

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 05 juni 2020
KENMERK CGM/200605-01
ONDERWERP Advies recombinant NDV-vaccin met Spike van SARS-CoV-2

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,


Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier getiteld 'Propagatie van recombinant Newcastle disease virus (laag pathogeen LaSota strain)' (IG 19-027_2.8-002), ingediend door Intravacc in Bilthoven, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd (gg-) virusvaccin gebaseerd op de laagpathogene Newcastle disease virus (NDV) vaccinstam LaSota. De aanvrager wil door middel van expressie van het S-eiwit een immunerespons initiëren die kan beschermen tegen infectie met SARS-CoV-2. Er zullen gg-NDV-Spike virussen worden gemaakt, die het gehele of een gedeelte van het gen coderend voor het S-eiwit van SARS-CoV-2 bevatten. In het S-eiwit zijn mutaties aangebracht die de fusie-activiteit van het eiwit moeten inactiveren, waardoor het S-eiwit geen rol meer kan spelen bij het binnendringen van cellen. In een aantal constructen zal het S-eiwit in het virusdeeltje van NDV worden opgenomen.

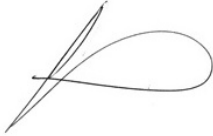
De COGEM acht het waarschijnlijk dat de inserties van SARS-CoV-2 in NDV LaSota tot attenuatie van de gg-virussen zal leiden. De COGEM is van oordeel dat de aangebrachte mutaties de fusie-activiteit van het S-eiwit van SARS-CoV-2 uitschakelen en dat aanhechting aan de (ACE-2) celreceptor niet tot infectie van de gg-NDV-Spike virussen kan leiden. In geval dat de S-eiwitten toch resterende fusie-activiteit bezitten, is de COGEM van oordeel dat het tropisme van de gg-NDV-Spike virussen niet is verhoogd, omdat de receptoren van NDV, siaalzuren, aanwezig zijn op alle celtypen van gewervelde dieren.

Indien de werkzaamheden op inperkingniveau ML-II worden uitgevoerd, in combinatie met de voorgestelde aanvullende maatregelen, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu, verwaarloosbaar klein zijn.



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. Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
DG Milieu en Internationaal

Met het oog op eventuele belangenverstremgeling zijn de COGEM leden prof. dr. J. Kortekaas en dr. B.P.H. Peeters niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies

Inschaling van werkzaamheden met een recombinant Newcastle disease virus met spike van SARS-CoV-2

COGEM advies CGM/200605-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd (gg-) virusvaccin gebaseerd op de laagpathogene Newcastle disease virus (NDV) vaccinstam LaSota (IG 19-027_2.8-002). De aanvrager, Intravacc in Bilthoven, wil door middel van expressie van het S-eiwit een immuunrespons initiëren die kan beschermen tegen infectie met SARS-CoV-2. Dit teneinde een vaccin te ontwikkelen gebaseerd op NDV dat geschikt is voor intranasale toediening. Er zullen gg-NDV-Spike virussen worden gemaakt, waarbij het gehele of een gedeelte van het gen coderend voor het S-eiwit van SARS-CoV-2 geïnsereerd is tussen het P- en het M-gen van NDV LaSota. Er zullen ook gg-virussen geproduceerd worden waarbij het S-gen is gefuseerd aan één van de genen van NDV. De recombinante virussen zullen met behulp van ‘reverse genetics’ worden geproduceerd en worden vermeerderd in zoogdiercellen in bioreactoren tot maximaal 100 liter.

1.1 Newcastle disease virus (NDV)

1.1.1 Newcastle disease

Newcastle disease virus (NDV) (ook wel bekend als *Avian orthoavulavirus 1*, voorheen Avian paramyxovirus (APMV)-1)) is een negatief enkelstrengs RNA virus behorende tot het genus *Orthoavulavirus*, familie *Paramyxoviridae*.¹ Het virus kan ‘Newcastle disease’, ofwel pseudovogelpest, veroorzaken, een zeer besmettelijke ziekte bij vele soorten vogels, waaronder kippen, fazanten, duiven, papegaaien en valkparkieten. ND is wereldwijd één van de belangrijkste pluimveeziektes en staat vermeld op de lijst van meldingsplichtige dierziekten van de Wereldorganisatie voor diergezondheid (OIE).^{2,3,4}

Niet elke soort is even gevoelig voor Newcastle disease; zo zijn kippen vatbaarder voor NDV dan eenden of ganzen. Ook variëren NDV stammen in virulentie en weefseltropisme.⁴ Op basis van de virulentie van het virus bij geïnfecteerde kippen, worden NDV stammen in verschillende pathotypen onderscheiden.^{4,5} De velogene (virulente) stammen veroorzaken ernstige systemisch infecties met hoge morbiditeit en mortaliteit (beide oplopend tot wel 100%). Virussen die neurotroof velogeen zijn, veroorzaken hoge mortaliteit als gevolg van neurologische symptomen (draainek, verlammingen) en ademhalingsproblemen. Virussen die viscerotroop velogeen zijn, veroorzaken acute dodelijke infecties met onder meer bloederige darmontsteking en groene diarree. Mesogene (mild-virulente) stammen veroorzaken luchtweginfecties, afname in de eiproductie en neurologische verschijnselen en hebben een lage mortaliteit (<10%). Lentogene (niet-virulente) stammen veroorzaken een milde infectie van de luchtwegen (niezen, hoesten) en een geringe afname in eiproductie. Als laatste zijn er ook virussen die

asymptomatische infecties veroorzaken, waarbij de virusreproductie hoofdzakelijk in het maag plaatsvindt.^{4,5,6}

NDV wordt overgedragen door direct contact met geïnfecteerde vogels, of indirect via contact met besmet voer, uitwerpselen, water of kleding. Daarnaast is NDV ook door de lucht overdraagbaar via aerosolen.^{4,5} Vooral in mest kan het virus een lange tijd infectieus blijven.⁴ Wereldwijd wordt pluimvee gevaccineerd tegen NDV. De gebruikte vaccinstammen zijn afgeleid van lentogene virusstammen.¹³

Mensen kunnen in potentie geïnfecteerd raken met NDV, zowel door virulente stammen als ook door niet-virulente vaccinstammen.⁹ Dergelijke infecties zijn zelflimiterend en leiden niet tot ernstige ziekte.⁹ Er zijn enkele sporadische gevallen van conjunctivitis bij mensen gerapporteerd.⁷ Er is onder andere een uitbraak van NDV in een pluimveebedrijf beschreven, waarbij 40 personen geïnfecteerd raakten en kortdurende conjunctivitis ontwikkelden (3-4 dagen) zonder systemische symptomen.⁸ Mens-op-mens transmissie is nog nooit gerapporteerd.⁹ NDV kan efficiënter repliceren in humane kankercellen dan in normale humane cellen.^{10,15} Een mogelijke verklaring hiervoor is dat er in normale cellen een interferon-respons opgang komt na infectie met NDV, terwijl interferon-signaalroutes vaak defectief zijn in kankercellen.¹⁵ NDV wordt om deze reden als oncolytisch agens voor humaan gebruik toegepast.^{10,11,15,17}

1.1.2 Genomische organisatie van NDV

Het enkelstrengs negatief RNA genoom van NDV is ~15 kb lang en codeert voor zes eiwitten: het nucleocapside (N), fosfoproteïne (P), matrix-eiwit (M), fusie-eiwit (F), haemagglutinine-neuraminidase eiwit (HN) en het 'large' polymerase eiwit (L).^{12,13} Door 'RNA editing' tijdens de transcriptie van het P gen worden twee additionele eiwitten (genaamd V- en W-eiwit) geproduceerd.¹³ Het RNA-afhankelijke RNA-polymerase bestaat uit de P en L eiwitten. Het RNA-genoom, ingepakt door het N-eiwit, vormt samen met het RNA-afhankelijke RNA-polymerase, een zogenaamd ribonucleoproteïne (RNP) complex, vanaf waar RNA-synthese plaatsvindt. Het M-eiwit bekleedt het binnenoppervlak van het lipidemembraan en is betrokken bij het vrijkomen van het virus uit de cel en de regulatie van de transcriptie. De oppervlakte-glycoproteïnen HN en F bevinden zich in het lipidemembraan en zijn respectievelijk verantwoordelijk voor de binding aan sialzuur (SA) receptoren van de gastheer cel, en fusie van de virale envelop met de gastheer cel.^{12,13} Sialzuren zijn wijd verspreid aanwezig op het oppervlakte van alle celtypen van gewervelde en sommige 'hogere' ongewervelde dieren.¹⁴

Het F-eiwit is een belangrijke bepalende factor voor NDV virulentie. Voordat nieuwgevormde virusdeeltjes infectieus zijn, moet het F0 molecuul door proteases van de gastheer cel gesplitst worden in de F1 en F2 eiwitten. De F-eiwitten van lentogene NDV stammen bezitten een basisch aminozuur bij de klievingsplaats van het F0 eiwit, en kunnen enkel door extracellulaire trypsine-achtige proteases die in de luchtweg- of - maagdarmkanaalcellen van de gastheer aanwezig zijn, worden gesplitst. Virulente NDV stammen hebben meerdere basische aminozuren bij de klievingsplaats van het F0 eiwit. Deze kunnen door intracellulaire furine proteases die aanwezig zijn in vrijwel alle lichaamscellen, worden gekliefd. Hierdoor kunnen deze NDV stammen in veel verschillende weefsels repliceren en fatale systemische infectie veroorzaken.^{13,15} De gehele reproductie-cyclus van NDV vindt plaats in het cytoplasma van de gastheer cel.¹⁵

1.1.3 NDV stam LaSota en toepassing als recombinant virusvaccin

De aanvrager is voornemens genetisch gemodificeerde (gg-) vectoren gebaseerd op de NDV stam LaSota te construeren voor vaccin-ontwikkeling tegen SARS-CoV-2. De lentogene avirulente LaSota stam repliceert hoofdzakelijk in de luchtwegen van kippen. Deze stam wordt wereldwijd al decennia lang als levend vaccin ingezet om pluimvee tegen Newcastle disease te beschermen en kent een lange historie van veilig gebruik bij pluimvee.¹⁶

Daarnaast vindt onderzoek met gg-NDV stammen, waaronder LaSota, plaats voor toepassing als recombinant virusvaccin om mensen en dieren tegen pathogenen als Ebola, ‘Middle East respiratory syndrome’ (MERS), ‘Severe acute respiratory syndrome’ (SARS), HIV, vogelgriep en ‘Rift Valley fever’ te beschermen.^{15,17} In verscheidene pre-klinische studies bij niet-humane primaten zijn de veiligheid en werkzaamheid van NDV stammen (waaronder LaSota) als potentiële vectoren voor humane vaccins onderzocht.^{17,18,19,20} In een studie van Bukreyev *et al.* (2005) is een recombinante LaSota vector die het HN eiwit van ‘human parainfluenza virus’ type 3 (HPIV3) tot expressie bracht, geconstrueerd en is attenuatie van LaSota bij niet-humane primaten aangetoond.²⁰ De niet-humane primaten werden intranasaal en intracheaal geïnoculeerd met een recombinante NDV stam LaSota (twee doseringen van 10^{6,5} PFU). Dit werd goed getolereerd, veroorzaakte geen symptomen, en er was sprake van zeer beperkte virusrePLICATIE in de luchtwegen.²⁰ In een andere studie werd een recombinante NDV stam met het HA eiwit van H5N1, intranasaal en intracheaal toegediend (twee doseringen van 10⁷ PFU) aan niet-humane primaten. Ook in deze studie werd slechts zeer beperkte replicatie waargenomen, met beperkte virus shedding in luchtwegsecreties.²¹ Deze pre-klinische studies bij niet-humane primaten wijzen er op dat de geattenueerde op NDV-gebaseerde virusvaccins geschikte kandidaten kunnen zijn voor verdere ontwikkeling als humane vaccinvectoren.^{13,17}

1.2 SARS-CoV-2

Sinds december 2019 is er een uitbraak onder de humane populatie gaande met een nieuw coronavirus uit de species *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (genus *Betacoronavirus* en familie *Coronaviridae*), genaamd SARS-CoV-2.²² De uitbraak is in China begonnen, maar heeft zich snel op wereldwijde schaal verspreid, waarbij Europa ook zwaar getroffen is.²³ Besmetting met SARS-CoV-2 kan bij de mens leiden tot koorts, respiratoire symptomen en longontsteking, met in het ergste geval de dood tot gevolg. Het ziektebeeld dat dit virus veroorzaakt wordt COVID-19 genoemd. Op basis van de huidige gegevens wordt ongeveer 20-30% van de gediagnostiseerde COVID-19 gevallen opgenomen in het ziekenhuis en heeft 4% een ernstiger verloop van de ziekte.²⁴ Echter, vanwege onderrapportage van het totale aantal geïnfecteerde personen, moeten deze getallen met de nodige voorzichtigheid worden geïnterpreteerd. Het virus wordt voornamelijk overgedragen via respiratoire druppeltjes (‘respiratory droplets’) die ontstaan als een geïnfecteerd persoon hoest, niest of praat.^{24,25} Er is op dit moment geen vaccin of antivirale therapie voorhanden.

SARS-CoV-2 bezit een enkelstrengs positief RNA genoom (~30 kb), waarop zich 11 ‘open reading frames’ (ORFs) bevinden. De genoomorganisatie is typisch voor coronavirussen: twee grote, deels overlappende ORFs bevinden zich aan het 5’ uiteinde van het genoom, beslaan ongeveer twee derde van

het genoom en coderen voor de replicase polyproteïnen die een rol spelen bij RNA-replicatie. De andere ORFs aan het 3' uiteinde coderen voor de structurele eiwitten S ('spike'), E ('envelope') en M ('membrane') en het N eiwit ('nucleocapsid') en de zogenoemde 'accessory' eiwitten.²⁶ Het S-eiwit is belangrijk voor het gastheerbereik ofwel tropisme van het virus. Het S-eiwit is een glycoproteïne wat als homotrimeer geïntegreerd is in de virale envelop, waarbij onder meer het 'receptor-binding domain' (RBD), verantwoordelijk voor de aanhechting van het virus aan de receptor van de gastheercel, uit het virusdeeltje steekt. Na binding aan de receptor vinden structurele veranderingen plaats in het S-eiwit, die leiden tot de fusie van de virale envelop met het plasmamembraan van de gastheer, waarna het virale RNA de gastheercel kan binnendringen. SARS-CoV-2 gebruikt het 'angiotensin converting enzyme' (ACE)-2 als receptor.^{27,28,29,30}

1.3 De gg-NDV-Spike constructen

Het S-eiwit bestaat uit twee subeenheden: S₁, wat betrokken is bij de binding aan de ACE-2 receptor op de gastheercel, terwijl S₂ membraanfusie faciliteert. Bij SARS-CoV-2 is er een furine-klievingssite aanwezig op de grens tussen de S₁- en S₂-subeenheden, die gesplitst wordt tijdens de vorming van virusdeeltjes en een rol speelt in de tropisme van het virus. Membraanfusie gaat gepaard met een conformatieverandering in het S-eiwit van een zogenaamde pre-fusie naar een post-fusie vouwing.³⁰ De ACE-2 receptor komt bij de mens voornamelijk tot expressie in het epitheel van de longen of de dunne darm, evenals in het endotheel van bloedvaten.³¹

In onderhavige aanvraag zullen verschillende gg-NDV-Spike virussen worden gemaakt, waarbij het gehele of een gedeelte van het gen coderend voor het S-eiwit van SARS-CoV-2 geïnsereerd is tussen het P- en het M-gen van NDV LaSota. Bij een aantal constructen zal een deel van het S-eiwit gefuseerd worden aan één van de eiwitten van het NDV virus. De kans is groot dat bij een aantal het S-eiwit wordt geïncorporeerd in de envelop van het NDV virus.

In de gg-NDV constructen zijn mutaties aangebracht in de S-eiwitten: er is een dubbele proline mutatie (2P) gecreëerd in de S₂ subunit³² en de furine-klievingssite is zodanig gemodificeerd dat splitsing niet meer mogelijk is.³⁰ Door de 2P mutatie is de fusie-activiteit uitgeschakeld, doordat het S-eiwit in zijn pre-fusie conformatie wordt gefixeerd.^{30,32,33} Inactivatie van de S1/S2 klievingsplaats leidt eveneens het uitschakelen van de fusie-activiteit van het S-eiwit.³⁴

1.4 Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil met behulp van 'reverse genetics' de bovenstaande gg-NDV-Spike virussen produceren in zoogdiercellen. Hiervoor worden zoogdiercellen getransfecteerd met het plasmide pNDFL (met een cDNA kopie van het NDV genoom achter de T7-promoter), samen met plasmides die de NP, P en L eiwitten van NDV tot expressie brengen. Om het virale NDV RNA vanaf pNDFL te transcriberen, worden de cellen vermoedelijk vooraf geïnfecteerd met recombinant 'fowlpox'-virus dat het T7-RNA-polymerase tot expressie brengt; dit is niet duidelijk uit de aanvraag. Na het produceren van de gg-NDV-Spike virussen, zullen deze virussen vermeerderd worden in bioreactoren (maximaal 100 liter).

Aangezien de aanvrager NDV als mogelijk aerogeen verspreidend beschouwt, is de aanvrager van plan open handelingen uit te voeren in een veiligheidskabinet klasse 2 (VK-2) en handschoenen te dragen tot over de mouw van de werkkleding. Tevens geeft de aanvrager aan dat FACS apparatuur dusdanig is geconstrueerd, dat verspreiding van aerosolen wordt voorkomen.

2. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft wildtype NDV in 2006 ingedeeld als dierpathogeen in pathogeniteitsklasse 3.^{35,36} De COGEM heeft SARS-CoV-2 in 2020 ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.³⁷

In 2002 heeft de COGEM geadviseerd over gg-werkzaamheden met een vaccinstam die afgeleid is van de lentogene NDV stam LaSota (vaccinstam NDV Clone-30).³⁸ In de vaccinstam werden sequenties coderend voor cytokinen (IL-2, IL-12 en IFN-g) tot expressie gebracht om de immuunrespons bij proefdieren te versterken. In dit advies adviseerde de COGEM de werkzaamheden met het vaccivirus uit te voeren op inperkingsniveau II.³⁸

In 2014 heeft de COGEM nogmaals geadviseerd over werkzaamheden met de NDV vaccinstam Clone-30.³⁹ De aanvrager was voornemens om de oppervlakte-eiwitten F en HN van APMV-1 te vervangen door die van APMV-3, -6 en -8. De COGEM concludeerde dat de gg-NDV's door uitwisseling van oppervlakte-eiwitten met APMV-3, -6 en -8 niet virulenter zijn dan de in klasse 2 ingedeelde APMV-3, -6. Gezien het feit dat de lentogene vaccinstam NDV Clone-30 een lange geschiedenis van veilig gebruik kent, adviseerde de COGEM de werkzaamheden op ML-II uit te voeren. Aangezien de vaccinstam conjunctivitis kan veroorzaken en zowel de vaccinstam als de APMV's via de aero gene route (aerosolen) overgedragen kunnen worden, achtte de COGEM het noodzakelijk om bij de werkzaamheden een aantal aanvullende voorschriften te hanteren.

3. Overweging en advies

Voor de milieurisicobeoordeling van de voorgeno men werkzaamheden zijn twee factoren van belang, namelijk de gebruikte virale vector, NDV LaSota, en het gebruikte insert, het S-gen van SARS-CoV-2. Hieronder zullen beide factoren verder worden toegelicht.

3.1 De virale vector NDV LaSota

De NDV uitgangsstam die de aanvrager voornemens is te gebruiken, is de lentogene avirulente LaSota stam. Deze stam kent een lange historie van veilig gebruik als levend vaccin bij pluimvee en is in verscheidene pre-klinische studies onderzocht voor toepassing als recombinante vaccinvector om mensen en dieren tegen pathogenen te vaccineren. In het verleden heeft de COGEM werkzaamheden met NDV vaccinstammen gebaseerd op LaSota ingeschaald op ML-II niveau.^{38,39}

In de gg-NDV-Spike virussen die geproduceerd zullen worden, zal het gehele of een gedeelte van het gen coderend voor het S-eiwit van SARS-CoV-2 geïnsereerd worden tussen de P- en M- genen van NDV. Voor deze specifieke gg-NDV-Spike virussen zijn nog geen experimentele data beschikbaar over de virulentie van deze virussen.

Insertie van (delen van) het S-gen zal de genomgrootte van NDV significant doen toenemen, wat naar verwachting zal resulteren in een ongunstig effect op de replicatie-efficiëntie. Bij vergelijkbare gg-vaccin virussen, zoals bijvoorbeeld NDV-vectoren die HN-eiwit van HPIV3 of het HA-eiwit van

influenza A virus tot expressie brengen, blijkt dat insertie leidt tot attenuatie.^{20,21} Om deze redenen acht de COGEM het waarschijnlijk dat de inserties van SARS-CoV-2 in NDV LaSota eveneens resulteren in attenuatie van de gg-virussen.

3.2 Het S-gen van SARS-CoV-2

De aanvrager verwacht dat bij een aantal constructen het S-eiwit (of een deel van het S-eiwit) in het membraan van de gg-NDV virusdeeltjes zal worden opgenomen. Bij het ontwerp van de gg-NDV-Spike virussen zijn mutaties aangebracht die leiden tot fixatie van het S-eiwit in de pre-fusie conformatie. Op grond van gegevens in de wetenschappelijke literatuur stelt de aanvrager dat deze mutaties geen effect hebben op de binding aan de ACE-2 receptor, maar er voor zorgen dat het S-eiwit niet meer in staat is om virus- en gastheermembraan met elkaar te laten fuseren.^{30,32,33} Aangezien membraanfusie essentieel is voor infectie, zal de incorporatie van het S-eiwit in het virusdeeltje niet leiden tot een veranderd weefsel of gastheertropisme van de gg-NDV-Spike virussen. Daarnaast geeft de aanvrager aan dat, mocht ACE-2 wel als receptor gebruikt kunnen worden, dit niet van invloed is op het tropisme van de gg-NDV-Spike virussen, aangezien het tropisme van NDV vanwege siaalzuren als receptor al erg breed is en cellen die ACE-2 tot expressie brengen eveneens siaalzuurreceptoren hebben.

Mede op basis van de beschikbare gegevens in de wetenschappelijke literatuur, is de COGEM is van oordeel dat de aangebrachte mutaties de fusie-activiteit van het S-eiwit van SARS-CoV-2 uitschakelen en dat aanhechting aan ACE-2 niet tot infectie van de gg-NDV-Spike virussen kan leiden. Door aanwezigheid van de 2P-mutatie en de modificatie van de furine-klievingssite zal expressie en eventuele incorporatie van het S-eiwit niet leiden tot een verhoging van het tropisme van de gg-NDV virussen.^{30,32,33,34}

Siaalzuren zijn aanwezig op het oppervlakte van alle celtypen van gewervelde dieren¹⁴; cellen die ACE-2 tot expressie zullen ook siaalzuren bevatten. Om deze reden is de COGEM van oordeel dat incorporatie van het S-eiwit in de gg-NDV virusmembraan niet tot verhoging van tropisme van de vector zal leiden, in het geval dat de fusie-activiteit van het S-eiwit door de mutaties niet volledig geïnactiveerd is.

Tot slot merkt de COGEM op dat er publicaties zijn die stellen dat de immuunrespons opgewekt tegen het S-eiwit na vaccinatie mogelijk kan leiden tot een verergerde pathologie bij een nieuwe infectie met een coronavirus.^{40,42} Hoewel het op dit moment nog onduidelijk is of dit daadwerkelijk het geval is⁴¹ en hoe relevant dit fenomeen is voor vaccinatie en infecties met SARS-CoV-2,⁴² is het theoretisch mogelijk dat de insertie van de S-sequenties de pathogeniteit van de NDV-vector vergroot. Dit is echter niet van invloed op het tropisme of de verspreiding van de ggo-virussen.

3.3 Conclusie en advies

Concluderend is de COGEM van oordeel dat insertie van de S-sequenties van SARS-COV-2 niet zal leiden tot tropismeverandering van de avirulente NDV LaSota uitgangsstam, en dat de inserties waarschijnlijk zullen resulteren in attenuatie van de gg-virussen. Alles in overweging nemende stemt de COGEM in met het uitvoeren van de voorgenomen werkzaamheden op ML-II inperkingsniveau, in

combinatie met de voorgestelde aanvullende maatregelen om verspreiding van aerosolen te voorkomen (het uitvoeren van open handelingen in een veiligheidskabinet klasse 2 (VK-2); het dragen van handschoenen tot over de mouw van de werkkleding; het tegengaan van verspreiding van aerosolen tijdens analyse in FACS-apparatuur).

Indien de werkzaamheden op het geadviseerde inperkingniveau worden uitgevoerd, in combinatie met de voorgestelde aanvullende maatregelen, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu, verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezoekt: 27 mei 2020)
2. World Organisation for Animal Health (OIE). OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2020. <https://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2020/> (bezoekt: 5 juni 2020)
3. Alexander DJ *et al.* (2012). The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathol.* 41: 329–335.
4. OIE-World Organisation for Animal Health. <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/animal-diseases/Newcastle-disease/> (bezoekt: 27 mei 2020)
5. Wageningen University & Research (WUR). Newcastle disease (pseudovogelpes). <https://www.wur.nl/nl/Onderzoek-Resultaten/Onderzoeksinstituten/Biovetinary-Research/Dierziekten/Virusziekten/Newcastle-disease-3.htm> (bezoekt: 28 mei 2020)
6. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. Chapter 1: Newcastle disease virology and epidemiology. <http://www.fao.org/3/y5162e/y5162e02.htm> (bezoekt: 28 mei 2020)
7. Lippmann O (1952). Human conjunctivitis due to the Newcastle-disease virus of fowls. *Am. J. Ophthalmol.* 35: 1021-1028
8. Nelson CB *et al.* (1952). An outbreak of conjunctivitis due to Newcastle disease virus (NDV) occurring in poultry workers. *Am. J. Public Health Nations Health* 42: 672-678
9. Alexander DJ (2000). Newcastle disease and other avian paramyxovirus. *Rev. Sci. Tech.* 19: 443-462
10. National Cancer Institute. Newcastle Disease Virus (PDQ®)–Health Professional Version. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/cam/hp/ndv-pdq> (bezoekt: 29 mei 2020)
11. Freeman AI *et al.* (2006). Phase I/II trial of intravenous ndv-huj oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Mol. Ther.* 13: 221-228
12. Peeters BP *et al.* (1999). Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: Evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J. Virol.* 73: 5001-5009
13. Ganar K *et al.* (2014). Newcastle disease virus: current status and our understanding. *Virus Res.* 184: 71-81
14. Varki A (2008). Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med.* 14: 351–360.
15. Bello MB *et al.* (2020). Exploring the prospects of engineered Newcastle disease virus in modern vaccinology. *Viruses* 12: 451

16. Goldhaft TM (1980). Historical note on the origin of the LaSota strain of Newcastle disease virus. 24: 297-301
17. Kim SH & Samal SK (2016). Newcastle disease virus as a vaccine vector for development of human and veterinary vaccines. *Viruses* 8: 183
18. DiNapoli JM (2007). Newcastle disease virus, a host range-restricted virus, as a vaccine vector for intranasal immunization against emerging pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 9788–9793.
19. Bukreyev A *et al.* (2007). Successful topical respiratory tract immunization of primates against Ebola virus. *J. Virol.* 81: 6379–6388.
20. Bukreyev A *et al.* (2005). Recombinant Newcastle disease virus expressing a foreign viral antigen is attenuated and highly immunogenic in primates. *J. Virol.* 79: 13275-133
21. DiNapoli, JM *et al.* (2007). Immunization of primates with a Newcastle disease virus-vectored vaccine via the respiratory tract induces a high titer of serum neutralizing antibodies against highly pathogenic avian influenza virus. *J. Virol.* 81: 11560–11568
22. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020). The species *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol.* 5: 536-544
23. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Situation update worldwide, as of 4 June 2020. <https://www.ecdc.europa.eu/en/geographical-distribution-2019-ncov-cases> (bezocht: 5 juni 2020)
24. European Centre for Disease Prevention and Control. Q&A on COVID-19. <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/questions-answers> (bezocht: 28 mei 2020)
25. World Health Organisation (WHO). Q&A on coronaviruses (COVID-19) <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/q-a-coronaviruses> (bezocht: 28 mei 2020)
26. Zhou P *et al.* (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273
27. Letko M *et al.* (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat. Microbiol.* 5, 562–569
28. Wan Y *et al.* (2020). Receptor recognition by novel coronavirus from Wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of SARS. *J. Virol.* 94: e00127-20
29. Letko M *et al.* (2020). Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat. Microbiol.* 5: 562-569
30. Walls AC *et al.* (2020). Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell* 181: 281-292.e6. doi:10.1016/j.cell.2020.02.058
31. Hamming I *et al.* (2004). Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J. Pathol.* 203: 631- 637
32. Pallesen J *et al.* (2017). Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, E7348–E7357
33. Kirchdoerfer RN *et al.* (2018). Stabilized coronavirus spikes are resistant to conformational changes induced by receptor recognition or proteolysis. *Sci. Rep.* 8, 15701.
34. Hoffmann M *et al.* (2020). A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 Is essential for infection of human lung cells. *Mol. Cell* 78: 779-784.e5

35. COGEM (2006). Classificatie van dierpathogene virussen – criteria en inperkingsmaatregelen voor pathogeniteitsklassen van dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/060420-04
36. COGEM (2019). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen (2019). COGEM advies CGM/190905-02
37. COGEM (2020). Pathogeniteitsclassificatie en inschaling van werkzaamheden met het nieuwe coronavirus 2019-nCoV uit Wuhan. COGEM advies CGM/200211-01
38. COGEM (2002). Genetische modificatie van enkel-strengs RNA virussen met behulp van infectieuze cDNA methodieken. COGEM advies CGM/020318-06
39. COGEM (2014). Uitwisseling van de oppervlakte eiwitten F en HN tussen aviaire paramyxovirussen. COGEM advies CGM/140404-01
40. Wan Y *et al.* (2020). Molecular mechanism for antibody-dependent enhancement of Coronavirus entry. *J. Virol.* 94:e02015-19
41. Francesco N (2020). Is antibody-dependent enhancement playing a role in COVID-19 pathogenesis? *Swiss Med. Wkly.* 150:w20249
42. De Alwis R *et al.* (2020). Impact of immune enhancement on Covid-19 polyclonal hyperimmune globulin therapy and vaccine development. *EBioMedicine* 55: 102768