

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

DATUM 16 maart 2023
KENMERK CGM/230316-01
ONDERWERP Advies werkzaamheden gg-SARS-CoV-2 VLPs op ML-II

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende dossier IG 17-119_2.8-004 getiteld 'M-Iik activiteiten bij Kling Biotherapeutics' afkomstig van Kling Biotherapeutics, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van infectie- en productie-werkzaamheden met 'virus-like particles' (VLP's), afgeleid van SARS-CoV-2, in cellijnen. Deze VLP's zijn 'lege' virusdeeltjes en bestaan uit de 4 structurele eiwitten van SARS-CoV-2 die de mantel van het virusdeeltje vormen, en 2 zogenaamde accessoire eiwitten (ORF3a en ORF7a). Daarnaast kan er mRNA in de VLP ingepakt worden dat codeert voor een 'reporter'-eiwit waarmee de infectie van de cel zichtbaar gemaakt kan worden.

Het genoom van SARS-CoV-2 codeert voor 29 eiwitten. Omdat de geproduceerde VLP's alleen de 4 structurele eiwitten en 2 accessoire eiwitten bevatten, en het virale genoom afwezig is en daarmee de genetische informatie voor alle andere SARS-CoV-2 eiwitten afwezig zijn, ontbreken alle elementen die noodzakelijk zijn voor het virus om te kunnen vermenigvuldigen. De COGEM is van oordeel dat de kans dat er virus ontstaat verwaarloosbaar klein is.

Op basis van de bovenstaande overwegingen, stemt de COGEM in met de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau ML-II met inachtnaam van enkele aanvullende voorschriften. Indien deze werkzaamheden op het geadviseerde inperkingsniveau en onder navolging van de genoemde aanvullende voorschriften worden uitgevoerd, 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.

- Drs. Y de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's,
DG Milieu en Internationaal

Werkzaamheden met gg-SARS-CoV-2 ‘virus-like particles’ (VLP) in verschillende cellijnen op inperkingsniveau ML-II

COGEM advies CGM/230316-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van infectie- en productiewerkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg-) SARS-CoV-2 ‘virus-like particles’ (VLPs) (IG 17-119). De aanvraag is afkomstig van Kling Biotherapeutics. De aanvrager is voornemens VLP's te produceren die alleen de structurele eiwitten en ORF3a en ORF7a van SARS-CoV-2 bevatten, en waarin mRNA dat codeert voor reportereiwitten ingepakt is. Wegens het ontbreken van componenten betrokken bij de virale replicatie in de VLP's, wordt verzocht de werkzaamheden uit te mogen voeren op inperkingsniveau ML-II met inachtnaam van aanvullende voorschriften.

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 SARS-CoV-2 (*Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2*, genus *Betacoronavirus*).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 humane vaccins beschikbaar die (gedeeltelijke) bescherming bieden tegen ernstige ziekte en verspreiding.

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 (ORFs): 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 ORF's aan het 3' uiteinde coderen voor de structurele eiwitten (S, E, M, en N) en 9 zogenoemde ‘accessory’ of accessoire eiwitten.^{2,9} Upstream van de ORF's 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.¹⁰

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.^{11,12,13} 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.¹⁴ In afwezigheid van TMPRSS2 is het protease cathepsin L van de gastheercel betrokken bij de membraanfusie.¹⁴

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens gg-SARS-CoV-2 VLP's te produceren in HEK293T en Expi293F cellijnen. De cellen worden hiervoor getransfecteerd met verscheidene ‘packaging’ plasmiden die *in trans* coderen voor alle eiwitten die onderdeel zullen uitmaken van de VLP's. Alle gebruikte expressievectoren zijn voorzien van humaan codon geoptimaliseerde ORF's. Twee plasmiden zullen worden gebruikt om de structurele eiwitten N (nucleoproteïne) en S (spike) in de cellen te produceren. De structurele eiwitten M (membraan) en E (envelop) worden, gescheiden door een ‘internal ribosome entry site’ (IRES), door één plasmide *in trans* aangeboden. Tevens zullen ORF3a en ORF7a door één plasmide *in trans* worden aangeboden en onderdeel uitmaken van de VLP's. De aanvrager stelt dat ORF3a en ORF7a interacties aangaan met de structurele eiwitten, waardoor inclusie van deze eiwitten resulteert in een VLP dat het meest op het virusdeeltje van SARS-CoV-2 lijkt. Verder kunnen de VLP's mRNA's bevatten die coderen voor luciferase of mCherry reportereiwitten, en voorzien zijn van een ‘packaging signaal’ (PS9). Het PS9 ‘packaging signaal’ is een sequentie van ca. 1 kb in *nsp15/16 (ORF1ab)* die gebruikt kan worden om mRNA via het N eiwit in de VLP's te incorporeren.¹⁵ Het gebruik van PS9 op het mRNA van een luciferase-gen resulteerde in expressie van het luciferase in VLP-geïnfecteerde cellen.¹⁵

De membraan(-geassocieerde) eiwitten in de VLP's zoals E, S, ORF3a of ORF7a kunnen C-terminaal gefuseerd worden met mCherry-XL of GFP. De eiwitten E, ORF3a of ORF7a zullen mogelijk ook N-terminal ‘getagged’ worden met een Strep-II of His6 peptide voor detectie en/of isolatie.

Alle virale eiwitsequenties zijn afkomstig zijn van de Wuhan-Hu-1 referentiesequentie. Uitzonderingen hierop zijn de R203M mutatie in het N eiwit, aanwezig in de Delta variant, die de mRNA ‘packaging’ capaciteit en virale replicatie verhoogt, en de N501Y/D614G in het Spike-eiwit die aanwezig is in de Gamma variant, en zorgt voor een stabielere S-eiwit en verhoogde virustiters.¹⁵

De aanvrager geeft aan dat verschillende cellijnen of gastheermaterialen zullen worden geïnfecteerd met de gg-SARS-CoV-2 VLP's voor onderzoek naar nieuwe breed neutraliserende antistoffen. De infectie-experimenten zullen worden uitgevoerd met de cellijnen HEK293T, Expi293F, 293T-hACE2-TMPRSS2, VeroE6-TMPRSS2, A549-hACE2 en met humane plasma ‘samples’.

3.1 Voorstel tot inschaling

Wegens het ontbreken van componenten betrokken bij de virale replicatie in de VLP's, wordt verzocht de werkzaamheden uit te mogen voeren op inperkingsniveau ML-II, waarbij de volgende aanvullende maatregelen in acht worden genomen:

- Het te gebruiken gastheermateriaal is vrij van SARS-CoV-2 en andere verwante virussen;
- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw van de werkkleding gedragen;
- Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II (VK-II) uitgevoerd;
- De gebruikte plastics zoals pipetten en pipetpuntjes worden in het VK-II kabinet direct geïnactiveerd met Virkon of hypochloriet.

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft SARS-CoV-2 in februari 2020 ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.¹⁶ Bij werkzaamheden met een genetisch gemodificeerde gg-SARS-CoV-2 variant die verzwakt was, stemde de COGEM in met inschaling van de werkzaamheden op inperkingsniveau ML-II met inachtneming van verscheidene additionele aanvullende voorschriften.¹⁷ De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over gg-SARS-CoV-2 VLP's.

5. Overweging

Het virale genoom van SARS-CoV-2 codeert voor 29 eiwitten, waarvan 16 non-structurele, 4 structurele en 9 accessoire eiwitten.¹⁸ Voor de werkzaamheden die de aanvrager voornemens is uit te voeren, worden er VLP's geproduceerd die maximaal 6 van de 29 eiwitten bevatten. Deze eiwitten zullen door middel van in de productiecel aanwezige 'packaging' plasmiden *in trans* worden aangeboden. Alleen de structurele eiwitten S, E, M en N, en de accessoire eiwitten ORF3a en ORF7a zullen onderdeel uitmaken van de geproduceerde VLP's. ORF3a en ORF7a gaan interacties aan met het virusdeeltje en zijn betrokken bij de antivirale afweer van de gastheer, maar zijn voor zover bekend niet betrokken bij de replicatie van SARS-CoV-2.^{18,19,20,21} De genetische informatie voor de andere 23 virale eiwitten is niet aanwezig in het productiesysteem. Hierdoor ontbreken in de geproduceerde VLP's alle elementen die onderdeel uitmaken van het virale replicatie- en transcriptiecomplex (RTC) waardoor de virusdeeltjes niet in staat zijn te repliceren, maar alleen de gastheercellen kunnen binnentreden.²² Tevens zal als voorwaarde worden gehanteerd dat het te gebruiken gastheermateriaal vrij is van SARS-CoV en andere coronavirussen en dat open werkzaamheden plaatsvinden in een VK-II, waardoor er geen wildtype of infectieus SARS-CoV-2 geproduceerd kan worden.

Het N-eiwit is betrokken bij de mRNA 'transfer' capaciteit van de VLP's.²³ Bij de onderhavige werkzaamheden zullen er via het PS9-sigitaal mRNA's in de VLP's worden ingepakt die coderen voor reporter genen. Hierbij worden geen mRNA-sequenties gebruikt die mogelijk de ontbrekende virale elementen kunnen complementeren. Het PS9-sigitaal verhoogt sterk de mate waarmee mRNA moleculen door het N-eiwit in de viruspartikels geïncorporeerd kunnen worden, waardoor mRNA moleculen zonder dit sigitaal met zeer lage efficiëntie in de VLP's ingepakt worden.¹⁵ Het is echter niet volledig uit te sluiten dat één of enkele virale mRNA's coderend voor de structurele eiwitten en/of ORF3a en ORF7a, aanwezig in de productiecellen, incidenteel in een beperkt aantal viruspartikels zal worden geïncorporeerd. Om efficiënt VLP's te vormen die de gastheercel kunnen verlaten en nieuwe cellen kunnen infecteren, zijn alle structurele eiwitten nodig.²⁴ Wegens het ontbreken van het PS9 'packaging sigitaal' is de kans zeer klein dat er meerdere virale mRNA's in de VLP's worden ingepakt. Zelfs in het scenario waarin er enkele virale mRNA's in het VLP aanwezig zijn, zullen deze na het binnentreden van de cellen snel worden afgebroken.

Al het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de kans verwaarloosbaar klein is dat er bij onderhavige werkzaamheden infectieus gg-SARS-CoV-2 ontstaat.

6. Advies

Op basis van bovenstaande overwegingen, stemt de COGEM in met de voorgenomen werkzaamheden (productie en infectie) met SARS-CoV-2 VLP's op inperkingsniveau ML-II, waarbij de volgende voorgestelde aanvullende voorwaarden in acht worden genomen:

- Het te gebruiken gastheermateriaal is vrij van SARS-CoV-2 en andere coronavirussen;
- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;

Indien de voorgenomen werkzaamheden op het geadviseerde inperkingsniveau en onder navolging van de genoemde aanvullende voorschriften worden uitgevoerd, is de COGEM van oordeel dat 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. 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
11. Walls AC *et al.* (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 181: 281–292
12. 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
13. 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
14. Jackson CB *et al.* (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23: 3–20
15. Syed AM *et al.* (2021). Rapid assessment of SARS-CoV-2-evolved variants using virus-like particles. *Science* 374: 1626-1632
16. COGEM (2020). Pathogeniteitsclassificatie en inschaling van werkzaamheden met het nieuwe coronavirus 2019-nCoV uit Wuhan. COGEM advies CGM/200211-01
17. COGEM (2022). Inschaling infectie en productiewerkzaamheden met geattenuerd gg-SARS-CoV-2 virus OTS-228. COGEM advies CGM/230308-02
18. Zhang J *et al.* (2022). Understanding the role of SARS-CoV-2 ORF3a in viral pathogenesis and COVID-19. *Front. Microbiol.* 13: 854567
19. Arshad N *et al.* (2022). SARS-CoV-2 accessory proteins ORF7a and ORF3a use distinct mechanisms to down-regulate MHC-I surface expression. *PNAS.* 120: e2208525120
20. Huang C *et al.* (2006) Severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a accessory protein is a viral structural protein. *J. Virol.* 80, 7287–7294
21. Timilsina U *et al.* (2022). SARS-CoV-2 ORF7a potentially inhibits the antiviral effect of the host factor SERINC5. *Nat. Comm.* 13: 2935
22. V'kovski P *et al.* (2021). Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* 19: 155-170
23. Morse M *et al.* (2023). Structural domains of SARS-Cov-2 nucleocapsid protein coordinate to compact long nucleic acid substrates. *Nucleic Acids Res.* 51: 290-303
24. Plescia CB *et al.* (2020). SARS-CoV-2 viral budding and entry can be modelled using BSL-2 level virus-like particles. *J. Biol. Chem.* 296: 100103