

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 8 maart 2023
KENMERK CGM/230308-02
ONDERWERP Advies werkzaamheden geattenuerd gg-SARS-CoV-2 OTS-228

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende dossier IG 23-022_2.8-000 getiteld 'Production of genetically modified coronavirus' afkomstig van Batavia Biosciences B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van infectie- en productiewerkzaamheden met een verzwakt genetisch gemodificeerd (gg-) SARS-CoV-2 virus genaamd OTS-228. OTS-228 is gebaseerd op de Wuhan stam en bevat meerdere mutaties en deleties in het virusgenoom. Er zijn in een groot deel van het genoom veranderingen aangebracht die tot gevolg kunnen hebben dat er verkorte, niet werkende eiwitten worden geproduceerd. Daarnaast zijn er mutaties en deleties aangebracht die betrokken zijn bij o.a. het binnendringen van de gastheercel en de antivirale afweer van de gastheer. Experimenten in cellen en knaagdieren tonen aan dat variant OTS-228 verzwakt is ten opzichte van wildtype SARS-CoV-2, en geen ziektesymptomen veroorzaakt. Ook de verspreiding van OTS-228 tussen hamsters was verminderd. Na herhaaldelijke passages in cellen blijft OTS-228 verzwakt en blijven de mutaties aanwezig.

De COGEM is van oordeel dat de experimentele gegevens voldoende aantonen dat OTS-228 een verzwakt gg-SARS-CoV-2 virus is. Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat het risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein is wanneer de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau ML-II worden uitgevoerd, waarbij additionele aanvullende voorschriften in acht moeten worden genomen.



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 infectie en productiewerkzaamheden met geattenuëerd gg-SARS-CoV-2 virus OTS-228

COGEM advies CGM/230308-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van infectie- en productiewerkzaamheden met geattenuëerd genetisch gemodificeerd (gg-) SARS-CoV-2 virus genaamd OTS-228 (IG 23-022). De aanvraag is afkomstig van Batavia Biosciences. SARS-CoV-2 variant OTS-228 is gebaseerd op de Wuhan stam en bevat verscheidene mutaties en deleties. De aanvrager stelt dat variant OTS-228 verzwakt is en verzoekt om de onderhavige werkzaamheden te laten plaats vinden op inperkingsniveau ML-II, waarbij aanvullende maatregelen in acht zullen worden genomen.

2. SARS-CoV-2

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.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-2.³ SARS-CoV-2 infecties zijn ook bij onder meer honden, gedomesticeerde en wilde katachtigen, marterachtigen en tweehoevigen vastgesteld.^{4,5} Er is voornamelijk sprake van overdracht van SARS-CoV-2 van mens-op-mens of van mens-op-dier. Het virus wordt primair overgedragen via respiratoire druppeltjes ('respiratory droplets') die ontstaan als een geïnfecteerd persoon hoest, niest of praat.^{6,7} Onder bepaalde condities is verspreiding via aerosolen mogelijk, voornamelijk in ruimtes waar veel mensen aanwezig zijn en slechte ventilatie is.⁸ Er zijn inmiddels meerdere vaccins beschikbaar die gedeeltelijk bescherming bieden tegen infectie en ziekte.

2.1 Het genoom van coronavirussen en infectie van gastheercellen

Coronavirussen bezitten een enkelstrengs positief RNA-genoom dat is omsloten door een eiwitmantel, bestaande uit nucleocapside-eiwitten (N). Het genoom en de eiwitmantel zijn omgeven door een lipidenmembraan met daarin de structurele eiwitten S ('spike'), E ('envelope') en M ('membrane'). Aan het 5' uiteinde van het genoom van coronavirussen bevinden zich twee grote, deels overlappende openleesramen: ORF1a en 1b. Deze beslaan ongeveer twee derde van het genoom en coderen voor een replicase-polyproteïne dat zichzelf opknipt in 16 niet-structurele eiwitten (nsp1 t/m nsp16) die onder meer een rol spelen bij RNA-replicatie.² De andere ORFs aan het 3' uiteinde coderen voor de structurele eiwitten (S, E, M, en N) en acht zogenoemde 'accessory' of accessoire eiwitten.^{2,9} De accessoire eiwitten ORF6 en ORF8 van SARS-CoV-2 onderdrukken de antivirale respons van de gastheer, ORF6 bevordert indirect de virale replicatie.^{10,11,12,13} Upstream van de ORFs die coderen voor de structurele en accessoire eiwitten zitten zogeheten 'transcription regulatory sequences' (TRS). Dit zijn korte sequenties die betrokken zijn bij 'template switching', het proces waarbij de mRNA-moleculen worden gevormd voor de expressie van de structurele en accessoire eiwitten.¹⁴

Om cellen te infecteren gebruikt SARS-CoV-2 het ‘angiotensin converting enzyme’ (ACE)-2 van de gastheercel als receptor, waar het virale S-eiwit aan hecht.^{15,16,17} Op het oppervlak van bepaalde cellen bevindt zich ook het ‘transmembrane protease, serine 2’ (TMPRSS2) dat het S-eiwit knipt, waardoor uiteindelijk membraanfusie plaatsvindt en het virale RNA-genoom in het cytoplasma van de gastheercel terecht komt.¹⁸ In afwezigheid van TMPRSS2 is het protease cathepsin L van de gastheercel betrokken bij de membraanfusie.¹⁸

3. SARS-CoV-2 variant OTS-228

De gg-SARS-CoV-2 variant OTS-228 is gebaseerd op de Wuhan SARS-CoV-2 stam, waarin verscheidene mutaties en deleties zijn aangebracht. In ORF1ab van het genoom zijn ‘one to stop’ (OTS) codons geïntroduceerd. Hierbij worden serine- en leucinecodons, die twee nucleotidewijzigingen vereisen voordat ze veranderen in een stopcodon, zodanig gewijzigd dat één nucleotide mutatie voldoende is voor het genereren van een stopcodon.¹⁹ Afhankelijk van de foutfrequentie van het virale RNA polymerase, resulteert introductie van OTS codons in een toegenomen kans op het genereren van stopcodons in ORF1ab tijdens virusrePLICATIE.

In aanvulling op de OTS codons zijn er in variant OTS-228 mutaties aangebracht in nsp1 en zijn *ORFS 6, 7a, 7b* en 8 (welke coderen voor accessoire eiwitten) uit het genoom van OTS-228 verwijderd. Tevens is het ‘furin cleavage site’ (FCS) uit het Spike eiwit verwijderd. OTS-228 is vervaardigd door middel van een ‘transformation-associated recombination’ (TAR) systeem in *Saccharomyces cerevisiae*.²⁰

3.1 Attenuatie van OTS-228

Om de karakteristieken en pathogeniteit van OTS-228 te onderzoeken, heeft de aanvrager verscheidene *in vitro* en *in vivo* experimenten uitgevoerd. De groeikarakteristieken van OTS-228 en wildtype SARS-CoV-2 waren in celkweek vergelijkbaar. Om de stabiliteit van de mutaties in OTS-228 te onderzoeken, heeft de aanvrager het virus 15 keer gepasseerd in Vero-E6 cellen en de genoomsequentie door middel van sequentieanalyse bepaald. Na 15 keer passeren waren geen van de geïntroduceerde OTS codons gereverteerd naar de wildtype sequentie en werden er geen veranderingen in de gemuteerde nsp1 sequenties of verwijderde regio’s waargenomen.

Om de attenuatie van OTS *in vivo* vast te stellen zijn er verscheidene experimenten uitgevoerd met K18-hACE-2 transgene muizen, die het humane ACE-2 tot expressie brengen door middel van de cytokeratin 18 promotor, en met Syrische goudhamsters. Beide diermodellen worden gebruikt in onderzoek naar de pathogeniteit en infectiviteit van SARS-CoV-2.^{21,22,23} Een voorloperstam die genetisch identiek is aan OTS-228, maar wel het FCS bevat, was bij een intranasaal toegediende dosis van 5000 ‘plaque forming units’ (PFU) in de K18-hACE-2 muizen geattenuëerd ten opzichte van de wildtype SARS-CoV-2. De voorloperstam veroorzaakte geen ziekteverschijnselen geassocieerd met COVID-19, en bood bescherming tegen een challenge met wildtype SARS-CoV-2. Intranasale infectie van de muizen met OTS-228 bij een dosis van 10⁴ of 10⁵ TCID₅₀ per muis leidde, met uitzondering van één muis met de hoge dosis, tevens niet tot ziekteverschijnselen geassocieerd met een SARS-CoV-2 infectie. De muis die wel ziekteverschijnselen vertoonde ontwikkelde o.a. encefalitis, maar er konden geen virale partikels

uit de longen of neus worden geïsoleerd. De aanvrager stelt dat de herseninfectie van OTS-228 een gevolg is van de kunstmatige eigenschappen van het K18-hACE-2 muismodel, waarin ACE-2 in de neuspassage en het neuro-epitheel tot overexpressie wordt gebracht. De neuroinvasiviteit van SARS-CoV en SARS-CoV-2 in dit muismodel zijn eerder in wetenschappelijke literatuur beschreven.^{21,24}

Intranasale infectie van hamsters ($10^{4,875}$ TCID₅₀/hamster) met de voorloper van OTS-228 waarin het FCS intact is, induceerde geen ziektesymptomen geassocieerd met SARS-CoV-2 in de geïnfecteerde dieren, terwijl wildtype SARS-CoV-2 dit wel veroorzaakte. Intranasale infectie van de hamsters met OTS-228 dat 1 of 15 keer in VeroE6 cellen was gepasseerd (10^6 TCID₅₀/hamster), liet voor beiden virus passages een vergelijkbare attenuatie zien, waarbij geen ziekte of gewichtsverlies in de dieren werd waargenomen.

Om de verspreiding van OTS-228 te onderzoeken, is het hamstermodel gebruikt en werden naïeve contactdieren 1 dag na infectie samen met de geïnfecteerde dieren gehuisvest. Bij het voorlopervirus van OTS-228 waarin het FCS intact is, kon verspreiding van geïnfecteerde dieren naar naïeve contactdieren worden waargenomen. Geen van de geïnfecteerde en contactdieren vertoonden ziektesymptomen. Verspreiding van OTS-228 tussen de hamsters was in vergelijking tot de voorloperstam, ook bij een hoge dosis, sterk verminderd.

4. Voorgenomen werkzaamheden

De werkzaamheden die de aanvrager voornemens is uit te voeren, betreffen de volgende activiteiten:

- Transfectie/electroporatie van 'full-length' OTS-228 RNA in Vero-E6 cellen in combinatie met mRNA coderend voor het N-eiwit (SARS-CoV-2 Wuhan stam);
- Infectie van VeroE6 cellen met OTS-228;
- Productie van OTS-228 op kleine schaal (< 10L) en in een bioreactor van maximaal 100L (waarbij de voorschriften uit Bijlage 9 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (Regeling ggo)²⁵ in acht worden genomen).

De aanvrager verzoekt de werkzaamheden uit te voeren op inperkingsniveau ML-II en vraagt of een aantal door hem voorgestelde aanvullende maatregelen daadwerkelijk noodzakelijk is om de veiligheid voor mens en milieu te waarborgen.

Een aantal van deze maatregelen is gebaseerd op voorschriften die worden gehanteerd bij reeds vergunde werkzaamheden met een geattenuëerd gg-SARS-CoV-2.

- Tijdens de werkzaamheden worden dubbele handschoenen tot over de mouw van de werkkleding en een 'disposable gown' over de werkkleding gedragen. Het tweede paar handschoenen wordt in een veiligheidskabinet van klasse II (VK-II kabinet) afgenomen met 1% virkon en gedeponneerd in een afvalzak aanwezig in de VK-II kabinet;
- Open handelingen worden in een VK-II kabinet uitgevoerd;
- Het te gebruiken gastheermateriaal is vrij van SARS-CoV-2 en andere verwante virussen.
- OTS-228 wordt niet meer dan 15x gepasseerd;

- Bij de werkzaamheden zijn geen plasmiden of RNA-transcripten aanwezig in de gebruikte gastheercellen die coderen voor de genen in de ORF1ab regio;
- Het dragen van een mond- en neuskapje, P2 of hogere specificatie, en een veiligheidsbril is verplicht;
- Medewerkers zijn gevaccineerd tegen SARS-CoV-2 of hebben een SARS-CoV-2 infectie doorgemaakt, volgens de actuele richtlijnen van de Overheid m.b.t. vaccinatie- en herstelbewijzen. Na vaccinatie zal een titerverificatie worden uitgevoerd;
- Medewerkers zullen zichzelf voor aanvang van de werkzaamheden, dagelijks testen op SARS-CoV-2 infectie;
- Medewerkers die symptomen van verkoudheid vertonen zijn uitgesloten van de werkzaamheden;
- De vloer is vloeistofkerend uitgevoerd;
- Het laboratorium is zodanig geconstrueerd dat desinfectie met behulp van gassen mogelijk is.
- Een ventilatiesysteem is aanwezig. Het zorgt voor een onderdruk van de werkruimte ten opzichte van de heersende atmosferische druk;
- Uitsluitend direct bij de werkzaamheden betrokken medewerkers hebben toegang tot de werkruimten; andere mogen deze slechts betreden met afzonderlijke schriftelijke toestemming van de biologische veiligheidsfunctionaris (BVF);
- Het betreden en verlaten van het ingeperkte gebied inclusief het aantrekken en verwijderen van de werkkleding en persoonlijk beschermingsmiddelen (PPE) vinden plaats volgens een door de aanvrager beschreven protocol. Bij het verlaten van de werkruimte worden de handen en onderarmen gewassen met zeep of ontsmet met een gevalideerde methode;
- Al het biologisch afval wordt verzameld en opgeslagen in de werkruimte in breukvaste, lekdichte containers die gesloten kunnen worden of een gelijkwaardige verpakking, en wordt geïnactiveerd voordat men zich ervan ontdoet;
- Materiaal dat in aanraking is geweest met ggo's wordt geïnactiveerd voordat het wordt gewassen, hergebruikt of als afval afgevoerd;
- de aanvullende voorschriften opgenomen in bijlage 9 van de Regeling GGO voor activiteiten met een bioreactor worden toegepast.

5. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft SARS-CoV-2 in februari 2020 ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.²⁶ De COGEM heeft tevens geadviseerd om werkzaamheden met replicatiecompetent (gg-)SARS-CoV-2 uit te voeren op ML-III inperkingsniveau met aanvullende maatregelen, gezien de transmissieroutes van dit virus:

- 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.

In 2022 heeft de COGEM een niet openbaar advies uitgebracht (wegens de aanwezigheid van door de aanvrager en vergunningverlener aangegeven vertrouwelijke gegevens) over de inschaling van werkzaamheden met twee gg-SARS-CoV-2 stammen.²⁷ Vanwege het geattenueerde fenotype van

deze stammen, kon de COGEM instemmen met inschaling van werkzaamheden op inperkingsniveau ML-II, met de volgende aanvullende maatregelen:

- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouwen van de werkkleding gedragen;
- Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
- Het te gebruiken gastheermateriaal is vrij van SARS-CoV-2 en andere verwante virussen.

Daar bovenop adviseerde de COGEM de volgende additionele maatregelen in acht te nemen, om het risico op uitsleep te minimaliseren:

- De gg-SARS-CoV-2 virussen worden niet meer dan 10x gepasseerd;
- Bij de werkzaamheden zijn geen plasmides of RNA-transcripten aanwezig in de gebruikte gastheercellen die coderen voor bepaalde complementaire hCoV genen;
- Het dragen van een mond- en neuskapje (P2 of hogere specificatie) en een veiligheidsbril;
- Medewerkers dienen gevaccineerd te zijn tegen SARS-CoV-2 of hebben een SARS-CoV-2 infectie doorgemaakt, volgens de actuele richtlijnen van de overheid m.b.t. vaccinatie- en herstellbewijzen.

Met het oog op monitoring adviseerde de COGEM om, zoals gebruikelijk bij werkzaamheden in laboratoria waar met coronavirussen gewerkt wordt, het volgende:

- Medewerkers dienen zichzelf tot zeven dagen na het beëindigen van de werkzaamheden met gg-SARS-CoV-2, dagelijks te testen op (gg-)SARS-CoV-2 infectie;

Met betrekking tot de productiewerkzaamheden met sCPD9 adviseerde de COGEM de volgende maatregel om verontreiniging van sCPD9 met wildtype SARS-CoV-2 verder te minimaliseren:

- Medewerkers dienen zichzelf voor aanvang van de werkzaamheden dagelijks te testen op SARS-CoV-2 infectie, om de kans te verkleinen dat zij reeds met SARS-CoV-2 geïnfecteerd zijn tijdens de geplande werkzaamheden.

6. Overweging

In de onderhavige aanvraag is de aanvrager voornemens infectie- en productiewerkzaamheden uit te voeren met gg-SARS-CoV-2 variant OTS-228. De attenuatie van OTS-228 is gebaseerd op de introductie van verscheidene mutaties en deleties. Voor de overweging van de inschaling van de werkzaamheden spelen verschillende aspecten een rol, die hieronder puntsgewijs zullen worden behandeld.

6.1 Attenuatie van OTS-228

De attenuatie van gg-SARS-CoV-2 variant OTS-228 is gebaseerd op de introductie van verscheidene mutaties en deleties. OTS-228 bevat OTS codons in ORF1ab. Voor Coxsackie B3 en *Influenza A virus* is aangetoond dat de introductie van OTS codons een reductie in de 'fitness' van het virus veroorzaken.¹⁹ In tegenstelling tot SARS-CoV-2, bevatten Coxsackie B3 en *Influenza A virus* echter geen 'high fidelity' RNA polymerase met *proofreading*-activiteit. Mede op basis van vertrouwelijke data van de aanvrager,

concludeert de COGEM dat de introductie van de aangebrachte OTS codons het virus beperkt atteneert. Naast de OTS codons, zijn er mutaties aangebracht in het nsp1 van OTS-228. Het nsp1 van verschillende coronavirussen, zoals SARS-CoV en *Middle East respiratory syndrome-related coronavirus* (MERS-CoV) is in staat de genexpressie en antivirale responsen van de gastheercellen te onderdrukken.²⁸ Voor SARS-CoV-2 nsp1 is aangetoond dat het de eiwittranslatie van de gastheercel remt door interacties aan te gaan met ribosomen, waardoor uiteindelijk meer virale eiwitten worden geproduceerd.²⁹ De door de aanvrager aangebrachte mutaties zorgen ervoor dat het nsp1 van OTS-228 niet meer in staat is deze eiwitexpressie te remmen. Tevens zijn de genen coderend voor de accessoire-eiwitten ORF6, 7a, 7b en 8 (ORF6-8) in OTS-228 verwijderd. Deze accessoire-eiwitten zijn o.a. betrokken bij de antivirale immuunrespons van de gastheer. Zo remt ORF6 de signalering van interferon door een interactie aan te gaan met het Rae1-nup98 complex, waardoor verschillende mRNAs niet langer uit de celkern worden geëxporteerd en tot eiwitexpressie komen.³⁰ Expressie van ORF8 heeft als gevolg dat er minder MHC-I moleculen op de geïnfecteerde cellen aanwezig zijn, waardoor deze minder gevoelig zijn voor lysis door cytotoxische T-lymfocyten (CTLs).³¹ Tot slot is het 'furin cleavage site' (FCS) uit het Spike-eiwit van OTS-228 verwijderd. SARS-CoV-2 mutanten zonder FCS in het S-eiwit repliceren minder goed in humane cellijnen en zijn geattenuëerd in transgene muizen en hamstermodellen.^{32,33}

Uit experimentele gegevens van de aanvrager blijkt dat OTS-228 in hamsters en transgene K18-hACE-2 muizen verzwakt is ten opzichte van wildtype SARS-CoV-2 en geen ziektesymptomen in deze dieren veroorzaakt. De aanvrager heeft experimenten in hamsters uitgevoerd om het verspreidingspotentieel van OTS-228 te bestuderen. De voorloperstam van OTS-228, die genetisch identiek is, maar wel de FCS in het Spike-eiwit bevat, verspreidde zich van geïnfecteerde hamsters naar naïeve contacthamsters. OTS-228 was, in vergelijking tot de voorloperstam, ook bij een hoge dosis minder goed in staat zich van geïnfecteerde dieren naar contactdieren te verspreiden. Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat voldoende is aangetoond dat OTS-228 geattenuëerd is.

6.2 Stabiliteit van OTS-228 in celkweek

Variant OTS-228 bevat meerdere mutaties en deleties in het virusgenoom. Na 15 keer passeren van OTS-228 in Vero-E6 cellen waren geen van de aangebrachte OTS codons gereverteerd naar de wildtype sequenties en zijn er geen sequentieveranderingen in de delen van het *nsp1* of de verwijderde genoomgebieden waargenomen. Er waren geen verschillen in de ziektesymptomen in hamsters nadat deze intranasaal geïnfecteerd waren met OTS-228 dat 1 of 15 keer in VeroE6 cellen was gepasseerd.

De COGEM is van oordeel dat reversie van de aangebrachte modificaties naar de wildtype SARS-CoV-2 sequentie verwaarloosbaar klein is. Tevens is de COGEM van oordeel dat de kans dat er bij maximaal 15 keer passeren mutaties in het genoom zullen ontstaan die leiden tot een virulenter virus, verwaarloosbaar klein is.

6.3 Recombinatie van OTS-228 met wildtype SARS-CoV-2 sequenties

Indien OTS-228 in contact komt met (wildtype) SARS-CoV-2 virus of wildtype sequenties van de gemuteerde genoomregio's, zou er mogelijk recombinatie kunnen plaatsvinden. Bij eventuele

recombinatie zouden de gemuteerde of verwijderde sequenties van OTS-228 vervangen/gecomplementeerd kunnen worden met SARS-CoV-2 genomesequenties, waarbij een wildtype SARS-CoV-2 virus ontstaat of OTS-228 (een deel van) het geattenueerde karakter verliest. Omgekeerd zou het wildtype virus gemuteerde sequenties van OTS-228 verkrijgen. In alle situaties ontstaat er geen recombinant virus met een hogere pathogeniteit dan wildtype SARS-CoV-2.

De COGEM is van oordeel dat de kans dat er bij voorgenomen werkzaamheden een nieuw virus ontstaat dat pathogener is dan wildtype SARS-CoV-2 verwaarloosbaar klein is. Tevens is de COGEM van oordeel dat de attenuatie van OTS-228 bij onderhavige werkzaamheden behouden blijft zolang er geen complementaire sequenties voor de gemuteerde en/of verwijderde genomengebieden in de gebruikte cellijnen aanwezig zijn.

7. Advies

De aanvrager verzoekt om werkzaamheden met OTS-228 uit te mogen voeren op inperkingsniveau ML-II, waarbij verscheidene aanvullende maatregelen worden voorgesteld. Wegens het geattenueerde fenotype van OTS-228 kan de COGEM instemmen om de voorgenomen werkzaamheden uit te voeren op inperkingsniveau ML-II, waarbij de volgende aanvullende maatregelen in acht worden genomen:

- Om het risico op uitsleep verder te reduceren, worden tijdens de werkzaamheden dubbele handschoenen tot over de mouw van de werkkleding gedragen, waarbij het tweede paar bij het beëindigen van de werkzaamheden in een afvalbak in de veiligheidskabinet van klasse II wordt gedeponed;
- Tijdens de werkzaamheden worden mond- en neuscapjes (P2) gedragen om het risico op incidentele besmetting te beperken;
- Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
- Het te gebruiken gastheermateriaal is vrij van SARS-CoV-2 en andere verwante virussen;
- Bij de werkzaamheden zijn geen plasmiden of RNA-transcripten aanwezig in de gebruikte gastheercellen die de sequenties van CoV *ORF1ab* (en daardoor ook *nsp1*), *ORF6*, *ORF7a*, *ORF7b* en *ORF8* bevatten;
- De aanvullende voorschriften opgenomen in bijlage 9 van de Regeling ggo²⁵ voor activiteiten met een bioreactor worden in acht genomen;
- OTS-228 wordt niet meer dan 15x gepasseerd;
- Medewerkers dienen gevaccineerd te zijn tegen SARS-CoV-2 of hebben een SARS-CoV-2 infectie doorgemaakt, volgens de actuele richtlijnen van de Overheid m.b.t. vaccinatie- en herstelbewijzen;^{34,35}
- Medewerkers die symptomen van verkoudheid vertonen, zijn uitgesloten van de werkzaamheden.

De COGEM is van oordeel dat bij de uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden met OTS-228 op inperkingsniveau ML-II, onder navolging van de hierboven genoemde additionele aanvullende voorschriften, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy: 2019 Release. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht op 06-03-2023)
2. 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 op 06-03-2023)
3. 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
4. World Organisation for Animal Health (OIE). Situation report #9 on SARS-CoV-2 and animals (31/01/2022). <https://www.oie.int/app/uploads/2022/02/sars-cov-2-situation-report-9.pdf> (bezocht op 06-03-2023)
5. Pickering B. *et al.* (2022). Highly divergent white-tailed deer SARS-CoV-2 with potential deer-to-human transmission. *bioRxiv* 2022.02.22.48155 doi: <https://doi.org/10.1101/2022.02.22.481551>
6. European Centre for Disease Prevention and Control. Q&A on COVID-19: Basic facts <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/questions-answers/questions-answers-basic-facts> (bezocht op 06-03-2023)
7. 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 op 06-03-2023)
8. 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 op 06-03-2023)
9. Zhou P *et al.* (2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579: 270–273
10. Gori Savellini G *et al.* (2022). Nucleopore Traffic Is Hindered by SARS-CoV-2 ORF6 Protein to Efficiently Suppress IFN- β and IL-6 Secretion. *Viruses* 14: 1273
11. Miyamoto Y *et al.* (2022). SARS-CoV-2 ORF6 disrupts nucleocytoplasmic trafficking to advance viral replication. *Comm. Biol.* 5: 483
12. Chen J *et al.* (2022). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 ORF8 Protein Inhibits Type I Interferon Production by Targeting HSP90B1 Signaling. *Front Cell Infect Microbiol.* 12: 899546
13. Beaudoin-Bussières G *et al.* (2022). SARS-CoV-2 Accessory Protein ORF8 Decreases Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *Viruses* 14: 1237
14. Malone B *et al.* (2022). Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23: 21–39
15. Walls AC *et al.* (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 181: 281–292
16. 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
17. Wan Y *et al.* (2020). Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *J. Virol.* 94: e00127-20
18. Jackson CB *et al.* (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23: 3–20

19. Moratorio G *et al.* (2017). Attenuation of RNA viruses by redirecting their evolution in sequence space. *Nat. Microbiol.* 2: 17088
20. Thao TTN *et al.* (2020). Rapid reconstruction of SARS-CoV-2 using a synthetic genomics platform. *Nature* 582: 561-584
21. Yinda CK *et al.* (2020). K18-hACE2 mice develop respiratory disease resembling severe COVID-19. *PLOS Path.* 17: e1009195
22. Imai M *et al.* (2020). Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *PNAS* 117: 16587-16595
23. Tostanoski LH *et al.* (2020). Ad26 vaccine protects against SARS-CoV-2 severe clinical disease in hamsters. *Nat. Med.* 26: 1694-1700
24. Oladunni FS *et al.* (2020). Lethality of SARS-CoV-2 infection in K18 human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice. *Nat. Comm.* 11: 6122
25. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2023-01-01#Bijlage9>
26. COGEM (2020). Pathogeniteitsclassificatie en inschaling van werkzaamheden met het nieuwe coronavirus 2019-nCoV uit Wuhan. COGEM advies CGM/200211-01
27. COGEM (2022). Inschaling van werkzaamheden met gg-SARS-CoV-2 virus sCPD9. COGEM advies CGM/220520-02 (vertrouwelijk advies)
28. Narayanan K *et al.* (2015). Coronavirus nonstructural protein 1: common and distinct functions in the regulation of host and viral gene expression. *Virus Res.* 202: 89-100
29. Schuter K *et al.* (2020). SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. *Nat. Struct. Mol.* 27: 956-966
30. Hall R *et al.* (2022). SARS-CoV-2 ORF6 disrupts innate immune signalling by inhibiting cellular mRNA export. *Plos Path.* 18: e1010349
31. Zhang Y *et al.* (2020). The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through down-regulating MHC-I. *PNAS* 118: e2024202118
32. Johnson BA *et al.* (2020). Loss of furin cleavage site attenuates SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature* 591: 293-308
33. Sasaki M *et al.* (2021). SARS-CoV-2 bearing a mutation at the S1/S2 cleavage site exhibits attenuated virulence and confers protective immunity. *Mbio* 12: e01415-21
34. Rijksoverheid Vaccinatiebewijs. <https://www.rijksoverheid.nl/onderwerpen/coronavirus-coronabewijs-en-coronatoegangsbewijs/vaccinatiebewijs/eisen-en-geldigheid> (bezocht op 03-03-2023)
35. Rijksoverheid Herstellbewijs. <https://www.rijksoverheid.nl/onderwerpen/coronavirus-coronabewijs-en-coronatoegangsbewijs/herstellbewijs> (bezocht op 23-03-2023)