

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

DATUM 25 oktober 2016
KENMERK CGM/161025-02
ONDERWERP Inschaling *in vitro* werkzaamheden met chimere coronavirussen


Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 16-229_2.8-000 getiteld "Constructie van chimere murine coronavirussen met aanhechtingseiwitten S en HE afkomstig van humane (OC43) en dierlijke (bovine coronavirus) beta1 Coronavirussen" ingediend door de Universiteit Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

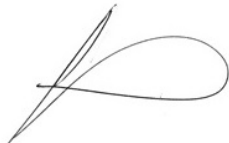
De COGEM is gevraagd te adviseren over de mogelijke risico's van de constructie en *in vitro* werkzaamheden met chimere murine coronavirussen. Coronavirussen zijn RNA virussen die mensen en dieren kunnen infecteren. De aanvrager is van plan om coderende sequenties voor aanhechtings- en oppervlakte-eiwitten van een muizenvirus (MHV) uit te wisselen met die van een humaan (HCoV-OC43) of van een rundervirus (BCoV). Het uitgangsvirus MHV heeft de muis als gastheer. De gastheerspecificiteit van coronavirussen wordt mede bepaald door het S oppervlakte-eiwit. Het risico van de voorgenomen werkzaamheden (uitwisseling van S en HE genen) is dat het gastheerbereik van het chimere virus zou kunnen veranderen ten opzichte van het gastheerbereik van het uitgangsvirus. De COGEM acht de kans dat de beoogde virussen zich zullen verspreiden onder mensen of runderen echter zeer klein, omdat naast het S eiwit ook andere factoren een rol spelen bij het in stand houden van de gastheerbarrière, zoals virus-gastheer interacties en afweermechanismen van de gastheer cel. Verder zijn er geen aanwijzingen dat MHV infecties bij de mens veroorzaakt.

Op basis van gegevens in wetenschappelijke literatuur is de COGEM van mening dat het uitwisselen van genen de pathogeniteit van de chimere coronavirussen zou kunnen beïnvloeden, maar dat dit niet zal leiden tot een virus met een hogere pathogeniteitsklasse dan die van de uitgangsvirussen. De COGEM adviseert daarom de voorgenomen werkzaamheden uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. Op dit inperkingsniveau en onder navolging van de door de aanvrager voorgestelde aanvullende voorschriften acht de COGEM de risico's voor mens in 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 dr. R.J. de Groot niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Inschaling *in vitro* werkzaamheden met chimere coronavirussen

COGEM advies CGM/161025-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag getiteld ‘Constructie van chimere murine coronavirussen met aanhechtingseiwitten S en HE afkomstig van humane (OC43) en dierlijke (bovine coronavirus) beta1 coronavirussen’ (IG 16-229) ingediend door de Universiteit Utrecht.

De vergunningaanvraag omvat de constructie van en *in vitro* werkzaamheden met vier chimere murine coronavirussen. In deze chimere varianten worden coderende sequenties voor spike (S) en hemagglutinine-esterase (HE) aanhechtings- en oppervlakte-eiwitten uitgewisseld met die van het Humane coronavirus HCoV-OC43 of van het Bovine coronavirus (BCoV) of een combinatie van beide. Doel van de voorgenomen werkzaamheden is om te onderzoeken of het gastheertropisme wordt bepaald door de interactie tussen S en HE om op deze manier inzicht te verkrijgen in het zoönotisch potentieel van Betacoronavirussen.

2. Coronavirussen

Coronavirussen behoren tot de familie van *Coronaviridae*. Taxonomisch gezien kan de familie onderverdeeld worden in de volgende 4 genera: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* en *Deltacoronavirus*. Het zijn positief-strengige RNA virussen (26-32 kb) die mensen en dieren kunnen infecteren.⁴ Transmissie vindt afhankelijk van de soort plaats via fomites, aerogeen of fecaal-oraal. Coronavirussen zijn normaal gesproken zeer soort-specifiek, maar hebben de potentie om zich aan te passen aan een nieuwe gastheer en hierbij van dier op mens (zoönose) of van mens op dier (omgekeerde zoönose) over te springen (host-shifting). Recent voor de mens ziekmakende voorbeelden zijn *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (SARS-CoV) en *Middle East respiratory syndrome coronavirus* (MERS-CoV).¹

2.1 Genomische organisatie van coronavirussen

Het genoom van coronavirussen is omgeven door een eiwitmantel (nucleocapside) en een membraan. De genomische structuur van alle coronavirussen is op vergelijkbare wijze georganiseerd. Tweederde van het genoom, gelegen aan het 5' einde en bestaande uit ORF1a en ORF1b, codeert voor niet-structurele eiwitten. Het overige deel, gelegen aan het 3' einde van het genoom codeert voor structurele eiwitten in de volgorde spike (S), envelop (E), membraan (M) en nucleocapside (N). Het membraan bevat M, E en S eiwitten en in sommige coronavirussen bevat het ook het HE glycoproteïne.

Het M eiwit is een transmembraan eiwit dat het membraan driemaal doorkruist en wordt in sommige stammen geglycosyleerd. Het E eiwit is een integraal membraaneiwit dat dient als een ionkanaal of zorgt voor membraanpermeabiliteit. Het N eiwit vormt samen met het genomische RNA de capsid. Daarnaast is het onder meer betrokken bij RNA synthese en translatie.

De gastheerspecificiteit en het weefsel-tropisme van coronavirussen wordt voornamelijk bepaald door het S eiwit. Het herkent de gastheerreceptor en medieert fusie van het virale celmembraan met het plasmamembraan van de gastheercel wat leidt tot opname van het virale genoom in de

gastheercel.^{1,4} Het niet-essentiële HE glycoproteïne vormt een tweede kleinere spike op het membraam van sommige coronavirussen. Het bindt aan de sialzuur-bevattende receptor van gastheercellen, gebruikt deze om de cel binnen te dringen en kan deze ook vernietigen.^{2,5} Sialzuren kennen een grote variëteit en komen differentieel tot expressie in cellen en weefsels. De weefsel- en celspecificiteit van coronavirussen wordt mede bewerkstelligd doordat hun HE eiwitten gericht zijn tegen specifieke sialzuurvarianten.³

2.2 MHV-A59

Het *Murine coronavirus* (mouse hepatitis virus, (MHV)) veroorzaakt ziekte in de muis. Het behoort binnen de familie der *Coronaviridae* tot het genus *Betacoronavirus*.⁴ Er zijn in de loop der tijd verschillende stammen MHV geïsoleerd die anders dan de naam van deze coronavirussoort doet vermoeden niet allemaal hepatotroof zijn. Er zijn ook isolaten die alleen een luchtweginfectie, darminfectie of infectie van het centrale zenuwstelsel veroorzaken.⁵ MHV dringt de gastheercel binnen door middel van celmembraanfusie getriggerd door de interactie van het membraaneiwit S met de cellulaire receptor CEACAM1a.

De MHV stam A59 veroorzaakt hepatitis, maar kan daarnaast microglia en verscheidene celtypes in het centraal zenuwstelsel (CZS) van de muis infecteren, wat leidt tot acute hersenontsteking gevolgd door chronische demyelinisatie. Het HE gen is aanwezig in het genoom van MHV-A59, maar het eiwit komt niet tot expressie, voor receptor herkenning is de stam daarom afhankelijk van het S eiwit. Het is echter tot op heden onduidelijk hoe de infectie en verspreiding van MHV-A59 precies verloopt, aangezien de CEACAM1a receptor laag tot expressie komt in het CZS van de muis.

2.3 HCoV-OC43

Op dit moment zijn er zes coronavirussen bekend die behoren tot de zogenaamde humane coronavirussen (HCoVs). *Human coronavirus 229E* (HCoV-229E) en *Human coronavirus NL63* (HCoV-NL63) behoren tot het genus *Alphacoronavirus*. *Human coronavirus OC43* (HCoV-OC43), *Human coronavirus HKU1* (HCoV-HKU1), SARS-CoV en MERS-CoV behoren tot het genus *Betacoronavirus*.⁶ Het HCoV-OC43 virus is een subspecies van *Betacoronavirus 1* en is al langere tijd geleden geïdentificeerd (1967). Het circuleert wijdverspreid in de humane populatie en veroorzaakt bij infectie van de hogere luchtwegen gewone verkoudheid. Bij mensen met een verzwakt immuunsysteem en ouderen kan HCoV-OC43 daarnaast ook de lagere luchtwegen infecteren en longontsteking veroorzaken.

Voor hechting en entry van de gastheercel maakt HCoV-OC43 gebruik van de membraaneiwitten S en HE. HCoV-OC43 infecteert cellen met trilharen (cilia) in de luchtwegen. Infectie met HCoV-OC43 is afhankelijk van de aanwezigheid van 9-O-geacetyleerd sialzuur als receptor.^{3,6} De genomen van HCoV-OC43 en BCoV zijn voor 96% identiek. Sequentie-analyse wijst er op dat HCoV-OC43 hoogstwaarschijnlijk is ontstaan uit een zoönotische transmissie van rund op mens.⁷

2.4 BCoV

BCoV is net als HCoV-OC43 een subspecies van *Betacoronavirus 1*.⁴ Het BCoV is een wijdverspreid pathogeen, dat wereldwijd ziekte veroorzaakt in de luchtwegen en darmen van runderen. Net als HCoV-OC43 is BCoV voor infectie afhankelijk van de aanwezigheid van 9-O-geacetyleerd sialzuur.

In kalveren kan een darminfectie tot diarree leiden en in volwassen runderen tot de zogenaamde Winter Dysenterie met hemorragische diarree.⁸ Een luchtweginfectie met BCoV komt bij runderen van verschillende leeftijden voor en leidt tot het zogenaamde ‘bovine respiratory disease’ of ‘shipping disease’. Het BCoV wordt uitgescheiden in feces en nasale afscheiding.

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil door middel van ‘reverse genetics’ genetisch gemodificeerde coronavirussen genereren, die gebaseerd zijn op MHV en waarin de coderende sequenties voor S en HE eiwit uitgewisseld zijn met die van het humane coronavirus HCoV-OC43 of van het BCoV of een combinatie van beide. Dit resulteert in vier verschillende chimere coronavirussen:

- a. gg-MHV met S en HE van HCoV-OC43
- b. gg-MHV met S van HCoV-OC43 en HE van BCoV
- c. gg-MHV met S van BCoV en HE van HCoV-OC43
- d. gg-MHV met S en HE van BCoV

Tevens is de aanvrager van plan om specifieke mutaties aan te brengen in de S en HE genen waardoor van iedere chimeer verschillende varianten zullen worden gemaakt. Naast de productie van bovengenoemde gg-coronavirussen wil de aanvrager ook infectieproeven doen met deze ggo's in animale cellen, om de betrokkenheid van S en HE bij het gastheertropisme van coronavirussen nader te onderzoeken.

4. Eerder COGEM advies

De meeste coronavirussen zijn ingedeeld als klasse 2 pathogeen, met uitzondering van SARS-CoV en MERS-CoV die beide zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.^{9,10}

Daarnaast heeft de COGEM in het verleden drie maal geadviseerd over werkzaamheden met chimere coronavirussen. Het eerste advies betrof de inschaling van werkzaamheden met chimere MHV's en chimeer *Feline infectious peritonitis virus* (FIPV), waarbij de chimeren werden gevormd door uitwisseling van sequenties van MHV stammen onderling of FIPV stammen onderling.¹¹ Er werden dus geen chimeren gemaakt waarin MHV sequenties met FIPV sequenties werden uitgewisseld. Alle *in vitro* experimenten met deze chimeren werden door de COGEM op ML-II (toentertijd C-I) inperkingsniveau ingeschaald en daarbij werden de volgende aanvullende voorschriften geadviseerd:

- tijdens de handelingen dienen handschoenen gedragen te worden
- alle handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II uitgevoerd te worden

Het tweede advies betrof de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met twee chimere virussen die vervaardigd werden door uitwisseling van het ORF3/4 domein tussen de Alphacoronavirussen HCoV-

229E en HCoV-NL63.¹² ORF3/4 coderende eiwitten worden tot de zogenaamde accessoire eiwitten gerekend en zijn niet essentieel voor de *in vitro* replicatie van het virus, maar spelen waarschijnlijk een rol bij de virus-gastheer interactie *in vivo*.¹³ Het ORF3 eiwit is in verband gebracht met de pathogeniteit van twee coronavirussen (PEDV en TGEV) die tot dezelfde groep behoren als HCoV-229E en HCoV-NL63.^{14,15} Aangezien de COGEM het waarschijnlijk achtte dat ORF3/4 van invloed is op de pathogeniteit en/of transmissie-efficiëntie adviseerde zij de werkzaamheden met deze chimere coronavirussen op ML-III inperkingsniveau in te schalen.

Het derde advies betrof werkzaamheden met chimeer *Infectious bronchitis virus* (IBV).¹⁶ In deze chimere coronavirussen werden regio's of gedeeltes van genen van verschillende IBV stammen met elkaar gecombineerd. De COGEM was van mening dat het celtropisme en de pathogeniteit van de recombinante IBV virussen zou kunnen veranderen, maar niet dusdanig dat het zou leiden tot een virus met een hogere pathogeniteitsklasse dan de uitgangsstammen. Derhalve adviseerde zij de *in vitro* werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau in te schalen en kon zij instemmen met de volgende aanvullende voorschriften:

- het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden is verplicht
- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd

5. Overwegingen en advies

De aanvrager is voornemens gebruik te maken van chimere murine coronavirussen waarin coderende sequenties voor S en HE aanhechtings- en oppervlakte-eiwitten zijn uitgewisseld met die van HCoV-OC43 of BCoV of een combinatie van beide. Daarnaast is de aanvrager van plan om specifieke mutaties aan te brengen in de S en HE genen waardoor van iedere chimeer verschillende varianten zullen worden gemaakt.

Coronavirussen zijn normaal gesproken zeer soort-specifiek, maar hebben de potentie om zich aan te passen aan een nieuwe gastheer. De gastheerspecificiteit en het weefsel-tropisme van coronavirussen wordt voornamelijk bepaald door het S eiwit.^{1,4} In theorie is het daarom mogelijk dat door de voorgenomen werkzaamheden (uitwisseling en verdere mutatie van S en HE genen) het gastheerbereik van het chimere murine virus verandert. Andere factoren spelen daarnaast ook een rol bij het in stand houden van de gastheerbarrière, zoals virus-gastheer interacties, innate immunity en host factoren.

Dat het S eiwit niet als enige van belang is bij de gastheerspecificiteit, blijkt uit het feit dat ondanks dat MHV-A59 in staat is om humane cellijnen te infecteren (na receptoradaptatie door meerdere passages in cellijnen), er geen aanwijzingen zijn dat MHV infecties bij de mens veroorzaakt.¹⁷ Het rundervirus BCoV is in staat om *in vitro* humane cellen te infecteren, toch is er slechts éénmaal melding gedaan van een BCoV infectie bij de mens, namelijk bij een kind met diarree.^{18,19,20} Eén van de onderliggende verklaringen hiervoor is dat gastheercellen van nature een innate immunity hebben tegen coronavirussen.²¹ Voor een succesvolle infectie moet het virus deze barrière overwinnen. Coronavirussen kunnen de innate immunity van hun natuurlijke gastheer overwinnen doordat zij antagonisten bij zich dragen die zijn aangepast aan de gastheer die zij infecteren. Ook zijn host

factoren belangrijk voor het functioneren van de eiwitten gecodeerd door ORF1a en ORF1b, die essentieel zijn voor de replicatie van het virusgenoom.²²

Op basis van deze gegevens acht de COGEM de kans dat de beoogde chimere MHV virussen zich zullen kunnen verspreiden onder mensen of runderen zeer klein.

De coronavirussen die de aanvrager wil gebruiken behoren alle drie tot het genus *Betacoronavirus* en zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. In theorie kan de uitwisseling van genen invloed hebben op de pathogeniteit en virulentie van de chimere virussen.

In verschillende eerdere experimenten zijn chimere recombinante MHV virussen gemaakt. Zo werd in één studie het replicase gen van een zeer neurovirulente MHV stam (JHM) uitgewisseld met die van de hepatrofe en mild neurovirulente MHV-A59 stam.²³ In een andere studie werd het S eiwit van de zeer neurovirulente stam MHV-4 uitgewisseld met die van MHV-A59.²⁴ Ook zijn er chimere MHV varianten gemaakt met N coderende sequenties van BCoV.²⁵ De gecreëerde chimere waren soms even virulent als één van de uitgangsvirussen, maar in het merendeel van de gevallen bleek het chimere virus geattenuëerd *in vivo*.

De aanvrager is van plan een geattenuëerde MHV variant (A59) te gebruiken, waarin een niet functioneel HE gen aanwezig is. De COGEM acht het enerzijds aannemelijk dat de uitwisseling van genen zal leiden tot verdere attenuatie van de uitgangsstam. Herstel van HE expressie door introductie van een functioneel BCoV/HCoV-OC43 HE gen in geattenuëerd MHV-A59, zou anderzijds het celtropisme en de virulentie van chimeer MHV-A59 kunnen veranderen, maar de COGEM is van mening dat dit niet zal leiden tot een virus met een hogere pathogeniteitsklasse dan een niet geattenuëerde MHV stam.

Alles in overweging nemende, is de COGEM van mening dat de pathogeniteit van de chimere murine coronavirussen de pathogeniteitsklasse van de uitgangsvirussen niet zal overschrijden. Er is geen reden om aan te nemen dat introductie van S en HE eiwitten van HCoV en BCoV in MHV eventueel zou kunnen leiden tot verspreiding van de chimere virussen onder mensen of runderen. De COGEM adviseert daarom de voorgenomen *in vitro* werkzaamheden uit te voeren op ML-II inperkingsniveau.

Met het oog op mogelijke aërogene verspreiding van de virussen adviseert zij daarbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden is verplicht
- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse II te worden uitgevoerd

Onder dit inperkingsniveau en aanvullende werkvoorschriften acht de COGEM de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Graham RL *et al.* (2013). A decade after SARS: strategies for controlling emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 11: 836-848

2. Langereis MA *et al.* (2015). Complexity and diversity of the mammalian sialome revealed by Nidovirus Virolectins. *Cell Rep.* 11: 1966-1978
3. de Groot RJ (2006). Structure, function and evolution of the hemagglutinin-esterase proteins of corona- and toroviruses. *Glycoconj. J.* 23: 59-72
4. King *et al.* (2012). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam 806-828
5. Bender SJ & Weiss SR (2010). Pathogenesis of murine coronavirus in the central nervous system. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 5: 336-354
6. Jonsdottir HR & Dijkman R (2016). Coronaviruses and the human airway: a universal system for virus-host interaction studies. *Viol. J.* 6: 13-24
7. Vijgen L *et al.* (2005). Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. *J. Virol.* 79: 1595-1604
8. Saif LJ (2010). Bovine respiratory coronavirus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26: 349-364
9. COGEM (2003). Toekenning pathogeniteitsklasse voor het aan SARS geassocieerde coronavirus. COGEM advies CGM/030429-01
10. COGEM (2013). Classificatie en werkzaamheden met *Middle East Respiratory Syndrome coronavirus* (MERS-CoV). COGEM advies CGM/130822-01
11. COGEM (2001). Genetische modificatie van coronavirussen door middel van gerichte homologe RNA recombinatie. COGEM advies CGM/010724-02
12. COGEM (2009). Inschaling van werkzaamheden met recombinante humane coronavirussen. COGEM advies CGM/090227-03
13. Dijkman R *et al.* (2006). Human coronavirus 229E encodes a single ORF4 protein between the spike and the envelope genes. *Viol. J.* 2:106
14. Woods RD (2001). Efficacy of a transmissible gastritis coronavirus with an altered ORF-3 gene. *Can. J. Vet. Res.* 65: 28-32
15. Song DS *et al.* (2003). Differentiation of a Vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 3. *Vaccine* 21: 1833-1832
16. COGEM (2012). Werkzaamheden met chimeer *Infectious bronchitis virus*. COGEM advies CGM/120104-01
17. de Haan CA *et al.* (2005). Murine coronavirus with an extended host range uses heparan sulfate as an entry receptor. *J. Virol.* 79: 14451-14456
18. Zhang XM *et al.* (1994). Biological and genetic characterization of a hemagglutinating coronavirus isolated from a diarrhoeic child. *J. Med. Virol.* 44: 152-161
19. Stipp DT *et al.* (2009) Isolation in HRT-18 cells and molecular analysis of a BCoV strain from diarrheic feces of naturally infected calves. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52: 51-56
20. Benfield DA & Saif LJ (1990). Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1454-1457
21. DeDiego ML *et al.* (2014). Coronavirus virulence genes with main focus on SARS-CoV envelope gene. *Virus Res.* 194: 124-137

22. Lim YX *et al.* (2016). Human coronaviruses: A review of virus–host interactions. *Diseases* 4: 26
23. Navas-Martin S *et al.* (2007). Replicase genes of murine coronavirus strains A59 and JHM are interchangeable: differences in pathogenesis map to the 3' one-third of the genome. *J. Virol.* 81: 1022-1026
24. Phillips JJ *et al.* (2001). Multiple regions of the murine coronavirus spike glycoprotein influence neurovirulence. *J. Neurovirol.* 7: 421-431
25. Peng D *et al.* (1995). Construction of murine coronavirus mutants containing interspecies chimeric nucleocapsid proteins. *J. Virol.* 69: 5475-5484