

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 07 september 2015
KENMERK CGM/150907-01
ONDERWERP Advies Grootschalige productie van gg-animale cellen in SUB

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de vergunningaanvraag IG 15-164_III-000 met als titel: 'Activiteiten met genetisch gemodificeerde animale cellen tot een volume van 1000 liter' van Patheon Biologics, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over de grootschalige kweek van genetisch gemodificeerde (gg-) dierlijke cellen in een bioreactor voor eenmalig gebruik. Deze zogenaamde Single-Use Bioreactor (SUB) bestaat uit een kunststof bioreactorzak. De adviesvraag betreft een SUB van het type Satorius STR 500L. De aanvrager verzoekt om de werkzaamheden op MI-III uit te mogen voeren.

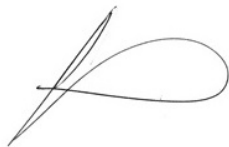
Belangrijke aspecten bij de risicoanalyse van deze aanvraag zijn de kans op lekkage van de SUB, de kans op verspreiding van de gg-cellen uit de beoogde productieruimte bij eventuele lekkage en de aard van de gg-cellen.

Op basis van de integriteitstest die de aanvrager voorafgaand aan de in gebruik name van de bioreactorzak uitvoert, de visuele inspecties en de aangebrachte elektronische beveiligingssystemen, acht de COGEM de kans dat de bioreactorzak gaat lekken zeer klein. Zij merkt daarbij op dat de productieruimte zodanig geconstrueerd is, dat de volledige inhoud van de SUB opgevangen wordt. De COGEM is daarom van mening dat de kans dat betreffende gg-cellen tijdens de werkzaamheden in het milieu terecht komen, verwaarloosbaar klein is.

De COGEM is tevens van mening dat de door de aanvrager toegepaste gg-cellen niet buiten de reactor kunnen overleven of vermenigvuldigen. De risico's voor mens en milieu van de betreffende ggo's bij vrijkomen in het milieu acht de COGEM derhalve verwaarloosbaar klein. Concluderend acht de COGEM de risico's bij de voorgenoemde werkzaamheden op MI-III 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 stylized 'S' followed by a loop and a horizontal stroke.

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

Grootschalige kweek van genetisch gemodificeerde dierlijke cellen in de ‘Single-Use Bioreactor Sartorius STR’

COGEM advies CGM/150907-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag van Patheon Biologics voor de grootschalige kweek van genetisch gemodificeerde (gg) dierlijke cellijnen met behulp van een bioreactor voor eenmalig gebruik, de zogenaamde ‘Single-Use Bioreactor’ (SUB). In plaats van de stalen reactorvaten wordt bij een SUB gebruik gemaakt van kunststof zakken. Vanwege het eenmalige gebruik van deze zakken is het risico op kruiscontaminatie bij opeenvolgende productieprocessen uitgesloten. Daarnaast hoeven zij na inactivatie niet schoongemaakt te worden, omdat ze na afloop worden vernietigd. De aanvrager wil voor de productie gebruik maken van twee verschillende soorten SUB’s. Het betreft de SUB van het type Sartorius STR 500L voor producties van maximaal 500 liter en van het type Hyclone HyC^R CX5-14 tot 1000 liter. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden uit te mogen voeren op MI-III inperkingsniveau.

Aangezien de COGEM al eerder heeft geadviseerd over grootschalige productie van vergelijkbare gg-animale cellen in een SUB van het type Hyclone HyC^R CX5-14 is de adviesvraag beperkt tot de beoordeling van het gebruik van de SUB van het type Sartorius STR 500L.¹

SUB’s en risicoanalyse

SUB systemen voor grootschalige productie (> 20 L) bestaan doorgaans uit een kunststof zak die wordt opgehangen in een roestvrijstalen omhulsel. De kunststof zak bevat onder andere geïntegreerde buizen voor het toedienen en afnemen van medium, een druksensor, geïntegreerde inlaatopeningen voor additionele metingen waarbij gebruik gemaakt wordt van conventionele sensoren, en gasleidingen met filter. In sommige SUB’s zijn bewegende onderdelen geïntegreerd. SUB’s worden al langere tijd gebruikt in de biofarmaceutische industrie. Hoewel er veel ervaring is met de risicoanalyse van conventionele stalen reactoren in combinatie met het toepassen van ggo’s, is dit bij het gebruik van SUB’s nog niet het geval.

Een aantal jaar geleden heeft Xendo Bioprocessing in opdracht van het toenmalige ministerie van VROM een rapport uitgebracht waarin een generieke risicoanalyse wordt geschetst voor de kweek van ggo’s in SUB’s.² Het rapport geeft aan dat bij het toepassen van SUB systemen ggo’s op twee manieren vrij kunnen komen. Enerzijds kan lekkage van ggo’s plaatsvinden ten gevolge van de aard van het systeem, de zogenaamde *construction containment risks*. Anderzijds kunnen ggo’s vrijkomen bij operationele handelingen, de zogenaamde *operational containment risks*. Het rapport biedt diverse handvatten voor het uitvoeren van de risicoanalyse wanneer een SUB systeem in gebruik genomen wordt.

Construction containment risks

Onder *construction containment risks* vallen risico's die kunnen optreden als gevolg van de fysieke karakteristieken van de SUB. De sterkte van de plastic zak is hierbij een belangrijke limiterende factor.

De kans op lekkage wordt tevens vergroot wanneer er conventionele sensoren worden gebruikt in de reactor voor het meten van bijvoorbeeld de pH of de partiële zuurstofdruk. Deze sensoren moeten door de wand van de zak worden gestoken. Een alternatief is het gebruik van SUB's met wegwerpsensoren. Deze sensoren zitten aan de binnenkant van de zak en worden door een extern apparaat afgelezen.

Sommige systemen maken gebruik van een roerpeddel die van bovenaf door de wand van de zak wordt gestoken. Hiermee wordt de integriteit van het systeem extra belast en wordt de kans op lekkage verhoogd.

Operational containment risks

Onder *operational containment risks* vallen risico's die kunnen optreden tijdens het gebruik van de SUB. Na montage van het systeem wordt de bioreactor, via een steriele verbinding, geïnoculeerd met het ggo. Bij dit proces worden twee buizen aan elkaar gekoppeld. Als deze koppeling niet goed wordt gemaakt, kan er lekkage optreden. Hetzelfde geldt voor de verbindingen die worden gemaakt tijdens het afnemen van monsters. Tevens kan er lekkage optreden wanneer de sensoren niet goed worden aangebracht. Voor al deze toepassingen zijn speciale koppelingsmechanismen en -systemen ontwikkeld (zogenaamde 'Kleenpak' en 'tube welder' systemen).

Veel processen in de bioreactor zijn met behulp van speciale software geautomatiseerd. Problemen kunnen ontstaan wanneer de software fouten bevat of wanneer de operateur handelingen verricht die interfereren met de geautomatiseerde processen.

Na afloop van het kweekproces, wanneer de inhoud uit de bioreactor geoogst is, moet de bioreactor gesloten blijven. Vervolgens wordt het achtergebleven materiaal in de bioreactorzak geïnactiveerd.

Eigenschappen van het ggo

Vectoren

De aanvrager is voornemens alleen vectoren te gebruiken die vermeld staan in bijlage 2 lijst A2 van de Regeling ggo.³ Dergelijke vectoren zijn geschikt voor de vervaardiging van ggo's waarmee op ML-I inperkingsniveau gewerkt mag worden.

Donorsequenties

In de vectoren kunnen synthetisch vervaardigde sequenties dan wel cDNA of genomisch DNA zijn gekloneerd afkomstig van mensen, zoogdieren, landbouw-, tuinbouw-, fruitgewassen of niet-pathogene micro-organismen, zoals vermeld op lijst A1 van de Regeling ggo milieubeheer 2013.³ Daarnaast kunnen de vectoren ook synthetisch vervaardigde sequenties bevatten van pathogene micro-organismen van ten hoogste pathogeniteitsklasse 2, zoals vermeld in bijlage 4 van de Regeling ggo milieubeheer 2013.⁴ Hierbij zal niet het gehele genoom van deze micro-organismen

in de vectoren worden gekloneerd, maar slechts delen hiervan. Bovendien geeft de aanvrager aan dat er geen gebruik zal worden gemaakt van adenovirale sequenties. De te gebruiken donorsequenties zijn gekarakteriseerde sequenties die niet coderen voor schadelijke eiwitten of aggregerende eiwitten met mogelijk pathogene eigenschappen.

Cellijnen

De cellijnen die zullen worden gebruikt voor de grootschalige producties zijn de BHK 2254-62.2, BHK tk-ts-13, BHK-21, CHO/dhfr-, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUKX, HEK-293, PER.C6, een rhabdomyosarcoma en de YB2/0 cellijn. Al deze cellijnen zijn van humane of dierlijke herkomst en kunnen alleen in aanwezigheid van kweekmedium overleven en reproduceren. Bij lagere omgevingstemperatuur, afwezigheid van voedingsstoffen of afwezigheid van aanvullende beluchting zijn de cellen niet in staat te overleven. Baby hamster kidney (BHK) cellijnen, Chinese hamster ovary (CHO) cellijnen, de HEK-293 cellijn en de PER.C6 cellijn worden sinds vele jaren in laboratoria gebruikt voor onderzoeksdoeleinden. De lijnen zijn goed gekarakteriseerd en staan bekend om hun lange historie van veilig gebruik.

BHK cellijnen zijn fibroblasten voortgekomen uit niercellen van één-dag-oude hamsters. BHK-21 is hierbij de voorlopercel, BHK 2254-62.2 en BHK tk-ts 13 zijn van BHK-21 afgeleide mutanten. Door de American type Culture Collection (ATCC) worden deze BHK cellijnen ingedeeld in biosafety level 1.⁵

CHO cellijnen zijn epitheelcellen voortgekomen uit de eierstokken van volwassen Chinese hamsters. CHO-K1 is hierbij de voorlopercel. De CHO/dhfr-, CHO DG44 en CHO-DUKX zijn van CHO-K1 afgeleide mutanten. Door de ATCC wordt CHO-K1 ingedeeld in biosafety level 1.⁵

HEK-293 is een humane embryonale kidney cellijn. Door de ATCC wordt HEK-293 ingedeeld in biosafety level 2 met de aanvullende opmerking dat *Adenovirus* type 5 chromosomaal geïntegreerd is, maar dat dit alleen de early region 1 (E1) gen sequentie van het virus betreft.⁶

PER.C6 is een humane cellijn voortgekomen uit een embryonale retinacel. De cellen zijn geïmmortaliseerd met behulp van *Adenovirus* type 5 E1A en E1B gensequenties.⁷

De aanvrager geeft aan dat de rhabdomyosarcoma cellijn een humane cellijn is. Rhabdomyosarcoma is een tumor ontstaan in de embryonale voorlopers van dwarsgestreepte spiercellen.

De YB2/0 cellijn is een hybridoma cellijn van een B lymfoblast geïsoleerd uit de milt van de bruine rat. De ATCC heeft YB2/0 ingedeeld in biosafety level 1.⁵

Gg-cellijnen

Op basis van de omschrijving van de donorsequenties, zullen de gg-animale cellijnen tijdens de kweek geen toxische eiwitten of aggregerende eiwitten met mogelijk pathogene eigenschappen produceren. Aangezien er slechts delen van het genoom van micro-organismen van pathogeniteitsklasse 2 in de gg-animale cellen tot expressie worden gebracht en niet het volledige genoom, zullen er bovendien geen pathogene micro-organismen worden geproduceerd.

Eerder COGEM advies

In 2010 heeft de COGEM geadviseerd over de grootschalige productie van soortgelijke gg-animale cellen als in onderhavige aanvraag in SUB's van 50, 250 en 1000 liter van de producent Thermo Scientific Hyclone.¹ In dit advies heeft de COGEM aangegeven voor de risicoanalyse van de aanvraag twee aspecten van belang te vinden. Dit zijn de kans op lekkage van het ggo en de aard van het ggo.

Om de kans op lekkage te minimaliseren, adviseerde de COGEM het SUB systeem voor de ingebruikname aan een integriteitstest te onderwerpen. Zij raadde daarvoor aan om de SUB onder maximale druk te plaatsen en daarbij zoveel mogelijk leidingen en sensoren aan te sluiten en de roerpeddel in werking te stellen. Zij gaf aan dat deze druktest bij voorkeur gedaan diende te worden met het kweekvolume waarmee de productie werd uitgevoerd. Met betrekking tot de aard van het ggo was de COGEM van mening dat de toegepaste ggo's apathogeen waren en niet in staat om buiten de SUB te overleven of te vermenigvuldigen. Concluderend achtte de COGEM de risico's van voorgenomen grootschalige productie op MI-III inperkingsniveau voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

De COGEM heeft in 2011 tweemaal geadviseerd over grootschalige productie in een SUB. De eerste aanvraag betrof de productie van gg-baculovirussen in insectencellen in een 500 liter SUB van het type Hyclone Hyc^R CX5-14.⁸ De COGEM achtte de voorgestelde maatregelen en werkprocedures adequaat om te voorkomen dat het gg-baculovirus in het milieu terecht kon komen. Aangezien het gehanteerde baculovirussysteem niet erkend is als groep 1 organisme adviseerde de COGEM, in lijn met de Regeling ggo de productie op MI-III inperkingsniveau in te schalen.

De andere aanvraag betrof de grootschalige productie van humane monoklonale antilichamen met behulp van gg-PER.C6 in een SUB van het type XDR.⁹ De COGEM was van mening dat de betreffende gg-PER.C6 cellen apathogeen zijn en alleen onder laboratoriumcondities kunnen overleven en delen. Bij eventueel lekkage van het ggo uit de bioreactor achtte de COGEM de milieurisico's derhalve verwaarloosbaar klein. Zij was van mening dat de grootschalige productie veilig uitgevoerd kon worden op MI-I inperkingsniveau.

Overweging en advies

In vergelijking met een conventionele roestvrijstalen bioreactor is er bij gebruik van een SUB, in theorie, een verhoogde kans op lekkage waarbij het betreffende ggo vrij kan komen. Belangrijke aspecten van de risicoanalyse voor een grootschalige productie van ggo's in een SUB zijn derhalve de kans op lekkage van de SUB, de kans op verspreiding van het ggo uit de beoogde productieruimte bij eventuele lekkage en de aard van het ggo. Deze aspecten worden in onderstaande overweging ieder afzonderlijk behandeld, waarbij de lekkage van de SUB is opgedeeld in *construction containment risks* en *operational containment risks*.

Construction containment risks

De aanvrager geeft aan dat de integriteit van de Sartorius STR 500L in de productieruimte wordt getest voordat de SUB in gebruik wordt genomen voor de grootschalige productie van het betreffende ggo. Voorafgaand aan de installatie van de bioreactorzak in het systeem wordt de zak

visueel geïnspecteerd op schade. Na installatie van de SUB wordt vervolgens een druktest uitgevoerd, waarbij een druk van 45-50 mbar op de bioreactorzak wordt gezet. Nadat alle lijnen zijn afgesloten wordt de druk voor 1200 seconden gemonitord. De druk mag in deze tijdsspanne niet meer dan 1 mbar afnemen. Deze druktest is gevalideerd door de producent van de bioreactorzakken en daaruit is gebleken dat op deze wijze zeer kleine gaatjes aangetoond kunnen worden.¹⁰ Indien uit de druktest geen lekkage blijkt, wordt de SUB gevuld met kweekmedium en wordt het systeem na een dag geïnspecteerd op contaminatie en lekkage, voordat het ggo wordt toegevoegd en de beoogde productie wordt gestart. De aanvrager voegt hier aan toe dat deze procedure al met succes wordt toegepast in hun faciliteit in Brisbane, Australië.

Door de gevoeligheid en validatie van de druktest en de aansluitende visuele inspectie van de bioreactorzak een dag nadat deze met het kweekmedium is gevuld, acht de COGEM de beschreven procedure een goede methode om de integriteit van het systeem voor de daadwerkelijke in gebruik name van iedere bioreactorzak, te controleren. Het is hierbij echter niet geheel duidelijk in hoeverre het systeem al volledig is opgetuigd met roerpeddels, sensoren etc. Het plaatsen van deze onderdelen kan de kans op lekkage verhogen. Conform haar eerdere advies, adviseert de COGEM het systeem daarom voorafgaand aan de druktest geheel op te tuigen. Als aan deze voorwaarde is voldaan acht de COGEM de kans op de zogenaamde *construction containment risks* verwaarloosbaar klein.

Operational containment risks

Als de SUB met kweekmedium geen lekkage vertoont wordt het ggo toegevoegd en de productie gestart. De aanvrager geeft aan dat het personeel wordt gealarmeerd als de druk tijdens de productie boven de 20 mbar oploopt, zodat tijdig actie ondernomen kan worden. Als extra veiligheid wordt de gastoevoer automatisch gestopt, middels een interlock beveiligingssysteem, als de druk onverhoopt verder oploopt en een waarde van 50 mbar bereikt. Naast deze elektrische beveiligingssystemen, wordt de integriteit van de SUB elke dag visueel gecontroleerd door de operator. Als er lekkage wordt geconstateerd, wordt het productieproces gestopt, de inhoud van de SUB overgepompt naar een container en de cellen afgedood met loog. De aanvrager merkt hierbij op dat er al jarenlange ervaring is met andere Satorius zakken die van hetzelfde materiaal gemaakt zijn als de nu te gebruiken bioreactorzakken. Deze zakken worden door de aanvrager gebruikt voor de bereiding en opslag van grote volumina buffers en media en worden als extreem sterk en robuust beoordeeld.

De aanvrager geeft aan dat als er toch een grote lekkage optreedt, de productieruimte zodanig is ingericht dat de volledige inhoud van de SUB binnen de productieruimte kan worden opgevangen. Het gelekte materiaal zal in dit geval met een zuiger die geschikt is voor vloeistoffen worden opgezogen en worden de ggo's afgedood.

De COGEM is van mening dat de aanwezige elektronische veiligheidssystemen de kans op lekkage als gevolg van overdruk minimaliseert. De lekkage van kunststof bioreactiezakken kan evenwel niet uitgesloten worden. Door de dagelijkse visuele inspectie van de SUB door het personeel acht

de COGEM de kans klein dat de volledige inhoud van de SUB onopgemerkt in de productieruimte zal lekken. Zij constateert echter dat zelfs als dit gebeurt er door de constructie van de productieruimte geen ggo buiten deze ruimte in het milieu terecht zal komen.

Aard van de ggo's

De gg-cellen die de aanvrager van plan is te gebruiken in combinatie met de Sartorius STR 500L zijn gebaseerd op bekende animale cellijnen. Bij lagere omgevingstemperatuur, afwezigheid van voedingstoffen of afwezigheid van aanvullende beluchting zijn deze cellijnen niet in staat te overleven en te reproduceren. Gezien de aard van de beschreven donorsequenties is de COGEM van mening dat de expressie van deze donorsequenties geen verandering zal brengen in de eigenschappen van deze cellijnen.

Afdoding ggo's

Na beëindiging van het productieproces worden de gg-cellen en het kweekmedium van elkaar gescheiden en wordt het cel-vrije medium verder gezuiverd totdat zuiver eindproduct is verkregen. De cel-fractie wordt hetzij afgedood door middel van incineratie hetzij door een behandeling met 0,1M NaOH voor minimaal 8 uur. De aanvrager geeft aan dat de afdoding van cel-bevattende vloeistoffen met behulp van 0.1M NaOH is gevalideerd in 10 ml celmonsters. Er wordt geen inzicht geboden in de uitgevoerde validatie.

Er van uitgaande dat bij de incineratie het aangeboden materiaal volledig wordt verbrand, beschouwt de COGEM dit als een effectieve methode om het celmateriaal af te doden. Het gebruik van 0.1M NaOH voor het afdoden van animale cellen in de context van grootschalige productie heeft de COGEM al eerder beoordeeld. In haar advies 'Grootschalige kweek van genetisch gemodificeerde dierlijke cellen in een Single-Use Bioreactor' uit 2010 betrof het grotendeels dezelfde cellijnen als in onderhavige aanvraag. In dit advies was de COGEM van oordeel dat op voldoende wijze aannemelijk was gemaakt dat de gg-cellijnen met behulp van deze methode werden geïnactiveerd.¹ Tevens achtte de COGEM afdoende aangetoond dat de inhoud van de bioreactorzak binnen enkele minuten volledig gemengd is.¹

Op basis van dit eerdere oordeel en het feit dat de aanvrager stelt de inactivatie op kleine schaal gevalideerd te hebben, is de COGEM van mening dat de incubatie gedurende minimaal 8 uur in een oplossing van 0,1M NaOH afdoende is voor afdoding van betreffende gg-cellen. Zij wijst er hierbij op dat volgens de specificaties van de producent de Cultibag STR alleen bruikbaar is bij een pH die tussen 5 en 8 ligt.¹⁰ Aangezien de pH van de suspensie van cellen, kweekmedium en 0.1M NaOH deze waarde hoogstwaarschijnlijk zal overstijgen, en het effect van een hoge pH op de integriteit van de bioreactorzak niet duidelijk is, acht de COGEM het verstandig dit van te voren te testen in een Cultibag STR met kweekmedium.

Conclusie

De COGEM acht de druktest die voorafgaand aan de in gebruik name van ieder bioreactor wordt uitgevoerd en de daarop aansluitende visuele inspectie van de bioreactorzak een dag nadat deze met

het kweekmedium is gevuld, afdoende om de integriteit van het systeem voor de start van de productie te verifiëren. Zij adviseert daarbij het systeem zo volledig mogelijk op te tuigen.

Hoewel er maatregelen getroffen worden om lekkage tijdens de productie te voorkomen en er controles worden uitgevoerd om eventuele lekkage zo snel mogelijk op te merken, kan de COGEM niet uitsluiten dat de SUB zal gaan lekken. Door de constructie van de betreffende MI-III ruimte acht zij de kans echter verwaarloosbaar klein dat het ggo bij eventuele lekkage buiten de productie ruimte komt. Daarbij constateert zij dat de procedure ter afdoding van betreffende ggo's middels 0.1 M NaOH afdoende is gevalideerd.

Tot slot merkt de COGEM op dat zelfs als levend materiaal onverhoopt uit de productieruimte in het milieu terecht komt, zij op basis van de aard van de ggo's van mening is dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

De COGEM concludeert derhalve dat de veiligheid voor mens en milieu is gewaarborgd als beschreven grootschalige producties in de Sartorius STR 500L op MI-III worden uitgevoerd.

Signalering

De COGEM wijst er op dat SUB's al weer enige jaren worden gebruikt voor onderzoek en productiedoeleinden. Hierdoor is ongetwijfeld veel ervaring opgedaan met de '*do's and don'ts*' van deze systemen en is inmiddels veel meer bekend over de voorspellende waarde van de integriteitstests en de betrouwbaarheid van de verschillende bioreactorzakken. Door deze ervaringen inzichtelijk te maken, kan de veiligheid van de SUB's met praktijkgegevens verder onderbouwd worden en kan mogelijk een standaard werkprocedure worden gedestilleerd om *construction* en *operational containment risks* te minimaliseren. Zowel de vergunningverlener als het werkveld kan haar voordeel doen met deze informatie. Gezien het belang van deze informatie zal de COGEM zich beraden op de mogelijkheid om hier meer inzicht in te verkrijgen.

Referenties

1. COGEM (2010). Grootschalige kweek van genetisch gemodificeerde dierlijke cellen in een Single-use bioreactor. COGEM advies CGM/101028-03
2. Xendo Bioprocessing (2010). GMO containment risks evaluation of single-use bioreactors
3. Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu (2014). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013; Bijlage 2. Website: http://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/geldigheidsdatum_02-09-2015 (bezocht: 2 september 2015)
4. Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu (2014). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013; Bijlage 4. Website: http://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/geldigheidsdatum_02-09-2015 (bezocht: 2 september 2015)
5. American Type culture Collection (ATCC). Animal cell line section. Website: http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines/Animal.aspx (bezocht: 2 september 2015)
6. American Type culture Collection (ATCC). Human cell line section. Website: http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/Cells_and_Microorganisms/Cell_Lines/Human.aspx (bezocht: 2 september 2015)

7. Fallaux FJ *et al.* (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication competent adenovirus. *Hum Gene Ther.* 9:1909-17
8. COGEM (2011). Productie van CSFV E2 en PCV manteleiwit met behulp van een baculovirusexpressiesysteem in een Single-Use Bioreactor. COGEM advies CGM/111128-02
9. COGEM (2011). Grootschalige productie van monoklonale antilichamen met behulp van PER.C6 cellen in een kweekstelsel voor eenmalig gebruik. COGEM advies CGM/110503-01
10. Sartorius Stedim biotech. (2014). Validation Guide CultiBag STR.