

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

| | | | |
|-------------------------------------|---------------|---------------|-------------|
| Uw kenmerk | Uw brief van | Kenmerk | Datum |
| IM 05-001.co1 | 28 april 2005 | CGM/050531-01 | 31 mei 2005 |
| Onderwerp | | | |
| Advies ontwerpbeschikking IM 05-001 | | | |

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de ontwerpbeschikking IM 05-001, getiteld 'Aanvraag voor toediening van AMT-010, een adeno-associated virus vector (AAV) coderend voor lipoproteïne lipase variant S447X (LPL^{S447X}) aan LPL deficiënte patiënten', van het AMC, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijk risico's voor mens en milieu van een klinisch onderzoek met een 'adeno-associated' virale (AAV) vector AMT-010, waarin een gen gekloneerd is dat codeert voor het lipoproteïne lipase (LPL). Infecties met AAV komen wereldwijd voor en gaan niet gepaard met een ziektebeeld. In de studie worden patiënten opgenomen met een defect *lpl* gen. Deze patiënten hebben een verhoogd vetgehalte in het bloed, waardoor ze een groter risico hebben op alvleesklierontsteking en aderverkalking. Het doel van de genterapiestudie is om het defecte gen dat codeert voor LPL te repareren middels toediening van het AMT-010 genterapieconstruct.

Vermenigvuldiging van AAV kan alleen optreden in aanwezigheid van een herpes- of adenovirus. Om de minimale kans op replicatie en verspreiding van de vector te beperken, dienen patiënten van de studie uitgesloten te worden die klinische symptomen vertonen van een herpes- of adenovirusinfectie. Tevens dienen 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 kan worden aangetoond. Tot slot adviseert de COGEM om behandelde patiënten uit te sluiten van donatie van weefsels en cellen voor transplantatie. Concluderend is de COGEM van mening dat, met inachtneming van de genoemde voorschriften de risico's voor mens en milieu verbonden aan de klinische studie met de replicatie deficiënte AAV vector, in combinatie met het transgen *LPL^{S447X}*, verwaarloosbaar klein zijn.

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 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

Titel: Genterapie van lipoproteïne lipase (LPL) deficiënte patiënten met een adeno-associated virale vector coderend voor het LPL-eiwit (AMT-010)

COGEM advies: CGM/050531-01

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijk risico's voor mens en milieu van een klinisch onderzoek met een adeno-associated virale vector AMT-010, waarin een gen gekloneerd is dat codeert voor het lipoproteïne lipase (LPL). De AMT-010 vector zal toegediend worden aan LPL deficiënte patiënten. Het doel van deze studie is het ontwikkelen van een genterapiestrategie voor de behandeling van LPL deficiëntie in mensen.

Het LPL enzym speelt een belangrijke rol bij de afbraak van vetten (triglyceriden) in het bloed (1). Het LPL eiwit wordt van nature aangemaakt in onder andere skeletspieren. Het LPL enzym hydrolyseert de triglyceriden in lipoproteïnen tot vetzuren, zodat ze opgenomen kunnen worden door de cellen. De vetzuren kunnen in de cel opgeslagen worden (vetweefsel) of gebruikt worden als energiebron (spieren). Patiënten met een niet goed functionerend LPL gen hebben een sterk verhoogd triglyceride gehalte in het bloed (2; 3). Dit vergroot het risico op alvleesklierontsteking en kan op termijn ook leiden tot aderverkalking. Met medicatie of een vet-arm dieet is een verlaging van het triglyceride gehalte in het bloed slechts beperkt haalbaar. In de praktijk is dit onvoldoende om schadelijke effecten op termijn te voorkomen.

Door de vector AMT-010 toe te dienen in spierweefsel van de patiënt wordt getracht om de LPL activiteit te verhogen en het triglyceride gehalte in het bloed te verlagen (4). Tevens zal hierdoor de kans op ontsteking van de alvleesklier en aderverkalking afnemen.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft eerder geadviseerd (CGM/010206-01, CGM/010702-02 en CGM/011129-03) over *ex vivo* genetische modificatie van cellen met een adeno-associated virale vector (AAV). De COGEM heeft destijds geconcludeerd dat uitscheiding (shedding) van AAV niet uitgesloten kon worden (5), gezien de aanwezigheid van replicatie-competent AAV (rcAAV) in het gebruikte vaccin. Tevens is geadviseerd om een monitoringsprotocol in de studie op te nemen om te controleren of eventuele shedding van de vector plaatsvindt. In een recentelijk advies heeft de COGEM over een klinische fase I onderzoek geadviseerd (CGM/040309-01), waarbij cellen *ex vivo* genetisch gemodificeerd werden. Hierbij is geconcludeerd dat

de toe te dienen cellen aan de proefpersonen nagenoeg geen rcAAV bevatten, waardoor de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Milieurisicoanalyse

Bij de risicobeoordeling van introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde organismen (ggo's), zoals die door de COGEM wordt uitgevoerd, wordt gekeken naar de effecten 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. De mogelijke schadelijke effecten van (toepassing van) een ggo worden 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; evaluatie van de kans op het optreden van mogelijke schadelijke effecten; schatting van het risico dat aan elk bepaald kenmerk van het ggo is verbonden; bepaling risicomanagementmaatregelen; en bepaling algehele risico van het ggo.

In het kader van onderhavige aanvraag belicht de COGEM de risico's die zijn verbonden aan het introduceren van het genetisch gemodificeerde genterapeutica AMT-010 in het milieu. De mogelijke nadelige effecten van deze introductie worden bestudeerd waarbij de effecten van het wildtype AAV als basislijn genomen wordt. Concreet betekent dit dat gekeken wordt naar de mogelijk schadelijke effecten van het genterapeuticum (waarbij onder meer de mogelijkheid van recombinitie 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 het gastheerorganisme waarin het transgen is ingebracht, de eigenschappen van het organisme waaruit de ingebrachte genen afkomstig zijn (donororganisme), de kenmerken van de ingebrachte transgenen, de mogelijke effecten van deze genen, en de kenmerken van het ggo.

Het gastheerorganisme

Het adeno-associated virus (AAV) dat als vector wordt gebruikt behoort tot de familie *Parvoviridae* en het genus *Dependovirus* (6). AAV is een enkelstrengs DNA virus en

is afhankelijk van de activiteit van een helpervirus. Van adenovirussen en herpes simplex virussen (HSV) is bekend dat zij voor AAV als helpervirus kunnen optreden (6; 7). Het helpervirus levert specifieke functies die AAV mist voor replicatie en zorgt ervoor dat AAV in een geïnfecteerde cel zich kan vermenigvuldigen (8). Infecties met AAV komen wereldwijd en frequent voor, maar gaan voor zover bekend niet gepaard met een ziektebeeld (9). Daardoor is er niet veel bekend over de infectiecyclus van AAV gedurende een infectie. Overdracht van het virus vindt waarschijnlijk plaats via aërosolen en huidcontact. Omdat een infectie met AAV geen ziekte veroorzaakt, wordt AAV beschouwd als een zeer geschikt virus voor de ontwikkeling van vectoren voor genterapie (9-13).

De genetische informatie van het AAV virus bestaat uit een tweetal genen, *rep* en *cap*, die verantwoordelijk zijn voor de replicatie en voor de vorming van het manteleiwit van het virus. De *rep* en *cap* genen zijn omgeven door twee 'inverted terminal repeats' (ITR's). Deze ITR's zijn nodig voor het inpakken van genetisch materiaal in omhulsels (virusmantel) van het AAV. Er zijn verschillende serotypen van AAV bekend welke onder andere verschil vertonen in gastheerspecificiteit en weefseltropisme.

Het donororganisme

In deze genterapiestudie wordt een natuurlijk voorkomende humane variant van het gen dat codeert voor het lipoproteïne lipase enzym (het allel *lpl*^{S447X}) tot expressie gebracht. Deze variant wordt geassocieerd met een gunstig lipidenprofiel en met een verlaagde kans op hart- en vaatziekten (4). Het transgen *lpl*^{S447X} codeert niet voor een schadelijk genproduct en heeft een duidelijk omschreven functie in het humane metabolisme (1; 3). Expressie van *lpl*^{S447X} zou theoretisch kunnen leiden tot een immuunrespons in de patiënt, waardoor cellen die geïnfecteerd zijn met het ggo AMT-010, afgebroken zouden kunnen worden. Een dergelijke immuunrespons is door de aanvrager waargenomen in studies met LPL deficiënte katten bij gebruik van tien tot honderd maal de klinische dosis AMT-010. Daarnaast leidt, volgens de aanvrager, sterke overproductie van LPL in een muizenmodel tot gewichtstoename.

Aspecten van het ggo AMT-010

De AAV vector die in deze studie wordt gebruikt bevat slechts een minimale hoeveelheid genetisch materiaal van het wildtype virus. De vector bevat alleen de twee 'inverted terminal repeats' (ITR's) die aan de uiteinden van het virale genoom van het AAV virus zitten. De ITR's zijn afkomstig van het serotype 2 van AAV (AAV-2). Alle overige genetische informatie die codeert voor genproducten van AAV (*rep* en *cap* genen) zijn verwijderd. Tussen deze twee ITR's is de *lpl* expressiecassette geplaatst. De expressiecassette bevat naast het *lpl* gen de volgende regulatoire sequenties: een *Cytomegalovirus* (CMV) promotor, het 'Woodchuck Hepatitis Posttranscriptional Regulatory Element' (WPRE) en een polyA sequentie. De CMV

promotor draagt zorg voor een constitutieve expressie in vrijwel alle weefseltypen. Dit betekent dat het *lpl* gen onafhankelijk van het cel- of weefseltype tot expressie komt. De CMV promotor codeert niet voor enig genproduct en kan daarom geen van de symptomen van een CMV infectie veroorzaken. Het WPRE codeert niet voor een genproduct maar heeft de functie het transport van mRNA vanuit de kern efficiënter te laten verlopen (14). De polyA codeert voor een polyadenyleringssignaal en bevordert de translatie van het mRNA.

De vector wordt geproduceerd met behulp van een productiesysteem dat ontwikkeld is met het oog op het vermijden van het ontstaan van 'replicatie-competente' AAV (rcAAV) virusdeeltjes (15). Dit wordt bereikt door de sequenties die nodig zijn voor de vermeerdering van een vectordeeltje te verdelen over aparte plasmiden en op één van de chromosomen van de productiecellijn. Eén plasmide bevat AMT-010 met de twee ITR's van AAV-2, terwijl het tweede plasmide de genen bevat coderend voor het AAV-2- *rep* gen, het AAV-1- *cap* gen en de adenovirus-helpergenen E2A, E4 en VA. De productiecellijn HEK 293 is een humane embryo niercel en brengt in dit systeem het E1 gen van adenovirus tot expressie (16). Het gevormde gemodificeerde virusdeeltje wordt omgeven door manteleiwitten die afkomstig zijn van het AAV-1-capside gen. Door de aanwezigheid van dit manteleiwit is het virusdeeltje in staat om spierweefsel te infecteren. De virusbatch die gebruikt wordt voor gentherapie is gecontroleerd op afwezigheid van replicatie-competent AAV, adeno- en herpesvirus. Batches die rcAAV of een helpervirus bevatten worden niet gebruikt. De productie van de vector AMT-010 maakt geen deel uit van de aanvraag en zal plaatsvinden onder een vergunning voor ingeperkt gebruik van ggo's.

De vector wordt aan de maximaal 50 deelnemende patiënten meerdere malen door middel van intramusculaire injectie toegediend. De eerste toediening vindt plaats in de bovenbeenspier, de vervolgdoses worden toegediend in onderbeen- en armspieren. Op de eerste dag worden 10^{11} gc/kg (vector genoom kopieën per kg lichaamsgewicht) toegediend, na 1 maand $3 \cdot 10^{11}$ gc/kg en na twee maanden 10^{12} gc/kg. De vector kan cellen infecteren met lage frequentie en kan vervolgens in het genoom integreren. Doordat de *rep* en *cap* genen zijn verwijderd is de vector niet meer in staat om te repliceren en zal ook verminderd persistent zijn in vergelijking tot het wildtype AAV. Vermenigvuldiging van de uitgangsvector zou kunnen optreden als de deficiëntie in replicatie van de AAV vector door complementatie wordt opgeheven. Complementatie kan optreden door een wildtype AAV stam die tegelijkertijd in de met AMT-010 geïnfecteerde lichaamscel aanwezig is. Hierbij geldt overigens dat voor replicatie ook tegelijkertijd een helpervirus aanwezig moet zijn in diezelfde cel. Recombinatie van AMT-010 met een wildtype AAV kan alleen optreden tussen de sequenties in AMT-010 die homoloog zijn aan AAV. AMT-010 bevat alleen de ITR's van wildtype AAV, de overige componenten in het genetisch materiaal vertonen geen homologie.

Overwegingen en advies

De in deze studie gebruikte vector bevat alleen de ITR's van het wildtype AAV die nodig zijn voor het inpakken van genetisch materiaal in een virusdeeltje. Alle overige genetische informatie die codeert voor genproducten van AAV is verwijderd en vervangen door het gen dat codeert voor het LPL. Hierdoor kan de recombinante AAV vector alleen nog cellen infecteren, maar niet meer repliceren. Een CMV promotor is geplaatst vóór het transgen. Deze promotor codeert echter niet voor enig genproduct en wordt door de COGEM veilig geacht (CGM/010509-02, CGM/011029-03 en CGM/041223-02).

De vector wordt geproduceerd met behulp van helperplasmiden die noodzakelijk zijn om de benodigde eiwitten tot expressie te brengen die afwezig zijn in de vector. Bij de virusproductie kan theoretisch hergroepering van genetisch materiaal plaatsvinden, waardoor recombinante virusdeeltjes ontstaan (rAAV), maar ook replicatie-competent virusdeeltjes (rcAAV). Hoewel onder bepaalde condities *in vitro* in specifieke huidcellen is waargenomen dat AAV autonoom kan repliceren (17), is AAV in het algemeen een helpervirus-afhankelijk virus dat voor replicatie afhankelijk is van co-infectie van de gastheercel door een adeno- of herpesvirus. In afwezigheid van een helpervirus zal rcAAV slechts stabiel in het genoom van de gastheer integreren en latent aanwezig blijven. Bij een acute infectie met een adeno- of herpesvirus kan rcAAV zich gaan vermenigvuldigen (9).

Replicatie-competent AAV

De aanvrager geeft aan dat batches gecontroleerd worden op aanwezigheid van rcAAV, adeno- en herpesvirus. Op basis van de gevoeligheid van de test (Infectious Center Assay) om rcAAV aan te tonen is er maximaal één rcAAV per $2,4 \times 10^9$ rAAV aanwezig. De concentratie van de batch is volgens de aanvrager $1,2 \times 10^{12}$ gc/ml. Dit betekent dat bij de hoogste dosis (10^{12} gc/kg) die aan een patiënt van gemiddeld 75kg toegediend krijgt, nul tot maximaal 3×10^4 rcAAV aanwezig kunnen zijn ($= 75\text{kg} \times 10^{12}\text{gc/kg} / 2,4 \times 10^9 \text{rAAV/rcAAV}$). Derhalve is de COGEM van mening dat niet kan worden uitgesloten dat er rcAAV in de batches aanwezig zijn. Zowel de batch als de productieceld worden met behulp van PCR getest op afwezigheid van adeno- en herpesvirussen. De gevoeligheid van deze testen zijn volgens de COGEM adequaat om eventuele aanwezigheid van helpervirus aan te tonen. Gezien het feit dat de kans dat met het productiesysteem rcAAV gevormd wordt zeer klein is (9; 15), de hoeveelheid rcAAV ten opzichte van rAAV in de batch onder de detectiegrens ligt (maximaal $2,4 \times 10^{-9}$ rcAAV per rAAV) en dat er geen helpervirus aanwezig is, is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu van de mogelijke aanwezigheid van rcAAV verwaarloosbaar klein zijn.

Recombinatie en complementatie

Recombinatie van AMT-010 met een wildtype AAV kan alleen optreden met de sequenties in AMT-010 die homologoog zijn aan AAV. Aangezien AMT-010 alleen de ITR's van wildtype AAV bevat en de overige componenten in het genetisch materiaal geen homologie vertonen, is de kans op homologe recombinatie zeer klein. Indien recombinatie optreedt, leidt dit tot de vorming van virusdeeltjes die identiek zijn aan het uitgangsmateriaal. Het genetisch materiaal van de genen *rep*, *cap* en het transgen *lpl^{S447X}* zijn samen in omvang te groot om in een AAV eiwitmantel te kunnen worden ingepakt (8; 15). Hierdoor is het zeer onwaarschijnlijk dat er replicatie-competente AAV virussen gevormd worden die tevens LPL produceren. Recombinatie met genetisch materiaal van bijvoorbeeld andere virussen is niet te verwachten, en het optreden van dergelijke gebeurtenissen in cellijnen, proefdieren of mensen is voor zover bekend nog nooit waargenomen of beschreven.

Replicatie van AMT-010 zou kunnen optreden als de replicatie-deficiënte van de toegediende AAV vector door complementatie wordt opgeheven. Hiertoe dient een met AMT-010 geïnfecteerde lichaamscel niet alleen met wildtype AAV geïnfecteerd te zijn maar tegelijkertijd ook met een helpervirus. De recombinante vector zal dan kunnen repliceren en vervolgens een andere cel kunnen infecteren. In deze nieuw geïnfecteerde cel zal alleen replicatie op kunnen treden als deze vervolgens ook geïnfecteerd is met wildtype AAV en een helpervirus. Aangezien niet elke cel gecoïnfecteerd zal zijn, zal de verspreiding van het virus uitdoven.

De COGEM is gezien het bovenstaande van mening dat de kans op recombinatie of complementatie van AMT-010 zeer onwaarschijnlijk is.

Transgen

Het transgen *lpl^{S447X}* in AMT-010 komt niet tot expressie op het oppervlak van het virus en zal daardoor geen invloed hebben op de weefsel- en gastheerspecificiteit. In proefdiermodellen is volgens de aanvrager aangetoond dat er geen significante toxische effecten zijn waargenomen na het toedienen van de vector (4). In een klinische studie waarbij hemofilie B patiënten zijn behandeld met een soortgelijke AAV vector zijn ook geen toxische effecten waargenomen (5; 18; 19). Op grond van deze gegevens is het niet waarschijnlijk dat er toxische effecten zullen worden waargenomen indien mensen in de omgeving van de patiënt geïnfecteerd raken. Er is wel aangetoond in diermodellen, dat overexpressie van LPL kan leiden tot gewichtstoename. In deze aanvraag wordt echter een tien tot honderd maal lagere dosis gebruikt, waardoor het onwaarschijnlijk is dat overexpressie van LPL wordt geïnduceerd. De COGEM is van mening dat de kans dat schadelijke effecten optreden van het transgen *lpl^{S447X}* verwaarloosbaar klein zijn.

Shedding

Het is principe mogelijk dat de toegediende vector uit de patiënt kan vrijkomen (shedding), waardoor mensen in de omgeving van de behandelde patiënt geïnfecteerd raken. Uit proefdierstudies met vergelijkbare protocollen is gebleken dat na toediening van de AAV vector in spieren, het merendeel daadwerkelijk in de spieren terecht komt en slechts een zeer klein deel in het bloed kan worden aangetoond (4; 13). In klinische studies waarbij AAV vectoren in spieren van hemofiele B patiënten is ingespoten, is na zeven dagen geen vector DNA meer terug te vinden in serum, speeksel en urine (5; 19). Klinische studies hebben aangetoond dat tot enkele dagen na injectie, het toegediende AAV gedetecteerd kan worden in sperma (13). Volgens gegevens van de aanvrager zijn in katten met de vector AMT-010 positieve spermamonsters gevonden. Hoewel er in de literatuur geen aanwijzingen voor kiembaantransmissie zijn met vergelijkbare AAV vectoren, is het voor AMT-010 niet uit te sluiten dat de vector in sperma terechtkomt (18).

De COGEM is van mening dat de kans op shedding van de toegediende vector minimaal is. Indien shedding en infectie van andere mensen optreedt, zal de hoeveelheid virusdeeltjes veel lager zijn dan het aantal virusdeeltjes dat aan patiënten in de studie wordt toegediend omdat replicatie van de vector niet kan optreden. Om de kans op verspreiding van de vector vanuit de patiënt verder te beperken dienen patiënten van de studie uitgesloten te worden die, op basis van klinische symptomen, een actieve herpes- of adenovirusinfectie ondergaan.

Van de behandelde patiënten worden monsters genomen van serum, speeksel, urine en, bij mannelijke patiënten, sperma. De monsternamen en het testen op de aanwezigheid van vector DNA in serum, speeksel en urine wordt volgens de aanvrager beëindigd als tests drie weken opeenvolgend negatief zijn. De spermamonsters worden gecontroleerd op de aanwezigheid van DNA-vector tot deze drie maal negatief zijn na een volledige cyclus van de spermatogenese (75 dagen). Conform de door de aanvrager gestelde voorwaarde, is de COGEM van mening dat mannelijke patiënten gedurende deze periode gebruik dienen te maken van op barrière beruste anticonceptie, vanwege de mogelijke aanwezigheid van het ggo in het sperma. Tot slot acht de COGEM het wenselijk dat behandelde patiënten afzien van het doneren van weefsels en cellen voor transplantatie, aangezien hierdoor verspreiding van gemodificeerde cellen in het milieu optreedt.

Conclusies

De COGEM concludeert dat de algehele risico's voor mens en milieu verbonden aan de klinische studie met AMT-010 verwaarloosbaar klein zijn. Hoewel niet volledig kan worden uitgesloten dat de virusbatch replicatie-competent AAV bevat, zijn de risico's van de mogelijke aanwezigheid van rcAAV echter verwaarloosbaar klein. Om de minimale kans op repliceren van AMT-010 in de patiënt, als gevolg van

recombinatie of complementatie, verder te beperken, dienen patiënten van de studie uitgesloten te worden die, op grond van klinische symptomen, een actieve herpes- of adenovirusinfectie ondergaan. Tevens dienen 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 kan worden aangetoond. Daarbij adviseert de COGEM om behandelde patiënten uit te sluiten van donatie van weefsels en cellen voor transplantatie.

Referenties

1. Mead, J. R., Irvine, S. A., and Ramji, D. P. (2002). Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med* **80**, blz. 753-69
2. Nierman, M. C., Rip, J., Twisk, J., Meulenberg, J. J., Kastelein, J. J., Stroes, E. S., and Kuivenhoven, J. A. (2005). Gene therapy for genetic lipoprotein lipase deficiency: from promise to practice. *Neth J Med* **63**, blz. 14-9
3. Evans, V. and Kastelein, J. J. (2002). Lipoprotein lipase deficiency--rare or common? *Cardiovasc Drugs Ther* **16**, blz. 283-7
4. Ross, C. J., Twisk, J., Meulenberg, J. M., Liu, G., van den Oever, K., Moraal, E., Hermens, W. T., Rip, J., Kastelein, J. J., Kuivenhoven, J. A., and Hayden, M. R. (2004). Long-term correction of murine lipoprotein lipase deficiency with AAV1-mediated gene transfer of the naturally occurring LPL(S447X) beneficial mutation. *Hum Gene Ther* **15**, blz. 906-19
5. Kay, M. A., Manno, C. S., Ragni, M. V., Larson, P. J., Couto, L. B., McClelland, A., Glader, B., Chew, A. J., Tai, S. J., Herzog, R. W., Arruda, V., Johnson, F., Scallan, C., Skarsgard, E., Flake, A. W., and High, K. A. (2000). Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* **24**, blz. 257-61
6. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.
7. Knipe, M. D. and Howley, P. M. (2001). Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
8. Smith-Arica, J. R. and Bartlett, J. S. (2001). Gene therapy: recombinant adeno-associated virus vectors. *Curr Cardiol Rep* **3**, blz. 43-9
9. Goncalves, M. A. (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virol J* **2**, blz. 43
10. Lai, C. M., Lai, Y. K., and Rakoczy, P. E. (2002). Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA Cell Biol* **21**, blz. 895-913.

11. El-Aneed, A. (2004). An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release* **94**, blz. 1-14.
12. Monahan, P. E. and Samulski, R. J. (2000). Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons? *Mol Med Today* **6**, blz. 433-40
13. Favre, D., Provost, N., Blouin, V., Blancho, G., Cherel, Y., Salvetti, A., and Moullier, P. (2001). Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle. *Mol Ther* **4**, blz. 559-66
14. Donello, J. E., Loeb, J. E., and Hope, T. J. (1998). Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element. *J Virol* **72**, blz. 5085-92
15. Grimm, D., Kern, A., Rittner, K., and Kleinschmidt, J. A. (1998). Novel tools for production and purification of recombinant adenoassociated virus vectors. *Hum Gene Ther* **9**, blz. 2745-60
16. Louis, N., Eveleigh, C., and Graham, F. L. (1997). Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* **233**, blz. 423-9, 423-9.
17. Meyers, C., Mane, M., Kokorina, N., Alam, S., and Hermonat, P. L. (2000). Ubiquitous human adeno-associated virus type 2 autonomously replicates in differentiating keratinocytes of a normal skin model. *Virology* **272**, blz. 338-46
18. Arruda, V. R., Fields, P. A., Milner, R., Wainwright, L., De Miguel, M. P., Donovan, P. J., Herzog, R. W., Nichols, T. C., Biegel, J. A., Razavi, M., Dake, M., Huff, D., Flake, A. W., Couto, L., Kay, M. A., and High, K. A. (2001). Lack of germline transmission of vector sequences following systemic administration of recombinant AAV-2 vector in males. *Mol Ther* **4**, blz. 586-92
19. Manno, C. S., Chew, A. J., Hutchison, S., Larson, P. J., Herzog, R. W., Arruda, V. R., Tai, S. J., Ragni, M. V., Thompson, A., Ozelo, M., Couto, L. B., Leonard, D. G., Johnson, F. A., McClelland, A., Scallan, C., Skarsgard, E., Flake, A. W., Kay, M. A., High, K. A., and Glader, B. (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* **101**, blz. 2963-72