

Aan de staatssecretaris van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
De heer drs. P.L.B.A. van Geel
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

29 augustus 2006
CGM/060829-01
Advies fase III klinische studie met genetisch gemodificeerde prostaattumorcellijnen
(IM 06-001)

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag met betrekking tot een fase III klinische studie met genetisch gemodificeerde prostaattumorcellijnen van het Academisch Ziekenhuis te Groningen, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over een fase III klinische studie met genetisch gemodificeerde prostaattumorcellijnen (CG1940 en CG8711) die aan patiënten worden toegediend als vaccin tegen prostaattumoren. Aan het erfelijke materiaal van deze vaccincellen is een genetisch gemodificeerd Adenovirus-geassocieerd virus (AAV) toegevoegd. Een groot deel van het genoom van het virus is vervangen door een sequentie coderend voor het eiwit 'humaan granulocyt macrofaag kolonie stimulerende factor' (hGM-CSF). De verwachting is dat het vaccin een immuunrespons in de patiënt opwekt waardoor het immuunsysteem de prostaattumorcellen herkent en opruimt.

De studie zou tot milieurisico's kunnen leiden indien de vector of de vaccincellen zich kunnen verspreiden buiten het lichaam van de patiënt. De kans op verspreiding van de AAV-vector is naar de mening van de COGEM verwaarloosbaar klein. De vector is stabiel geïntegreerd in het genoom van de vaccincellen en is niet in staat zich te vermenigvuldigen onder meer door de afwezigheid van hiervoor essentiële genen. Verder acht de COGEM de kans op verspreiding als gevolg van reactivatie van de vector door complementatie of recombinatie met bijvoorbeeld wildtype AAV verwaarloosbaar klein.

De COGEM acht tevens de kans op verspreiding van de vaccincellen verwaarloosbaar klein omdat deze, voorafgaand aan toediening, bestraald worden zodat vermenigvuldiging in de patiënt niet plaatsvindt. Verder migreren de cellen niet vanaf de plaats van toediening. Bovendien vernietigt het immuunsysteem van de patiënt de vaccincellen binnen enkele dagen.

Gezien het bovenstaande acht de COGEM de risico's van deze klinische studie voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized loop on the left and a long, horizontal stroke extending to the right.

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

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

Fase III klinische studie met genetisch gemodificeerde tumorcellijnen in patiënten met prostaatkanker

COGEM advies CGM/060829-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de mogelijke risico's van een fase III klinische studie waarbij gebruik gemaakt wordt van genetisch gemodificeerde cellijnen die worden ingezet als vaccin gericht tegen prostaattumoren. Het vaccin bestaat uit twee prostaattumorcellijnen die zijn gemodificeerd met behulp van een replicatiedeficiënt genetisch gemodificeerd Adenovirus-geassocieerd virus (AAV). Een groot deel van het genoom van dit virus is vervangen door een sequentie coderend voor de cytokine 'humaan granulocyt macrofaag kolonie stimulerende factor' (hGM-CSF).

Verwacht wordt dat de expressie van het cytokine hGM-CSF door de vaccincellen tot een immuunrespons tegen prostaattumoren leidt. Dit kan tot gevolg hebben dat het immuunsysteem kankercellen herkent en opruimt. Om de immuunrespons verder te versterken, krijgt een deel van de patiënten tevens het chemotherapeuticum docetaxel toegediend.

Prostaatkanker

In 2003 werd bij 7900 mannen in Nederland prostaatkanker vastgesteld, waarbij ongeveer de helft van de mannen 75 jaar of ouder is (1). De prostaat is een klier die prostaatvocht aanmaakt dat bij een zaadlozing samen met de zaadcellen naar buiten komt.

Prostaatkanker ontwikkelt zich in de cellen van de klierbuisjes van de prostaat. De tumor zou kunnen doorgroeien in omliggend weefsel en eventueel uitzaaien naar bijvoorbeeld de botten of de lever. Methodes die vaak gebruikt worden bij de behandeling van prostaatkanker zijn chirurgie, bestraling of chemotherapie (2).

Naast de genoemde behandelmethodes wordt momenteel immuno-gentherapie experimenteel toegepast waarbij het immuunsysteem gestimuleerd wordt om de tumorcellen te vernietigen. Ook de onderhavige klinische studie behoort tot deze vorm van therapie. Patiënten die lijden aan prostaattumoren, krijgen intradermaal een vaccin toegediend. Het vaccin bestaat uit twee prostaattumorcellijnen (CG1940 en CG8711) die genetisch gemodificeerd zijn met een AAV vector waarin de sequentie coderend voor het eiwit hGM-CSF gekloneerd is. De vector is stabiel geïntegreerd in het genoom van beide cellijnen. De cellen van beide cellijnen worden vóór de toediening bestraald zodat deze niet meer in het lichaam van de patiënt kunnen vermenigvuldigen. De cellen zijn echter

nog wel in staat om een aantal levensfuncties uit te oefenen, zoals de productie en uitscheiding van hGM-CSF. De aanvrager verwacht dat de toegediende vaccincellen niet langer dan vier dagen aanwezig zullen blijven.

Een deel van de patiënten krijgt naast het vaccin tevens intraveneus het chemotherapeutikum docetaxel toegediend. Met de toediening beoogt de aanvrager de activiteit van het immuunsysteem verder te versterken. De studieresultaten zullen vergeleken worden met een chemotherapeutische behandeling (docetaxel/prednison). In totaal zullen 1200 patiënten aan de studie deelnemen.

Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft eerder geadviseerd over gentherapie met vaccincellen die gemodificeerd zijn met een AAV-vector. De eerste maal betrof het autonome melanoomcellen die *ex vivo* genetisch gemodificeerd waren met genen coderend voor het cytokine hGM-CSF (CGM/010206-01). Destijds is de COGEM tot de conclusie gekomen dat replicatie-competent AAV (rcAAV), ontstaan tijdens de productie van de vector, aanwezig zou kunnen zijn in het toe te dienen vaccin. Daarom was zij van mening dat de aanvragers gebruik dienden te maken van verbeterde productiesystemen of dienden te voorzien in een monitoringsysteem waarmee shedding bij patiënten waargenomen kon worden (3). De aanvrager heeft hierop de vergunningaanvraag ingetrokken en een nieuwe aanvraag ingediend. Hierover heeft de COGEM geadviseerd (CGM/010702-02 en CGM/011129-03) dat shedding van AAV niet kon worden uitgesloten mede gezien de aanwezigheid van replicatie-competent AAV in het vaccin. De aanvrager moest daarom voorzien in een monitoringsprotocol om te controleren op eventuele shedding van de vector (4;5).

De COGEM heeft verder geadviseerd (CGM/040309-01) over een fase I studie met dezelfde cellijnen als in het onderhavige advies (CG1940 en CG8711), al dan niet in combinatie met een immuunstimulerend antilichaam (6). Destijds was de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein waren. De gehanteerde vaccincellen worden getest op afwezigheid van rcAAV en niet-geïntegreerd recombinant AAV (recAAV). Zodoende zou de patiënt na toediening van het vaccin geen vector uitscheiden in het milieu. Verder waren de vaccincellen voor toediening bestraald zodat vermenigvuldiging in de patiënt niet mogelijk was (6).

Milieurisicoanalyse

Bij de risicobeoordeling voor introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde organismen (ggo's), zoals die door de COGEM wordt uitgevoerd, worden de effecten

beoordeeld die het ggo kan hebben op mens en milieu (waarbij de mens als integraal onderdeel van het milieu wordt beschouwd).

Onder risico wordt verstaan de combinatie van de gevolgen van een gevaar en de kans dat deze gevolgen zich kunnen voordoen. Hierbij worden de mogelijke schadelijke effecten van (toepassing van) een ggo vergeleken met die van het ongemodificeerde organisme (de zogenaamde basislijn) waaruit het ggo is afgeleid.

De uitgangspunten en de methodiek van de milieurisicobeoordeling is in de EU richtlijn 2001/18 en de bijbehorende bijlagen beschreven. Hierin is vastgelegd dat bij de milieurisicobeoordeling zowel gekeken wordt naar mogelijk directe als indirecte schadelijke effecten van het ggo. Om tot een risico-inschatting te komen worden de volgende stappen doorlopen: de identificatie van kenmerken die schadelijke effecten kunnen hebben; de evaluatie van mogelijke gevolgen van het mogelijk optreden van schadelijke effecten; de evaluatie van de kans op het optreden van mogelijke schadelijke effecten; de schatting van het risico dat aan elk bepaald kenmerk van het ggo is verbonden; de bepaling risicomanagementmaatregelen en de bepaling van het algehele risico van het ggo.

In het kader van onderhavige aanvraag analyseert de COGEM de risico's die zijn verbonden aan het introduceren van de gehanteerde gemodificeerde prostaattumorcellijnen in het milieu. Dit betekent dat gekeken wordt naar de mogelijke schadelijke effecten van het ggo (waarbij onder meer de mogelijkheid van recombinatie en de gevolgen daarvan wordt bekeken), de kans op verspreiding in het milieu en de effecten die door de mogelijke verspreiding teweeg gebracht kunnen worden. Om deze aspecten te kunnen beoordelen wordt een aantal factoren in ogenschouw genomen: de eigenschappen van de vector, de kenmerken van het ingebracht gen en de kenmerken van de vaccincellen.

De vector

De sequentie coderend voor het eiwit hGM-CSF wordt toegevoegd aan de prostaattumorcellijnen met behulp van een virale vector die is afgeleid van serotype-2 AAV (AAV2). Dit is een enkelstrengs DNA virus dat integreert in het gastheergenoom (7). AAV behoort tot de familie *Parvoviridae* (geslacht *Dependovirus*) en is voor zijn replicatie afhankelijk van de activiteit van een helpervirus. Als helpervirus van AAV kunnen Adenovirussen en Herpesvirussen, bijvoorbeeld Herpes Simplex virus type I en II, optreden (8). Helpervirussen leveren specifieke functies die AAV mist voor replicatie en maken daardoor vermenigvuldiging van AAV in een geïnfecteerde cel mogelijk. In afwezigheid van helpervirussen veroorzaakt AAV slechts een latente infectie (8). Een co-

infectie met helpervirussen kan het geïntegreerde AAV-genoom reactiveren waarna AAV zich alsnog kan vermenigvuldigen (8).

Infecties met AAV komen wereldwijd frequent voor en naar schatting is 80% van de bevolking seropositief voor AAV2. Overdracht vindt waarschijnlijk plaats via de luchtwegen of het maag-darmstelsel (8). Voor zover bekend gaat een AAV-infectie niet gepaard met een ziektebeeld (9). Tezamen met de afhankelijkheid van helpervirussen, maakt dit AAV geschikt voor de ontwikkeling van vectoren voor gentherapie (9).

Het virusgenoom van AAV bestaat onder andere uit de genen *rep* en *cap*, welke respectievelijk verantwoordelijk zijn voor replicatie en voor de vorming van het manteleiwit (7). De uiteinden van het genoom bestaan uit 'inverted terminal repeats' (ITR's), dit zijn niet coderende sequenties welke onder andere noodzakelijk zijn voor integratie van het virale genoom in het gastheergenoom, replicatie van het virus en het inpakken van genetisch materiaal in de virusmantel (10).

De recombinante AAV (recAAV) vector die in deze studie wordt gebruikt om de prostaattumorcellijnen te transduceren bevat slechts de ITR's. Alle overige genetische informatie is verwijderd. Hierdoor is replicatie van de vector niet meer mogelijk, ook niet in aanwezigheid van een helpervirus. De vector is nog wel in staat om cellen te infecteren waarna het virale genetische materiaal stabiel wordt opgenomen in het gastheergenoom (11).

De verwijderde genetische informatie is vervangen door het gen dat codeert voor hGM-CSF. Dit gen is achter een cytomegalovirus (CMV) promotor tussen de ITR's geplaatst. Deze promotor is verantwoordelijk voor een voortdurende hoge expressie van hGM-CSF in cellen van vrijwel alle weefseltypen. De CMV promotor codeert niet voor een genproduct en veroorzaakt daarom geen symptomen van een CMV infectie. Verder zijn in de AAV-vector sequenties voor een β -globine intron en een β -globine polyadenyleringssignaal (poly A) sequentie aanwezig. Met deze delen van het β -globuline gen wordt getracht een toename van hGM-CSF expressie te bewerkstelligen. Het polyA bevordert de vertaling van mRNA.

Voor de productie van de recAAV-vector wordt gebruik gemaakt van een AAV-vectorplasmide, een AAV-helperplasmide, een replicatie-defectief helperadenovirus en een productiecellijn. Het AAV-vectorplasmide bevat onder meer het hGM-CSF gen en de AAV-ITR's. Het helperplasmide codeert voor de aanmaak van de AAV-eiwitten *rep* en *cap*. Beide plasmides worden in humane embryo niercellen (HEK 293) gebracht, waarna deze geïnfecteerd worden met het helperadenovirus. Vervolgens worden de recombinante virusdeeltjes in een aantal stappen geïsoleerd en gezuiverd van adenovirus en celresten.

De vector is gereed voor transductie van de gehanteerde cellijnen. De batch wordt overigens getest op aanwezigheid van rcAAV en adenovirus.

Het insert

Een groot deel van de AAV-sequenties is vervangen door een sequentie coderend voor het humane cytokine GM-CSF. Dit eiwit stimuleert de groei en ontwikkeling van specifieke cellen van het immuunsysteem (12). Expressie van hGM-CSF leidt daarmee tot een verminderde tolerantie van het immuunsysteem, zodat tumorcellen moeilijker aan het immuunsysteem kunnen ontsnappen (12).

De vaccincellen

De genetisch gemodificeerde cellijnen CG1940 en CG8711 komen tot stand door de cellen, buiten het lichaam van de patiënt, te infecteren met de beschreven recAAV-vector. Hierna wordt van elke cellijn één cel geselecteerd waarbij de vector stabiel in het genoom geïntegreerd is. De twee cellen, zogenaamde ‘single-cell clones’ worden vervolgens verder opgekweekt tot grotere hoeveelheden. De constructie en productie van deze cellijnen is uitgevoerd onder ‘Good Manufacturing Practice’ (GMP). Hiertoe wordt voor afgifte van de batches onder andere getest op afwezigheid van verschillende virussen (waaronder het helpervirus). Verder wordt bepaald of het vaccin vrij is van niet-geïntegreerd recAAV, en rcAAV deeltjes die tijdens het productieproces van de vector gevormd kunnen zijn. De bij de screening gehanteerde kwaliteitscriteria staan vermeld in de vergunningaanvraag. De aanvrager meldt dat tot nu 50 batches (elk groter dan 50 liter) getest zijn en dat er nog nooit rcAAV gevonden is. Indien niet wordt voldaan aan de gestelde criteria voor afwezigheid van onder meer virussen en vrije vectordeeltjes, is de batch onbruikbaar.

Na de productie worden de beide cellijnen bestraald, zodat deling niet meer mogelijk is. De gehanteerde inoniserende stralingsdosis is, afhankelijk van de cellijn, 30% of 50% hoger dan de minimale dosis waarbij de cellen niet meer in staat zijn te delen.

Het intradermaal toe te dienen vaccin bestaat uiteindelijk uit gelijke hoeveelheden van de cellen CG1940 en CG8711.

Overwegingen en advies

Risico's als gevolg van de klinische studie kunnen optreden indien de gehanteerde vaccincellen of de recAAV-vector zich na toediening aan de patiënt zouden kunnen verspreiden in het milieu. Verder dient de aanwezigheid van vrije niet-geïntegreerde recAAV-vectordeeltjes in het vaccin voorkomen te worden. Deze deeltjes zouden theoretisch kunnen vrijkomen en tot infecties leiden. Hieronder wordt ingegaan op deze aspecten.

Kans op aanwezigheid van niet-geïntegreerd recAAV is verwaarloosbaar klein

Na transductie van de gehanteerde vaccincellen, dient het uiteindelijke vaccinproduct vrij te zijn van niet-geïntegreerde vectordeeltjes. Gezien het feit dat de vaccinbatch gecontroleerd wordt op de afwezigheid van vrije vectordeeltjes en vanwege de kweekprocedures, waaronder het gebruik van zogenaamde 'single-cell clone' methode, is de COGEM van mening dat de kans op aanwezigheid van niet-geïntegreerde recAAV in het uiteindelijke vaccin, verwaarloosbaar klein is.

Kans op verspreiding van de vaccincellen is verwaarloosbaar klein

Uit een (pre)klinische studie blijkt dat drie tot vier dagen na injectie van de vaccincellen geen hGM-CSF in het bloed detecteerbaar is. Volgens de aanvrager duidt dit er op dat het immuunsysteem de geïnjecteerde vaccincellen heeft vernietigd. Verder blijkt uit (pre)klinische studies dat de vaccincellen niet migreren vanaf de injectieplaats. Overigens zijn niet-bestraalde vaccincellen niet in staat om buiten het lichaam van de patiënt te overleven. De aanvrager geeft aan dat deze cellen voor hun groei afhankelijk zijn van een zeer specifiek voedingsmedium.

De COGEM onderschrijft de gegevens en is het eens met de beredenering van de aanvrager en is van mening dat de kans op verspreiding van vaccincellen verwaarloosbaar klein.

Kans op verspreiding van de vector is verwaarloosbaar klein

Aangezien recAAV-vector stabiel in het erfelijk materiaal van de vaccincellen geïntegreerd is, zal vermenigvuldiging en verspreiding van de vector enkel kunnen plaatsvinden wanneer deze gereactiveerd wordt. Reactivatie zou eventueel kunnen optreden indien de vector door complementatie of recombinatie met eventueel aanwezig rcAAV of wildtype AAV in staat is tot replicatie. Om deze kans te kunnen inschatten, dient de kans op aanwezigheid van rcAAV of wildtype AAV beoordeeld te worden.

Tijdens de vectorproductie is de vorming van rcAAV eventueel mogelijk door een theoretische hergroepering van genetisch materiaal. Door niet-homologe recombinatie zouden de ITR's van de vector gekoppeld kunnen worden aan de overige genetische informatie van AAV zodat rcAAV deeltjes, naast recAAV, gevormd worden. De COGEM merkt op dat deze kans zeer klein is.

Hoewel de kans op vorming van rcAAV klein is, test de aanvrager de vaccinbatches tijdens en na het productieproces op afwezigheid van deze deeltjes. De aanvrager meldt dat tot nu toe al vele batches getest zijn en dat rcAAV niet aangetoond is. Bij aanwezigheid van ongewenste deeltjes wordt de batch niet vrijgegeven.

Naar de mening van de COGEM, maakt dit alles de kans dat rcAAV daadwerkelijk aanwezig zal zijn in het uiteindelijke vaccin, verwaarloosbaar klein. Verspreiding van rcAAV zal daarom niet kunnen optreden. Verder is de kans op verspreiding van de geïntegreerde vector door complementatie of recombinatie met rcAAV verwaarloosbaar klein is.

Aangezien de vaccinbatch vrij is van rcAAV kan slechts de aanwezigheid van wildtype AAV in de patiënt tot een mogelijke verspreiding van de vector leiden door complementatie of recombinatie van de vector. Hoewel is waargenomen dat het AAV-virus zich onder zeer specifieke condities *in vitro* in bepaalde huidcellen autonoom kan repliceren, is AAV voor zijn replicatie in het algemeen afhankelijk van helpvirussen (13). Dit betekent dat de vaccincel gelijktijdig geïnfecteerd moet zijn met een wildtype AAV én een helpvirus om verspreiding van de AAV-vector mogelijk te maken. Het toe te dienen vaccin wordt getest op afwezigheid van wildtype AAV en helpvirussen, zodat de vaccincellen slechts direct na toediening aan de patiënt geïnfecteerd kunnen worden door lokaal op of in de huid aanwezige AAV-virussen en helpvirussen. De COGEM acht het onwaarschijnlijk dat significante hoeveelheden helpvirussen aanwezig zullen zijn op de plaats van vaccinatie. Zoals reeds hierboven gesteld is, migreren de vaccincellen niet, zodat contact met helpvirussen op andere plaatsen in het lichaam van de patiënt uitgesloten is.

De geringe kans op een gelijktijdige infectie van de vaccincellen met wildtype AAV en helpvirussen reduceert de kans op verspreiding van de AAV vector sterk. Daarnaast is de COGEM van mening dat de tijdspanne waarin complementatie of recombinatie van recAAV kan optreden sterk beperkt doordat de vaccincellen bestraald zijn en relatief snel worden opgeruimd door het immuunsysteem van de patiënt.

Indien toch onverhoopt een gelijktijdige infectie plaatsvindt, zou recAAV zich kunnen vermeerderen door complementatie of recombinatie en andere cellen kunnen infecteren. De COGEM is van mening dat in geval van complementatie een dergelijke infectie snel zal uitdoven. Wanneer gereactiveerd AAV een andere cel infecteert, kan replicatie namelijk opnieuw alleen plaatsvinden in aanwezigheid van wildtype AAV, de vector is voor replicatie namelijk afhankelijk van de *rep* en *cap* genen, en helpvirussen.

Wanneer recAAV gereactiveerd wordt door recombinatie met wildtype AAV, is het zeer onwaarschijnlijk dat een replicatiecompetent AAV virus ontstaat dat ook het insert hGM-CSF draagt. AAV vectoren hebben namelijk een geringe packaging capaciteit (maximaal 5.2 kb) zodat de insertie van hGM-CSF met een grootte van 2100 bp in AAV-2 dat 4681 bp groot is, niet waarschijnlijk lijkt (10;14). Wanneer onverhoopt toch een replicatiecompetent AAV virus met hGM-CSF zou ontstaan dan is dit wel in staat om een andere cel te infecteren, maar is het gereactiveerde virus alsnog afhankelijk van

helpervirussen. Dit maakt het aannemelijk dat de infectie ook in dit geval snel zal verminderen en uitdoven. Overigens meldt de aanvrager dat patiënten met een klinisch relevante actieve infectie worden uitgesloten van deelname aan de studie.

De COGEM is verder van mening dat docetaxel en hGM-CSF de reactivering van de vector niet zal beïnvloeden. Toediening van het chemotherapeuticum alsmede de expressie van hGM-CSF zal stimulatie van het immuunsysteem tot gevolg hebben.

Conclusie

De COGEM is van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn bij de beschreven fase III klinische studie, waarbij patiënten prostaattumorcellijnen toegediend krijgen die genetisch gemodificeerd zijn met een recombinante AAV-vector waarin de sequentie voor hGM-CSF gekloneerd is. De geïntegreerde replicatiedeficiënte AAV-vector kan zich namelijk niet zelfstandig verspreiden in het milieu vanwege de afwezigheid van de *rep* en *cap* genen, integratie van de vector in het genoom van de gehanteerde tumorcellen, de afwezigheid van vrije vectordeeltjes en helpervirussen. Verder zijn de vaccincellen niet meer in staat tot vermenigvuldiging, verspreiden deze cellen zich niet in het lichaam en vernietigt het immuunsysteem van de patiënt de vaccincellen binnen enkele dagen.

Referenties

1. Nationaal kompas volksgezondheid. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. Internet: http://www.rivm.nl/vtv/object_class/kom_prostaatkanker.html (25 juli 2006).
2. Koningin Wilhelmina Fonds voor de Nederlandse Kankerbestrijding. Internet: www.kwf.nl (25 juli 2006).
3. COGEM advies CGM/010206-01. COGEM (2001). Advies BGGO 00/05.
4. COGEM advies CGM/010702-02. COGEM (2001). Advies BGGO 01/07.
5. COGEM advies CGM/011129-03. COGEM (2001). Advies kennisgeving BGGO 01/07.
6. COGEM advies CGM/040309-01. COGEM (2004). Klinische fase I studie met AAV-GM-CSF gemodificeerde prostaattumorcellijnen in combinatie met antilichaam MDX-010 in patiënte met prostaatkanker.
7. Van Regenmortel, M.H.V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego
8. Knipe, M.D. en Howley, P.M. (2001). Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
9. Gonçalves, M.A.F.V. (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to

- effective vector. *Virology* 2: 43.
10. Li, C., Bowles, D.E., Van Dyke, T. en Samulski, R.J. (2005). Adeno-associated virus vectors: potential applications for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 12(12): 913-925.
 11. Grimm, D., Kern, A., Rittner, K. en Kleinschmidt, J.A. (1998). Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum Gene Ther* 9: 2745-2760.
 12. Dranoff, G. (2002). GM-CSF-based cancer vaccines. *Immunol Rev* 188: 147-154.
 13. Meyers, C., Mane, M., Kokorina, S.A. en Hermonatt, P.L. (2000). Ubiquitous human adeno-associated virus type 2 autonomously replicates in differentiating keratinocytes of a normal skin model. *Virology* 272: 338-346.
 14. Grimm, D. en Kay, M.A. (2003). From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr Gene Ther* 3: 281-304.