toediening) en 1, 3, 6, 9, 12 en 15 maanden na toediening. Na deze periode vindt controle elke volgende 3 maanden na behandeling plaats totdat de studie gesloten wordt.

## **2.1 Geschiedenis van veilig gebruik**

De veiligheid en effectiviteit van de AAV1/SERCA2a vector is in verschillende dieren, waaronder ratten, varkens en schapen getest.<sup>12,13,14</sup> In geen van deze studies zijn schadelijke effecten van het ggo waargenomen. In 2009 is er in de VS een fase 1 klinische studie met AAV1/SERCA2a uitgevoerd waarbij 3 groepen van 3 patiënten met hartfalen een dosis van respectievelijk  $1,4 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$  of  $3 \times 10^{12}$  virale partikels kregen toegediend.<sup>15</sup> Als vervolg hierop is er in 2011 een fase 2 studie uitgevoerd waarbij 39 patiënten verdeeld over 4 groepen een placebo, een lage dosis ( $6 \times 10^{11}$ ), een gemiddelde dosis ( $3 \times 10^{12}$ ) of een hoge dosis ( $1 \times 10^{13}$ ) van de vector kregen toegediend.<sup>16</sup> Uit deze studies kwam naar voren dat de vector goed getolereerd werd en dat de vector geen nadelige effecten had voor de patiënt.

## **3. Overweging en advies**

In de onderhavige aanvraag wordt de replicatie-deficiënte vector AAV1/SERCA2a toegediend aan patiënten met hartfalen. Mogelijke risico's die hierbij kunnen optreden hebben betrekking op de pathogeniteit van het ggo, de mogelijke verspreiding van het ggo in het milieu en de eventuele vorming van nieuwe recombinante virussen. Door de verspreiding zouden andere personen dan de deelnemende patiënten geïnfecteerd kunnen worden met het ggo of met een recombinant virus.

### **3.1 Pathogeniteit en karakterisatie van het ggo**

In februari 2013 heeft de COGEM een advies uitgebracht met daarin de criteria voor de moleculaire karakterisering van ggo's voor toepassing in klinische of veterinaire studies.<sup>17</sup> In dit advies onderscheidt de COGEM verschillende aspecten van de karakterisering. Het eerste aspect betreft de karakterisering van het uitgangsgenoom, het tweede aspect betreft de moleculaire karakterisering van de beoogde modificatie en het laatste aspect betreft de eventuele aanwezigheid van mogelijke onbedoelde wijzigingen. Om inzicht te verkrijgen in bovengenoemde aspecten prefereert de COGEM een sequentieanalyse van het gehele genoom van het ggo.<sup>17</sup>

### **3.1.1 Pathogeniteit**

De in onderhavige studie gebruikte virale vector is gebaseerd op een laag pathogeen oudervirus. De vector bevat de ITRs van het wild-type AAV2 die nodig zijn voor het inpakken van het genetische materiaal in een virusdeeltje. De *rep* en *cap* sequenties zijn verwijderd en vervangen door het gen dat codeert voor SERCA2a. Hierdoor kan de gg-vector alleen nog cellen infecteren, maar niet meer repliceren.

### **3.1.2 Karakterisatie**

De volledige genoomsequentie van AAV1/SERCA2a is aangeleverd en hieruit blijkt dat de ITRs onveranderd aanwezig zijn en dat de sequentie van het gehele insert is bevestigd. Er zijn geen aanwijzingen dat er onbedoelde wijzigingen in het genoom van de vector zijn ontstaan. De COGEM is daarom van mening dat de moleculaire karakterisering van AAV1/SERCA2a volledig is.

### **3.2 Shedding**

Na toediening van de virale vector mag de patiënt binnen 24 uur het ziekenhuis verlaten. Hierdoor kan het ggo zowel in het ziekenhuis als in de thuissituatie of elders in het milieu worden uitgescheiden. De aanvrager verwacht dat de AAV1/SERCA2a deeltjes tot maximaal 1 week na toediening uitgescheiden kunnen worden in urine, speeksel, bloed of sperma. De aanvrager baseert zich op vergelijkbare klinische studies waarbij recombinante AAV vectoren zijn toegediend aan patiënten met hemofilie (intramusculaire injectie), lipoproteïne lipase deficiëntie (intramusculaire injectie) en cystische fibrose (toediening via een inhaler).<sup>18,19,20</sup> Verder zou de vector tijdens de preparatie gemorst kunnen worden of tijdens de toediening aan de patiënt vrij kunnen komen.

Hoewel de kans op uitscheiding aanwezig is, acht de COGEM de nadelige effecten die hieraan verbonden zijn verwaarloosbaar klein. De vector is apathogeen en kan niet repliceren. Daarnaast bevat de vector een humane SERCA2a sequentie die van nature in menselijke cellen voorkomt. De vector kan zich na uitscheiding niet verder verspreiden, omdat het naast een helpervirus ook de *rep* en *cap* sequenties nodig heeft voor replicatie. Om de kans op verspreiding naar derden te beperken, wordt de behandelde patiënten door de aanvrager gevraagd effectieve anticonceptie in acht te nemen gedurende de eerste drie maanden na behandeling. Ook zijn zwangere vrouwen en vrouwen die borstvoeding geven uitgesloten van deelname. Verder zal de vector niet toegepast worden wanneer er klinische aanwijzingen zijn voor een actieve virale infectie.

### **3.3 Recombinatie en complementatie**

Het ggo wordt geproduceerd in HeLa S3 cellen die stabiel getransfecteerd zijn met het p-TPK-ABG12 plasmide dat vijf verschillende expressiecassettes bevat. De aanvrager geeft aan dat recombinatie tijdens het productieproces mogelijk kan leiden tot replicatiecompetent AAV (rcAAV). Daarnaast kunnen er tijdens het productieproces AAV deeltjes ontstaan, waarin gastheercel sequenties (zoals E6 en 18S rDNA) of productiesysteem gerelateerde sequenties (zoals *rep*, *cap*, Puro<sup>R</sup>, Kan<sup>R</sup>, E2A) terecht gekomen zijn.

### 3.3.1 rcAAV

De aanvrager geeft aan dat de aanwezigheid van rcAAV in een batch gecontroleerd zal worden met een 'quantitative real time PCR' (qPCR). Deze qPCR assay heeft een detectielimiet van 30 rcAAV per  $1 \times 10^{11}$  virusdeeltjes. Met deze gevoeligheid zouden er bij een negatieve PCR theoretisch gezien minder dan 3000 rcAAV partikels in een dosis van  $1 \times 10^{13}$  kunnen zitten.

De COGEM acht de kans op aanwezigheid van rcAAV in een batch verwaarloosbaar klein, omdat er voor productie van de vector een stabiele cellijn wordt gebruikt waarin het packaging plasmide is geïntegreerd. Voor het ontstaan van rcAAV moeten er meerdere recombinaties optreden.

In het onwaarschijnlijke geval er toch rcAAV partikels in een batch aanwezig zijn, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein vanwege het laag pathogene karakter van de uitgangsvirussen en vanwege het feit dat de vector voor zijn replicatie en verspreiding ook nog afhankelijk is van een helpervirus.

### 3.3.2 Aanwezigheid van niet vector gerelateerde sequenties

Naast de aanwezigheid van rcAAV partikels wordt een batch gecontroleerd op de aanwezigheid van niet-vector gerelateerde sequenties via verschillende qPCR assays. Uit deze assays blijkt dat in iedere batch een hele lage hoeveelheid niet-virusvector gerelateerde sequenties ingepakt worden in mantelwitte (3 tot 5 log lager dan het AAV1/SERCA2a deeltje). Deze sequenties zijn hoofdzakelijk afkomstig van de p-TPK-ABG12 plasmide die gebruikt wordt voor de productie van de virale vector. Dit is een bekend fenomeen voor recombinante AAV vectoren dat ook in andere klinische studies is gezien.<sup>21</sup>

De aanwezigheid van heterologe sequenties in aparte partikels leidt volgens de COGEM niet tot risico's voor mens en milieu, omdat deze sequenties geen selectief voordeel opleveren en zich niet verder kunnen verspreiden. Op basis van deze gegevens acht de COGEM de risico's van aanwezigheid van niet-vector gerelateerde sequenties in een virusbatch verwaarloosbaar klein.

### 3.3.3 Recombinatie/complementatie in patiënt

Na toediening van het ggo aan de patiënt kan in aanwezigheid van wild-type AAV en helpervirus recombinatie of complementatie optreden. Bij recombinatie tussen de ITRs van de vector en wild-type AAV kunnen de *rep* en *cap* sequenties van het wild-type AAV uitgewisseld worden met de SERCA2a expressiecassette van het ggo. In deze situatie ontstaat er geen nieuw recombinant virus. De nieuw ontstane virusdeeltjes zijn gelijk aan het ggo of het wild-type AAV.

Bij complementatie kunnen er theoretisch gezien nieuwe gg-deeltjes ontstaan. Echter, de kans dat er in één hartspiercel zowel AAV1/SERCA2a, wild-type AAV en helpervirus aanwezig is acht de COGEM verwaarloosbaar klein. Temeer omdat de vector niet wordt toegediend wanneer er aanwijzingen zijn voor een actieve virale infectie. Om die reden acht de COGEM het risico op complementatie verwaarloosbaar klein.

## 4. Conclusie

De COGEM is van mening dat de AAV1/SERCA2a vector apathogeen is. Daarnaast is de moleculaire karakterisering van de vector volledig. De COGEM acht de kans op uitscheiding aanwezig. Om de



eventuele nadelige effecten van uitscheiding te minimaliseren acht de COGEM de volgende voorschriften van belang:

- Patiënten dienen effectieve anticonceptie in combinatie met een barrièremiddel in acht te nemen gedurende de eerste drie maanden na behandeling.
- De vector zal niet toegepast worden wanneer er klinische aanwijzingen zijn voor een actieve virale infectie.
- De behandelde patiënten worden uitgesloten van donatie van bloed, cellen en weefsels.

Onder navolging van deze voorschriften en op basis van het apathogene -en replicatiedeficiënte karakter van de vector, acht de COGEM de risico's van uitscheiding verwaarloosbaar klein. Verder is de COGEM van mening dat de kans op het ontstaan van recombinant virus tijdens de productiefase of na toediening in de patiënt verwaarloosbaar klein is.

Concluderend is de COGEM van mening dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met een de AAV1/SERCA2a vector verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). Hartfalen: epidemiologie, risicofactoren en toekomst. RIVM Rapport 260401006/2012.
2. Gwathmey JK *et al.* (2011). Cardiac gene therapy with SERCA2a: From bench to bedside. *J Mol Cell Cardiol.* 50: 803-12.
3. Muntinga HJ *et al.* (1995). Diastolische dysfunctie van de linker ventrikel als oorzaak van hartfalen: een klinisch probleem. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 139:2023-8.
4. Muzyczka N & Berns KI (2001). Parvoviridae: The viruses and their replication. In: *Fields virology*, volume 2, fourth edition. Edited by Knipe DM en Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia 2333-2359.
5. Tijssen P *et al.* (2012). Family Parvoviridae In: *Virus Taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Edited by King AMQ *et al.* Academic Press, San Diego 405-425.
6. Smith-Arica JR & Bartlett JS (2001). Gene therapy: recombinant adeno-associated virus vectors. *Current cardiology reports* 3: 43-49.
7. Zincarelli C *et al.* (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther.* 16:1073-1080.
8. Gonçalves MA *et al.* (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology* 337: 43-51.
9. COGEM (2012). Classificaties van humaan- en dierpathogene virussen. Advies CGM/120301-01.
10. Zincarelli C *et al.* (2008). Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther.* 16: 1073-80.
11. COGEM (2005). Gentherapie van lipoproteïne lipase (LPL) deficiënte patiënten met een adeno-associated virale vector coderend voor het LPL-eiwit (AMT-010). Advies CGM/050530-01.
12. Kawase Y *et al.* (2008). Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure. *J Am Col Cardiol* 51: 1112-1119.
13. Sakata S *et al.* (2007) Restoration of mechanical and energetic function in failing aortic banded rat

- hearts by gene transfer of calcium cycling proteins. *J Mol Cell Cardiol* 42: 852-61.
14. Byrne M *et al.* (2008). Recirculating cardiac delivery of AAV2/1SERCA2a improves myocardial function in an experimental model of heart failure in large animals. *Gene Ther* 15: 1550-1557.
  15. Jaski BE *et al.* (2009). Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial. *J Card Fail.* 15:171-81.
  16. Jessup M *et al.* (2011) Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation.* 2011 124: 304-13.
  17. COGEM (2013). Criteria voor moleculaire karakterisering van ggo's voor toepassing in klinische of veterinaire studies. Advies CGM/130227-05.
  18. Aitken, M *et al.* (2001). A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to CF subjects with mild lung disease." *Hum Gene Ther* 12: 1907-1916.
  19. Manno, C *et al.* (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 101: 2963-2972.
  20. Moss, R *et al.* (2004). Repeated Adeno-Associated Virus Serotype 2 Aerosol-Mediated Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Gene Transfer to the Lungs of Patients With Cystic Fibrosis. *Chest* 125: 509-521.
  21. Hauck B *et al.* (2009). Undetectable transcription of cap in a clinical AAV vector: implications for performed capsid in immune responses. *Mol Ther.* 17: 144-52