

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

**DATUM** 25 augustus 2020  
**KENMERK** CGM/200825-01  
**ONDERWERP** Advies productie van YFV combinatievaccin met Spike van SARS-CoV-2 virus

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag getiteld 'Productie van virus in zoogdiercellen' (IG 15-186\_Ilk-021), ingediend door Batavia Biosciences B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

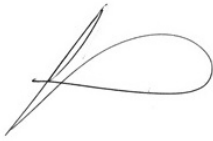
**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van productiewerkzaamheden met een recombinant virusvaccin ter preventie van COVID-19. In het gg-virus, YF-S0, dat gebaseerd is op de Yellow fever virus (YFV) vaccinstam YF-17D, is het gen dat codeert voor het Spike (S)-eiwit van SARS-CoV-2, ingebouwd. In het S-gen is de zogenaamde furine-klievingssite verwijderd, waardoor het S-eiwit geen rol meer kan spelen bij het binnendringen van cellen van de gastheer.

Dit jaar heeft de COGEM twee adviezen uitgebracht over werkzaamheden met recombinante combinatievaccins gebaseerd op YF-17D. Het gg-virus uit deze aanvraag is vergelijkbaar met het construct YF-17D-nCoV-S in het COGEM-advies CGM/200407-03. Op basis van literatuurgegevens en experimentele gegevens die de aanvrager heeft overlegd, is de COGEM van oordeel dat YF-S0 minder virulent en geattenuëerd is ten opzichte van de vaccinstam YF-17D en acht de COGEM de kans op 'pseudotypering' van YF-S0 met het S-eiwit verwaarloosbaar klein. In het onwaarschijnlijk geval dat het S-eiwit toch in het virusdeeltje wordt opgenomen, zal dit niet leiden tot een veranderd gastheerbereik door de verwijdering van de furine-klievingssite in het S-eiwit. De COGEM adviseert de voorgenoemde werkzaamheden uit te voeren op inperkingsniveau ML-II. Indien de werkzaamheden op het geadviseerde inperkingsniveau 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.        - Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo  
              - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's  
                  DG Milieu en Internationaal

# Productie van een YFV combinatievaccin met het SARS-CoV-2 Spike eiwit in zoogdiercellen

## COGEM advies CGM/200825-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een recombinant virusvaccin gebaseerd op de *Yellow fever virus* vaccinstam YF-17D (IG 15-186). De aanvrager, Batavia Biosciences B.V. uit Leiden, wil een gg-YF-17D vaccinkandidaat ter preventie van COVID-19, YF-S0, produceren waarin het gen dat codeert voor het S-eiwit van *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (SARS-CoV)-2 geïnsereerd is. Het S-gen is codon-geoptimaliseerd en de furine-klievingssite is verwijderd, waardoor S-eiwit in de pre-fusie conformatie tot expressie gebracht wordt. Het doel van het YF-S0 vaccin is om een effectieve immuunreactie tegen het S-eiwit op te wekken. Het benodigde DNA-vaccinconstruct en het vanaf dit construct geproduceerde gg-virus worden door een derde (Katholieke Universiteit (KU) van Leuven, België) aangeleverd.

Dit jaar heeft de COGEM twee adviezen uitgebracht over werkzaamheden met recombinante combinatievaccins gebaseerd op YF-17D, eveneens afkomstig van KU Leuven.<sup>1,2</sup> Dit betrof combinatievaccins gericht tegen het *Rabies lyssa virus* (RABV), verschillende flavivirussen (*Japanese encephalitis virus* (JEV) en *Zika virus* (ZIKV))<sup>1</sup>, en tegen SARS-CoV-2.<sup>2</sup> De aanvrager heeft aangegeven dat YF-S0 ‘technisch identiek’ is aan het construct YF-17D-nCoV-S, in het COGEM-advies van april 2020 (CGM/200407-03).<sup>2</sup> Vanwege de overlap tussen de risicobeoordeling van de aanvragen, zal in het onderliggende advies alleen ingegaan worden op aspecten die specifiek zijn voor YF-S0.

#### 1.1 Het construct YF-S0

Het ‘basis-construct’ van YF-S0 bestaat uit de *Yellow fever virus* vaccinstam YF-17D waarmee inmiddels al miljoenen mensen zijn gevaccineerd. YF-17D wordt al langere tijd gebruikt als virale vector om vaccins tegen flavivirussen te ontwikkelen, onder meer door uitwisseling van de prM en E coderende genen, of om zogenaamde combinatievaccins te produceren tegen andere virussen door de insertie van ‘foreign’ epitopes in het genoom.<sup>3,4</sup> In het construct van de onderhavige aanvraag is de coderende sequentie voor het Spike (S)-eiwit van het SARS-CoV-2 ‘in frame’ geïnsereerd tussen de E en NS1 coderende genen van YF-17D.

Het S-eiwit is belangrijk voor het gastheerbereik (tropisme) van SARS-CoV-2. Het is een glycoproteïne dat als homotrimeer geïntegreerd is in de virale envelop van SARS-CoV-2, waarbij onder meer het ‘receptor-binding domain’ (RBD), verantwoordelijk voor de aanhechting van het virus aan de receptor van de gastheercel, uit het virusdeeltje steekt. Na binding aan de receptor van de gastheercel vinden structurele veranderingen plaats in het S-eiwit, die leiden tot de fusie van de virale envelop met het plasmamembraan van de cel, waarna het virale RNA de gastheercel kan binnendringen. SARS-CoV-2 gebruikt het ‘angiotensin converting enzyme’ (ACE)-2 als receptor.<sup>5,6,7</sup>

De sequentie van het S-eiwit in YF-S0 is codon-geoptimaliseerd; de eerste 13 aminozuren van de N-terminale signaalpeptidesequentie zijn verwijderd en de C-terminus is gefuseerd met een extra

transmembraandomein van het E-eiwit uit het *West Nile virus* (WNV). De aanvrager geeft aan dat aanwezigheid van het transmembraandomein van WNV noodzakelijk is om de topologie van het YF-17D polyproteïne in het endoplasmatisch reticulum (ER) te behouden, en voor een juiste verwerking van YFV-eiwitten en het S-eiwit van SARS-CoV-2. Eveneens is de furine-klievingssite verwijderd, waardoor een pre-fusie versie van het S-eiwit tot expressie wordt gebracht.<sup>7</sup>

De aanvrager geeft aan dat YF-S0 ‘technisch identiek’ is aan construct YF-17D-nCoV-S besproken in het COGEM advies CGM/200407-03 ‘Inschaling van *in vitro* en *in vivo* werkzaamheden met gg-Yellow fever virus vaccinstam 17D met het gen dat codeert voor het S-eiwit van SARS-CoV-2’,<sup>2</sup> en dat het S-gen op identieke wijze tussen de E en NS1 coderende genen in het genoom is geïnsereerd. Er wordt in de onderhavige aanvraag onder meer verwezen naar de tekst en (‘supplementary’) figuren uit een publicatie onder ‘peer review’ waarin de constructie en effectiviteit van het kandidaatvaccin YF-S0 worden beschreven.<sup>8</sup> In het construct, beschreven in het eerdere COGEM-advies, zijn de eerste 9 aminozuren van de NS1 sequentie van YF-17D aanwezig vóór de insertie van het S-gen om de signaalpeptidasesequentie te behouden, zodat de ‘processing’ van het polyproteïne correct verloopt.<sup>2</sup> Hierdoor wordt het S-eiwit in het ER uit het YF-17D polyproteïne geknipt. Echter, de COGEM merkt op dat deze informatie niet als zodanig in de onderhavige aanvraag of in het gerefereerde manuscript vermeld staat.

## **1.2 Voorgenomen werkzaamheden**

De aanvrager is voornemens het YF-S0 virus te produceren in zoogdiercellen, na transfectie of electroporatie van BHK-21 of Vero cellen met een bacmide construct. In dit construct (pShuttle/YFV-17D-S) is een cDNA kopie van het gemodificeerde genoom van YF-17D gekloneerd tussen een SV40 promotor aan het 5’ uiteinde en een hepatitis delta virus ribozyme aan het 3’ uiteinde. De werkzaamheden omvatten de productie van het gg-virus YF-S0, infectie van BHK-21 of Vero cellen met YF-S0 (geproduceerd door de aanvrager of verkregen van derden) en handelingen met deze cellen, de productie van gg-virus op kleine schaal en in een bioreactor, en het karakteriseren en opzuiveren van YF-S0.

De aanvrager geeft aan de werkzaamheden op ML-II niveau te willen uitvoeren, met de volgende aanvullende voorschriften:

1. Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw van de werkkleding gedragen;
2. Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd;
3. Medewerkers die zwanger zijn, zijn uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden;
4. De voorschriften voor het werken met bioreactoren zoals beschreven in artikel 9.1.1.3.3.1. van de Regeling ggo<sup>9</sup> worden gehanteerd.

## **2. Eerdere COGEM adviezen**

De COGEM heeft de geattenueerde vaccinstam YF-17D ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2,<sup>10</sup> en SARS-CoV-2 in pathogeniteitsklasse 3.<sup>11</sup> In februari 2020 heeft de COGEM advies uitgebracht over *in vitro*

werkzaamheden met op YFV-17D gebaseerde combinatievaccins gericht tegen RABV en verschillende flavivirussen (YFV, JEV en ZIKV). De COGEM heeft destijds geoordeeld dat deze combinatievaccins tenminste zo geattenuëerd zijn als YF-17D, en adviseerde de voorgenomen werkzaamheden met de combinatievaccins uit te voeren op ML-II niveau.<sup>1</sup>

In april 2020 heeft de COGEM geadviseerd over de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden en vaccinatieproeven in apen met gg-virus YF-17D-nCoV-S. De COGEM stemde in met de door de aanvrager voorgestelde inschaling van de werkzaamheden op MLIII en DM-III niveau met de voorgestelde aanvullende maatregelen.<sup>2</sup>

Het YF-S0 construct is volgens de aanvrager ‘technisch identiek’ aan YF-17D-nCoV-S, die op een vergelijkbare manier ontwikkeld is als het YF-17D-RABV vaccin.

### 3. Overwegingen

Voor de milieurisicobeoordeling van de voorgenomen werkzaamheden is gekeken naar de virulentie van YF-S0 en naar mogelijke ‘pseudotypering’<sup>a</sup> van het gg-virus. Hieronder zullen beide factoren verder worden toegelicht.

#### 3.1 Virulentie van YF-S0

De aanvrager stelt dat gg-virus YF-S0 geattenuëerd is ten opzichte van vaccinstam YF-17D en onderbouwt dit met *in vitro* en *in vivo* experimentele gegevens.<sup>8</sup> Bij ‘plaque-assays’ met BHK21 cellen werden bij YF-S0 kleinere plaques gevonden dan bij YF-17D, hetgeen wijst op attenuatie van het gg-virus. De overleving van BALB/c babymuizen is bij intracraniale injectie van 100 ‘plaque forming units’ (PFU) beter bij YF-S0 dan bij YF-17D. In AG129 muizen die deficiënt zijn voor type-I en type-II interferon, leidde intraperitoneale injectie van 1 PFU YF-17D tot neuro-invasie waarna de muizen geëuthanaseerd moesten worden, terwijl de muizen na injectie met een 1000 maal hogere dosis YF-S0 ziektevrij bleven. Eveneens hadden BALB/c en AG129 muizen nauwelijks gewichtsverlies na vaccinatie met YF-S0, dit in tegenstelling tot muizen die gevaccineerd waren met YF-17D.<sup>8</sup>

Op basis van de experimentele gegevens met YF-S0 is de COGEM van oordeel dat het gg-vaccin YF-S0 minder pathogeen en geattenuëerd is ten opzichte van de vaccinstam YF-17D.

#### 3.2 ‘Pseudotypering’ YF-S0

De aanvrager geeft aan dat ‘pseudotypering’ van YF-S0 met het S-eiwit niet mogelijk is, aangezien het S-eiwit tijdens de maturatie uit het YFV polyproteïne wordt geknipt en via het ER en het Golgi-apparaat uitgescheiden zal worden. Daarnaast noemt de aanvrager dat er geen publicaties zijn waarin beschreven wordt dat ‘pseudotypering’ van flavivirussen met oppervlakte-eiwitten van virussen buiten het genus *Flavivirus* mogelijk is. Door de verwijdering van de furine-klievingssite in het S-eiwit van YF-S0, is membraanfusie en daarmee het binnendringen van de cel geblokkeerd. De aanvrager stelt dat

---

<sup>a</sup> In dit geval wordt met pseudotypering bedoeld dat het gen, coderend voor een niet-eigen virus envelopeiwit, in het genoom is ingebracht. Normaliter wordt de term pseudotypering gebruikt voor de situatie waarbij het eiwit aangeboden wordt aan het virusdeeltje, zonder dat het coderende gen in het genoom is geïnsereerd.

verandering van celtropisme door de aanwezigheid van het S-eiwit in YF-S0 om die reden niet aannemelijk is. Er zijn geen experimentele gegevens overlegd die de afwezigheid van ‘pseudotypering’ ondersteunen.

Ook bij de COGEM zijn geen publicaties bekend waarin beschreven wordt dat ‘pseudotypering’ van flavivirussen, met oppervlakte-eiwitten van virussen buiten het genus *Flavivirus*, mogelijk is. Verder is recent beschreven dat ‘pseudotypering’ ook niet altijd mogelijk is wanneer PrM en E tussen verschillende virussoorten binnen het genus *Flavivirus* worden uitgewisseld.<sup>12</sup>

Het S-eiwit van SARS-CoV-2 bestaat uit twee subeenheden: S<sub>1</sub>, wat betrokken is bij de binding aan de ACE-2 receptor op de gastheer cel, en S<sub>2</sub> dat de membraanfusie faciliteert. Bij SARS-CoV-2 is er een furine-klievingssite aanwezig op de grens tussen de S<sub>1</sub>- en S<sub>2</sub>-subeenheden, die gekleefd wordt tijdens de vorming van virusdeeltjes en een rol speelt in de tropisme van het virus. Membraanfusie gaat gepaard met een conformatieverandering in het S-eiwit van een zogenaamde pre-fusie naar een post-fusie vouwing.<sup>7</sup> Het verwijderen van de klievingssite tussen de S<sub>1</sub> en S<sub>2</sub> subeenheden leidt tot het uitschakelen van de fusie-activiteit van het S-eiwit.<sup>13</sup>

Alles in ogenschouw nemende, concludeert de COGEM dat de kans op ‘pseudotypering’ van YF-S0 met het SARS-CoV-2 S-eiwit verwaarloosbaar klein is. Door het verwijderen van de furine-klievingssite zal, in het onwaarschijnlijke geval dat het S-eiwit op de oppervlakte van het virusdeeltje aanwezig is, dit niet leiden tot verandering van het celtropisme van YF-S0.

#### 4. Conclusie en advies

Alle bovenstaande overwegingen in ogenschouw nemende, adviseert de COGEM de werkzaamheden met YF-S0 in te schalen op ML-II. Op het genoemde inperkingsniveau, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

#### Referenties

1. COGEM (2020). Inschaling werkzaamheden met combinatievaccins gebaseerd op *Yellow fever virus* stam 17D. COGEM advies CGM/200203-01
2. COGEM (2020). Inschaling van in vitro en in vivo werkzaamheden met gg-Yellow fever virus vaccinstam 17D met het gen dat codeert voor het S-eiwit van SARS-CoV-2. COGEM advies CGM/200407-03
3. Bonaldo MC *et al.* (2014). The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines. *Hum. Vacc. Immunother.* 10: 1256-1265.
4. Guy B *et al.* (2010). Preclinical and clinical development of YFV 17D-based chimeric vaccines against dengue, West Nile and Japanese encephalitis viruses. *Vaccine* 28: 632-649
5. 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
6. 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

7. 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
8. Sanchez-Felipe L. *et al.* (2020). A single-dose live-attenuated YF17D-vectored SARS-CoV2 vaccine candidate. *bioRxiv* doi: <https://doi.org/10.1101/2020.07.08.193045>
9. Bijlage 9 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013.  
<https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2020-07-01#Bijlage9> (bezoekt 21 augustus 2020)
10. COGEM (2019). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene RNA en DNA virussen (2019). COGEM advies CGM/190905-02
11. COGEM (2020). Pathogeniteitsclassificatie en inschaling van werkzaamheden met het nieuwe coronavirus 2019-nCoV uit Wuhan. COGEM advies CGM/200211-01
12. Hobson Peters J *et al.* (2019). A recombinant platform for flavivirus vaccines and diagnostics using chimeras of a new insect-specific virus. *Sc. Translat. Med.* 11: doi:10.1126/scitranslmed.aax7888  
<https://stm.sciencemag.org/content/11/522/eaax7888> (bezoekt: 25 augustus 2020)
13. Hoffmann M *et al.* (2020). A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 Is essential for infection of human lung cells. *Mol. Cell* 78: 779-784.e5