

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

DATUM 06 juli 2020
KENMERK CGM/200706-01
ONDERWERP Advies inschaling *in vitro* werkzaamheden met chimeer rSARS-CoV-2-MHV-reporter virus

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 20-120_III-000 getiteld 'Recombinant SARS-CoV-2', ingediend door Janssen Vaccines & Prevention B.V. deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een chimeer coronavirus gebaseerd op SARS-CoV-2. De aanvrager is voornemens het zogenaamde 'spike' (S-) eiwit van SARS-CoV-2 uit te wisselen met het S-eiwit van *Murine coronavirus* (MHV). Het vervaardigen van het chimere virus is een tussenstap naar het maken van gg-SARS-CoV-2 virussen die reporter genen tot expressie brengen.

Het uitgangsvirus SARS-CoV-2 heeft de mens als gastheer en is de oorzaak van COVID-19. De gastheerspecificiteit van coronavirussen wordt in belangrijke mate bepaald door het S-eiwit. Door de uitwisseling van het SARS-CoV-2 S-eiwit met dat van MHV, verandert het gastheerbereik van het chimere virus naar verwachting van mens naar de muis. De COGEM is van oordeel dat de pathogeniteit en virulentie van het chimere coronavirus, door het ontbreken van het 'humane' S-eiwit, lager en zeker niet hoger, zal zijn voor de mens dan SARS-CoV-2. Door het aanwezige MHV S-eiwit is het mogelijk dat het chimere virus virulent(er) wordt voor muizen.

Alles in overweging nemende kan de COGEM instemmen met de door de aanvrager voorgestelde inschaling op ML-III van de voorgenomen werkzaamheden en de voorgestelde aanvullende voorschriften. De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op ML-III, onder navolging van de door de aanvrager voorgestelde voorschriften, 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 belangenverstrengeling is het COGEM lid prof. dr. R.C. Hoeben niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies

Inschaling *in vitro* werkzaamheden met chimeer rSARS-CoV-2-MHV-reporter virus

COGEM advies CGM/200706-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met chimeer SARS-CoV-2 virus (IG 20-120). De aanvrager, Janssen Vaccines & Prevention B.V., is voornemens middels twee verschillende ‘reverse genetics’ technieken genetisch gemodificeerde (gg-) SARS-CoV-2 virussen te construeren die reporter genen tot expressie brengen, ten behoeve van vaccinonderzoek en -ontwikkeling.

De adviesvraag aan de COGEM heeft betrekking op de activiteiten waarbij ‘targeted RNA recombination’ wordt toegepast, waarbij chimeer SARS-CoV-2 virus als tussenstap vervaardigd wordt. In het chimere virus is de coderende sequentie van het S-eiwit van SARS-CoV-2 uitgewisseld met de overeenkomende sequentie van *Murine coronavirus* (MHV); er worden meerdere mutanten gemaakt die verschillende reporter genen (o.a. mCherry, GFP, etc.) tot expressie brengen. De COGEM is door BGGO gevraagd te adviseren over de inschaling van de activiteiten met deze chimere rSARS-CoV-2-MHV-reporter virussen. De aanvrager verzoekt deze werkzaamheden op ML-III uit te mogen voeren.

Voor de andere ‘reverse genetics’ methode die de aanvrager voornemens is toe te passen om gg-SARS-CoV-2 virussen te vervaardigen, wordt gebruik gemaakt van *in vitro* assemblage van cDNA fragmenten van het genoom van SARS CoV-2. Hiervoor geldt dat de COGEM eerder (niet-chimere) gg-SARS-CoV-2 virussen die geproduceerd zijn met een vergelijkbare methode, heeft ingeschaald op inperkingsniveau ML-III.¹ Daarom maken deze werkzaamheden geen onderdeel uit van de adviesvraag aan de COGEM.

1.1 SARS-CoV-2

Sinds december 2019 is er een wereldwijde pandemie gaande met een nieuw coronavirus uit de species *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (genus *Betacoronavirus* en familie *Coronaviridae*), genaamd SARS-CoV-2.² SARS-CoV-2 infecties zijn ook onder meer bij honden, gedomesticeerde en grote katachtigen, en marterachtigen vastgesteld.³

De SARS-CoV-2 pandemie is in China begonnen, maar heeft zich snel op wereldwijde schaal verspreid, waarbij Europa ook zwaar getroffen is.⁴ Besmetting met SARS-CoV-2 kan bij de mens onder andere leiden tot koorts, respiratoire symptomen, longontsteking en neurologische symptomen, 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 ernstig verloop van de ziekte.⁵ Echter, vanwege onderrapportage van het totale aantal geïnfecteerde personen, moeten deze getallen met de nodige voorzichtigheid worden geïnterpreteerd.

Er is sprake van overdracht van SARS-CoV-2 van mens-op-mens. Het virus wordt voornamelijk overgedragen via respiratoire druppeltjes (‘respiratory droplets’) die ontstaan als een geïnfecteerd persoon hoest, niest of praat.^{5,6} Er is op dit moment geen vaccin of antivirale therapie voorhanden.

1.1.1 Genomische organisatie SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 bezit een enkelstrengs positief RNA genoom (~30 kb), waarop zich 11 ‘open reading frames’ (ORFs) bevinden. De organisatie van het genoom 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.⁷ 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), dat verantwoordelijk is 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.^{8,9,10}

1.2 Murine coronavirus

Het *Murine coronavirus* (murine hepatitis virus, MHV) veroorzaakt ziekte bij de muis. Het virus behoort binnen de familie *Coronaviridae*, net als SARS-CoV-2, tot het genus *Betacoronavirus*.¹¹ Er zijn in de loop der tijd verschillende MHV stammen geïsoleerd die anders dan de naam van deze soort doet vermoeden, niet allemaal hepatotroof zijn. Er zijn enterotrofe stammen, maar ook neurotrofe stammen die infecties van het centrale zenuwstelsel veroorzaken, en stammen die luchtweginfecties teweegbrengen.^{12,13} MHV dringt de gastheercel binnen door middel van celmembraanfusie die getriggerd wordt door de interactie van het S-eiwit met de cellulaire receptor ‘carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1’ (CEACAM1).¹³ Wanneer deze receptor ‘artificieel’ tot expressie wordt gebracht op het celoppervlak van hamster of humane fibroblasten, is infectie van deze niet-murine cellen door MHV mogelijk.¹⁴

1.3 Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens middels twee verschillende ‘reverse genetics’ technieken gg-SARS-CoV-2 virussen te vervaardigen die reportergenen tot expressie brengen. Het onderhavige advies heeft betrekking op de activiteiten waarbij ‘targeted RNA recombination’ wordt toegepast, waarbij chimeer SARS-CoV-2 virus (zogenaamde rSARS-CoV-2-MHV-reporter virussen) als tussenstap wordt vervaardigd. In het chimere virus is de coderende sequentie van het S-eiwit van SARS-CoV-2 uitgewisseld met de overeenkomende sequentie van MHV; er worden meerdere mutanten gemaakt die verschillende reporter genen (o.a. mCherry, GFP, etc.) tot expressie brengen.

Deze ‘targeted RNA recombination’ techniek maakt gebruik van het feit dat recombinatie bij coronavirussen vaak voorkomt.^{15,16} Dit treedt op als gevolg van ‘template switching’ van het virale RNA polymerase tijdens de RNA synthese. Om de recombinante SARS-CoV-2 reporter virussen te construeren wordt ‘host cell switching’ toegepast. Samengevat vindt allereerst homologe recombinatie plaats tussen donor RNA, dat het 3’ uiteinde van SARS-CoV-2 het genoom met daarin de coderende sequenties voor het MHV S-eiwit en een reporter gen bevat, en het genomisch RNA van SARS-CoV-2.

Hierdoor wordt de coderende sequentie voor het endogene S-eiwit van het coronavirus uitgewisseld voor een heterologe sequentie. Deze uitwisseling zorgt voor de vorming van een chimeer virus met naar verwachting een ander gastheertropisme (dit wordt in belangrijke mate bepaald door het S-eiwit). Vervolgens wordt een selectiestap uitgevoerd op cellen die gevoelig zijn voor het chimere virus. Het chimere virus wordt geoogst en fungeert daarna als ontvanger voor de tweede homologe recombinatiestap met een tweede donor RNA (die het 3' uiteinde van SARS-CoV-2 het genoom met daarin de coderende sequenties voor het SARS-CoV-2 S-eiwit (of varianten) en een reporter gen bevat). Tijdens deze stap worden de uiteindelijke mutanten gegenereerd.^{15,16} Stapsgewijs ziet dat er als volgt uit:

- Stap A: Infectie van (humane) cellen die humaan ACE-2 (hACE-2) en humaan 'transmembrane protease serine 2' (TMPRSS2) tot expressie brengen, met SARS-CoV-2 wildtype virus.
- Stap B: Transfectie van geïnfecteerde cellen van stap A met *in vitro* getranscribeerd RNA coderend voor heteroloog S eiwit van MHV en een reporter gen, gevolgd door het oogsten van chimeer rSARS-CoV-2-MHV-reporter virus.
- Stap C: Infectie van (murine) cellen die murine CEACAM1 (mCEACAM1) tot expressie brengen, met rSARS-CoV2-MHV-reporter om zodoende het chimere virus selectief te amplificeren, gevolgd door het oogsten van het chimere virus.
- Stap D: Infectie van (murine) cellen die mCEACAM1 tot expressie brengen, met infectieus chimeer rSARS-CoV-2-MHV-reporter virus.
- Stap E: Transfectie van geïnfecteerde (murine) cellen van stap D met *in vitro* getranscribeerd RNA coderend voor het S eiwit (of varianten) van SARS-CoV-2 en een reporter gen, gevolgd door het oogsten van rSARS-CoV-2-reporter virus.
- Stap F: Infectie van (humane) cellen die hACE-2 en hTMPRSS2 tot expressie brengen voor het selectief amplificeren van rSARS-CoV-2-reporter virus, gevolgd door oogsten van het recombinante virus.

2. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft *Murine coronavirus* ingedeeld als strikt dierpathogeen in pathogeniteitsklasse 2.¹⁷ Eerder dit jaar heeft de COGEM SARS-CoV-2 ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.¹ In dit advies heeft de COGEM ook geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met (niet-chimere) gg-SARS-CoV-2 virussen. In deze gg-SARS-CoV-2 virussen werden in de natuur voorkomende puntmutaties, deleties of inserties geïntroduceerd in het genoom, en verder werden 'tags' of reporter genen zoals GFP geïnsereerd in het virale genoom. De COGEM adviseerde werkzaamheden met deze gg-SARS-CoV-2 virussen op inperkingsniveau III uit te voeren, waarbij zij gezien de transmissieroute van het virus, het dragen van handschoenen tot over de mouwen van de werkkleding en het dragen van een mond- en neuskapje (P2 of hogere specificatie) en een veiligheidsbril, als aanvullende maatregelen noodzakelijk achtte.¹

In 2016 heeft de COGEM geadviseerd over de constructie en *in vitro* werkzaamheden met chimere murine coronavirussen.¹⁸ Met 'targeted RNA recombination' werden gg-coronavirussen gegenereerd die

gebaseerd waren op MHV (variant A59), waarin de coderende sequenties voor de S en HE eiwitten uitgewisseld waren met die van een humaan coronavirus (HCoV-OC43) of van het bovine coronavirus (BCoV) of een combinatie van beide. Tevens werden specifieke mutaties aangebracht in de S en HE genen, om van iedere chimeer verschillende varianten te maken.

De COGEM achtte het aannemelijk dat de uitwisseling van deze genen zou leiden tot verdere attenuatie van de uitgangsstam. Zij was van oordeel dat het gastheerbereik van de chimere murine virussen zou kunnen veranderen ten opzichte van het uitgangsvirus door de uitwisseling van de S en HE genen. De COGEM concludeerde dat de pathogeniteit van de chimere murine coronavirussen de pathogeniteitsklasse van de uitgangsvirussen niet zou overschrijden en dat er geen reden was 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 adviseerde om de voorgenomen *in vitro* werkzaamheden uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. Met het oog op mogelijke aërogene verspreiding van de virussen adviseerde zij daarbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren: het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden en het uitvoeren van open handelingen in een veiligheidskabinet klasse II.¹⁸

Verder heeft de COGEM in het verleden nog driemaal geadviseerd over werkzaamheden met chimere coronavirussen. In het eerste advies adviseerde de COGEM werkzaamheden met chimere MHV's en chimere Feline infectious peritonitis virussen (FIPV) in te schalen op ML-II inperkingsniveau.¹⁹ De chimeren werden gevormd door uitwisseling van sequenties van MHV stammen onderling of FIPV stammen onderling. 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 HCoV-229E en HCoV-NL63.²⁰ De COGEM adviseerde deze werkzaamheden op ML-III inperkingsniveau in te schalen. Het derde advies betrof werkzaamheden met chimeer *Infectious bronchitis virus* (IBV).²¹ In deze chimere coronavirussen werden regio's of gedeeltes van genen van verschillende IBV stammen met elkaar gecombineerd. De COGEM adviseerde de werkzaamheden met chimere IBV partikels, al dan niet in associatie met proefdieren, met in achtneming van aanvullende voorwaarden op inperkingsniveau II in te schalen.

3. Overweging en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met chimeer SARS-CoV-2 virus. Dit zogenaamde rSARS-CoV-2-MHV-reporter virus wordt als tussenstap vervaardigd tijdens de 'targeted RNA recombination' methode (zie §1.3) die de aanvrager voornemens is toe te passen, om gg-SARS-CoV-2 reporter virussen te genereren.

Het uitgangsvirus SARS-CoV-2 heeft de mens als gastheer (daarnaast zijn onder meer infecties bij honden, gedomesticeerde en grote katachtigen, en marterachtigen vastgesteld). MHV is een strikt dierpathogeen en veroorzaakt ziekte bij muizen. Het tropisme en de gastheerspecificiteit van coronavirussen wordt in belangrijke mate bepaald door het S-eiwit, dat aan de receptor van de gastheercel bindt. Door de uitwisseling van het S-eiwit van SARS-CoV-2 met het S-eiwit van MHV,

verandert het gastheerbereik van het chimere rSARS-CoV-2-MHV-reporter virus naar verwachting van humaan naar muis.

Het chimere virus kan door de expressie van het MHV S-eiwit gepropageerd worden in murine cellen. Door het ontbreken van het S-eiwit van SARS-CoV-2 zal het gg-virus geen humane cellen meer kunnen infecteren. De COGEM is van oordeel dat de pathogeniteit en virulentie van het chimere rSARS-CoV-2-MHV-S-reporter virus, door het ontbreken van het humane S-eiwit, lager en zeker niet hoger, zal zijn voor de mens dan SARS-CoV-2. Door het aanwezige MHV S-eiwit is het mogelijk dat het chimere virus virulent(er) wordt voor muizen.

De COGEM merkt op dat in de eerste stap van de recombinatie-procedure gebruik wordt gemaakt van wildtype SARS-CoV-2 virus en dat niet geheel uit te sluiten valt dat er tijdens de daaropvolgende stappen nog resterend SARS-CoV-2 virus aanwezig is. Het kan dan ook niet door de COGEM worden uitgesloten dat replicatie van eventueel resterend SARS-CoV-2 virus op humane cellen plaats zal vinden gedurende de werkzaamheden, of dat er zich ongewenste mutaties of recombinaties voordoen met onvoorziene effecten.

Alles in overweging nemende, en mede gezien de mogelijkheid dat naast chimeer gg-SARS-CoV-2-MHV-reporter virus ook wildtype SARS-CoV-2 aanwezig is tijdens de werkzaamheden, stemt de COGEM in met de door de aanvrager voorgestelde inschaling van de werkzaamheden op ML-III en de door de aanvrager voorgestelde aanvullende voorschriften:

- Het dragen van handschoenen tot over de mouwen van de werkkleding;
- Het dragen van een mond- en neuskapje (P2 of hogere specificatie) en een veiligheidsbril.

De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau ML-III, onder navolging van de door de aanvrager voorgestelde voorschriften, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. COGEM (2020). Pathogeniteitsclassificatie en inschaling van werkzaamheden met het nieuwe coronavirus 2019-nCoV uit Wuhan. COGEM advies CGM/200211-01
2. 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
3. World Organisation for Animal Health (OIE). Questions and Answers on the COVID-19. <https://www.oie.int/en/scientific-expertise/specific-information-and-recommendations/questions-and-answers-on-2019novel-coronavirus/> (bezoekt: 24 juni 2020)
4. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Situation update worldwide, as of 23 June 2020. <https://www.ecdc.europa.eu/en/geographical-distribution-2019-ncov-cases> (bezoekt: 23 juni 2020)
5. European Centre for Disease Prevention and Control. Q&A on COVID-19. <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/questions-answers> (bezoekt: 23 juni 2020)

6. World Health Organisation (WHO). Q&A on coronaviruses (COVID-19) <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/q-a-coronaviruses> (bezocht: 23 juni 2020)
7. Zhou P *et al.* (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273
8. 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
9. 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
10. 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
- 11 International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 24 juni 2020)
12. Bender SJ & Weiss SR (2010). Pathogenesis of murine coronavirus in the central nervous system. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 5: 336-354
13. Masters PS & Perlman S (2013). Chapter 28 *Coronaviridae*. In: *Fields Virology*, volume 1, sixth edition. Edited by Knipe DM *et al.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia
- 14 Dveksler GS *et al.* (1991). Cloning of the Mouse Hepatitis Virus (MHV) Receptor: Expression in Human and Hamster Cell Lines Confers Susceptibility to MHV. *J. Virol.* 65: 6881-6891
- 15 Masters PS & Rotter PJM (2005). Coronavirus Reverse Genetics by Targeted RNA Recombination. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 287: 133-159
16. De Haan CAM *et al.* (2007). Manipulation of the Coronavirus Genome Using Targeted RNA Recombination with Interspecies Chimeric Coronaviruses. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 454: SARS- and Other Coronaviruses, Ed. Cavanagh D.229, Humana Press, New York, NY
17. COGEM (2019). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen (2019). COGEM advies CGM/190905-02
18. COGEM (2016). Inschaling in vitro werkzaamheden met chimere coronavirussen. COGEM advies CGM/161025-02
19. COGEM (2001). Genetische modificatie van coronavirussen door middel van gerichte homologe RNA recombinatie. COGEM advies CGM/010724-02
20. COGEM (2009). Inschaling van werkzaamheden met recombinante humane coronavirussen. COGEM advies CGM/090227-03
21. COGEM (2012). Werkzaamheden met chimeer Infectious bronchitis virus. COGEM advies CGM/120104-01