

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

DATUM 24 november 2016
KENMERK CGM/161124-02
ONDERWERP Advies classificatie en inschaling werkzaamheden mensen-, apen- en slangenadenovirussen

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier over 'Replication-deficient adenoviral vectors: new adenoviruses and capsid-chimeric vectors' (IG 320_2.8-000) ingediend door Crucell Holland B.V. deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van Human mastadenovirus type 56 (HAdV-56), Simian mastadenovirus type 17 (SAdV-17) en Snake atadenovirus type 2 (SnAdV-2). Tevens is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met een breed scala aan op adenovirus gebaseerde transgene chimere genetisch gemodificeerde (gg-) vectoren afkomstig van mens, aap en slang.

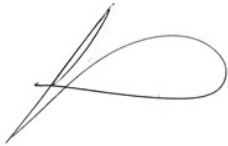
De COGEM adviseert HAdV-56, SAdV-17 en SnAdV-2 in te delen in pathogeniteitsklasse 2, en SnAdV-2 daarbij aan te merken als strikt dierpathogeen.

De voorgenomen kloneringswerkzaamheden van de diverse adenovirale genoomsequenties in *Escherichia coli* adviseert zij uit te voeren op ML-I inperkingsniveau.

Met betrekking tot de *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met de gg-adenovirale vectoren, kan de COGEM niet uitsluiten dat er replicatie-competent gg-adenovirus aanwezig is. Zij heeft echter geen redenen om aan te nemen dat deze gg-adenovirussen pathogener zijn dan de adenovirussen waarop ze gebaseerd zijn. Zij adviseert daarom deze werkzaamheden respectievelijk op ML-II en DM-II inperkingsniveau uit te voeren. Indien daarbij tevens enkele aanvullende voorschriften in acht worden genomen, acht de COGEM de risico's bij voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

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

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Met het oog op eventuele belangenverstrengelingen is het COGEM lid prof. dr. T. Boekhout niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Classificatie van mensen-, apen- en slangenadenovirussen, en inschaling werkzaamheden met hiervan afgeleide gg-adenovirale vectoren

COGEM advies CGM/161124-02

1. Inleiding

Naar aanleiding van het dossier IG 16-320, getiteld 'Replication-deficient adenoviral vectors: new adenoviruses and capsid-chimeric vectors', is de COGEM gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsclassificaties van het mensenadenovirus 'HAdV-56', apenadenovirus 'SAdV-17' en slangenadenovirus 'SnAdV-2'. Tevens is de COGEM gevraagd of SAdV-17 en SnAdV-2 als strikt dierpathogeen beschouwd dienen te worden. Tenslotte is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met hiervan afgeleide genetisch gemodificeerde (gg-) virussen. Daarbij is de COGEM gevraagd of activiteiten met niet nader gespecificeerde, ongekaracteriseerde, genetisch gemodificeerde (gg-) adenovirus-isolaten van de soort *Human mastadenovirus B* en afkomstig uit mensapen, ingeschaald kunnen worden op ML-II dan wel DM-II inperkingsniveau.

1.1 Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen. Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met ggo's van die klasse.

Apathogene micro-organismen worden ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. Dergelijke micro-organismen dienen minimaal aan één van de volgende criteria te voldoen:

- a) het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant,
- b) het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen,
- c) het micro-organisme behoort tot een soort die vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie,
- d) van het micro-organisme is het niet-virulente karakter door middel van adequate tests aangetoond.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 2 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is, alsmede een micro-organisme dat bij planten een ziekte kan veroorzaken.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 3 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 4 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

1.2 Strikt dierpathogenen

Naast de pathogeniteitsklasse-indeling wordt bij de inschaling van ggo-werkzaamheden met virussen of virale sequenties in Bijlage 5 van de Regeling ggo ook onderscheid gemaakt tussen virussen die strikt dierpathogeen zijn, en virussen die pathogeen zijn voor mens en dier.

In Bijlage 4 van de Regeling ggo is een lijst van virussen opgenomen met de pathogeniteitsklasse waarin zij ingedeeld zijn. Tevens wordt voor ieder van de virussen in deze Bijlage aangegeven of zij tot de groep van humaan- en dierpathogene virussen of de groep van strikt dierpathogene virussen worden gerekend.

In 2014 heeft de COGEM in een advies beschreven aan welke criteria een virus moet voldoen om als strikt dierpathogeen virus aangemerkt te worden.¹ De definitie die zij hiervoor hanteert, luidt als volgt: *Een strikt dierpathogeen virus is een virus met een dier als primaire gastheer waarbij infectie, al dan niet gevolgd door ziekte, bij de mens nooit is waargenomen, tenzij onder uitzonderlijke omstandigheden.*

De overweging die de COGEM hanteert om dierpathogenen te classificeren wijkt op enkele punten af van die van humaanpathogenen. In 2014 heeft de COGEM in een signalering inzicht geboden in haar overweging bij de classificatie van dierpathogene micro-organismen, en aangegeven welke aspecten een rol spelen in haar oordeel.² De classificatie van dierpathogene micro-organismen is gebaseerd op vier elementen:

- a) het ziekmakende potentieel,
- b) de enzoötische aanwezigheid,
- c) het verspreidingspotentieel van het betreffende micro-organisme,
- d) de mogelijkheden om verspreiding in te perken.

Deze elementen belichten specifieke kenmerken van het betreffende micro-organisme en vormen ieder een onderdeel van de totale classificatie. De COGEM benadrukt hierbij dat geen van de elementen afzonderlijk een doorslaggevende rol heeft, maar altijd in samenhang met elkaar tot een classificatie leidt.

2. Adenovirussen

Adenovirussen behoren tot de familie van de *Adenoviridae* en komen voor bij gewervelde dieren, zoals mensen, apen, knaagdieren, runderen, slangen, varkens en vogels. De familie *Adenoviridae* omvat vijf genera, waaronder de genera *Mastadenovirus* en *Atadenovirus*.^{3,4} Het genus

Mastadenovirus omvat 27 verschillende species, waaronder *Human mastadenovirus* (HAdV) A tot en met G en *Simian mastadenovirus* (SAdV) A tot en met C.^{3,4,5,6,7,8} Het genus *Atadenovirus* omvat vijf soorten, waaronder het *Snake atadenovirus* (SnAdV) A.^{3,4}

Binnen elke adenovirussoort worden subtypen onderscheiden op basis van onder meer hun onderlinge fylogenetische afstand, hemagglutinatiefiel, gastheertropisme en de mogelijkheid tot recombinatie.³ Deze subtypen worden aan de hand van een nummer weergegeven, zoals in betreffende aanvraag de adenovirussen HAdV-56, SAdV-17 en SnAdV-2.

2.1 Biologische eigenschappen adenovirussen

Adenovirussen kennen een nauw gastheerbereik dat beperkt is tot één of enkele nauw verwante diersoorten, en infecteren de luchtwegen, het maagdarmsstelsel en soms de ogen.^{3,6} Bepaalde subtypen kunnen (kerato)conjunctivitis veroorzaken.^{6,9,10,11,12,13} Een infectie verloopt meestal asymptomatisch of met lichte verkoudheidssymptomen, zonder noodzaak tot medische behandeling, en is doorgaans zelflimiterend, maar kan ook met behulp van antivirale middelen behandeld worden.^{6,13} Bij patiënten met een sterk verzwakt afweersysteem kunnen echter ontstekingen aan de nieren en longen ontstaan met mogelijk fatale gevolgen.³ Infectie met adenovirus vindt plaats via direct contact, besmette feces of urine, en ten gevolge van aerogene transmissie.^{3,14}

2.2 Structuur en genomische organisatie adenovirussen

Adenovirusdeeltjes bestaan uit een lineair dubbelstrengs DNA molecuul omgeven door een eiwitmantel.^{5,6} De eiwitmantel is opgebouwd uit hexonen en pentonbasen. In de pentonbasen zijn zogenaamde ‘fibers’ verankerd. Deze fibers steken uit boven het manteloppervlak en binden aan een receptor op de gastheercel.³ De hexonen, pentonbasen en fibers bezitten antigene determinanten en spelen een belangrijke rol bij het immuunsysteem.¹³

De genomen van adenovirussen zijn onderverdeeld in een zogenaamde vroege (Early of E) en late (Late of L) regio. De E-regio komt kort na binnenkomst van het virus in de cel tot expressie. De L-regio komt pas tot expressie als de DNA-replicatie is gestart.

De E-regio bestaat uit vijf transcriptie-units: E1A, E1B, E2, E3 en E4. De E1A eiwitten zijn betrokken bij de inductie van virale replicatie en expressie van de overige vroege en late genen. De E1B eiwitten beschermen de gastheercel tegen geprogrammeerde celdood (apoptose). De E2 regio codeert voor eiwitten noodzakelijk voor replicatie van het virale genoom. De E3 eiwitten blokkeren de afweerreactie tegen het virus.^{5,6,15} De E4 regio tenslotte, codeert voor een aantal eiwitten die betrokken zijn bij het controleren van de celcyclus.⁵ De L-regio bevat genen die coderen voor structurele eiwitten die betrokken zijn bij de opbouw van het virusdeeltje.⁵

2.3 Human mastadenovirus type 56

HAdV-56 wordt geassocieerd met ziekteverschijnselen bij de mens en is voor het eerst beschreven in 2011.⁹ Het virus veroorzaakte toen een fatale luchtweg-infectie bij een neonaat en conjunctivitis bij drie volwassen zorgverleners van de neonaat. Tevens is gerapporteerd dat het virus in Japan sporadisch conjunctivitis en urethritis veroorzaakt.^{10,11} Daarnaast heeft er in 2012 een uitbraak van

conjunctivitis onder Chinese fabrieksmedewerkers plaatsgevonden, eveneens veroorzaakt door HAdV-56.¹²

Het is op dit moment nog niet bekend binnen welke *Human mastadenovirus* soort de International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) HAdV-56 taxonomisch indeelt. In de literatuur wordt voorgesteld HAdV-56 onder te brengen binnen de soort *Human mastadenovirus D* (voorheen Human adenovirus D).^{4,9}

2.4 Simian mastadenovirus type 17

Apen adenovirus SAdV-17 komt voor bij niet-humane primaten, maar is niet geassocieerd met een ziekte bij aap of mens.^{16,17} Het is op dit moment nog niet bekend hoe de ICTV het virus taxonomisch indeelt. In de literatuur wordt voorgesteld SAdV-17 onder te brengen bij de nieuwe soort Simian mastadenovirus F.¹⁷

2.5 Snake atadenovirus type 2

Slangen adenovirus SnAdV-2 is voor het eerst beschreven in 2008 en heeft waarschijnlijk een aantal fatale infecties veroorzaakt in twee in gevangenschap levende slangenpopulaties.¹⁸ Gebaseerd op de sequentie van het DNA-polymerase, lijkt SnAdV-2 een aparte atadenovirussoort te zijn en in verschillende slangenfamilies voor te komen (onder meer de *Viperidae* (adderachtigen)), maar niet daarbuiten.^{18,19} De seroprevalentie bij hagedissen is negatief.¹⁹ Het is op dit moment nog niet bekend hoe de ICTV SnAdV-2 taxonomisch indeelt.

3. Voorgenomen werkzaamheden

Adenovirale vectoren worden bij laboratoriumwerkzaamheden veelvuldig gebruikt als een effectief genoverdrachtsysteem.⁶ De aanvrager wil gg-adenovirale vectoren vervaardigen ten behoeve van vaccinontwikkeling. Omdat de bestaande immuniteit onder de bevolking de werkzaamheid van op *Adenovirus* gebaseerde vaccins bemoeilijkt, wil de aanvrager als backbone zeldzame mensen-adenovirus-typen of adenovirussen die niet uit de mens geïsoleerd zijn, gaan gebruiken.

Backbone A

In de adenovirale backbone is de E1- regio verwijderd, al dan niet de E3- regio verwijderd, en al dan niet het E4 ORF6 verwisseld met dat van HAdV-5 (species *Human mastadenovirus C*). Door de deletie van de E1- regio zijn de vectoren replicatie-deficiënt. Het betreft de volgende backbones:

- mensenadenovirussen HAdV- 1 tot en met -54, en HAdV-56 (*Human mastadenovirus A* tot en met *G*),
- adenovirussen geïsoleerd uit gezonde bonobo's, chimpansees en gorilla's uit een dierentuin, en gezonde in het wild levende gorilla's. Op basis van hexon/ fiber karakterisering zijn de dierentuinisolaten geïdentificeerd als *Human mastadenovirus B*, *C* en *E*. De isolaten afkomstig van de in het wild levende gorilla's zijn op basis van karakterisering van verschillende adenovirale genen geïdentificeerd als *Human mastadenovirus C*,
- aap adenovirus SAdV-17.

Backbone B

Van een aantal van de onder *backbone A* beschreven E1-gedeleteerde en al dan niet E4 ORF6/HAdV-5 uitwisselde vectoren, zal tevens de E3-regio gedeleteerd zijn. De adenovirale backbones die hiervoor gebruikt zullen worden, betreffen:

- mensenadenovirussen HAdV-4 (*Human mastadenovirus E*) en HAdV-26 (*Human mastadenovirus D*),
- mensaap-adenovirus geïsoleerd uit een gezonde gorilla van een dierentuin; op basis van hexon/fiber karakterisering geïdentificeerd als *Human mastadenovirus C*.

Backbone C

Voor het derde backbone type zal het genoom van een slangenadenovirus SnAdV-2 isolaat gebruikt worden. Het virus is afkomstig van zieke in gevangenschap levende slangen uit Duitsland en in 2011 geïsoleerd. De aanvrager geeft aan dat het betreffende isolaat niet in staat is zich in bepaalde mensencellijnen (A549 en PER.C6) te verspreiden of daarin een cytopathologisch effect te veroorzaken, en zal het virus daarom kweken op daarvoor geschikte slangencellijnen. Van de adenovirale vector zullen alleen delen van de RH-regio tussen de E4-regio en de rechter ‘inverted terminal repeat’ verwijderd worden. De aanvrager geeft aan dat de functie van de RH-regio onbekend is en verwacht dat deze regio niet van belang is voor de replicatie van SnAdV-2. Alleen bij deze backbone is er sprake van een replicatie-competente adenovirale vector.

In de verschillende adenovirale backbones zullen transgene virale sequenties coderend voor antigene determinanten, en/of marker- en reporter genen gekloneerd worden. De te insereren expressiecassettes zijn afkomstig van verschillende virussoorten (*Foot-and-mouth disease virus*, *Human papilloma virus*, *Marburg virus*, *Human respiratory syncytial virus*, *Zika virus* en diverse Ebola virus soorten), en coderen niet voor een schadelijk genproduct. Ze zijn gekarakteriseerd en zullen ter plekke van de E1- of E3-regio, of tussen de E4-regio en de rechter ‘inverted terminal repeat’ van het adenovirale genoom ingebracht worden.

In backbone B zullen daarnaast (delen van) de fiber en hexonen van verschillende adenovirussen uitgewisseld worden (zogenaamde ‘hexon/ fiber swabs’), waardoor een breed palet aan capsidedeterminanten verkregen wordt. De fiber en hexon donorsequenties die ‘gepaard’ geïnsereerd zullen worden, zijn afkomstig van:

- mensenadenovirussen HAdV-1 tot en met -52 (*Human mastadenovirus A* tot en met *G*),
- mensapadenovirussen behorende tot *Human mastadenovirus B, C* en *E*.

De fiber en hexon donorsequenties die ‘gemengd’ geïnsereerd zullen worden, zijn afkomstig van:

- adenovirussen uit in het wild levende chimpansees (*Human mastadenovirus E*)²⁰, voor zover het hexonsequenties betreffen,
- adenovirussen van gezonde in dierentuinen levende chimpansees en gorilla’s (*Human mastadenovirus E*) of mensenadenovirussen (*Human mastadenovirus B* en *D*), voor zover het fibersequenties betreffen.

De constructie van de diverse adenovirale backbones en klonering van de verschillende expressiecassettes zal plaatsvinden in *Escherichia coli* K12. Daarna zullen de virale partikels op verscheidene cellijnen van animale en humane oorsprong geproduceerd en getest worden. Ten slotte zullen de gg-virusdeeltjes als vaccin aan muizen en ratten worden toegediend waarna cellen en weefsels van deze dieren onderzocht zullen worden.

4. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft in 2013 geadviseerd om HAdV-56 in te delen in pathogeniteitsklasse 2.²¹ Adenovirussen afkomstig van al dan niet in het wild levende humane en non-humane primaten heeft de COGEM diverse malen geadviseerd in te delen in pathogeniteitsklasse 2.^{21,22,23,24} Daarbij adviseerde zij tevens deze virussen niet als een strikt dierpathogeen te beschouwen.^{22,23,25}

Het kloneren van delen van het genoom van ‘simian adenovirussen’ adviseerde de COGEM uit te voeren op ML-I inperkingsniveau.²¹ De productie van de hierop gebaseerde gg-virale vectoren en transfectie in dierlijke cellen adviseerde zij uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. Om mogelijke transmissie van gg-adenovirussen uit apen naar mensen te voorkomen, achtte de COGEM het van belang om inademing van infectieuze aërosolen door werknemers tegen te gaan. Zij adviseerde de standaardvoorschriften geldend voor aerogeen overdraagbare virussen in acht te nemen. Dit betroffen het uitvoeren van alle open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse-II (VK-II kabinet) en het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden.

Werkzaamheden met adenovirale ‘fiber swab’ mutanten gebaseerd op virussen geïsoleerd uit mensapen, adviseerde de COGEM op ML-II inperkingsniveau in te schalen.²⁴ Daarbij adviseerde zij dezelfde aanvullende standaardvoorschriften in acht te nemen. Kloneringswerkzaamheden van delen van het adenovirale genoom adviseerde zij op ML-I inperkingsniveau uit te voeren.

Voor de vaccinatie van non-humane primaten met gg-adenovirale vectoren gebaseerd op chimpansee adenovirus, stemde de COGEM ermee in om deze uit te voeren op DM-III niveau.²³ Dit hogere dan gewoonlijke inperkingsniveau werd toegepast, omdat het niet mogelijk is primaten in filtertopkooien te huisvesten. Tevens stemde zij ermee in tijdens de werkzaamheden een daartoe geëigend mond- en neuskapje en een veiligheidsbril te dragen, om besmetting van de medewerkers te voorkomen. Werkzaamheden met cellen van de gevaccineerde apen adviseerde zij op ML-II inperkingsniveau uit te voeren, wederom onder in achtneming van de hierboven genoemde standaard aanvullende voorschriften.

5. Overwegingen

5.1 Onbekende apenadenovirussen

De COGEM is onder meer gevraagd om werkzaamheden met nog te isoleren adenovirussen van in het wild of in gevangenschap levende mensapen van de soorten *Human mastadenovirus B*, *C* en *E* in te schalen. Op grond van de lage pathogeniteit van adenovirussen en de verwachte overeenkomsten tussen de nieuwe mensaapadenovirussen en reeds bekende apen- en mensenadenovirussen, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de te isoleren adenovirussen pathogener zullen zijn dan eerder beschreven apenadenovirussen. Zij ziet daarom geen redenen om nieuwe uit mensapen te

isoleren adenovirussen in een hogere pathogeniteitsklasse in te delen dan andere tot nu toe geclassificeerde apenadenovirussen. De tot nu toe geclassificeerde apenadenovirussen heeft de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.^{21,22,23,24}

5.2 Aanwezigheid van gg-replicatie-competent adenovirus

Aangezien gg-virussen gebaseerd op backbones A en B na verwijdering van de E1 regio niet meer tot replicatie in staat zijn, is er een helpercellijn noodzakelijk voor de productie van en infectie met de op deze backbones gebaseerde gg-adenovirale vectoren. In deze cellijnen komt de E1 regio tot expressie. Voor onderhavige aanvraag zal hierbij gebruik gemaakt worden van de helpercellijnen PER.C6, PER.55, HEK293, HER96, HER911 en daarvan afgeleide cellijnen.

De aanvrager geeft aan dat bij de voorgenomen activiteiten niet uitgesloten kan worden dat er in bepaalde cellijnen door middel van recombinatie replicatie-competent (gg-) adenovirus ontstaat. De COGEM is van mening dat de replicatie-competente gg-adenovirale vectoren die uit backbone A zullen ontstaan, niet pathogener zullen zijn dan de adenovirussen waarop backbone A is gebaseerd (pathogeniteitsklasse 2), aangezien de donorsequenties niet coderen voor een schadelijk genproduct en daarnaast afkomstig zijn van geheel andere virusfamilies.

Uit de gg-adenovirussen gebaseerd op backbone B kunnen in het geval van recombinatie transgene 'fiber/hexon swab' mutanten ontstaan. Door de wijziging van de capsid-determinanten ten opzichte van die van het ouderorganisme, kan dit mogelijk een effect hebben op tropisme, gastheerbereik, transmissieroute of pathogeniteit. Aangezien de donorvirussen van de hexon/fiber sequenties eveneens humane en primate adenovirussen zijn, zal het gastheertropisme niet breder worden dan dat van de uitgangsvirussen waarop backbone B is gebaseerd (eveneens mens of aap). Daarbij merkt de COGEM op dat alle humane en primate adenovirussen in pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld zijn. Ook is in backbone B, naast de E1-regio, de E3 regio verwijderd. De COGEM is van mening dat door het ontbreken van de immuunmodulerende eigenschappen van de E3 eiwitten, de capsid-chimere gg-adenovirale vectoren naar verwachting geattenuëerd zullen zijn.

De productie van en infectie met gg-slangenvirus SnAdV-2 is gebaseerd op een replicatie-competente adenovirale vector (backbone C). De aanvrager geeft aan dat het gg-virus op slangencellijnen gekweekt zal worden aangezien kweek op mensencellijnen niet mogelijk is. De COGEM acht de kans verwaarloosbaar klein dat de gg-adenovirale vectoren gebaseerd op backbone C de mens zullen infecteren. Zij merkt echter op dat er in Nederland een voor SnAdV-2 vatbare slangensoort voorkomt.

6. Advies

6.1 Pathogeniteitsclassificaties

6.1.1 Human mastadenovirus type 56

Eerder heeft de COGEM HAdV-56 ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.²¹ Op basis van de gegevens uit de literatuur heeft zij geen redenen om deze classificatie aan te passen. Zij blijft daarom bij haar advies om HAdV-56 in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

6.1.2 Simian mastadenovirus type 17

Apen adenovirus SAdV-17 komt voor in de ingewanden van niet-humane primaten en is niet geassocieerd met een ziekte bij aap of mens. Echter, in een seroprevalentie-onderzoek bij mensen zijn antilichamen tegen adenovirussen van niet-humane primaten gevonden.²⁶ Hoewel er kennelijk geen aanwijzingen zijn dat mensen ziek worden van dergelijke virussen, kan het niet uitgesloten worden dat zij ermee geïnfecteerd kunnen worden. Op basis van deze argumenten adviseert de COGEM in lijn met haar eerdere adviezen over primate adenovirussen, SAdV-17 in te delen in pathogeniteitsklasse 2 en het virus niet te beschouwen als een strikt dierpathogeen.^{21,24,22,23,25}

6.1.3 Snake atadenovirus type 2

De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over adenovirussen die bij slangen voorkomen. SnAdV-2 kan ernstige ziekte veroorzaken bij bepaalde slangenfamilies, waaronder adderachtigen, en is enzoötisch. De COGEM merkt op dat in Nederland adders voorkomen, zeldzaam zijn en een beschermde diersoort betreffen.^{27,28,29} Er zijn geen aanwijzingen dat SnAdV-2 ziekte veroorzaakt bij de mens. Tevens geeft de aanvrager aan dat kweek van gg-SnAdV-2 op mensencellijnen niet mogelijk is en daarom op slangencellijnen gekweekt zal worden. Op basis van deze gegevens adviseert de COGEM SnAdV-2 te beschouwen als een strikt dierpathogeen en, de criteria voor strikt dierpathogene virussen in overweging nemende, in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

6.2 Inschaling werkzaamheden

6.2.1 Inschaling in vitro werkzaamheden

De aanvrager wil van diverse mensen-, apen- en slangenadenovirussen al dan niet replicatie-deficiënte gg-adenovirale vectoren genereren. Gezien de bovenstaande overwegingen en de indeling van HAdV-56, SAdV-17, SnAdV-2 en de overige te gebruiken adenovirussen in pathogeniteitsklasse 2, adviseert de COGEM de voorgenomen kloneringswerkzaamheden in *E. coli* - conform Regeling ggo - onder de daarvoor geldende werkvoorschriften op ML-I inperkingsniveau uit te voeren.³⁰

Productie en infectie van de op backbone A, B en C gebaseerde gg-adenovirale vectoren, en handelingen met cellen en weefsels afkomstig van met de gg-adenovirale vectoren gevaccineerde muizen en ratten (zie hieronder bij '6.2.2 Inschaling in vivo werkzaamheden'), adviseert de COGEM wegens de hierboven geschetste overwegingen betreffende de potentiële aanwezigheid van replicatie-

competent gg-adenovirus van pathogeniteitsklasse 2, uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. Om eventuele aerogene en contacttransmissie van gg-adenovirussen te voorkomen, acht de COGEM het van belang dat de volgende aanvullende voorschriften in acht worden genomen:

- open handelingen dienen uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet van klasse-II,
- het dragen van handschoenen is verplicht.

6.2.2 *Inschaling in vivo werkzaamheden*

In vivo werkzaamheden met de op backbone A, B en C gebaseerde gg-adenovirale vectoren, adviseert de COGEM wegens de hierboven geschetste overwegingen betreffende de potentiële aanwezigheid van replicatie-competent gg-adenovirus van pathogeniteitsklasse 2, uit te voeren op DM-II inperkingsniveau. Om eventuele aerogene en contacttransmissie van gg-adenovirussen te voorkomen, acht de COGEM het van belang dat de volgende aanvullende voorschriften in acht worden genomen:

- de dieren zijn gehuisvest in filtertopkooien,
- tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen,
- open handelingen, waaronder alle handelingen waarbij een besmette filtertopkooi geopend wordt, worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd.

7. Conclusie

Samenvattend adviseert de COGEM *Human mastadenovirus* type 56, *Simian mastadenovirus* type 17 en *Snake atadenovirus* type 2 in te delen in pathogeniteitsklasse 2 en daarbij *Snake atadenovirus* type 2 te beschouwen als een strikt dierpathogeen. *In vitro* werkzaamheden met de beschreven gg-adenovirale vectoren uit mens, aap en slang adviseert zij uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. De *in vivo* werkzaamheden met deze beschreven gg-adenovirale vectoren in ratten en muizen adviseert zij uit te voeren op DM-II inperkingsniveau. Tevens adviseert zij daarbij enkele aanvullende voorschriften in acht te nemen.

Op deze inperkingsniveaus en onder navolging van de bovenstaande aanvullende voorschriften, is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verbonden aan het gebruik van gg-adenovirale vectoren bij de voorgenomen *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden, verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. COGEM (2014). Inventarisatie van strikt dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/141216-02
2. COGEM (2014). Criteria voor de classificatie van dierpathogene micro-organismen. COGEM signalering CGM/141013-02
3. Harrach B *et al.* (2012). Family *Adenoviridae*. In *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
4. International Committee on Taxonomy of Viruses (2015). <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> (bezocht: 15 november 2016)

5. McConnell MJ & Imperiale, MJ (2004). Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 15: 1022-1033
6. Berk AJ (2013). *Adenoviridae*. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
7. Davison AJ *et al.* (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *J. Gen. Virol.* 84: 2895-2908
8. Malouli D *et al.* (2015). Full genome sequence analysis of a novel adenovirus of rhesus Macaque origin indicates a new simian adenovirus type and species. *Viol. Rep.* 3-4: 18–29
9. Robinson CM *et al.* (2011). Computational analysis and identification of an emergent human adenovirus pathogen implicated in a respiratory fatality. *Virology* 409: 141-147.
10. Nakamura M *et al.* (2012). Surveillance of Adenovirus D in patients with epidemic keratoconjunctivitis from Fukei Prefecture, Japan, 1995-2015. *J. Med. Virol.* 84: 81-86
11. Hiroi S *et al.* (2012). A case of urethritis caused by Human adenovirus type 56. *Jpn. J. Infect. Dis.* 65: 273-274
12. Huang G *et al.* (2015). Outbreak of epidemic keratoconjunctivitis caused by Human adenovirus type 56, China, 2012. *PLoS One* 9: e110781
13. Wold WSM & Ison MG (2013). *Adenoviruses*. In: Fields virology, volume 2, sixth edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
14. Lion T (2014). Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* 27: 441-462
15. Miller DL *et al.* (2006). Adenovirus type 5 exerts genome-wide control over cellular programs governing proliferation, quiescence, and survival. *Genome Biology* 8: R58
16. Kalter SS (1982). Enteric viruses of non-human primates. *Vet. Pathol.* 19: 33-43
17. Pantó *et al.* (2015). *Arch. Virol.* 160: 3165-3177
18. Garner MM *et al.* (2008). Pathology and molecular characterization of two novel atadenoviruses in colubrid snakes. *J. Herpetol. Med. Surg.* 18: 86-94
19. Ball I *et al.* (2014). Prevalence of neutralising antibodies against adenoviruses in lizards and snakes. *Vet. J.* 201: 176-181
20. Wevers D *et al.* (2011). Novel adenoviruses in wild primates: a high level of genetic diversity and evidence of zoonotic transmission. *J. Virol.* 85: 10774-10784
21. COGEM (2013). Classificatie van elf adenovirus serotypen. COGEM advies CGM/130606-01
22. COGEM (2015). Classificatie van vier primate adenovirussen. COGEM advies CGM/150615-01
23. COGEM (2016). Classificatie van en inschaling van werkzaamheden met chimpansee adenovirus type 3. COGEM advies CGM/160906-01
24. COGEM (2012). Experimenten met onbekende adenovirussen uit mensapen. COGEM advies CGM/121210-01
25. COGEM (2014). Inventarisatie van strikt dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/141216-02
26. Abbink P *et al.* (2015). Construction and evaluation of novel rhesus monkey adenovirus vaccine vectors. *J Virol* 89: 1512-1522

27. Nederlands soortenregister. Overzicht van de Nederlandse biodiversiteit. Adder *Vipera berus*. www.nederlandsesoorten.nl/linnaeus_ng/app/views/species/nsr_taxon.php?id=138867&cat=144 (bezocht: 22 november 2016)
28. Adder (*Vipera berus*). Soortenbank.nl. Dieren, planten en paddenstoelen in Nederland. www.soortenbank.nl/soorten.php?soortengroep=reptielen_en_amfibieen&id=17&menuentry=soorten (bezocht: 22 november 2016)
29. Ministerie van Economisch Zaken (2016). Beschermdde natuur in Nederland: soorten en gebieden in wetgeving en beleid. Adder (*Vipera berus* spp. Berus). Wetgeving en beleid. <http://minez.nederlandsesoorten.nl/node/100178304> (bezocht: 22 november 2016)
30. Ministerie van Infrastructuur en Milieu (2015). Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. www.officielebekendmakingen.nl/stcrt-2014-11317.html (bezocht: 21 november 2016)