

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

BEZOEKADRES:
A. VAN LEEUWENHOEKLAAN 9
3721 MA BILTHOVEN

POSTADRES:
POSTBUS 578
3720 AN BILTHOVEN

TEL.: 030 274 2777
FAX: 030 274 4476
INFO@COGEM.NET
WWW.COGEM.NET

DATUM 8 november 2016
KENMERK CGM/161108-01
ONDERWERP Advies 'Inschaling van gg-AAV geïnfecteerde (weefsels van) muizen en ratten'

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 16-267_2.8-000 getiteld 'Werkzaamheden met replicatie deficiënt AAV in proefdieren; omlaagschaling naar D-I' ingediend door het Nederlands Herseninstituut, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met niet-replicerend genetisch gemodificeerd (gg-) adeno-associated virus (AAV) in combinatie met muizen en ratten. De gg-AAV deeltjes zijn gebaseerd op verschillende serotypen AAV en bevatten onder andere genetische informatie die betrokken is bij (patho)fysiologische mechanismen in de hersenen. De aanvrager wil de dieren op DM-II inperkingsniveau met gg-AAV infecteren, en verzoekt ze zeven dagen na injectie op D-I inperkingsniveau te mogen huisvesten. De aanvrager vraagt tevens om invasieve handelingen met de dieren op D-I en de analyse van geïsoleerde weefsels van geïnjecteerde dieren op ML-I inperkingsniveau uit te mogen voeren.

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

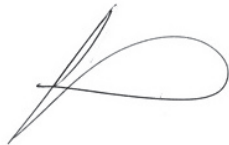
Op basis van haar eerdere adviezen kan de COGEM instemmen als de dieren die met maximaal 1×10^9 gg-AAV-1, -2, -5 en -6 deeltjes zijn geïnjecteerd, na een week worden teruggeplaatst naar D-I. De COGEM is van mening dat bij dieren die met gg-AAV-3, -4, -7, -8 en -9 deeltjes zijn geïnjecteerd, eerst geverifieerd dient te worden of het bloed van deze dieren vrij is van gg-AAV deeltjes. Als aan deze voorwaarde is voldaan, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de dieren gg-AAV zullen uitscheiden en acht zij terugplaatsing van deze dieren naar D-I gerechtvaardigd.

Door invasieve handelingen wordt de natuurlijk inperking van gg-AAV binnen het dier doorbroken. De COGEM is van mening dat hierbij gg-AAV deeltjes vrij kunnen komen die mogelijk nog aanwezig zijn in het geïnjecteerde weefsel. Om de eventuele risico's voor mens en milieu te minimaliseren adviseert de COGEM de invasieve handelingen met geïnjecteerde dieren en handelingen met weefsels van deze dieren op respectievelijk D-I en ML-I in te schalen en daarbij enkele aanvullende voorschriften op te leggen.



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 gemodificeerde-AAV geïnfecteerde muizen en ratten

COGEM advies CGM/161108-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag getiteld ‘Werkzaamheden met replicatie deficiënt AAV in proefdieren; omlaagschaling naar D-I’ (IG 16-267) die is ingediend door het Nederlands Herseninstituut te Amsterdam. Binnen het onderzoeksproject zullen muizen en ratten geïnjecteerd worden met replicatie-deficiënt genetisch gemodificeerd adeno-associated virus (gg-AAV) serotype 1 t/m 9. Naast het verzoek om de gg-AAV geïnjecteerde proefdieren 7 dagen na injectie te mogen huisvesten op D-I, vraagt de aanvrager tevens om de geplande invasieve handelingen met deze dieren op D-I te mogen uitvoeren en weefsels en/of cellen van deze dieren op ML-I te mogen analyseren. De COGEM is gevraagd om over dit verzoek te adviseren.

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 is een enkelstrengs DNA virus 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 een 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. Productie van gg-AAV deeltjes

Voor het onderzoek wil de aanvrager gebruik maken van replicatie-deficiënte gg-AAV-deeltjes die gebaseerd zijn op AAV serotype 1 t/m 9. In het genoom van deze gg-AAV deeltjes is de aanvrager van plan een breed scala van donorsequenties te plaatsen die betrokken zijn bij de (patho)fysiologische

activiteit van het brein. Deze sequenties kunnen afkomstig zijn van zoogdieren, vissen en vogels. Daarnaast wil de aanvrager ook gebruik maken van onder andere marker- en reporter-genen, Cre-recombinase sequenties, sequenties gericht op gene-silencing en CRISPR/Cas sequenties.

De virusdeeltjes zullen met behulp van twee verschillende productiesystemen geproduceerd worden. Het ene productiesysteem is gebaseerd op de co-transfectie van HEK 293T cellen met een transferplasmide en één, of in sommige gevallen twee packaging/helper plasmiden.⁷ Het transferplasmide bevat de ITR's van AAV en de te expresseren sequenties onder controle van een CVM of cel-specifieke promotor. Tevens bevat het transferplasmide het 'Woodchuck Hepatitis Posttranscriptional Regulatory Element' (WPRE) element. Het WPRE element codeert niet voor een genproduct, maar laat het transport van mRNA vanuit de celkern efficiënter verlopen.⁸ Er wordt ook gebruik gemaakt van dit element om de aanwezigheid van gg-AAV in bijvoorbeeld bloed aan te tonen (qPCR assay). Het helper/packaging plasmide bevat de *rep* en *cap* genen van de verschillende AAV serotypes en de benodigde *Adenovirus* serotype 5 helperfuncties VA, E2A en E4.^{9,10} In sommige gevallen wordt voor de productie van beoogde gg-AAV deeltjes gebruik gemaakt van twee helper/packaging plasmiden. In dat geval zijn de helperfuncties en packaging genen verdeeld over twee plasmiden.

Het andere productiesysteem maakt gebruik van gg-baculovirus en Sf9 insectencellen. Dit systeem is beschreven door Urabe *et al.*¹¹ en omvat drie recombinant baculovirussen. Eén met het gg-AAV genoom en twee helper baculovirussen met respectievelijk de *rep* en *cap* genen.

In beide productiesystemen worden replicatie-deficiënte gg-AAV deeltjes gegenereerd

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is van plan de hersenen, het ruggenmerg of de perifere ganglia van muizen en ratten te infecteren met de hierboven beschreven replicatie-deficiënte gg-AAV deeltjes. Het gg-AAV kan op meerdere plaatsen in het brein van een enkel dier worden toegediend met een maximum van 2×10^{11} AAV deeltjes per dier. De toediening zal op DM-II inperkingsniveau worden uitgevoerd en na toediening worden de dieren in een filtertopkooi op DM-II gehuisvest.

De aanvrager vraagt om de dieren één week na de toediening van het gg-AAV naar D-I te mogen terugplaatsen, als de dosis gg-AAV maximaal 2×10^9 bedraagt voor AAV type 1, 5 of 6 en maximaal 1×10^9 voor AAV type 2 of 9. In het geval de toegediende dosis hoger is, zal de aanvrager met een gevalideerde qPCR-assay het serum van de dieren analyseren op aanwezigheid van AAV deeltjes. In deze situatie vraagt de aanvrager de dieren naar D-I te mogen terugplaatsen als uit de test blijkt dat de dieren vrij zijn van gg-AAV deeltjes.

Om het effect van gg-AAV op het geïnfecteerde weefsel en de geïnfecteerde cellen te kunnen analyseren, wil de aanvrager deze uit de betreffende proefdieren isoleren. Hij wil onder andere elektrofysiologische metingen aan hersenweefsel uitvoeren. Het materiaal wordt daarbij niet geïnactiveerd. De aanvrager verzoekt de invasieve handelingen met de dieren op D-I en de analyse van de weefsels en cellen op ML-I uit te mogen voeren.

5. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft drie keer eerder geadviseerd over laboratoriumwerkzaamheden met gg-AAV in associatie met 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 proefdieren wordt uitgescheiden en zich vervolgens verspreidt.

6.1 Inperkingsniveau voor huisvesting van gg-AAV geïnjecteerde muizen en ratten

De aanvrager geeft aan dat het productiesysteem voor gg-AAV's en de te gebruiken proefdieren vrij zijn van wildtype AAV, wildtype adenovirus en andere virussen die in een helperfunctie van AAV kunnen voorzien. Op basis van de minieme sequentieoverlap tussen de verschillende plasmiden of tussen de recombinant baculovirussen in de te gebruiken productiesystemen, de langdurige ervaring met de beschreven productiesystemen en de garantie dat de productiecellen vrij zijn van wildtype AAV en helpervirussen acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat gedurende de productie replicatie-competent AAV zal ontstaan. Door de afwezigheid van wildtype AAV en helpervirussen in de te gebruiken proefdieren is de COGEM bovendien van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is, dat complementatie of recombinatie in het proefdier zal leiden tot replicatie van het gg-AAV.

Het gg-AAV zal rechtstreeks toegediend worden in de hersenen, het ruggenmerg of de perifere ganglia van muizen en ratten. Alvorens gg-AAV kan worden uitgescheiden, 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 Anderzijds kunnen gg-AAV deeltjes in de bloedcirculatie terecht komen, als tijdens de toediening onverhoopt bloedvaten worden geraakt. Hierdoor kan er lekkage van gg-AAV naar de bloedbaan optreden. De gg-AAV deeltjes worden na verloop van tijd uit de bloedbaan geklaard. De snelheid waarmee dit gebeurt is voor ieder AAV serotype verschillend.⁶

Op basis van gegevens over de halfwaardetijd van bepaalde AAV serotypen bij eerdere vergunningaanvragen heeft de COGEM geadviseerd dat muizen en ratten die geïnjecteerd zijn met gg-AAV deeltjes van serotype 1, 2, 5 en 6 na zeven dagen op D-I gehuisvest kunnen worden, mits de toegediende dosis niet boven de 1×10^9 deeltjes uit komt. De COGEM acht dit ook van toepassing op onderhavige vergunningaanvraag.

Naast gg-AAV-1, -2, -5 en -6 is de aanvrager ook van plan om gg-AAV deeltjes te generen en toe te passen die gebaseerd zijn op AAV serotype 3, 4, 7, 8 en 9. De COGEM wijst er op dat zij nog niet eerder heeft geadviseerd over de omlaagschaling naar D-I inperkingsniveau van muizen en ratten die geïnjecteerd zijn met deze gg-AAV serotypen. Over de klaring van deze AAV serotypen uit het bloed

van muis en rat zijn verschillende wetenschappelijke publicaties verschenen.^{6,16,17,18} Hieruit blijkt dat de halfwaardetijd van bepaalde AAV serotypen in het bloed niet eenduidig is en afhankelijk van verschillende factoren. Het gg-AAV9 lijkt evenwel beduidend langzamer uit het bloed verwijderd te worden dan bijvoorbeeld gg-AAV 1.⁶ De aanvrager hanteert voor AAV9 zelf een halwaarde tijd van 10 uur. De COGEM constateert dat op basis van deze halfwaardetijd een dosis van 1×10^9 gg-AAV9 deeltjes in een periode van 7 dagen niet volledig wordt geklaard uit het bloed. Voor AAV8 wordt in een van de studies een vergelijkbare halfwaardetijd gevonden, al wordt in een andere studie de halfwaardetijd op ongeveer 4 uur gesteld.

Gezien het feit dat de halfwaardetijd voor AAV-3, -4, -7, -8 en -9 niet eenduidig is en mogelijk langer is dan de halfwaardetijd van eerder beoordeelde serotypen, kan de COGEM voor AAV-3, -4, -7, -8 en -9 niet uitsluiten dat een week na toediening van 1×10^9 AAV deeltjes er nog virusdeeltjes in de circulatie van de dieren aanwezig zijn. Om de kans op verspreiding van gg-AAV ten gevolge van uitscheiding te voorkomen, adviseert de COGEM om het bloed van dieren die met deze gg-AAV deeltjes zijn geïnjecteerd na een week eerst op aanwezigheid van gg-AAV deeltjes te controleren met behulp van beschreven qPCR assay. Pas als uit deze assay blijkt dat er geen gg-AAV deeltjes meer in het bloed aanwezig zijn, adviseert de COGEM om de betreffende dieren op D-I inperkingsniveau te huisvesten.

6.2 Inschaling van invasieve handelingen met gg-AAV geïnjecteerde muizen en ratten en handelingen met weefsels en cellen van deze dieren

In onderhavig experiment wordt gg-AAV geïnjecteerd in de hersenen, het ruggenmerg of de perifere ganglia van muizen en ratten. Zoals hierboven aangegeven kunnen met gg-AAV geïnjecteerde dieren onder bepaalde voorwaarden op D-I gehuisvest worden. Dit is gebaseerd op de afwezigheid van circulerend gg-AAV in het bloed in eerdere experimenten met eenzelfde doses gg-AAV van betreffend serotype of op basis van genoemde qPCR assay. Als aan deze voorwaarden is voldaan, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat geïnjecteerde dieren gg-AAV deeltjes zullen uitscheiden.

Zij merkt hierbij echter op dat de afwezigheid van gg-AAV deeltjes in het serum mogelijk niet indicatief is voor de situatie in de geïnjecteerde weefsels. Derhalve kan de COGEM niet uitsluiten dat er lokaal nog infectieuze gg-AAV deeltjes aanwezig zijn. Door invasieve handelingen, zoals het isoleren van geïnjecteerd hersenweefsel, ruggenmerg of perifere ganglia, uit te voeren, wordt de natuurlijke inperking van deze gg-AAV deeltjes binnenin het dier doorbroken en kunnen een beperkt aantal gg-AAV deeltjes vrij komen. Ditzelfde geldt voor het prepareren en het analyseren van de weefsels om eventuele effecten van betreffende gg-AAV infectie *in vitro* te kunnen onderzoeken.

Op basis van de mogelijkheid dat een beperkt aantal gg-AAV deeltjes bij voorgenomen handelingen vrij kunnen komen, kan de COGEM niet uitsluiten dat de medewerker met gg-AAV in aanraking komt op D-I of ML-I bij de daarvoor geldende standaard werkvoorschriften. Zoals aangegeven, kan een dergelijke besmetting van de medewerker alleen leiden tot de replicatie en verspreiding als de cellen die geïnfecteerd worden door gg-AAV ook geïnfecteerd zijn met wildtype AAV en een helpervirus. De COGEM acht de kans dat cellen van betreffende medewerker op hetzelfde moment geïnfecteerd zijn door zowel een wildtype AAV, een helpervirus en gg-AAV zeer klein. Zij merkt daarbij op dat de gg-AAV deeltjes een zeer breed palet aan donorsequenties kunnen

bevatten, inclusief donorsequenties die betrokken zijn bij een pathologisch effect in de zenuwen of hersenen.

Op basis van bovenstaande overwegingen acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van beschreven invasieve handelingen met geïnfecteerde dieren en handelingen met geïsoleerde weefsels en cellen op respectievelijk D-I en ML-I inperkingsniveau zeer klein, maar kan deze niet geheel uitsluiten. Om deze nog verder te minimaliseren adviseert de COGEM om de volgende aanvullende werkvoorschriften te hanteren:

- in het laboratorium waarin betreffende werkzaamheden worden uitgevoerd, is het dragen van een bril en een mond- en neuskapje verplicht
- tijdens de werkzaamheden worden door de werknemer handschoenen gedragen

Onder navolging van bovenstaande voorschriften acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein als beschreven invasieve handelingen met geïnfecteerde dieren en handelingen met geïsoleerde weefsels en cellen op respectievelijk D-I en ML-I inperkingsniveau worden uitgevoerd.

6.3 Generiek advies over inschaling van werkzaamheden met gg-AAV

De COGEM heeft de laatste jaren meerdere malen geadviseerd om werkzaamheden met biologisch ingeperkt virussystemen zoals AAV vectoren omlaag te schalen. Gezien deze trend, is de COGEM voornemens om binnen afzienbare tijd hierover een generiek advies op te stellen. Als aanzet tot dit generieke advies zal zij een onderzoek laten uitvoeren om de verschillende AAV productiesystemen in kaart te brengen en te inventariseren welke werkzaamheden met gg-AAV van deze productiesystemen standaard omlaag geschaald kunnen worden. Zodra dit onderzoek is afgerond zal de COGEM u hier nader over informeren.

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 (bezoekt: 7 november 2016)
2. International Committee on Taxonomy of Viruses (2015). <http://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/5945> (bezoekt: 7 november 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. Grimm D. *et al.* (1998). Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum. Gene Ther.* 9:2745-2760
8. Donello JE *et al.* (1998). *Woodchuck hepatitis virus* contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J. Virol.* 72: 5085-5092
9. 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
10. 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
11. Urabe M *et al.* (2002). Insect cells as a factory to produce Adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum. Gene Ther.* 13: 1935-1943
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. Van Gestel M.A. *et al.* (2014). Recombinant adeno-associated virus: efficient transduction of the rat VMH and clearance from the blood. *Plos One* 9:e97639
17. Kotchey N.M. *et al.* (2011). A potential role of distinctively delayed blood clearance of recombinant adeno-associated virus serotype 9 in robust cardiac transduction. *Mol. Ther.* 19:1079-1089
18. Reuter J.D. *et al.* (2012). Assessment of hazard risk associated with the intravenous use of viral vectors in rodents. *Comp. Med.* 62:1-10