

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw S.A.M. Dijkma
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 31 augustus 2016
KENMERK CGM/160831-01
ONDERWERP Advies 'Inschaling werkzaamheden genetisch gemodificeerd AAV in associatie met apen'

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 16-174_2.8-000 getiteld 'The function of primary visual cortex in visual perception' ingediend door het Nederlands Herseninstituut, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag betreffende onderzoek naar het gezichtsvermogen van resusapen. Hiervoor wil de aanvrager de hersenen van de dieren infecteren met niet-replicerende genetisch gemodificeerde (gg-) virusdeeltjes die gebaseerd zijn op het adeno-associated virus (AAV). In het gg-AAV is onder meer genetische informatie ingebracht die de lichtgevoeligheid in de hersenen beïnvloedt. De aanvrager wil de apen op DM-III inperkingsniveau in een veiligheidskabinet met gg-AAV infecteren, en verzoekt de dieren zeven dagen na injectie naar D-I inperkingsniveau over te mogen plaatsen.


AAV is een virus dat de meeste gewervelde dieren kan infecteren, maar geen ziekte veroorzaakt. Het virus replicateert alleen als er in de geïnfecteerde cel tevens co-infectie met een helpervirus plaatsvindt. De gg-virussen missen enkele genen, waardoor zij voor vermenigvuldiging niet alleen een helpervirus, maar ook wildtype AAV nodig hebben.

Onder inachtneming van de voorgenomen werkvoorschriften, kan de COGEM instemmen met de door de aanvrager aangevraagde werkzaamheden. Zij acht het daarbij in de praktijk niet mogelijk te garanderen dat de apen vrij zijn van wildtype AAV en helpervirus. In plaats daarvan adviseert de COGEM dieren die verschijnselen vertonen die geassocieerd kunnen worden met een actieve helpervirusinfectie, van de studie uit te sluiten. Tevens acht zij het noodzakelijk dat voor terugplaatsing naar het lagere D-I niveau de afwezigheid van gg-AAV in het bloed van de apen met een test wordt bevestigd. Onder in achtneming van de aanvullende voorschriften, acht de COGEM de milieurisico's verwaarloosbaar klein als de apen zeven dagen na de toediening van gg-AAV op D-I inperkingsniveau worden gehuisvest.



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

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

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

Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd AAV in associatie met resusapen

COGEM advies CGM/160831-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag getiteld ‘The function of primary visual cortex in visual perception’ (IG 16-174) ingediend door het Nederlands Herseninstituut te Amsterdam. Binnen het onderzoeksproject zal gebruik worden gemaakt van virale transductie-systemen gebaseerd op replicatie-deficiënt genetisch gemodificeerd adeno-associated virus (gg-AAV) serotype 1, 2, 5 en 6. Het gg-AAV bevat onder meer genen coderend voor lichtgevoelige ion-kanalen. De aanvrager wil de gg-AAV deeltjes injecteren in de hersenen van resusapen en vervolgens de invloed van licht op de visuele perceptie onderzoeken. De onderhavige vergunningsaanvraag betreft het verzoek om de apen een week na toediening van het gg-AAV van DM-III naar D-I inperkingsniveau te mogen overbrengen.

2. Adeno-associated virus

AAV behoort tot de familie *Parvoviridae* en het genus *Dependoparvovirus*. Binnen dit genus worden op basis van serotype en genoomstructuur verschillende AAV species en subspecies onderscheiden die gastheer specifiek zijn.^{1,2,3} AAV serotypes 1 tot en met 4 behoren tot het species *Adeno-associated dependoparvovirus A* en AAV serotype 5 behoort tot het species *Adeno-associated dependoparvovirus B*. AAV serotypes 6 tot en met 9 zijn tot op heden nog niet als aparte species of subspecies erkend en nog niet binnen een genus ondergebracht.^{1,2,3}

AAV soorten zijn enkelstrengs DNA virussen met een genoom van circa 4,7 kilobasen. Het genoom bevat 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 eveneens betrokken zijn bij de DNA-replicatie en integratie van het DNA in het genoom van de gastheer.^{4,5} Voor succesvolle replicatie van AAV is co-infectie van een helpervirus nodig, zoals een adenovirus of een herpesvirus.^{3,4} Als er geen ander virus in de cel aanwezig is, blijft AAV latent intra- of extra-chromosomaal in de celkern aanwezig, in afwachting van infectie door een helpervirus.⁴

AAV kan bijna alle gewervelde dieren infecteren, onder meer de mens. Virale sequenties worden in veel verschillende weefsels aangetroffen.^{4,6} Infecties met het virus komen wereldwijd en frequent voor (80% van de humane populatie is seropositief voor het subspecies AAV-2), maar gaan voor zover bekend niet gepaard met ziekteverschijnselen.^{4,5} Overdracht van het virus vindt waarschijnlijk plaats via de respiratoire, gastro-intestinale of seksuele route.⁴

3. Productiesysteem en samenstelling replicatie-deficiënte gg-AAV deeltjes

Voor het onderzoek zal de aanvrager gebruik gaan maken van vier verschillende replicatie-deficiënte gg-AAV-deeltjes die de manteeiwitten van AAV-1, AAV-2, AAV-5 of AAV-6 bevatten. De

virusdeeltjes worden extern geproduceerd met behulp van twee verschillende productiesystemen.

Het ene productiesysteem is gebaseerd op de co-transfectie van HEK 293T cellen met plasmide pAAV, en helper plasmides pXR2 (of equivalenten hiervan) en pXX6 (of equivalenten hiervan). Het pAAV plasmide bevat een CAG of CAMkIIa promotor, de ITR's van AAV, de te expresseren genen van interesse, en het 'Woodchuck Hepatitis Posttranscriptional Regulatory Element' (WPRE) element. Het WPRE element codeert niet voor een genproduct, maar heeft als functie het transport van mRNA vanuit de celkern efficiënter te laten verlopen.⁷ Het pXR2 plasmide bevat de voor de productie benodigde *rep* en *cap* genen van de verschillende AAV serotypes, en het pXX6 plasmide bevat de benodigde *Adenovirus* serotype 5 helperfuncties VA, E2A en E4.^{8,9}

Het andere productiesysteem maakt gebruik van gg-baculovirus en insectencellen. Dit systeem is beschreven door Urabe *et al.*¹⁰ De aanvrager geeft aan dat hierbij dezelfde replicatie-deficiënte gg-AAV deeltjes worden gegenereerd als beschreven onder het eerstgenoemde productiesysteem, en onderbouwt dit met literatuurgegevens.¹⁰

De aanvrager stelt dat beide productiesystemen vrij zijn van wildtype AAV of helpervirussen waardoor er tijdens de productie geen recombinatie tot replicatie-competent gg-AAV kan plaatsvinden.

De productiesystemen genereren replicatie-deficiënte gg-AAV deeltjes die alleen de genetische informatie van de ITR's van AAV, regulatoire sequenties, en transgenen bevatten, en daarnaast omhuld worden door manteleiwitten. De transgenen coderen voor eiwitten die betrokken zijn bij de normale fysiologische activiteit van het brein. De sequenties zijn afkomstig van zoogdieren, vissen en vogels. Daarnaast coderen de transgenen voor fluorescente markers en lichtgevoelige ionkanalen. De productie van de virusdeeltjes valt niet onder de voorliggende vergunningsaanvraag.

4. Aard van de werkzaamheden

De aanvrager is van plan de hersenen van resusapen (*Macaca mulatta*) diverse malen te infecteren met de hierboven beschreven replicatie-deficiënte gg-AAV deeltjes. Daartoe zullen de apen eerst worden geopereerd. Bij deze operatie wordt de schedel geopend, en ter plekke van de opening een 'recording chamber' aangebracht, zoals beschreven door Yazdan-Shamorad *et al.*¹¹ Deze 'recording chamber' zorgt ervoor dat het hersenweefsel is afgesloten van het externe milieu waardoor contact met de omringende lucht en daarin aanwezige ziektekiemen voorkomen wordt. Via de 'chamber' kunnen in een later stadium het gg-AAV worden toegediend en diverse metingen worden verricht.

De aanvrager geeft aan dat AAV is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2, waardoor de uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden in associatie met dieren op DM-II inperkingsniveau uitgevoerd zouden kunnen worden. Echter, aangezien de apen niet in filtertopkooien kunnen worden gehuisvest, zal de toediening van het gg-AAV en de huisvesting uit voorzorg op DM-III inperkingsniveau plaatsvinden. Tijdens de toediening zullen de apen binnen een stereotactisch frame in een veiligheidskabinet worden geplaatst. De in te brengen dosis replicatie-deficiënt gg-AAV zal maximaal 2×10^{11} deeltjes per aap bedragen. De aanvrager geeft aan dat de infectie zal resulteren in een lokale transductie van neuronen en gliacellen, en niet tot integratie van gg-AAV in het genoom.

Een uur na de eerste toediening zal bloed van de apen worden afgenomen. De apen zullen vervolgens zeven dagen binnen de DM-III faciliteit worden verzorgd waarna opnieuw bloed zal worden afgenomen. De aanvrager geeft aan dat alle medewerkers in de DM-III faciliteit een bril en mond/neuskapje dragen, waardoor de kans op kruiscontaminatie en blootstelling van de apen aan wildtype AAV of helpervirussen wordt voorkomen. De aanvrager is van mening dat er hierdoor geen complementatie of recombinatie tot replicatie-competent gg-AAV kan plaatsvinden.

De bloedmonsters zullen met behulp van een 'nested' PCR worden geanalyseerd. Deze PCR detecteert het WPRE element, dat in alle geproduceerde replicatie-deficiënte gg-AAV varianten aanwezig is. De aanvrager stelt dat de detectielimiet van deze PCR 125 gg-AAV genoomkopieën per ml bloed bedraagt en levert validatiegegevens aan. Als na zeven dagen geen kopieën van het WPRE element in het bloed worden gedetecteerd, acht de aanvrager aangetoond dat de apen vrij zijn van gg-AAV. Alleen bij een negatieve PCR-uitslag zullen de apen in aanmerking komen voor overplaatsing naar D-I inperkingsniveau.

5. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft drie keer eerder geadviseerd over laboratoriumwerkzaamheden met gg-AAV in associatie met dieren (ratten en muizen).^{12,13,14}

In 2002 heeft de COGEM positief geadviseerd over een verzoek om AAV-2 vectoren buiten een veiligheidskabinet van klasse II (VK-II kabinet) in de hersenen van ratten te mogen injecteren.¹² Hoewel de COGEM van mening was dat aërosolvorming en verspreiding van het gg-AAV niet geheel uitgesloten kon worden, achtte zij het door de aard van de vector en de verwaarloosbaar kleine kans op de aanwezigheid van replicatie-competent gg-AAV onwaarschijnlijk dat de veiligheid van mens en milieu in het geding was. Om ook gedurende het experiment de kans op het ontstaan van replicatie-competent AAV te minimaliseren, adviseerde zij de volgende aanvullende voorschriften:

- gedurende de werkzaamheden dienen de medewerkers een neus- en mondkapje te dragen
- aërosolvorming moet zoveel mogelijk worden voorkomen
- de ratten dienen direct na injectie in filtertopkooien geplaatst te worden
- de DM-II ruimte moet tijdens de handelingen afgesloten zijn.

De geïnjecteerde dieren waren conform de classificatie van AAV gehuisvest op DM-II inperkingsniveau. De aanvrager verzocht de dieren een week na injectie op D-I niveau te mogen huisvesten, als de aanwezigheid van AAV deeltjes na deze periode niet meer aangetoond kon worden. De COGEM achtte het risico van deze omlaagschaling verwaarloosbaar klein op basis van het feit dat de vector replicatie-deficiënt is en op basis van de aangeleverde PCR resultaten, waaruit kon worden afgeleid dat een week na injectie de hoeveelheid vector minimaal is.

In 2009 heeft de COGEM advies uitgebracht over een verzoek van dezelfde aanvrager. Deze verzocht de hiervoor beschreven PCR test voorafgaand aan de terugplaatsing naar D-I inperkingsniveau van muizen en ratten die met gg-AAV-1 geïnjecteerd werden, achterwege te mogen laten.¹³ Op basis van de gegevens van de aanvrager en aanvullende literatuur bleek AAV in bloed van ratten en muizen snel

afgebroken te worden (een halfwaardetijd van ongeveer een uur). Tevens kon de aanvrager één uur na injectie van gg-AAV in de hersenen van deze dieren geen virus detecteren in de bloedbaan. Op basis van deze gegevens achtte de COGEM de PCR test overbodig en adviseerde zij positief over het wijzigingsverzoek.

In 2012 heeft de COGEM positief geadviseerd over een verzoek om op DM-II inperkingsniveau AAV-5 en AAV-6 vectoren buiten een VK-II kabinet in muizen te mogen injecteren.¹⁴ Tevens adviseerde zij positief over het verzoek de muizen zeven dagen na injectie naar D-I inperkingsniveau over te mogen brengen. Bij een toedieningsdosis van 10^9 genoomkopieën gg-AAV achtte zij daarbij een PCR-test op AAV-DNA in bloed overbodig omdat op basis van de gegevens van de aanvrager en aanvullende literatuur bleek dat AAV in bloed van ratten en muizen snel wordt afgebroken. Bij hogere toedieningsdoses achtte de COGEM het wel van belang dat eerst met PCR reproduceerbaar werd aangetoond dat er geen gg-AAV meer in de bloedbaan aanwezig was, alvorens tot terugplaatsing naar D-I kon worden overgegaan.

Om gedurende het experiment de kans op het ontstaan van replicatie-competent AAV te minimaliseren, adviseerde zij de volgende aanvullende voorschriften:

- het productiesysteem is vrij van wildtype AAV en helpervirussen
- de injectiespuit wordt vooraf gevuld in een VK-II kabinet
- aërosolvorming moet zoveel mogelijk worden voorkomen
- gedurende de werkzaamheden dienen de medewerkers een neus- en mondkapje te dragen
- de kans op besmetting van de ogen wordt tot een minimum beperkt

6. Overwegingen

Het milieurisico van de voorliggende te beoordelen werkzaamheden, wordt onder meer bepaald door de kans dat er door complementatie en recombinatie replicatie-competent gg-AAV ontstaat, en dat gg-AAV door de apen wordt uitgescheiden en zich vervolgens verspreidt.

6.1 Kans op uitscheiding van gg-AAV

Het gg-AAV zal rechtstreeks toegediend worden aan de hersenen. Alvorens de aap gg-AAV kan uitscheiden, zal dit eerst in de bloedbaan terecht moeten komen. Voor zover bij de COGEM bekend, is AAV niet in staat de hersen/bloedbaan barrière te passeren. Alleen van AAV-9 is beschreven dat er in neonatale muizen via de omgekeerde route (dus van de bloedbaan naar de hersenen), viruspassage kan plaatsvinden.¹⁵ De COGEM merkt op dat gg-AAV eventueel in de bloedcirculatie terecht zou kunnen komen als er door virusreplicatie grote hoeveelheden virus zouden ontstaan en er via beschadigde bloedvaten lekkage zou optreden. Aangezien het hier echter een replicatie-deficiënte vector betreft, acht de COGEM de kans dat dit gebeurt verwaarloosbaar klein.

De COGEM kan niet volledig uitsluiten dat bijvoorbeeld ten gevolge van kleine beschadigingen aan bloedvaatjes in de hersenen direct na toediening, gg-AAV in de bloedbaan terecht komt. De aanvrager stelt in zijn risicobeoordeling dat zeven dagen na de toediening, de hoeveelheid gg-AAV in het bloed van de apen ten gevolge van 'clearance' verwaarloosbaar zal zijn. Hij verwijst hiervoor naar eerdere

COGEM-adviezen,^{12,13,14} en literatuur over studies met AAV types 1 tot en met 9 in associatie met knaagdieren en resusapen.^{6,16,17}

In de studies beschreven in de literatuur werden grote hoeveelheden (variërend van 10^{10} tot 10^{12} genoomkopieën) direct in de bloedbaan, lever of hersenen van dieren ingespoten. Toediening van 10^{10} kopieën gg-AAV aan de hersenen van apen liet zien dat binnen vier dagen geen infectieus virus meer in de bloedbaan aanwezig was.¹⁷ Wel kon 14 dagen na toediening in één van de apen nog vector DNA in het bloed worden gedetecteerd. In een ander experiment kon na injectie van 10^{12} kopieën gg-AAV in de poortader na acht dagen geen AAV-DNA meer in de bloedbaan van apen gedetecteerd worden.¹⁶ Rechtstreekse toediening van 10^{11} kopieën gg-AAV aan de bloedbaan van muizen liet zien dat na 48 uur de reductie in vector DNA, afhankelijk van het AAV serotype, varieerde van een factor 10^3 tot 10^4 .⁶ Deze gegevens wijzen erop dat bij de voorgenomen werkzaamheden er na zeven dagen geen infectieus gg-AAV in het bloed van de apen aanwezig meer aanwezig zou zijn. Echter in een andere studie, waarbij apen in de bloedbaan geïnjecteerd werden met een gg-AAV (infectiedosis 10^{13} /kg lichaamsgewicht) bleek dat vector DNA tot 20 dagen (en soms langer) in onder meer bloed, feces en speeksel kon worden gedetecteerd.¹⁸

Gezien de tegenstrijdige gegevens in de literatuur (die deels verklaard kunnen worden door verschillende experimentele omstandigheden zoals de hoogte van de geïnjecteerde dosis, en het feit dat de aanwezigheid van vector DNA niet gelijk gesteld kan worden met de aanwezigheid van infectieus virus), is de COGEM van mening dat niet op voorhand volledig uitgesloten kan worden dat gg-AAV zeven dagen na toediening nog aanwezig is. Zij is daarom van mening de apen getest moeten worden op de aanwezigheid van gg-AAV alvorens ze teruggeplaatst kunnen worden naar D-I.

6.2 Kans op complementatie en recombinatie

Om te voorkomen dat de apen tijdens het experiment via kruisbesmetting met wildtype virussen in aanraking komen en er daardoor replicatie-competent gg-AAV ontstaat, zullen gedurende de periode dat de apen in de DM-III faciliteit gehuisvest zijn de medewerkers persoonlijke beschermingsmiddelen dragen (bril, mond/neuskapje). De COGEM is van mening dat deze maatregelen afdoende zijn om kruiscontaminatie met wildtype AAV of helpervirus, en daardoor het ontstaan van replicatie-competent gg-AAV, tegen te gaan.

De COGEM wijst er op dat bekend is dat een groot deel van de apen, net als de mens, geïnfecteerd is met virussen die als helper van AAV kunnen optreden, ook kunnen helpervirussen en AAV latent aanwezig zijn in primaten, of zijn primaten juist seropositief zonder dat de virussen nog aanwezig zijn.^{19,20,21,22,23} Het is daardoor niet mogelijk te werken met apen die gegarandeerd vrij zijn van AAV of virussen die als helper voor AAV kunnen optreden.

In theorie kan na toediening van gg-AAV in apen, replicatie-competent gg-AAV ontstaan wanneer het gg-AAV een cel die al met wildtype AAV en een helpervirus geïnfecteerd is, zou infecteren. Mede gezien het feit dat het gg-AAV in de hersenen wordt toegediend, acht de COGEM de kans op een dergelijk gebeurtenis verwaarloosbaar klein. Om deze kans verder te minimaliseren, acht zij het van belang om apen, die klinische verschijnselen vertonen die geassocieerd kunnen worden met een actieve infectie met adenovirus of herpesvirus (ooginfectie of koortslip), en daardoor grote

hoeveelheden helpervirus bij zich kunnen dragen, van de experimenten uit te sluiten. Dit is analoog aan de COGEM-adviezen over klinische studies bij de mens met replicatie-deficiënte gg-AAV vectoren.^{24,25,26,27}

6.3 Testen op afwezigheid AAV

De aanvrager geeft aan dat hij de afwezigheid van gg-AAV in het bloed nog zal confirmeren met behulp van een ‘nested-PCR’ die het ‘WRPE’ element van de gg-AAV partikels aantoonst. Op basis van de door de aanvrager aangeleverde gegevens, acht de COGEM de ‘nested-PCR’ gevoelig genoeg en afdoende om gg-AAV in het bloed aan te tonen.

7. Conclusie en Advies

Alles in overweging nemende is de COGEM van mening dat de risico’s voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn als de voorgenomen werkzaamheden met replicatie-deficiënt gg-AAV in associatie met apen volgens het aangeleverde protocol op DM-III niveau worden uitgevoerd. Zij acht het daarbij van belang dat de productiesystemen van de gg-vector vrij zijn van AAV en virussen (adenovirussen en herpesvirussen) die als helper voor AAV-replicatie kunnen optreden, en dat de betrokken medewerkers in de DM-III faciliteit een beschermende bril en een daartoe geëigend mond/neuskapje dragen.

De COGEM adviseert dat de apen zeven dagen na toediening van gg-AAV naar D-I inperkingsniveau overgeplaatst kunnen worden, mits met behulp van de voorgestelde PCR-test is aangetoond dat er geen gg-AAV detecteerbaar is. Verder is zij van mening dat de voorgenomen experimenten onder de gestelde voorwaarden ook uitgevoerd kunnen worden indien een hogere dosis in de hersenen toegediend wordt, en met AAV types die nauw verwant zijn aan AAV-1, -2, -5 en -6, zoals AAV serotype 8.

Tot slot merkt de COGEM op dat het in de praktijk niet haalbaar en mogelijk is om (in tegenstelling tot muizen en ratten) te garanderen dat de voor de werkzaamheden geselecteerde apen vrij zijn van AAV of helpervirus. In plaats daarvan adviseert zij apen die klinische verschijnselen vertonen die geassocieerd worden met een actieve infectie met adenovirus of herpesvirus (bijvoorbeeld ooginfecties of koortslip), van de studie uit te sluiten. Op deze wijze wordt de kans op eventuele replicatie van gg-AAV geminimaliseerd.

Samenvattend acht de COGEM onder inachtneming van de voorgestelde werkvoorschriften en bovenstaand aanvullend voorschrift de risico’s voor mens en milieu bij voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (2013).
http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/vertebrate-official/4844 (bezocht: 25 augustus 2016)

2. International Committee on Taxonomy of Viruses (2015). <http://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/5945> (bezocht: 25 augustus 2016)
3. 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
4. Berns KI & Parrish CR (2013). *Parvoviridae*. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
5. Gonçalves MA (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology J.* doi:10.1186/1743-422X-2-43
6. 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
7. Donello JE *et al.* (1998). Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J. Virol.* 72: 5085-5092
8. Rabinowitz JE *et al.* (2002). Cross packaging of a single Adeno-associated virus type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J. Virol.*: 791-801
9. Xiao X *et al.* (1998). Production of high-titer recombinant Adeno-associated virus vectors in the absence of helper Adeno virus. *J. Virol.*: 72: 2224-2232
10. Urabe M *et al.* (2002). Insect cells as a factory to produce Adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum. Gene Ther.* 13: 1935-1943
11. Yazdan-Shamorado A *et al.* (2016). A large-scale interface for optogenetic stimulation and recording in nonhuman primates. *Neuron*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01013>
12. COGEM (2002). Kennisgeving GGO 00-114/1. COGEM advies CGM/020319-01
13. COGEM (2009). *In vivo* experimenten met een vector gebaseerd op adeno-associated virus. COGEM advies CGM/091130-05
14. COGEM (2012). Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd AAV in muizen. COGEM advies CGM/121122-02
15. Manfredsson FP *et al.* (2009). AAV-9: a potential blood-brain barrier buster. *Molec. Ther.* 17: 403-404
16. Ciron C *et al.* (2009). Human α -iduronidase gene transfer mediated by adeno-associated virus types 1, 2, and 5 in the brain of nonhuman primates: vector diffusion and biodistribution. *Human Gene Ther.* 20: 350-360
17. Nathwani AC *et al.* (2015). Sustained high-level expression of human factor DC (hFIX) after liver-targeted delivery of recombinant adeno-associated virus encoding the hFIX gene in rhesus macaques. *Blood* 100: 1662-1669
18. Paneda A *et al.* (2013). Safety and liver transduction efficacy of raav5-*cohpbgd* in nonhuman primates: a potential therapy for acute intermittent porphyria. *Human Gene Ther.* 24:1007-1017
19. Hernandez YJ *et al.* (1999). Latent adeno-associated virus infection elicits humoral but not cell-mediated immune responses in a nonhuman primate model. *J. Virol.* 73: 8549-8558
20. Roy S *et al.* (2012). Adenoviruses in fecal samples from asymptomatic rhesus macaques, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 18: 1081-1088
21. Huff JL & Barry PA (2003). B-virus (*Cercopithecine herpesvirus 1*) infection in humans and macaques: potential for zoonotic disease. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 246-250

22. Estep RD *et al.* (2010). Simian herpesviruses and their risk to humans. *Vaccine* 28, suppl 2: B78-B84
23. Tenenbaum L *et al.* (2003). Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. *Curr. Gene Ther.* 3: 545-565
24. COGEM (2005). Ontwerpbeschikking IM 05-001. COGEM advies CGM/050531-01
25. COGEM (2013). Een fase 2b klinische studie met gg-AAV ter behandeling van patiënten met hartfalen. COGEM advies CGM/130603-01
26. COGEM (2015). Een fase I/II klinische studie met gg-AAV ter behandeling van patiënten met ernstige tot matig ernstige hemofilie B. COGEM advies CGM/150617-01
27. COGEM (2016). Klinische studie met genetisch gemodificeerd adeno-associated virus ter behandeling van patiënten met reumatoïde artritis. COGEM advies CGM/160719-02