

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. B. Visser
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 14 oktober 2021
KENMERK CGM/211014-01
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden met chimeer SARS-CoV-2-MHV-S

Geachte mevrouw Visser,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningsaanvraag IG 21-134_2.8-000 getiteld 'Handelingen met recombinant SARS-CoV-2', ingediend door de Universiteit Utrecht, 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 een coronavirus uit muizen (*Murine coronavirus*; MHV). De aanvrager is voornemens deze genetisch gemodificeerde (gg-) virussen te gebruiken om op veilige wijze de replicatie van SARS-CoV-2 te bestuderen.

Het uitgangsvirus SARS-CoV-2 heeft de mens als gastheer. MHV is een strikt dierpathogeen en heeft de muis als gastheer. Op basis van de beschikbare literatuur over coronavirussen, acht de COGEM het aannemelijk dat het uitwisselen van het SARS-CoV-2 S-gen met het S-gen van MHV, tot gevolg heeft dat het chimere SARS-CoV-2-MHV-S virus niet meer in staat is om menselijke cellen te infecteren, maar alleen muizencellen kan infecteren.

De COGEM is van oordeel dat het risico op reversie van het chimere SARS-CoV-2-MHV-S virus naar varianten die mensen kunnen infecteren, met inachtneming van aanvullende maatregelen, verwaarloosbaar klein is.

Alles in overweging nemende, adviseert de COGEM de voorgestelde werkzaamheden op MLII uit te voeren onder een aantal aanvullende voorwaarden, en is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen werkzaamheden 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. - Drs. Y. de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
 DG Milieu en Internationaal

Inschaling van werkzaamheden met chimeer SARS-CoV-2-MHV-S

COGEM advies CGM/211014-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag van de Universiteit Utrecht over werkzaamheden met chimeer genetisch gemodificeerd (gg-) SARS-CoV-2-MHV-S virus (IG 21-134). De aanvrager is voornemens geproduceerde of verkregen gg-SARS-CoV-2 te gebruiken, waarbij het autologe S-gen is vervangen door het S-gen van *Murine coronavirus* (MHV). In dit chimere virus kunnen daarnaast ook reportergenen aanwezig zijn in de niet-essentiële ‘open reading frames’ (ORFs, in ORF3a en ORF6). Het doel van de werkzaamheden omvat het vermeerderen van het chimere SARS-CoV-2-MHV-S voor het maken van werkstocks, het bestuderen van de replicatie van het chimere SARS-CoV-2-MHV-S virus, en het screenen van antivirale middelen en het bestuderen van hun werking. De aanvrager verzoekt deze werkzaamheden met chimeer SARS-CoV-2-MHV-S op inperkingsniveau ML-II uit te mogen voeren.

2. Coronavirussen

Coronavirussen (familie *Coronaviridae*) worden onderverdeeld in vier genera, *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* en *Deltacoronavirus*.¹ Gamma- en deltacoronavirussen infecteren voornamelijk vogels, terwijl alpha- en betacoronavirussen verschillende zoogdiersoorten kunnen 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), Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), en het huidige circulerende SARS-CoV-2 aan toegevoegd.²

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 leesramen: ORF1a en 1b. Deze beslaan ongeveer twee derde van het genoom en coderen voor de replicase-polyproteïnen die onder meer een rol spelen bij RNA-replicatie. De andere ORFs aan het 3’ uiteinde coderen voor de structurele eiwitten S (‘spike’), E (‘envelope’), M (‘membrane’) en N (‘nucleocapsid’) en de zogenoemde ‘accessory’ eiwitten.^{3,4} 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.

2.1 Murine coronavirus (MHV)

Het *Murine coronavirus* (murine hepatitis virus, MHV) veroorzaakt ziekte bij de muis. Het virus behoort binnen de familie *Coronaviridae* tot het genus *Betacoronavirus*, net als SARS-CoV-2.⁵ Er zijn in de loop der tijd verschillende MHV-stammen geïsoleerd die anders dan de naam van het virus doet vermoeden, niet allemaal de lever aantasten. Er zijn stammen die het darmstelsel aantasten, maar ook neurotrofe stammen die infecties van het centrale zenuwstelsel veroorzaken, en stammen die luchtweginfecties teweegbrengen.^{6,7} 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 1a’ (CEACAM1a).⁷ 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.⁸

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-2.⁹ SARS-CoV-2 infecties zijn ook onder meer bij honden, gedomesticeerde en wilde katachtigen, en marterachtigen vastgesteld.¹⁰

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.¹¹ 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 coronavirus disease 2019 (COVID-19) genoemd. Op basis van de huidige gegevens behoort tot 30% van de gediagnostiseerde COVID-19 gevallen die in het ziekenhuis zijn opgenomen tot de oudere populatie, en heeft tot 20% van deze oudere, opgenomen groep mechanische ventilatie nodig.^{12,13} De kans op ziekenhuisopname of ernstige ziekte is onder jongere patiënten significant kleiner als er geen sprake is van onderliggende medische aandoeningen.

Er is sprake van overdracht van SARS-CoV-2 van mens-op-mens of van mens-op-dier. Het virus wordt voornamelijk overgedragen via respiratoire druppeltjes (‘respiratory droplets’) die ontstaan als een geïnfecteerd persoon hoest, niest of praat.^{12,13} Onder bepaalde condities is verspreiding via aerosolen mogelijk, voornamelijk in ruimtes waar veel mensen aanwezig zijn en slechte ventilatie is.¹⁴ Er zijn meerdere vaccins beschikbaar. SARS-CoV-2 gebruikt het ‘angiotensin convertend enzyme’ (ACE)-2 als receptor, waar het S-eiwit aan hecht.^{15,16,17} Voor SARS-CoV-2 is daarnaast een co-receptor geïdentificeerd; neuropilin-1 (NRP1).^{18,19}

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens met behulp van chimere SARS-CoV-2-MHV-S coronavirussen de replicatie van het SARS-CoV-2 virus op een veilige wijze te bestuderen, voor o.a. het screenen van antivirale middelen die op het replicatiemechanisme en/of andere processen aangrijpen.

In het chimere SARS-CoV-2-MHV-S coronavirus wordt het autologe S-gen van SARS-CoV-2 vervangen door het S-gen van MHV stam A59. Daarnaast is de aanvrager voornemens gebruik te maken van SARS-CoV-2-MHV-S waarin één van de accessoire genen ORF3a of ORF6 is vervangen door een reporter-gen (coderend voor bijvoorbeeld ‘Green Fluorescent Protein’ (GFP) of luciferase).

De aanvrager is voornemens de hierboven beschreven rSARS-CoV-2-MHV-S virussen te gebruiken om HeLa-CEACAM1a cellen te infecteren. Deze cellijn brengt na transfectie met een op pQCXIN gebaseerde plasmide²⁰ de muizenreceptor CEACAM1a tot expressie. De aanvrager geeft aan dat de humane cellijnen niet gebruikt zullen worden voor virusvermeerdering of seriële passage van het virus. Vermeerdering van het virus om werkstocks te genereren, zal plaatsvinden in LR7 muizencellen, waarbij infectie plaatsvindt via de MHV receptor CEACAM1a.

De aanvrager verzoekt de werkzaamheden met de chimere SARS-CoV-2-MHV-S virussen uit te voeren op inperkingsniveau ML-II, waarbij de volgende aanvullende voorschriften gehanteerd zullen worden:

- a. Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen
- b. Open handelingen worden uitgevoerd in een biologisch veiligheidskabinet klasse II

Tevens is de COGEM in onderhavige adviesvraag gevraagd of zij de aanvullende maatregelen noodzakelijk acht:

- c. Het te gebruiken gastheermateriaal is vrij van SARS-CoV-2 en andere verwante virussen
- d. Seriële passages met genetisch gemodificeerde rSARS-CoV-2-MHV-S(-reporter) virussen zijn niet toegestaan.

De aanvrager geeft aan dat de chimere SARS-CoV-2-MHV-S coronavirussen van externe partijen worden verkregen, of zelf worden vervaardigd door middel van ‘targeted recombination’ via homologe RNA recombinatie^{21,22,23} of een ‘reverse genetics’ technologie gebaseerd op recombinatie van cDNA kopieën in de gist *Saccharomyces cerevisiae*.²⁴ Het (zelf) vervaardigen van het chimere coronavirus is geen onderdeel van onderhavige vergunningaanvraag, maar wordt hierin wel beschreven.

Bij de ‘targeted recombination’ methode worden met wildtype SARS-CoV-2 geïnfecteerde cellen, getransfecteerd met een synthetisch, niet replicerend RNA dat de 3’ sequenties vanaf het 3’ einde van ORF1b tot aan de poly(A)staart van SARS-CoV-2 bevat, maar waarin het autologe S gen is vervangen door het S gen van MHV stam A59. De gewenste recombinante virussen worden vervolgens geselecteerd op LR7 (muizen) cellen, plaque gezuiverd en genetisch gekarakteriseerd. Het vervaardigen van de recombinante coronavirussen door middel van ‘reverse genetics technologie’ vindt plaats door meerdere subgenomische cDNA fragmenten in de gist *Saccharomyces cerevisiae* te brengen, waarna door recombinatie een volledige cDNA kopie van het recombinante virale genoom wordt geassembleerd. Deze cDNA kopie onder de controle van de T7-promoter kan gebruikt worden om infectieus RNA van het gewenste chimere SARS-CoV-2-MHV-S coronavirus te transcriberen.

De aanvrager geeft aan dat, indien er volledige cDNA kopieën van de recombinante virussen worden vervaardigd door een externe partij, uit veiligheidsoverwegingen de RNA transcriptie in het laboratorium van de aanvrager zelf zal plaatsvinden.

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft *Murine coronavirus* (murine hepatitis virus, MHV) ingedeeld als strikt dierpathogeen in pathogeniteitsklasse 2²⁵ en SARS-CoV-2 ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.²⁶ De COGEM heeft in 2020 over deels vergelijkbare activiteiten van Janssen Vaccines & Prevention geadviseerd²⁷, waarbij de aanvrager voornemens was om chimeer rSARS-CoV-2-MHV-reporter virus te vervaardigen, als tussenstap om reportervirussen van SARS-CoV-2 te vervaardigen. De COGEM adviseerde de werkzaamheden conform de aanvraag op inperkingsniveau ML-III uit te voeren, met als aanvullende maatregelen: het dragen van handschoenen tot over de mouwen van de werkkleding en een mond- en neuskapje (P2 of hogere specificatie) en een veiligheidsbril.

5. Overweging en advies

Het uitgangsvirus SARS-CoV-2 heeft de mens als gastheer, maar kan o.a. ook honden, gedomesticeerde en grote katachtigen, en marterachtigen infecteren.²⁸ MHV is strikt dierpathogeen en heeft de muis als gastheer. De gastheerspecificiteit en het tropisme van coronavirussen wordt grotendeels bepaald door het S-eiwit, dat aan een specifieke receptor van de gastheercel bindt. De S-eiwitten van SARS-CoV-2 en MHV binden elk aan andere gastheerreceptoren (respectievelijk ACE-2 en CEACAM1a). Door de aanvrager wordt verondersteld dat uitwisseling van het SARS-CoV-2 S-eiwit met het S-eiwit van MHV stam A59, tot gevolg zal hebben dat infectie van humane cellen met rSARS-CoV-2-MHV-S niet meer mogelijk is, en het gastheerbereik van dit chimere coronavirus verandert van humaan naar muis. De COGEM acht dit voldoende aannemelijk en is van oordeel dat de kans dat dat rSARS-CoV-2-MHV-S humane cellen kan infecteren, verwaarloosbaar klein is.

De aanvrager stelt dat vermeerdering van rSARS-CoV-2-MHV-S voor het produceren van werkstocks in LR7 muizencellen zal plaatsvinden. Verder stelt de aanvrager dat infectie van de cellen zal plaatsvinden via de CEACAM1a receptor, en dat alleen chimeer rSARS-CoV-2-MHV-S de cellen kunnen infecteren en zich daar in vermeerderen. Op basis van de beschikbare literatuur over coronavirussen, acht de COGEM het aannemelijk dat alleen het recombinante SARS-CoV-2-MHV-S LR7 cellen kan infecteren en in deze cellen kan repliceren.

Tevens merkt de COGEM op dat de (N)501Y mutatie in het S-gen van SARS-CoV-2, aanwezig in de varianten B.1.1.7, 501Y.V1 (Alfa-variant), B.1.351, 501Y.V2 (Beta-variant) en P.1, 501Y.V3 (Delta-variant), tot gevolg heeft dat muizencellen mogelijk via de murine ACE2 (mACE2) receptor door SARS-CoV-2 geïnfecteerd kunnen worden.^{29,30} De COGEM beschikt niet over de gegevens om vast te stellen of de LR7 cellen, die in het geval van 'targeted recombination' gebruikt zullen worden om het geproduceerde rSARS-CoV-2-MHV-S te scheiden van wildtype SARS-CoV-2 en om werkstocks van het recombinante virus te genereren, de mACE2 receptor tot expressie brengen.

De COGEM wijst erop dat, om uit te sluiten dat wildtype SARS-CoV-2 resteert in de experimenten, de aanvrager of de externe partij bij het genereren van rSARS-CoV-2-MHV-S via 'targeted recombination', geen gebruik dient te maken van SARS-CoV-2 stammen die de 501Y mutatie bevatten.

Indien de aanvrager SARS-CoV-2 stammen die de 501Y mutatie bevatten wenst te gebruiken voor de ‘targeted recombination’, dient de aanvrager gegevens te overleggen waaruit blijkt dat LR7 cellen niet geïnfecteerd kunnen worden door SARS-CoV-2 varianten met deze mutatie.

Uit de literatuur blijkt verder dat mutaties kunnen optreden in het S-gen van MHV die het risico met zich meebrengen dat het gastheerbereik van het virus wordt vergroot wanneer cellen langdurig met MHV geïnfecteerd zijn.³¹ Om te voorkomen dat er adaptaties optreden in het S-gen van rSARS-CoV-2-MHV-S die mogelijk tot verandering van gastheerbereik leiden, adviseert de COGEM om het creëren en aanhouden van persistent geïnfecteerde cellijnen (waaronder ook LR7) niet toe te staan.

De aanvrager is tevens voornemens infectie-experimenten in HeLA-mCEACAM1a cellen uit te voeren met (het eerder in LR7 cellen vermeerderde) rSARS-CoV-2-MHV-S. De aanvrager stelt dat deze werkzaamheden eindpunt-experimenten betreffen en dat er geen seriële passage van het chimere virus op deze humane cellen zal plaatsvinden. Onder deze voorwaarden is de COGEM van oordeel dat het risico op reversie van rSARS-CoV-2-MHV-S naar humane gg-SARS-CoV-2 varianten verwaarloosbaar klein is.

Alles in overweging nemende, adviseert de COGEM de door de aanvrager voorgestelde werkzaamheden in te schalen op inperkingsniveau ML-II, met inachtneming van de volgende aanvullende voorschriften:

- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouwen van de werkkleding gedragen;
- Open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse-II te worden uitgevoerd;
- Het te gebruiken gastheermateriaal is vrij van SARS-CoV-2 en andere verwante virussen;
- Er zijn geen plasmides of RNA transcripten aanwezig in de gebruikte gastheercellen die coderen voor humane coronavirus S-genen;
- Indien gewerkt wordt met chimeer rSARS-CoV-2-MHV-S(-reporter) virussen geproduceerd via ‘targeted recombination’, is in het gebruikte wildtype SARS-CoV-2 de (N)501Y mutatie afwezig;
- Seriële passages met de rSARS-CoV-2-MHV-S(-reporter) virussen in cellijnen is niet toegestaan;
- Het creëren en aanhouden van persistent geïnfecteerde cellijnen met rSARS-CoV-2-MHV-S is niet toegestaan.

De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau ML-II, onder navolging van de hierboven genoemde aanvullende voorschriften, de risico’s voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

6. Signalerende opmerking

De COGEM merkt op dat bij het vervaardigen van rSARS-CoV-MHV-S door middel van ‘targeted recombination’ gebruik gemaakt wordt van wildtype SARS-CoV-2. Deze werkzaamheden worden om deze reden uitgevoerd op inperkingsniveau ML-III (zie ook vergunning IG 20-120_III-000)³². De COGEM signaleert dat de aanvrager dient uit te sluiten dat er uitsleep van wildtype SARS-CoV-2, of

andere op ML-III aanwezige pathogenen, bij transport van het geproduceerde rSARS-CoV-MHV-S virus van ML-III naar inperkingsniveau ML-II zal plaatsvinden.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy: 2019 Release. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 24 februari 2021)
2. Corman VM *et al.* (2018). Chapter eight: Hosts and sources of endemic human coronaviruses. *Advances in Virus Res.* 100: 163-188
3. Zhou P *et al.* (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579: 270–273
4. 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)
5. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 24 juni 2020)
6. Bender SJ & Weiss SR (2010). Pathogenesis of murine coronavirus in the central nervous system. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 5: 336-354
7. 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
8. 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
9. 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
10. World Organisation for Animal Health (OIE). Situation report #4 on SARS-CoV-2 and animals (31/08/2021). <https://www.oie.int/app/uploads/2021/09/sars-cov-2-situation-report-4.pdf> (bezocht: 5 oktober)
11. 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: 5 oktober 2021)
12. 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: 5 oktober 2021)
13. 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: 5 oktober 2021)
14. 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: 5 oktober 2021)
15. 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
16. 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

17. Walls AC *et al.* (2020). Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. Cell