



Commissie Genetische Modificatie

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

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 |
| IG 04-155/01.co1 | 17 augustus 2005 | CGM/050831-02 | 31 augustus 2005 |

Onderwerp
Advies op voorstel tot inschaling IG 04-155/01

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de adviesvraag en het voorstel tot inschaling door het Bureau GGO betreffende de vergunningaanvraag IG 04-155/01, getiteld 'Onderzoek naar genen in de regulatie van luchtwegontsteking en verwante ziekten', van het Academisch ziekenhuis Groningen, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met longcellen waarin een genetisch gemodificeerd (gg-) virus (adenovirale vector) is ingebracht. Handelingen met deze cellen dienen plaats te vinden in een ML-II ruimte. De apparatuur die gebruikt wordt voor de experimenten is echter niet aanwezig in een ML-I of ML-II ruimte. De aanvrager verzoekt derhalve de experimenten te mogen uitvoeren in een ruimte waaraan geen inperkingsniveau is toegekend (buiten inperking).

De longcellijn is onsterfelijk gemaakt met een niet-gg hybride virus van *Adenovirus type 12* (Ad12) en *Simian virus 40* (SV40). Onbekend is welke delen van het Ad12 en het SV40 in de longcellen aanwezig zijn. De gg-adenovirale vector is gebaseerd op het genoom van *Adenovirus type 5* (Ad5) en is zo vervaardigd dat deze zich niet kan vermenigvuldigen. Doordat in de longcellen ook het hybride virus aanwezig is, kan hiermee een interactie optreden en valt niet uit te sluiten dat de vector zich toch kan vermenigvuldigen of dat er een nieuw hybride virus ontstaat met onbekende eigenschappen. Als deze virussen zich verspreiden, kunnen ze een risico vormen voor mens en milieu. Het is tevens niet duidelijk of de cellen, voordat ze buiten inperking bestudeerd worden, nog vrije virusdeeltjes bevatten. Gezien de aard van de beoogde handelingen die buiten inperking, kan niet worden uitgesloten dat aërosolen gevormd worden, waardoor de vrije virusdeeltjes in het milieu kunnen komen. De COGEM is daarom van mening dat de veiligheid voor mens en milieu niet gegarandeerd kan worden, wanneer de voorgenomen experimenten buiten inperking worden uitgevoerd.

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 on the right.

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

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

Titel: Handelingen met adenovirale getransduceerde cellen buiten inperking

COGEM advies: CGM/050831-02

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke risico's voor mens en milieu van handelingen met adenovirale getransduceerde animale cellen buiten inperking.

Het doel van de aanvrager is om eiwitten betrokken bij luchtwegontsteking en verwante ziekten te onderzoeken. Hiertoe worden humane bronchiale epitheelcellen getransfecteerd met replicatie deficiënte adenovirale vectoren. Hierin zijn genen gekloneerd die coderen voor eiwitten betrokken bij luchtwegontstekingen en aanverwante ziekten. De humane bronchiale cellijn is vóór transductie geïmmortaliseerd middels transformatie met een Human adenovirus 12/*Simian virus 40* (Ad12-SV40) hybride, welke niet genetisch gemodificeerd (gg) is. Op deze wijze is de cellijn BEAS-2B ontstaan (1).

Adenovirale vector

Adenovirale vectoren zijn afgeleid van adenovirussen (*Adenoviridae*, genus *Mastadenovirus*) en worden veelvuldig gebruikt als genoverdrachtsysteem. Adenovirale vectoren hebben het voordeel dat ze een groot aantal celtypen kunnen infecteren en dat de mate van genoverdracht hoog is. Hiernaast kunnen de vectoren relatief grote stukken DNA herbergen en kunnen ze dit DNA inbrengen in niet-delende cellen.

Als basis voor onderhavige adenovirale vectoren (Ad5-HO-1 en Ad5-LacZ) wordt gebruik gemaakt van het genoom van adenovirus type 5 (Ad5). Het genoom bestaat uit één lineair dubbelstrengs DNA molecuul van ongeveer 36 kilobasen. Het genoom van het adenovirus is onderverdeeld in een vroege en een late regio. De vroege ('early') regio (E-regio) wordt kort na de binnenkomst van het virus in de cel, tot expressie gebracht. De late regio van het genoom komt alleen tot expressie nadat de virale DNA replicatie is begonnen (2). Tijdens de vroege fase spelen de zogenaamde E1A en de E1B-regio een cruciale rol (3). Het E1A eiwit is essentieel voor de efficiënte transcriptie van alle virale transcriptie units die in de vroege fase tot expressie komen. Het E1B eiwit zorgt er onder andere voor dat de cellen niet in apoptose (geprogrammeerde celdood) raken.

Om ervoor zorg te dragen dat de gg-adenovirale vector zich niet zoals het wildtype Ad5 kan verspreiden, bevatten de onderhavige vectoren een niet-functionerende E1-regio. De vector is ontstaan door homologe recombinatie tussen de plasmide pJM17 en pAC-HO-1 of pAC-LacZ (4). De pAc-HO-1 en pAc-LacZ plasmiden bevatten het gen van interesse (HO-1 of LacZ). pJM17 bestaat uit het gehele Ad5 genoom met een

insert in de E1 regio waardoor deze niet meer functioneel is (5). De replicatie deficiënte vector die gebruikt wordt in onderhavige experimenten bevat dus het gehele Ad5 genoom waarbij het gen van interesse zich binnen de E1 regio bevindt (6).

Ad12-SV40 hybride

De BEAS-2B cellijn, die in onderhavige aanvraag wordt geïnfecteerd met de adenovirale vector is verkregen door humane bronchiale epitheel cellen te infecteren met een Ad12-SV40 hybride virus (1).

Het hybride virus is ontstaan door 'African green monkey kidney cell (vero) cultures' te infecteren met zowel adenovirus type 12 (Ad12) als SV40 (7). Het hybride virus wordt ingesloten door adenovirus capsiden (8). Voor zover bekend bij de COGEM, is het hybride virus niet moleculair gekarakteriseerd waardoor het niet duidelijk is welke delen van het virus bestaan uit Ad12 en welke uit SV40 sequenties.

De opbouw van het Ad12 genoom komt overeen met het Ad5 genoom. Ad12 bezit in tegenstelling tot Ad5 echter een hoog tumor-inducerend vermogen bij knaagdieren. Een verband tussen het ontstaan van tumoren bij mensen en de aanwezigheid van een adenovirus is echter nooit aangetoond (2).

Simian virus 40 (Polyomaviridae, genus Polyomavirus) is, net als het adenovirus een dubbelstrengs DNA virus (3). Het genoom van SV40 is evenals adenovirussen, verdeeld in een vroege en een late regio. In de vroege fase speelt het 'Large T antigen' (LT) van SV40 een bepalende rol door na infectie van een cel de DNA replicatie in werking te stellen (2). Het SV40 staat bekend om zijn tumor-inducerend vermogen bij knaagdieren. Sinds 1960 is binnen de wetenschappelijke wereld een debat gaande over de vraag of SV40 bijdraagt aan de vorming van humane tumoren (9). Het is bekend dat SV40 DNA aanwezig is in verschillende humane tumoren, zoals de longtumor mesothelioma. Of het daadwerkelijk de veroorzaker is van kanker is echter nog steeds controversieel (9).

BEAS-2B cellijn

Om cellen te immortaliseren en te transformeren door middel van infectie met de Ad12-SV40 hybride is integratie van de transformerende regio's (LT van SV40 of E1 regio van het adenovirus) noodzakelijk. Eén of meer van deze regio's zijn dus geïntegreerd in het genoom van de cel.

Met behulp van immunofluorescentietechnieken is in het verleden de aanwezigheid van LT in BEAS-2B cellen aangetoond. De aanwezigheid van E1A en E1B eiwit was niet aantoonbaar, maar de aanwezigheid van kleine hoeveelheden van het eiwit kan niet worden uitgesloten. Ook de aanwezigheid van mRNA van het E1A en E1B kon niet worden aangetoond (1). Omdat er geen rt-PCR test is gedaan, kan echter niet met zekerheid worden vastgesteld dat de cellen geen E1A en E1B mRNA bevatten.

De leverancier van de cellijn (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Verenigde Staten) heeft de cellijn ingeschaald op BSL-2 niveau. Zij vermelden tevens in hun 'fact sheet' dat de cellen *Papovavirus (Polyomavirus)* bevatten. Uit de 'fact sheet' valt niet op te maken of de cellen het virus uitscheiden. In een wetenschappelijke publicatie is gerapporteerd dat BEAS-2B cellen waarschijnlijk geen virus uitscheiden (1). Hiertoe werd de cellijn gecocultiveerd met vero cellen die ondermeer gevoelig zijn voor het SV40. De aanwezigheid van SV40 resulteert daardoor in een veranderde celmorfologie. Na cultivatie werden bij de vero cellen geen karakteristieke cytopatische effecten gezien, hetgeen duidt op de afwezigheid van SV40. BEAS-2B cellen werden tevens bestudeerd met behulp van electronenmicroscopie, waarbij geen virusdeeltjes werden aangetoond (1). Het is echter niet bekend of de cellen die door de ATCC worden geleverd, en in onderhavige experimenten worden gebruikt, dezelfde cellen zijn als waar het onderzoek (1) naar is verricht. Er kan derhalve geen uitsluitsel worden gegeven of de BEAS-2B cellijn die geleverd wordt door de ATCC, wel of niet SV40 uitscheidt.

Van de Ad12-SV40 hybride is bekend dat deze over een groter tumor-inducerend vermogen beschikt dan het SV40. Het tumor-inducerend vermogen van de BEAS-2B cellen is daarom onderzocht door de cellen te injecteren in zogenaamde 'naakte' muizen waarvan de thymus is weggehaald. 'Naakte' muizen bezitten geen of weinig T-cellen. Door afwezigheid van zowel T-cellen als thymus kan tumorvorming in muizen efficiënt worden bestudeerd. Minimaal twaalf maanden na injectie zijn de muizen onderzocht en werden er geen tumoren geconstateerd (1).

De adviesvraag

De COGEM is verzocht een advies uit te brengen over handelingen met adenovirale getransduceerde humane BEAS-2B cellen. Deze handelingen dienen plaats te vinden buiten een ingeperkte ruimte met inachtnaam van ML-I werkvoorschriften. Het betreft experimenten met een 'Fluorescence activated cell sorter' (FACS), een fluorimeter en een luminometer.

De FACS, fluorimeter en luminometer zijn niet voorhanden binnen een ML-I of ML-II laboratorium. Hoewel handelingen met adenovirale getransduceerde humane cellen plaats dienen te vinden in een veiligheidskabinet van klasse 2 verzoekt de aanvrager derhalve handelingen uit te mogen voeren buiten een ingeperkte ruimte.

FACS experiment

De BEAS-2B cellijn zal gedurende 6,5 uur getransduceerd worden met 10^8 pfu/ml (moi = 100) adenovirale deeltjes. Na de transductie zullen de cellen driemaal gewassen worden met vers medium en éénmaal met trypsine.

De cellen worden op de afwezigheid van vrije adenovirale deeltjes getest, voordat ze vanuit de ML-II ruimte worden overgebracht naar de niet-ingeperkte ruimte waar de FACS zich bevindt. De aanvrager levert gegevens waaruit blijkt dat na afloop van

de 6,5 uur durende transductie, $2,5 \times 10^5$ pfu/ml adenovirus aanwezig was. Na afloop van de wasstappen en de trypsine behandeling konden geen vrije adenovirale deeltjes meer worden aangetoond. Deze bepaling vindt plaats met behulp van een 'Limiting dilution AdEasy assay'.

De getransduceerde cellen zullen ook geïnjecteerd worden in muizen en ratten. Waarschijnlijk worden de cellen 6,5 uur getransduceerd met de adenovirale vector voordat ze in de dieren worden ingespoten maar dit kan uit de aanvraag niet worden opgemaakt. Tevens is het onduidelijk hoe lang de BEAS-2B cellen zich in de dieren hebben bevonden voordat cellen uit de dieren geïsoleerd worden ten behoeve van de experimenten die plaatsvinden buiten inperking. Tenslotte is het onbekend of de cellen afkomstig uit de dieren worden getest op aanwezigheid van adenovirale deeltjes, voordat ze bestudeerd worden in de ruimte zonder inperking.

Het vervoer van de cellen van de ML-II ruimte naar de FACS vindt plaats in gesloten, lekdichte en breukvrije containers die voor het vervoer uitwendig zullen worden ontsmet.

Voor het FACS experiment wordt gebruik gemaakt van een gesloten FACS-systeem. Aërosolvorming kan alleen plaatsvinden tijdens het openen van de buizen, voordat ze op de FACS worden aangesloten. De cellen worden in een afgesloten compartiment van het FACS apparaat opgevangen. In dit compartiment zit altijd een verse chlooroplossing ter inactivatie. Na afloop van het experiment wordt de FACS doorgespoeld met een chlooroplossing, zodat de daarin eventueel aanwezige virusdeeltjes zullen worden geïnactiveerd. Het afval wordt in een gesloten container vervoerd naar een ML-I laboratorium.

Fluorescentie- en chemoluminescentie analyse

De handelingen voorafgaand aan het transport naar de fluorimeter en luminometer zijn eender aan de hierboven geschetste handelingen voor de FACS analyse. Voordat het vervoer plaatsvindt worden de cellen overgebracht in een microtiterplaat en wordt deze afgedekt met een deksel en omwikkeld met afplakfolie.

Vlak voor de analyses worden de afplakfolie en de deksel van de microtiterplaat verwijderd en wordt de plaat in het meetapparaat gezet. Gedurende de analyse wordt de vloeistof met hierin de cellen niet aangeraakt. Na afloop van de experimenten worden de platen weer van een deksel voorzien en afgeplakt. De aanvrager geeft aan dat hierdoor het ontstaan van aërosolen kan worden voorkomen.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft eerder over omlaagschaling van handelingen met adenovirale vectoren geadviseerd. In het geval van 'specified pathogen free' (SPF) varkens mochten deze drie dagen na toediening van de adenovirale vector worden teruggeplaatst naar D-I niveau nadat was vastgesteld dat 24 uur na toediening van de

vector geen ‘shedding’ van het virus meer optrad. Bovendien was de gebruikte virusbatch vrij van replicatie competent adenovirus (RCA). Vanuit de D-I ruimte werden de varkens vervoerd naar een MRI-faciliteit (ruimte zonder inperking) alwaar ze onderzocht werden (CGM/031031/06).

In het geval van handelingen met apen mochten de dieren na minimaal zeven dagen teruggeplaatst worden indien was aangetoond dat geen shedding meer optrad (CGM/021216-03).

Overweging en advies

In onderhavige experimenten wordt gebruik gemaakt van adenovirale vectoren waarvan de E1-regio niet meer functioneert. De vectoren zijn hierdoor replicatie deficiënt. De mogelijke risico’s voor mens en milieu die zich kunnen voordoen bij dergelijke experimenten zijn dat middels recombinatie of complementatie het virus zich kan repliceren en zich in het milieu kan verspreiden of dat door recombinatie een nieuw virus met onbekende eigenschappen ontstaat.

Kweken van de cellijn BEAS-2B

Het voorstel tot inschaling van de handelingen met BEAS-2B cellen op ML-I niveau is gebaseerd op het feit dat het Ad12-SV40 virus hybride geen ggo is. De COGEM wijst erop dat de ATCC de cellijn heeft ingeschaald op BSL-2 niveau en dat niet kan worden uitgesloten dat de cellijn nog virus uitscheidt. Daarom acht de COGEM het raadzaam handelingen met deze cellen uit te voeren op ML-II niveau. Indien er tijdens werkzaamheden aërosolen gevormd worden, kunnen deze uitgevoerd worden in een veiligheidskabinet van klasse II waardoor de veiligheid voor mens en milieu optimaal gewaarborgd is.

Productie vectorbatch

Om replicatie deficiënte adenovirale vectoren te produceren wordt gebruik gemaakt van zogenaamde helpercellijnen. Deze cellijnen brengen de E1-regio van Ad5 constitutief tot expressie waardoor de virale DNA transcriptie kan plaatsvinden. Op deze wijze complementeren de helpercellijnen de productie van viruspartikels van E1 deficiënte adenovirale vectoren.

Tijdens de productie van de adenovirale vectoren valt niet uit te sluiten dat er recombinatie optreedt tussen de helpercellijn en de virale vectoren, zodat er een RCA ontstaat die zich wel in de cellen kan repliceren en zich mogelijk in het milieu kan verspreiden. De aanvrager heeft niet aangegeven op welke wijze de adenovirale vectorbatch geproduceerd is en of deze getest is op de aanwezigheid van RCA. De COGEM kan hierdoor niet vaststellen of de gebruikte virusbatch als veilig kan worden beschouwd.

Infectie van de BEAS-2B cellijn met Ad-Ho-1 en Ad-LacZ

De aanvrager geeft aan de BEAS-2B cellen 6,5 uur te incuberen met de adenovirale vectorbatch alvorens de cellen drie maal met medium en één maal met trypsine te wassen. De BEAS-2B cellijn is geconstrueerd door humane bronchiale endotheelcellen te infecteren met een Ad12-SV40 hybride. De COGEM beschikt niet over gegevens aangaande de karakterisatie van de Ad12-SV40 hybride. Hierdoor is het de COGEM niet duidelijk welke delen van het Ad12 genoom en het SV40 genoom aanwezig zijn in de hybride. Het is de COGEM eveneens onduidelijk welke virale regio's in de BEAS-2B cellijn tot expressie komen. Uit de literatuur blijkt dat het SV40 T-antigeen in de cellen aantoonbaar is. Er zijn aanwijzingen dat de E1A en de E1B-regio niet tot expressie komen in de cellijn, maar dit valt op grond van de literatuurgegevens niet geheel uit te sluiten (1).

Indien BEAS-2B cellen de E1-regio dragen, is het mogelijk dat deze als 'helper' optreden waardoor de op Ad5-gebaseerde E1-gedeleteerde adenovirusvector kan repliceren (10). Het is eveneens mogelijk dat er een recombinatie kan optreden met de vector waardoor er een RCA ontstaat. Hierbij merkt de COGEM op dat deze kans zeer gering zal zijn gezien de beperkte homologie tussen Ad5 en Ad12. Omdat het niet duidelijk is welke SV40 sequenties in de cellen aanwezig zijn, kunnen deze geflankeerd worden door Ad12 DNA. Door homologe recombinatie tussen de Ad12-SV40 hybride en de vector zou zo een recombinant Ad5-SV40 virus kunnen ontstaan waarvan de eigenschappen slecht voorspelbaar zijn. De COGEM acht het daarom essentieel dat op een gevalideerde wijze wordt nagegaan welke Ad12 sequenties de BEAS-2B cellen bevatten.

Injectie getransduceerde BEAS-2B cellen in proefdieren

De aanvrager is voornemens om getransduceerde BEAS-2B cellen te injecteren in proefdieren. Naast recombinatie en complementatie die kunnen optreden doordat de BEAS-2B cellen getransduceerd worden met de adenovirale vector kunnen de proefdieren ook geïnfecteerd zijn met virussen waarmee eveneens recombinatie of complementatie kan optreden.

In het genoom van de BEAS-2B cellen zijn delen van het Ad12-SV40 hybride geïntegreerd. Er dient voorkomen te worden dat deze sequenties uit het genoom kunnen treden door middel van recombinatie met andere virussen. Het is daarom van belang dat de proefdieren ten tijde van de infectie-experimenten vrij zijn van polyoma- of adenovirussen.

Het is eveneens van belang dat de cellen afkomstig van de proefdieren voordat ze buiten inperking worden bestudeerd, gecontroleerd worden op de aanwezigheid van vrije virusdeeltjes.

Wassen cellen en controle op vrije adenovirale deeltjes

Voordat de cellen buiten inperking worden bestudeerd, is het van belang dat de cellen geen vrije adenovirale deeltjes meer bevatten. Om dit te bewerkstelligen worden de cellen nadat ze 6,5 uur zijn blootgesteld aan de adenovirale vector, driemaal gewassen met medium en ondergaan de cellen een trypsinebehandeling. Het is niet bekend hoelang de cellen worden blootgesteld aan de trypsine en wat de concentratie van de trypsine-oplossing bedraagt.

Na afloop van de 6,5 uur durende incubatietijd wordt het supernatant van de cellen voor de eerste keer getest op aanwezigheid van vrije adenovirale deeltjes middels een 'limiting dilution AdEasy' bepaling. Na de wasstappen en de trypsine behandeling wordt dit herhaald. De aanvrager verstrekt gegevens waaruit blijkt dat na 6,5 uur incubatie de hoeveelheid vrije virusdeeltjes $2,51 \times 10^5$ pfu/ml bedraagt. Na afloop van de wasstappen zijn volgens de aanvrager geen vrije virusdeeltjes meer te detecteren. De data die dit aantonen ontbreken echter.

De COGEM is van mening dat de informatie over de 'limiting dilution AdEasy' bepaling en de uitkomsten daarvan onvoldoende is. Zij kan niet vaststellen of de voorgestelde methode adequaat en gevoelig genoeg is om te kunnen concluderen dat de getransduceerde cellen vrij zijn van adenovirus. Hiernaast wijst de COGEM erop dat voorbeelden uit de praktijk laten zien dat drie wasstappen met medium gevolgd door een trypsine behandeling vaak niet volstaan om alle infectieve deeltjes kwijt te raken. Het wassen met humaan immunoglobuline met een hoge titer aan adenovirus neutraliserende activiteit is een efficiënt alternatief om de cellen vrij te krijgen van het virus uit het inoculum.

De COGEM is dan ook van mening dat niet met zekerheid kan worden vastgesteld of de getransduceerde cellen geen vrije adenovirale deeltjes meer bevatten, voordat ze onderzocht worden in een ruimte zonder inperking,

Experimenten buiten inperking

Gezien de aard van de handelingen, zoals die zullen worden uitgevoerd in de ruimte buiten inperking, valt niet uit te sluiten dat aërosolvorming en verspreiding van eventuele aanwezige virusdeeltjes optreedt. Hierdoor kunnen er risico's ontstaan voor mens en milieu.

Concluderend bestaat er onduidelijkheid over de aanwezigheid van RCA in de adenovirale vectorbatch, de samenstelling van het hybride virus, de expressie van het hybride virus in de BEAS-2B cellen en de methode om te kunnen vaststellen of de cellen voordat ze buiten inperking worden bestudeerd, vrij zijn van adenovirus. Hierdoor valt niet uit te sluiten dat complementatie en recombinatie plaatsvindt waardoor er RCA of nieuwe virushybriden ontstaan die zich in het milieu kunnen verspreiden. Derhalve is de COGEM van mening dat de veiligheid voor mens en milieu niet gewaarborgd is, wanneer de voorgestelde handelingen plaatsvinden in een ruimte zonder inperking.

Referenties

1. Reddel RR, Ke Y, Gerwin BI, McMenamin MG, Lechner JF, Su RT, Brash DE, Park JB, Rhim JS, and Harris CC (1988). Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer research* **48**: 1904-1909
2. Knipe DM and Howley PM (2001). *Fields of virology*, volume two, fourth edition. Lippincott Williams & Wilkins.
3. Van Regenmortel MHV (2000). *Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses*. Academic Press, San Diego.
4. Otterbein LE, Kolls JK, Mantell LL, Cook JL, Alam J and Choi AMK (1999). Exogenous administration of heme oxygenase-1 by gene transfer provides protection against hyperoxia-induced lung injury **103**:1047-1054
5. McGrory WJ, Bautista DS and Graham FL (1988). A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. *Virology* **163**:614-617
6. Gómez-Foix AM, Coats WS, Baqué S, Alam T, Gerard RD and Newgard CB (1992). Adenovirus-mediated transfer of the muscle glycogen phosphorylase gene into hepatocytes confers altered regulation of glycogen metabolism. *The journal of biological chemistry* **267**: 25129-25134
7. Schell K, Lane WL, Casey MJ and Huebner RJ (1966). Potentiation of oncogenicity of adenovirus type 12 grown in african green monkey kidney cell cultures preinfected with SV40 virus: Persistence of both T antigens in the tumors and evidence for possible hybridization. *Proceedings of the National Academy of Science* **55**: 81-88
8. Rhim JS, Trimmer R, Arnstein P, Huebner RJ (1981). Neoplastic transformation of chimpanzee cells induced by adenovirus 12-simian virus 40 hybrid virus. *Proceedings of the National Academy of Science* **78**: 313-317
9. Garcea RL and Imperiale MJ (2003). Simian virus 40 infection of humans. *Journal of virology* **77**: 5039-5045
10. Rademaker HJ, Abou El Hassan MA, Versteeg GA, Rabelink MJWE and Hoeben RC (2002). Efficient mobilization of E1-deleted adenovirus type 5 vectors by wild-type adenoviruses of other serotypes. *Journal of general virology* **83**: 1311-1314