

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

DATUM 01 maart 2021
KENMERK CGM/210301-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden 229E-SARS-CoV-2

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningsaanvraag IG 20-238_III-002 getiteld 'Productie van NL63-SARS-CoV-2 hybride coronavirussen als mogelijk vaccin tegen COVID 19', ingediend door de Stichting Biomedical Primate Research Centre, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met het chimere 229E-SARS-CoV-2 virus. Voor deze werkzaamheden zal in het *Human coronavirus 229E* minimaal één, en maximaal vier structurele genen uitgewisseld worden met die van SARS-CoV-2. De aanvrager is voornemens deze 229E-SARS-CoV-2 chimeren te produceren en te karakteriseren. De COGEM heeft eerder over een vergelijkbare vergunningaanvraag geadviseerd met chimere NL63-SARS-CoV-2 virussen. Zowel HCoV-229E als SARS-CoV-2 hebben de mens als gastheer. Waar HCoV-229E een voornamelijk zelflimiterend ziektebeeld geeft, kan infectie met SARS-CoV-2 een ernstiger ziekteverloop geven. De structurele genen van deze coronavirussen zijn mogelijk betrokken bij de pathogeniteit, virulentie en transmissie van de virussen. De COGEM is van oordeel dat de uitwisseling van de structurele genen van HCoV-229E met die van SARS-CoV-2 waarschijnlijk gepaard gaat met een verandering in tropisme. Er is echter geen reden om aan te nemen dat de virulentie of pathogeniteit van de chimere virussen hoger zal zijn dan die van SARS-CoV-2. De COGEM is van oordeel dat met inachtneming van de bij SARS-CoV-2 gehanteerde inperkingsmaatregelen bij werkzaamheden met de chimere 229E-SARS-CoV-2 virussen, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Alles in overweging nemende kan de COGEM instemmen met de door de aanvrager voorgestelde inschaling op ML-III van de voorgenomen werkzaamheden met inachtneming van 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

Inschaling van werkzaamheden met het chimere coronavirus 229E-SARS-CoV-2

COGEM advies CGM/210301-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een verzoek tot wijziging van een vergunning voor werkzaamheden met chimere NL63-SARS-CoV-2 virussen (IG 20-238), ingediend door het Biomedical Primate Research Centre. De COGEM heeft in 2020 geadviseerd over de eerdere vergunde werkzaamheden.¹ De wijziging betreft de inschaling van werkzaamheden met chimere 229E-SARS-CoV-2 virussen, die de aanvrager voornemens is te vervaardigen door één of meerdere structurele genen uit het *Human coronavirus 229E* (HCoV-229E) uit te wisselen met die van het Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Eender aan de voorgaande vergunning wordt hiervoor *in vitro* RNA geproduceerd van chimere DNA constructen, dat getransfecteerd wordt in verschillende cellijnen om infectieuze chimere virusdeeltjes te produceren. Vervolgens worden de chimere gg-229E-SARS-CoV-2 virusdeeltjes verder moleculair en biochemisch gekarakteriseerd. De aanvrager verzoekt deze werkzaamheden op ML-III (met enkele aanvullende voorschriften) uit te mogen voeren.

2. Coronavirussen

Coronavirussen (familie *Coronaviridae*) worden onderverdeeld in vier genera, *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* en *Deltacoronavirus*.² Gamma- en deltacoronavirussen infecteren voornamelijk vogels, en alpha- en betacoronavirussen kunnen verschillende zoogdiersoorten infecteren, waaronder de mens. Coronavirussen zijn normaal gesproken zeer soortspecifiek, 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'). Er zijn oorspronkelijk vier verschillende coronavirussen geïdentificeerd die mensen kunnen infecteren; HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, en HCoV-HKU1. In de laatste decennia zijn daar de drie (zoönotische) virussen, Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-CoV) en Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), en het huidige circulerende SARS-CoV-2 aan toegevoegd.³

2.1 *Human coronavirus 229E*

De virussoort *Human coronavirus 229E* (HCoV-229E) behoort tot het genus *Alphacoronavirus*.^{4,5} HCoV-229E veroorzaakt meestal milde, zelflimiterende infecties van de bovenste luchtwegen (verkoudheid) in mensen.⁶ Een HCoV-229E infectie kan in immuungecompromitteerden, ouderen en kinderen leiden tot een ernstige infectie van de lagere luchtwegen.^{7,8} Het virus herkent en bindt aan de gastheerreceptor aminopeptidase N (APN), die aanwezig is op het membraan van verschillende celtypen, waaronder epitheelcellen van de darmen, de longen en de nieren.⁹ Homologen van deze receptor in andere (dier)soorten kunnen gebruikt worden door coronavirussen serologisch verwant aan 229E-CoV, maar deze coronavirus-APN receptor interacties zijn vaak gastheer- en virusspecifiek. Zo kan HCoV-229E wel gebruik maken van de humane APN (hAPN), maar niet van die uit biggen (pAPN), en kunnen varkenscoronavirussen van pAPN gebruik maken, maar niet hAPN.¹⁰

2.2 SARS-CoV-2

Sinds december 2019 is er een pandemie gaande met een nieuw coronavirus uit de soort *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (genus *Betacoronavirus*), genaamd SARS-CoV-2.¹¹ SARS-CoV-2 infecties zijn ook onder meer bij honden, gedomesticeerde en grote katachtigen, en marterachtigen vastgesteld.¹²

De SARS-CoV-2 pandemie is in China begonnen, maar heeft zich snel op wereldwijde schaal verspreid, waarbij ook Europa en Noord- en Zuid-Amerika zwaar getroffen zijn.¹³ 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 tot 30% van de gediagnostiseerde COVID-19 gevallen opgenomen in het ziekenhuis en heeft tot 20% daarvan mechanische ventilatie nodig.^{14,15} 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.^{14,15} Onder bepaalde condities is verspreiding via aerosolen mogelijk, voornamelijk in ruimtes waar veel mensen aanwezig zijn en slechte ventilatie is.¹⁶

2.3 Genoomorganisatie coronavirussen

Coronavirussen bezitten een enkelstrengs positief RNA genoom dat omgeven is door een eiwitmantel en een membraan (envelop). Aan het 5' uiteinde van het genoom van coronavirussen bevinden zich twee grote, deels overlappende 'open reading frames' (ORFs, *Ia* en *Ib*). Deze 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 (waaronder ORF3 voor alphacoronavirussen).^{17,18} 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 gastheer, 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 gastheer cel kan binnendringen. SARS-CoV-2 gebruikt het 'angiotensin converting enzyme' (ACE)-2 als receptor, HCoV-229E gebruikt aminopeptidase N (APN) als receptor.^{9,18,19,20,21} Voor SARS-CoV-2 is daarnaast recent een co-receptor geïdentificeerd; neuropilin-1 (NRP1).^{22,23}

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens chimere 229E-SARS-CoV-2 coronavirussen te produceren en te karakteriseren die in een vervolgstudie getest zullen worden als vaccin tegen COVID-19. De 229E-SARS-CoV-2 chimeren zijn afgeleid van HCoV-229E, maar hierin zullen één of meerdere structurele genen (S-, E-, M-, en N-genen) van HCoV-229E uitgewisseld worden met die van SARS-CoV-2. De

niet-structurele genen *1a*, *1b* (die coderen voor de replicase eiwitten) en *4a* en *4b* (die coderen voor de accessoire eiwitten) van HCoV-229E zullen ongewijzigd blijven in de chimere virussen.

Hiervoor wordt *in vitro* RNA geproduceerd van chimere DNA constructen, dat getransfecteerd wordt in verschillende cellijnen om infectieuze chimere virussen te produceren. Aan het 5' uiteinde van het chimere DNA construct bevindt zich de T7 polymerase promotorsequentie, om RNA productie mogelijk te maken, en aan het 3' uiteinde wordt een polyA-staart geconstrueerd, gevolgd door de sequentie van het Hepatitis delta virus ribozym. Dit ribozym zorgt ervoor dat het afgeschreven RNA gelijk van lengte is waardoor de translatie effectiever verloopt, en daardoor de vorming van virusdeeltjes bevordert.

Alle mogelijke combinaties van de uitwisseling (minimaal één en maximaal alle vier de genen) kunnen in onderhavige aanvraag gecreëerd worden. Op verschillende locaties, namelijk tussen de ORF van het S-gen en ORF3, tussen ORF3 en het E-gen, tussen het E- en M-gen of tussen het M- en N-gen wordt per construct één marker gen (GFP, mCherry of nano luciferase) geïnsereerd.

De productie van de gg-virussen zal gevolgd worden met behulp van microscopie en de virusdeeltjes worden verder moleculair en biochemisch gekarakteriseerd. Hiervoor wordt gebruik gemaakt van 'fluorescence-activated cell sorting' (FACS Aria) dat is opgesteld in een VK-II op een ML-III laboratorium met een aerosol-managementsysteem. Ook worden kruisinfecties met andere cellijnen uitgevoerd om te onderzoeken of de geproduceerde chimere virussen andere cellijnen kunnen infecteren.

De aanvrager verzoekt de werkzaamheden op inperkingsniveau ML-III uit te voeren, waarbij de volgende aanvullende voorschriften gehanteerd zullen worden:

- a. Tijdens de werkzaamheden voor de productie van, en infectie met chimere coronavirussen zal beschermende kleding (Tyvec), dubbele handschoenen, laarzen en adembescherming (Proflow) gedragen worden in het ML-III lab, om accidentele infectie van personen met SARS-CoV-2-achtige virussen te voorkomen;
- b. Na de werkzaamheden wordt de adembescherming gedesinfecteerd met ethanol en deze blijft achter in de sluis, samen met de laarzen. Tyvecs en handschoenen worden als afval via de en suite doorgeefautoclaaf ontsmet en daarna als specifiek ziekenhuisafval afgevoerd (conform bijlage 9, artikel 9.1.1.4.2. r en s van de regeling ggo).

4. Eerder COGEM advies

SARS-CoV-2 is door de COGEM in pathogeniteitsklasse 3 ingedeeld.²⁴ *Human Coronavirus 229E* is door de COGEM geclassificeerd in pathogeniteitsklasse 2.²⁵

In december 2020 heeft de COGEM geadviseerd over de voorgaande aanvraag betreffende productie en infectiewerkzaamheden met NL63-SARS-CoV-2 chimeren. De COGEM achtte het niet uitgesloten dat de uitwisseling van structurele genen tussen HCoV-NL63 en SARS-CoV-2 gepaard kan gaan met een mogelijke verhoging of verlaging van de pathogeniteit, de virulentie of het verspreidingspotentieel van de chimere virussen ten opzichte van het uitgangsvirus (HCoV-NL63). Zij achtte het onwaarschijnlijk dat de geproduceerde chimere virussen pathogener of virulenter zijn dan SARS-CoV-2. Naar aanleiding van de maatregelen die de aanvrager wil hanteren merkte de COGEM op dat de Proflow adembescherming een nog betere bescherming biedt voor de medewerker dan eerder geadviseerde

aanvullende maatregelen bij andere vergunningaanvragen met gg-coronavirussen. De COGEM adviseerde derhalve de door de aanvrager voorgestelde maatregelen in de vergunning op te nemen. Alles in overweging nemende stemde de COGEM in met de door de aanvrager voorgestelde inschaling van de werkzaamheden op ML-III met inachtneming van de door de aanvrager voorgestelde aanvullende voorschriften.

5. Overweging en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met chimere 229E-SARS-CoV-2 virussen. De voorgenomen werkzaamheden zijn analoog aan de eerder vergunde werkzaamheden met NL63-SARS-CoV-2 chimeren¹, met als enige verschil dat de chimeren in onderhavige wijziging van de vergunning afgeleid zijn van HCoV-229E. De chimere virussen worden geproduceerd met behulp van *in vitro* transcriptie van chimere DNA-constructen. Het geproduceerde RNA wordt in verschillende cellijnen getransfecteerd om de chimere virussen te produceren. Onderdeel van de karakterisering zijn infectiewerkzaamheden, waarbij onderzocht wordt of de chimere virussen andere cellijnen kunnen infecteren, en flowcytometrie met een FACS Aria opgesteld in een VK-II en voorzien van een aerosol-managementsysteem. Hierdoor wordt tijdens de analyses een volledig gesloten systeem gecreëerd, zodat geen uitwisseling met de externe omgeving plaats kan vinden.

De mogelijke effecten van de uitwisseling van de structurele genen (S, E, M en N) op de pathogeniteit, virulentie en transmissie van de chimere virussen zijn nog onbekend. Deze vier structurele eiwitten spelen een belangrijke rol bij de assemblage en infectiviteit van de virusdeeltjes. Het tropisme en de gastheerspecificiteit van coronavirussen worden in belangrijke mate bepaald door het S-eiwit, dat aan de receptor van de gastheercel bindt. Zowel het uitgangsvirus HCoV-229E als het SARS-CoV-2 hebben de mens als gastheer, maar maken gebruik van een andere receptor voor infectie van gastheercellen. HCoV-229E maakt gebruik van de APN receptor en SARS-CoV-2 maakt gebruik van de ACE-2 receptor.^{9,20} Voor SARS-CoV-2 is recent een co-receptor geïdentificeerd (NRP1) en zijn daarnaast onder meer infecties bij honden, marterachtigen en gedomesticeerde en grote katachtigen vastgesteld.^{22,23} Het is niet bekend of HCoV-229E ook in andere soorten dan de mens voorkomt.

Door de uitwisseling van het S-eiwit van HCoV-229E met die van SARS-CoV-2 is het, gezien de verschillende receptorspecificiteit van HCoV-229E (APN) en SARS-CoV-2 (ACE-2), aannemelijk dat het tropisme zal veranderen. De COGEM merkt op dat zowel de APN receptor als de ACE-2 receptor in het menselijk lichaam algemeen voorkomend is.^{10,20} Tevens valt niet uit te sluiten dat de uitwisseling van de structurele genen tussen HCoV-229E en SARS-CoV-2 gepaard kan gaan met een mogelijke wijziging in transmissie- of infectieroute, of verhoging of verlaging van de pathogeniteit, de virulentie, of het verspreidingspotentieel van de chimere virussen ten opzichte van het uitgangsvirus (HCoV-229E). Er is echter geen reden om aan te nemen dat de virulentie of de pathogeniteit van de chimere virussen hoger zal zijn dan die van SARS-CoV-2. Wel dient te worden opgemerkt dat de immuniteit tegen SARS-CoV-2 die in de humane populatie bestaat door natuurlijke infectie of door vaccinatie, verminderd effectief kan zijn tegen deze chimere virussen.

De aanvrager is voornemens alle werkzaamheden in een VK-II uit te voeren in een ML-III laboratorium. Ook handelingen met de FACS Aria met aerosol-managementsysteem worden in een VK-II uitgevoerd, waarbij tijdens de analyses een volledig gesloten systeem is gecreëerd. Tijdens de werkzaamheden worden verschillende persoonsbeschermende maatregelen getroffen, namelijk het dragen van beschermende kleding (Tyvec), dubbele handschoenen, laarzen en Proflow adembescherming (een volgelaatsmasker met HEPA-gefilterde aanblaasunit).

Alles in overweging nemende stemt de COGEM in met de door de aanvrager voorgestelde inschaling van de werkzaamheden met 229E-SARS-CoV-2 chimere op ML-III met inachtneming van de door de aanvrager voorgestelde aanvullende voorschriften. 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). Inschaling van werkzaamheden met chimere NL63-SARS-CoV-2 coronavirussen. COGEM advies CGM/201216-01
2. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy: 2019 Release. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezoekt: 24 februari 2021)
3. Corman VM *et al.* (2018). Chapter eight: Hosts and sources of endemic human coronaviruses. *Advances in Virus Research* 100: 163-188
4. Fehr AR & Perlman S (2015) Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Coronav.* 1282: 1-23
5. Hamre D & Procknow JJ (1966) A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121: 190-193
6. Chan J F *et al.* (2012) Is the discovery of the novel human betacoronavirus 2c EMC/2012 (HCoV-EMC) the beginning of another SARS-like pandemic? *J. Infect.* 65: 477-489
7. Ding X *et al.* (2020). Human Coronavirus-229E, -OC43, -NL63- and -HKU1. *Ref. Mod. Life Sc.* <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21501-X>.
8. Gaunt E. R. *et al.* (2010) Epidemiology and clinical presentations of the four Human coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR method. *J. Clin. Microbiol.* 48: 2940-2947
9. Yeager C. L. *et al.* (1992) Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* 357: 420-422
10. Wentworth DE & Holmes K V (2001). Molecular determinants of species specificity in the Coronavirus Receptor aminopeptidase N (CD13): Influence of N-linked glycosylation. *J. Virol.* 75: 9741-9752
11. 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

12. World Organisation for Animal Health (OIE). Questions and Answers on the COVID-19. <https://www.oie.int/scientific-expertise/specific-information-and-recommendations/questions-and-answers-on-2019-novel-coronavirus/> (bezocht: 24 februari 2021)
13. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). COVID-19 situation update worldwide, as of 18 February 2021. <https://www.ecdc.europa.eu/en/geographical-distribution-2019-ncov-cases> (bezocht: 24 februari 2021)
14. European Centre for Disease Prevention and Control. Q&A on COVID-19: Basic facts <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/facts/questions-answers-basic-facts> (bezocht: 24 februari 2021)
15. World Health Organisation (WHO). Q&A on COVID-19 and related health topics <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub> (bezocht: 24 februari 2021)
16. World Health Organisation (WHO). Coronavirus disease (COVID-19): How is it transmitted? <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/coronavirus-disease-covid-19-how-is-it-transmitted> (bezocht: 24 februari 2021)
17. Zhou P *et al.* (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579: 270–273
18. ICTV 9th Report (2009). Coronaviridae. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae (bezocht: 24 februari 2021)
19. 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
20. 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
21. 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
22. Cantuti-Castelvetri L *et al.* (2020). Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science* 370: 856-860
23. Daly JL *et al.* (2020). Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science* 370: 861-865
24. COGEM (2020). Pathogeniteitsclassificatie en inschaling van werkzaamheden met het nieuwe coronavirus 2019-nCoV uit Wuhan. COGEM advies CGM/200211-01
25. COGEM (2019). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene DNA en RNA virussen (2019). COGEM advies CGM/190905-02