



De minister van Volkshuisvesting,
Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer
Mevrouw dr. J.M. Cramer
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 27 februari 2009
KENMERK CGM/090227-03
ADVIES Inschaling van recombinante humane coronavirussen

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag met de titel
“*Human coronavirus pathogenesis*” van het Academisch Medisch Centrum te
Amsterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

Tot op heden zijn er vier humane coronavirussen (HCoV's) bekend. HCoV-OC43 en HCoV-229E zijn al langere tijd geleden geïdentificeerd en worden beschouwd als zogenaamde gewone verkoudheidsvirussen. Een infectie met deze coronavirussen leidt tot een mild ziektebeeld en gaat veelal vanzelf over. HCoV-229E en HCoV-OC43 zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. De andere twee humane coronavirussen, HCoV-NL63 en HCoV-HKU1, zijn recentelijk geïdentificeerd.

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse waarin de twee nieuwe humane coronavirussen ingedeeld dienen te worden. Daarnaast is de COGEM verzocht advies te geven over de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met twee chimere virussen die vervaardigd zijn door een uitwisseling van het ORF3/4 domein tussen HCoV-229E en HCoV-NL63.

HCoV-NL63 of HCoV-HKU1 worden wereldwijd aangetroffen en de gevolgen van een infectie met een van deze virussen zijn over het algemeen beperkt tot koorts, hoesten en een loopneus. Het ziektebeeld is ernstiger bij mensen met een beperkte afweer, maar ook onder deze groep is de mortaliteit zeer laag. Op basis van de beperkte pathogeniteit van zowel HCoV-NL63 als HCoV-HKU1 en de overeenkomsten met de eerder beschreven humane coronavirussen adviseert de COGEM beide HCoV's in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

De precieze functie van de door ORF3/4 gecodeerde eiwitten is niet bekend. De eiwitten zijn *in vitro* niet noodzakelijk voor de virusrelicatie. De COGEM acht het waarschijnlijk dat ORF3/4 van invloed is op de pathogeniteit en/of de transmissie-efficiëntie van het virus. Het effect van voorgenomen uitwisseling kan zij niet met zekerheid bepalen. De COGEM adviseert daarom de *in vitro* werkzaamheden op ML-III inperkingsniveau in te schalen. Onder dit inperkingsniveau en de daarvoor geldende werkvoorschriften acht zij de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop followed by a horizontal stroke and a small vertical tick.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Inschaling van werkzaamheden met recombinante humane coronavirussen

COGEM advies CGM/090227-03

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag getiteld ‘*Human coronavirus pathogenesis*’. De aanvrager wil *in vitro* werkzaamheden uitvoeren met de recombinante humane coronavirussen HCoV-229E en HCoV-NL63 en enkele chimere varianten daarvan. In deze chimere varianten is het zogenaamde ORF3/4 domein dat codeert voor niet-structurele accessoire eiwitten van beide virussen uitgewisseld.

De coronavirussen

Coronavirussen behoren tot de familie van *Coronaviridae* (1, 2). De coronavirussen kunnen vogels en vele zoogdieren, waaronder de mens, infecteren. Er zijn geen biologische vectoren bekend. De coronavirussen infecteren voornamelijk de epitheelcellen van de luchtwegen, het spijsverteringskanaal en neurologische weefsels (3). Transmissie vindt plaats via afscheiding vanuit de luchtwegen, en via mechanisch, oraal of fecaal contact (3).

De coronavirussen worden op basis van fylogenetische en serologische eigenschappen ingedeeld in drie groepen. Groep 1 en 2 bevatten de coronavirussen die in verschillende zoogdieren worden aangetroffen en groep 3 bevat voornamelijk virussen die in vogels zijn gevonden (5).

Het coronavirus is een positief-strengs RNA virus met een genoom van 27 tot 32 kb. Het genoom is omgeven door een eiwitmantel (nucleocapside) en een membraan (envelop). Het genoom van alle coronavirussen is op een vergelijkbare wijze georganiseerd. Tweederde van het genoom codeert voor de eiwitten die betrokken zijn bij de RNA replicatie (4). Het overige deel dat gelegen is aan de 3' zijde van het genoom codeert voor structurele eiwitten zoals het zogenaamde spike-eiwit, het envelopeiwit, het membraaneiwit en het nucleocapside-eiwit. Daarnaast liggen er op dit deel van het genoom ook nog een of meer genen die coderen voor niet-structurele accessoire eiwitten. De functie van deze niet-structurele eiwitten is grotendeels onbekend.

Humane coronavirussen

Tot voor kort waren er slechts twee virus species bekend die tot de zogenaamde humane coronavirussen (*Human coronavirus*, HCoV) behoren, HCoV-OC43 en HCoV-229E. Bij het deel van de bevolking dat het meest vatbaar is voor infecties, zoals kinderen, bejaarden en mensen met een verzwakt immuunsysteem kunnen deze HCoV's zowel hoge als lage luchtwegen infecteren (7). Over het algemeen resulteert een infectie met één van deze virussen echter in een gewone verkoudheid (6). Op basis van de beschikbare gegevens worden beide humane coronavirussen beschouwd als relatief onschadelijke pathogenen en zijn in Nederland ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.

Onlangs zijn er twee nieuwe humane coronavirussen geïdentificeerd. Het betreft HCoV-NL63 en HCoV-HKU1. Het HCoV-NL63 is voor het eerst beschreven in 2004 (8, 9). HCoV-NL63 is net als HCoV-229E ingedeeld in groep 1. Het HCoV-HKU1 is ontdekt in 2004 in een 71-jaar oude Chinese man met een chronische luchtwegaandoening (10). HCoV-HKU1 lijkt op HCoV-OC43 en wordt ingedeeld in groep 2.

Eerder COGEM advies

In het verleden heeft de COGEM geadviseerd om de *in vitro* werkzaamheden met gg-coronavirussen die afgeleid zijn van muizen hepatitis virus (MHV), feline coronavirussen (FIPV), HCoV-229E en HCoV-OC43, in te schalen op ML-II inperkingsniveau (11, 12). Aangezien de voorgenomen werkzaamheden tot een verandering van het gastheerbereik van de betreffende virussen zou kunnen leiden, achtte de COGEM het van belang daar twee aanvullende voorschriften aan toe te voegen. Het betrof de volgende voorschriften:

- open handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse 2 uitgevoerd te worden;
- het dragen van handschoenen tot over de mouw van de jas is verplicht.

SARS-coronavirus

Voor het coronavirus dat wordt geassocieerd met de ziekte SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome), is door de COGEM pathogeniteitsklasse 3 geadviseerd (13).

Geplande werkzaamheden en adviesvraag

Tot op heden zijn er vier humane coronavirussen bekend die mensen kunnen infecteren. Dit zijn HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 en HCoV-HKU1. De aanvrager wil de eigenschappen van genen, gensegmenten en niet-coderende sequenties van deze humane coronavirussen *in vitro* bestuderen.

Tevens wil de aanvrager in deze studie gebruik maken van recombinante coronavirussen. Het betreft recombinant HCoV-NL63 en HCoV-229E en twee chimere varianten van deze HCoV's (HCoV-NL63/ORF3/4 HCoV-229E en HCoV-229E/ORF3/4 HCoV-NL63). Deze chimeren zijn vervaardigd door uitwisseling van het ORF3/4 domein tussen HCoV-NL63 en HCoV-229E. Hierdoor hoopt de aanvrager meer inzicht te krijgen in de functie van het eiwit dat door dit domein wordt gecodeerd. Het vervaardigen van genoemde virussen wordt in het buitenland uitgevoerd en valt derhalve niet onder onderhavige vergunningaanvraag. De aanvrager wil de betreffende recombinante coronavirussen in kweek brengen en gebruiken voor infectie-experimenten in animale cellen.

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over de pathogeniteitsklasse van de relatief nieuwe humane coronavirussen HCoV-HKU1 en HCoV-NL63. Daarnaast is zij verzocht te adviseren over het inperkingsniveau waarop *in vitro* werkzaamheden met het recombinant HCoV-NL63 uitgevoerd dienen te worden en over de eventueel noodzakelijke aanvullende voorschriften.

Het laatste onderdeel van de onderhavige adviesvraag betreft de inschaling van de werkzaamheden met de chimere varianten van de humane coronavirussen HCoV-NL63 en HCoV-229E waarvan het ORF3/4 domein is uitgewisseld.

Overwegingen en advies

Pathogeniteit van HCoV-HKU1

Het HCoV-HKU1 is onlangs geïdentificeerd en nog niet zo uitvoerig bestudeerd als HCoV-229E of HCoV-OC43. Bovendien is er voor het HCoV-HKU1 tot op heden geen diermodel of kweekstelsel bekend waardoor het virus verder gekarakteriseerd zou kunnen worden (14). De kennis over HCoV-HKU1 is daardoor beperkt tot de klinische gegevens die als gevolg van een infectie met dit virus zijn gepubliceerd.

Het virus is aangetoond in patiënten uit Noord-Amerika, Europa, Australië en Azië (14). De COGEM leidt hieruit af dat het virus wereldwijd aanwezig is. Desondanks acht zij de populatie van gezonde volwassenen die door dit virus zijn geïnfecteerd relatief klein. In slechts 2% van de onderzochte volwassenen worden antilichamen aangetroffen tegen het HCoV-HKU1 (9).

Een infectie met HCoV-HKU1 gaat veelal gepaard met koorts, hoesten en een loopneus (rinorroe) en behoeft geen speciale medische behandeling. Deze milde symptomen acht de COGEM kenmerkend voor een gewoon verkoudheidsvirus. Opname in een ziekenhuis als gevolg van een HCoV-HKU1 infectie is alleen beschreven voor kinderen, volwassenen met een onderliggende ziekte en bejaarden (14). Tot op heden zijn er twee sterfgevallen beschreven die geassocieerd worden met een infectie door HCoV-HKU1. Beide patiënten hadden naast deze infectie echter een ernstige onderliggende ziekte. De ene patiënt had een hartaanval gehad en leed daarnaast aan diabetes mellitus en darmkanker, de andere patiënt was getroffen door een beroerte en leed aan prostaatkanker en diabetes mellitus (15). Het is derhalve niet duidelijk wat de bijdrage van de HCoV-HKU1 infectie aan het overlijden is geweest.

De beschikbare antivirale middelen tegen coronavirussen zijn met name gericht op een infectie met *SARS-coronavirus* en niet op de humane coronavirussen die op dit moment in de humane populatie circuleren (14). Een selectieve behandeling van HCoV-HKU1 is derhalve niet voorhanden.

Bovenstaande in overweging nemende is de COGEM van mening dat HCoV-HKU1 als een weinig pathogeen virus beschouwd kan worden. Ze adviseert daarom HCoV-HKU1 overeenkomstig HCoV-OC43 en HCoV-229E in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

Pathogeniteit van HCoV-NL63

HCoV-NL63 wordt wereldwijd aangetroffen (14). Analyse van humaan serum op neutraliserende antilichamen tegen HCoV-NL63 wijst uit dat vrijwel alle volwassenen gedurende hun leven geïnfecteerd zijn geweest met dit virus (16). De COGEM leidt hieruit af dat het virus zich zeer efficiënt verspreidt onder de bevolking.

De infectie is over het algemeen zelf-limiterend en vereist geen medische behandeling. Kenmerkende symptomen van een infectie met HCoV-NL63 zijn koorts, hoesten en een loopneus (rinorroe). Opname in een ziekenhuis als gevolg van een HCoV-NL63 infectie is alleen beschreven voor kinderen,

volwassenen met een onderliggende ziekte en bejaarden (14). Van de patiënten zonder onderliggende ziekte is voor zover bekend slechts één bejaarde patiënt overleden aan de gevolgen van een infectie met HCoV-NL63 (14, 17). De aanvrager geeft aan dat op basis van het ziektebeeld geen onderscheid gemaakt kan worden tussen ziekenhuispatiënten met respiratoire infecties die worden veroorzaakt door HCoV-NL63, HCoV-OC43 of HCoV-229E. HCoV-NL63 kan net als HCoV-OC43 en HCoV-229E zowel lagere als hogere luchtwegen infecteren.

HCoV-NL63 wordt in tegenstelling tot HCoV-OC43 en HCoV-229E relatief vaak aangetroffen in kinderen met pseudokroep (18). Deze aandoening wordt gekenmerkt door een ontsteking van de stembanden en slijmvliezen van de bovenste luchtwegen en heeft heesheid, hoesten en moeilijke ademhaling tot gevolg. De para-influenzavirussen die worden beschouwd als belangrijkste veroorzaker van pseudokroep worden ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.

Net als voor de overige humane coronavirussen is er voor HCoV-NL63 geen selectieve behandeling beschikbaar.

Met het oog op het milde ziektebeeld dat wordt veroorzaakt door HCoV-NL63, de grote overeenkomsten met HCoV-229E en HCoV-OC43 en de aanname dat een groot deel van de bevolking reeds een infectie met HCoV-NL63 heeft doorgemaakt, adviseert de COGEM HCoV-NL63 in te delen in pathogeniteitsklasse 2. In lijn met deze indeling is de COGEM van mening dat de werkzaamheden met HCoV-NL63 op inperkingsniveau ML-II uitgevoerd dienen te worden. Met het oog op de effectieve aerogene verspreiding van dit virus adviseert zij daarbij de volgende aanvullende voorschriften te hanteren:

- open handelingen dienen in een klasse 2 veiligheidskabinet uitgevoerd te worden;
- het dragen van handschoenen is verplicht.

Inschaling van chimere varianten van HCoV-NL63 en HCoV-229E

De aanvrager is voornemens gebruik te maken van chimeren die zijn ontstaan door de uitwisseling van het ORF3/4 domein tussen HCoV-NL63 en HCoV-229E. De humane coronavirussen vertonen een nauwe verwantschap en worden binnen de *Coronaviridae* beide ingedeeld in groep 1. Zoals hierboven is aangegeven, is de COGEM van mening dat beide uitgangsvirussen behoren tot pathogeniteitsklasse 2. Een infectie met deze HCoV's resulteert in gezonde volwassenen in een mild ziektebeeld en is overwegend zelf-limiterend. De

uitwisseling van genen of gensegmenten tussen virussen die beide behoren tot pathogeniteitsklasse 2 leidt over het algemeen niet tot een verhoogde pathogeniteit. Men zou derhalve kunnen beargumenteren dat de veiligheid van mens en milieu gewaarborgd is als de werkzaamheden met bovengenoemde chimere varianten op ML-II niveau ingeschaald zou worden.

Anderzijds is het moeilijk de invloed van de voorgenomen uitwisseling op de pathogene eigenschappen van de chimere virussen op de juiste waarde te schatten. Daarvoor ontbreekt het aan belangrijke informatie over de functie van de ORF3/4 coderende eiwitten.

In de wetenschappelijke literatuur worden de ORF3/4 coderende eiwitten gerekend tot de zogenaamde accessoire eiwitten. Deze eiwitten zijn niet essentieel voor de *in vitro* replicatie van het virus (5). Het is derhalve waarschijnlijk dat deze eiwitten met name *in vivo* een rol spelen en betrokken zijn bij virus-gastheer interacties.

Het ORF3 eiwit van het *Transmissible gastroenteritis virus* (TGEV) en het *Porcine epidemic diarrhea virus* (PEDV) is in verband gebracht met de pathogeniteit van deze virussen (19, 20). TGEV en PEDV behoren net als HCoV-NL63 en HCoV-229E tot de groep 1 coronavirussen. De COGEM acht het derhalve waarschijnlijk dat het ORF3/4 domein van HCoV-NL63 en HCoV-229E een rol zal spelen in de pathogeniteit en/of de transmissie-efficiëntie van deze virussen in de mens.

Gezien de eigenschappen van de uitgangsvirussen acht de COGEM de kans klein dat de pathogeniteit of transmissie-efficiëntie van de chimere virussen hoger zal zijn dan de uitgangsvirussen. Zij kan een verhoogde pathogeniteit of transmissie-efficiëntie evenwel niet uitsluiten.

Verder wijst de COGEM erop dat er geen vaccins of antivirale middelen zijn die specifiek gericht zijn op een infectie met HCoV's. Hierdoor ziet de COGEM geen mogelijkheid een verspreiding van de virussen op selectieve wijze tegen te gaan.

Alles in overweging nemende, adviseert de COGEM in dit specifieke geval de voorgenomen werkzaamheden met de chimere coronavirussen uit te voeren op ML-III inperkingsniveau. Op dit inperkingsniveau en onder navolging van de voor dit niveau geldende voorschriften is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Lai MMC and Holmes KV. (2001) *Coronaviridae*: The viruses and their replication. In: *Fields Virology*. Edited by: Knipe MD and Howley PM. Philadelphia: 1163-1185
2. Holmes KV. (2001) Coronaviruses. In: *Fields Virology*. Edited by: Knipe MD and Howley PM. Philadelphia: 1187-1203
3. Enjuanes L, Brian D, Cavanagh D *et al.* (2000) Family *Coronaviridae*. In: *Virus taxonomy*. Edited by: Regenmortel van MHV, Fauquet CM, Bishop DHL *et al.* San Diego: 835-849
4. Pyrc K *et al.* (2006) Inhibition of human coronavirus NL63 infection at early stages of the replication cycle. *Antimicrob. Agents Chemther.* **50**:2000-2008
5. Dijkman R *et al.* (2006) Human coronavirus 229E encodes a single ORF4 protein between the spike and the envelope genes. *Virology J.* **3**:106
6. Bradburne AF *et al.* (1967) Effects of a “new” human respiratory virus in volunteers. *Br. Med. J.* **3**: 767-769
7. Elden van LJ *et al.* (2004) Frequent detection of human coronaviruses in clinical specimens from patients with respiratory tract infection by use of a novel real time reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* **189**: 652-657
8. Hoek van der L *et al.* (2004) Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* **10**: 368-373
9. Fouchier RAM *et al.* (2004) A previously undescribed coronavirus associated with respiratory disease in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**:6212-6216
10. Woo PC *et al.* (2005) Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol.* **79**: 884-895
11. COGEM. (1999) Advies kennisgeving GGO 98-150 (CGM/990414-03)
12. COGEM. (2001) Genetische modificatie van coronavirussen d.m.v. gerichte homologe RNA recombinatie (CGM/010724-02)
13. COGEM. (2003) Toekenning pathogeniteitsklasse voor het aan SARS geassocieerde coronavirus (CGM/030429-01)
14. Hoek van der L. (2007) Human coronaviruses: what do they cause? *Antiviral therapy* **12**: 651-658
15. Woo PC *et al.* (2005) Clinical and molecular epidemiological features of coronavirus HKU1-associated community-acquired pneumonia. *J. Infect. Dis* **192**: 1898-1907
16. Hofmann H *et al.* (2005) Human coronavirus NL63 employs the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor for cellular entry *Proc. Natl. Acad. Sci.*

COGEM Advies: CGM/090227-03

USA **102**: 7988-7993

17. Bastien N *et al.* (2005) Human coronavirus NL63 infection in Canada. *J. Infect. Dis.* **191**: 503-506
18. Hoek van der L *et al.* (2005) Croup is associated with the novel coronavirus NL63. *PLoS Med.* **2**: e240
19. Woods RD. (2001) Efficacy of a transmissible gastroenteritis coronavirus with an altered ORF-3 gene. *Can. J. Vet. Res.* **65**: 28-32
20. Song DS *et al.* (2003) Differentiation of a Vero cell adapted porcine epidemic diarrhea virus from Korean field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF3. *Vaccine* **21**: 1833-1842