

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

DATUM 08 maart 2023
KENMERK CGM/230308-01
ONDERWERP Advies werkzaamheden VSIVΔG gepseudotyperd met CoV-S

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende dossier IG 20-018_2.8-004 getiteld 'Vesicular stomatitis virus pseudotyperen met coronavirus fusie eiwitten', ingediend door het Erasmus M.C., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de omlaagschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-)Vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV), waarvan het G-eiwit is vervangen door het S-eiwit van verschillende coronavirussen (gg-VSIVΔG-CoV-S). De aanvrager verzoekt de werkzaamheden uit te voeren op ML-II, met inbegrip van enkele aanvullende werkvoorschriften.

VSIV veroorzaakt ziekte in vee met symptomen die lijken op mond- en klauwzeer, en is als klasse 3 pathogeen geclassificeerd. Coronavirussen kunnen vogels en verschillende zoogdiersoorten, waaronder de mens, infecteren en in deze dieren ziekte veroorzaken. De meeste geclassificeerde coronavirussen zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2, met uitzondering van MERS-CoV, SARS-CoV en SARS-CoV-2, die als klasse 3 pathogenen zijn ingedeeld.

De COGEM is van oordeel dat de te produceren gg-VSIVΔG-CoV-S verzwakt zijn ten opzichte van wildtype VSIV. Zij kan op basis van de huidige beschikbare informatie niet uitsluiten dat dieren die vatbaar zijn voor zowel coronavirus als VSIV, geïnfecteerd kunnen worden met gg-VSIVΔG-CoV-S, waarbij verdere verspreiding mogelijk is.

Alles in overweging nemende, adviseert de COGEM om de werkzaamheden met gg-VSIVΔG-CoV-S in te schalen op ML-II, mits open handelingen plaatsvinden in een veiligheidskabinet van klasse II, handschoenen gedragen worden, contact met gevoelige diersoorten tot 3 dagen na de werkzaamheden vermeden wordt en alleen sequenties gebruikt worden van thans geclassificeerde coronavirussen.

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

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM lid dr. M. de Graaf niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Inschaling van werkzaamheden met gg-VSIV gepseudotypeerd met het S-glycoproteïne van verschillende coronavirussen

COGEM advies CGM/230308-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een genetisch gemodificeerd (gg-) Vesicular Stomatitis Indiana Virus (VSIV) waarbij het G-eiwit volledig is vervangen door het Spike glycoproteïne (S) van coronavirussen uit pathogeniteitsklasse 2 en 3 (IG 20-018). De aanvraag is afkomstig van het Erasmus Medisch Centrum. De aanvrager verzoekt de voorgenoemde werkzaamheden met gg-VSIVΔG-CoV-S virussen uit te voeren op inperkingsniveau ML-II met inachtnaam van enkele aanvullende voorschriften.

2. *Vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV)*

Het Vesicular stomatitis Indiana virus (VSIV, ook wel VSV genoemd) behoort binnen de familie van de *Rhabdoviridae* tot het genus *Vesiculovirus*.¹ De 'International Committee on Taxonomy' (ICTV) heeft in 2016 de soortnaam van VSIV gewijzigd in *Indiana vesiculovirus*.²

VSIV heeft als primaire gastheren knaagdieren, vee, varkens en paarden.³ Het virus is enzoötisch in de Verenigde Staten, Midden-Amerika en een deel van Zuid-Amerika, en veroorzaakt vesiculaire stomatitis bij runderen, schapen, varkens en paarden. Deze ziekte is besmettelijk, wordt gekenmerkt door blaasjes op de tong, het tandvlees, de uiers en de hoeven van de dieren, en lijkt sterk op mond-en-klauwzeer.^{4,5} Een uitbraak van VSIV kan tot grote economische schade leiden. Het virus wordt overgedragen door insecten, via direct contact met wondjes op de huid van besmette dieren, of via inhalatie van virus bevattende aerosolen.^{4,5,6}

VSIV kan ook mensen infecteren. Infectie vindt vaak plaats via blootstelling aan geïnfecteerde dieren. Ook is infectie door blootstelling aan het virus in het laboratorium beschreven.^{3,5} De humane infecties verlopen meestal zonder klinische verschijnselen, hoewel sommige mensen griepachtige symptomen ontwikkelen.^{3,7} In zeer uitzonderlijke gevallen kan encefalitis optreden na infectie met VSIV.⁸ Verspreiding tussen mensen onderling is niet gerapporteerd.⁹

VSIV heeft een niet-gesegmenteerd negatief enkelstrengs RNA-genoom. De virusdeeltjes worden omhuld door een membraan.^{5,7} Het genoom codeert voor vijf eiwitten: het 'nucleoprotein' (N), het 'phosphoprotein' (P), het 'large protein' (L), het 'matrixprotein' (M) en het 'glycoprotein' (G). De N-, L- en P-eiwitten vormen een RNA-afhankelijk RNA-polymerase complex dat verantwoordelijk is voor zowel virale transcriptie als replicatie. Het G-eiwit zit in het membraan verankerd en is betrokken bij de hechting aan en fusie met de gastheercel. Het M-eiwit speelt een belangrijke rol in de constructie van het virus, remming van de genexpressie van de gastheer, virus 'budding' en apoptose (geprogrammeerde celdood).^{5,10,11} VSIV kent een breed celtropisme. De 'low density lipoprotein' receptor (LDLR) en leden van de LDLR familie zijn geïdentificeerd als de cellulaire receptoren voor VSIV infectie.¹²

3. Coronavirussen

Coronavirussen (familie *Coronaviridae*) worden onderverdeeld in vier genera: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* en *Deltacoronavirus*.¹³ Gamma- en deltacoronavirussen infecteren voornamelijk vogels, terwijl alpha- en betacoronavirussen verschillende zoogdiersoorten kunnen infecteren, waaronder de mens.¹⁴ Eén van de meest bekende coronavirussen is het sinds december 2019 wereldwijd circulerende SARS-CoV-2 (species *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus*, genus *Betacoronavirus*).¹⁵

Coronavirussen bezitten een positief enkelstrengs 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 15 tot 16 niet-structurele eiwitten (nsps) die onder meer een rol spelen bij RNA-replicatie.¹⁴ De andere ORF's aan het 3' uiteinde coderen voor de structurele eiwitten (S, E, M, en N) en tot acht zogenoemde 'accessory' of accessoire eiwitten (afhankelijk van de coronavirus species).¹⁴

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens replicatiecompetente gg-VSIVΔG virussen te produceren die gespeudotypeerd^a zijn met het S-eiwit van coronavirussen, zowel uit pathogeniteitsklasse 2 als 3. In deze gg-virussen is de sequentie coderend voor het S-eiwit van coronavirus geïnsereerd op de positie van de G-coderende sequentie in het VSIV genoom; daarbij is de G-sequentie uit het genoom verwijderd (gg-VSIVΔG-CoV-S). Ook is het gen voor een 'enhanced green fluorescent protein' (eGFP) in het VSIV genoom geïnsereerd. Voor de 'rescue' van de virussen zullen verschillende cellijnen (HEK293T, BHK-21, Vero, Vero-E6, Vero-TMPRSS2, VeroE6-TMPRSS2) worden getransfecteerd met een plasmide dat een antisense kopie van het gg-VSIV-genoom bevat (waarin de coderende sequentie van het G-eiwit is vervangen door die van het S-eiwit van het betreffende coronavirus) achter een T7-promoter, een plasmide dat T7-polymerase tot expressie brengt, en expressieplasmiden voor de N-, P, M-, L- en G-eiwitten van VSIV. De geproduceerde gg-VSIVΔG-CoV-S virussen zullen meerdere infectieronden worden gepasseerd op cellen, waarna ontstane mutaties in het S-eiwit worden bestudeerd. De aanvrager geeft aan dat deze experimenten van belang zijn om toekomstige uitbraken met coronavirussen te kunnen voorspellen en hierop te kunnen anticiperen. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden in te schalen op ML-II, met de volgende aanvullende voorschriften:

- Open handelingen worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet van klasse II;
- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen.

^a Hier wordt met pseudotypering bedoeld dat ook 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.

5. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft VSIV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3 omdat het virus gemakkelijk tussen dieren wordt overgedragen en de consequenties van een ontsnapping naar het milieu aanzienlijk kunnen zijn.¹⁶ De door COGEM geclassificeerde coronavirussen zijn vrijwel allemaal ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2,¹⁷ met uitzondering van SARS-CoV,¹⁸ SARS-CoV-2¹⁹ en MERS-CoV²⁰ die in pathogeniteitsklasse 3 zijn ingedeeld.

De COGEM heeft meerdere malen positief geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met VSIV(Δ G) chimere met heterologe oppervlakte-eiwitten. In verschillende verzoeken tot omlaagschaling van gg-VSIV, waarbij het gen coderend voor het G-eiwit vervangen werd door het gen coderend voor het G-eiwit van het Ebolavirus (gg-VSIV-ZEBOV)²¹ of het GPC-eiwit van het Lassa virus (VSV Δ G/LASVGPC)²², achtte de COGEM het gg-VSIV-ZEBOV vaccin op basis van vaccinatie-studies bij mensen en dieren voldoende geattenuëerd ten opzichte van wildtype VSIV om omlaagschaling van ML-III naar ML-II niveau te rechtvaardigen, onder voorwaarde van enkele aanvullende voorschriften.

Ook heeft de COGEM in 2020 geadviseerd over productiewerkzaamheden (ontdooien, formuleren en het uitvullen in ampullen) met een gg-VSIV, waarvan het gen coderend voor het G-eiwit is vervangen door het gen dat codeert voor het S-eiwit van SARS-CoV-2 (rVSIV Δ G-CoV2-S).²³ De COGEM adviseerde dat de werkzaamheden op MI-III konden worden uitgevoerd, met inbegrip van de door de aanvrager/BGGO voorgestelde aanvullende maatregelen. Daar bovenop adviseerde de COGEM dat de buitenkant van de ampullen na het vullen niet besmet mocht zijn en dat contact met gevoelige dieren door medewerkers vermeden moest worden tot drie dagen na het uitvoeren van handelingen met rVSIV Δ G-CoV2-S. In een vervolgadvisie oordeelde de COGEM dat rVSIV Δ G-CoV2-S geattenuëerd is ten opzichte van wildtype VSIV en dat werkzaamheden met dit virus op ML-II kunnen plaatsvinden, met als aanvullende maatregelen dat open handelingen in een veiligheidskabinet van klasse II worden uitgevoerd en tijdens de werkzaamheden handschoenen worden gedragen. Tevens werd toegelicht dat alleen runderen, schapen, varkens en paarden als bevattelijke dieren worden beschouwd.²⁴

6. Overweging en advies

VSIV is een diervirus; infectie van mensen is mogelijk, maar er is tot op heden geen verspreiding van mens op mens gerapporteerd. In de onderhavige aanvraag is de aanvrager voornemens een chimeer VSIV te produceren, waarin de sequentie van het VSIV-G eiwit vervangen is door de sequentie van het S-eiwit van coronavirussen. Voor de overweging van de inschaling van de werkzaamheden van het chimere virus rVSIV Δ G-CoV-S spelen een aantal aspecten een rol, die hieronder puntsgewijs zullen worden behandeld.

6.1 Attenuatie van gg-VSIV Δ G-CoV-S

De aanvrager stelt dat de te produceren gg-VSIV Δ G-CoV-S virussen geattenuëerd zullen zijn ten opzichte van het VSIV wildtype virus vanwege de deletie van het gen coderend voor het G-eiwit. Ter onderbouwing overlegt de aanvrager enkele wetenschappelijke publicaties over vergelijkbare gg-VSIV Δ G virussen waarbij de coderende sequentie van de envelopeiwitten van verschillende virussen in

het VSIV-ΔG genoom zijn geïnserieerd en onderzocht zijn als potentieel vaccin of oncolytische therapie. Het gaat daarbij om de glycoproteïnen uit onder andere het Chikungunya virus, H5N1 influenza virus, Lassa virus, lymphocytic choriomeningitis virus, Ebola virus, en de coronavirussen MERS-CoV en SARS-CoV-2.^{25,26,27,28,29,30,31,32,33,34} De aanvrager geeft tevens aan dat de te gebruiken gg-VSIV stam geattenuëerd is ten opzichte van de natuurlijk voorkomende VSIV stammen, mogelijk veroorzaakt door laboratorium-adaptatie van het virus,^{35,36} en dat aanwezigheid van het eGFP in de gg-VSIVΔG-CoV-S virusdeeltje het virus verder zal attenueren.³⁷ Experimentele gegevens over de attenuering van de in onderhavige aanvraag te produceren gg-VSIVΔG-CoV-S virussen zijn niet beschikbaar.

Het gg-VSIVΔG-CoV-S uit de vergunningaanvraag betreft een replicatiecompetent gg-virus, waarbij het G-eiwit, dat een belangrijke virulentiefactor is³⁸ en verantwoordelijk is voor de aanhechting van wildtype VSIV aan de LDL-receptor, vervangen is door het S-eiwit van verschillende coronavirussen. Het S-eiwit van coronavirussen is verantwoordelijk voor de binding aan en infectie van de gastheercellen en speelt eveneens een belangrijke rol in de pathogeniteit van en immuniteit tegen het virus.¹⁴

Voor de hierboven genoemde vergelijkbare VSIVΔG-constructen met heterologe oppervlakte-eiwitten is beschreven dat deze chimere virussen geattenuëerd zijn ten opzichte van het wildtype VSIV. In enkele preklinische studies naar een rVSIVΔG-SARS-CoV-2-S vaccin in dieren, waaronder een beperkt aantal varkens (n=6)³⁹ en goudhamsters³², zijn geen ziekteverschijnselen waargenomen. De COGEM acht het niet aannemelijk dat het mechanisme achter de attenuatie anders zou zijn bij gebruik van heterologe oppervlakte-eiwitten afkomstig van verschillende thans bekende coronavirussen, ongeacht in welke pathogeniteitsklasse zij ingedeeld zijn. De COGEM heeft in 2020 over een vergunningaanvraag voor kleinschalige handelingen met rVSIVΔG-CoV2-S (waarin het gen dat codeert voor het G-eiwit vervangen is door het SARS-CoV-2 S-gen) geadviseerd dat deze op ML-II plaats konden vinden, onder voorwaarde van enkele aanvullende maatregelen.²⁴ In analogie met de vergelijkbare VSIVΔG-constructen waarbij het gen coderend voor een heteroloog oppervlakte-eiwit is geïnserieerd, acht de COGEM het aannemelijk dat de te produceren gg-VSIVΔG-CoV-S virussen geattenuëerd zullen zijn ten opzichte van wildtype VSIV. Tevens is de insertie van eGFT in het gg-VSIVΔG-CoV-S virusdeeltje attenuerend.

De aanvrager vermeldt dat tijdens de productie van de gepseudotypeerde gg-VSIVΔG-CoV-S virussen het G-eiwit *in trans* wordt aangeboden vanaf een expressieplasmide. Dit zou de rescue-efficiëntie verhogen middels het fuseren van cellen. Wanneer er overlappende sequenties aanwezig zijn, bestaat het risico dat er tijdens de productie recombinatie optreedt tussen het plasmide dat het virale genoom van VSIVΔG-CoV-S bevat en de sequentie van het VSIV-G eiwit in de expressieplasmide. De aanvrager geeft echter aan dat er geen overlappende sequenties zijn tussen het VSIVΔG-CoV-S genoom en de VSV-G expressieplasmide, waardoor de kans op recombinatie verwaarloosbaar klein is. Daarnaast is recombinatie van negatieve (ss)RNA virussen zeer zeldzaam.⁴⁰ De *Rhabdoviridae* staan nauwelijks bekend om het ontstaan van recombinanten.

Er wordt in de aanvraag niet ingegaan op het ontstaan van gg-VSIVΔG-CoV-S virusdeeltjes die gepseudotypeerd zijn met het VSIV-G eiwit. Omdat de sequentie van het VSIV-G eiwit in de gg-

VSIVΔG-CoV-S virusdeeltjes ontbreekt, kunnen echter na één infectieronde geen VSIV-G gepseudotyperde VSIV-ΔG-CoV-S virusdeeltjes meer ontstaan.

6.2 Tropisme van gg-VSIVΔG-CoV-S

In de te produceren VSIVΔG-CoV-S virussen zal het S-eiwit in het membraan van de virusdeeltjes worden opgenomen en zal het tropisme van het virus veranderen ten opzichte van het wildtype VSIV. De aanvrager stelt dat de gg-VSIVΔG-CoV-S virussen een kleiner gastheerbereik zullen hebben dan het wildtype VSIV. Tevens geeft de aanvrager aan dat bij de voorgenomen herhaaldelijke passages op gevoelige cellen mutaties in het S-eiwit kunnen ontstaan die mogelijk veranderingen in het tropisme en gastheerbereik van het gg-VSIVΔG-CoV-S teweeg kunnen brengen. De kans dat gg-VSIVΔG-CoV-S met betrekking tot de transmissie, virulentie en het gastheerbereik door het passeren vergelijkbaar zal worden aan dat van wildtype VSIV, acht de aanvrager verwaarloosbaar klein.

De COGEM acht het aannemelijk dat het tropisme van rVSIVΔG-CoV-S beperkter zal zijn dan dat van wildtype VSIV door de afwezigheid van het G-eiwit, dat voor een breed tropisme zorgt (VSIV kan vrijwel alle humane cellen, en daarnaast ook verschillende andere organismen infecteren).⁴¹ Voor coronavirussen zijn verschillende celreceptoren beschreven. Zo maakt SARS-CoV-2 voor infectie en membraanfusie gebruik van de ‘angiotensin convertende enzyme’ (ACE)-2 receptor en het ‘transmembrane protease, serine 2’ (TMPRSS2) van de gastheer cel.^{42,43,44,45} In afwezigheid van TMPRSS2 is het protease cathepsin L van de gastheer cel betrokken bij de membraanfusie.⁴⁵ Het MERS-CoV S-eiwit kan binden aan de dipeptidyl peptidase 4 (DPP4 ofwel CD26) die onder meer op humane cellen voorkomt.⁴⁶ Het *Human coronavirus 229E* daarentegen gebruikt de humane gastheerreceptor aminopeptidase N (APN, ofwel CD13).⁴⁷ Het herhaaldelijk passeren van de rVSIVΔG-CoV-S virussen kan invloed hebben op het tropisme, en mogelijk ook op andere eigenschappen van het chimere virus. Zo kan verdere aanpassing aan de gebruikte cellijn optreden, waarbij verdere attenuatie een mogelijkheid is. Een toename in virulentie of transmissie, of verandering van gastheerbereik door mutaties in het S-eiwit bij herhaalde passage acht de COGEM onwaarschijnlijk. Hierbij speelt mee dat de coronavirus S-eiwitten tot een andere klasse behoren (klasse I fusie-eiwitten) dan VSIV-G eiwitten (klasse III fusie-eiwitten), en dat bij celweek niet geselecteerd wordt op het verhogen van deze eigenschappen; hiervoor zijn verdere (evolutionaire) adaptaties nodig die niet zullen plaatsvinden onder laboratoriumomstandigheden.

6.3 Verspreiding in het milieu

Zoals eerder in het advies is aangegeven, is VSIV een diervirus. VSIV kan mensen infecteren, maar transmissie tussen mensen is tot op heden niet gerapporteerd. Aangenomen wordt dat de aangeboren immuniteit (onder meer door de productie van interferon-alfa en -beta) verantwoordelijk is voor het zelf-limiterende karakter van een infectie met VSIV.^{27,48} Om die reden is het niet aannemelijk dat de transmissie van het gg-VSIVΔG-CoV-S tussen mensen mogelijk zal zijn, wanneer het oppervlakte-eiwit van VSIV is vervangen voor het S-eiwit in het rVSIVΔG-CoV-S virusdeeltje. Ook voor het ebolavaccin rVSIVΔG-ZEBOV, waarbij de receptor voor het ingebrachte Ebolavirus GP-eiwit alleen voorkomt in mensen en apen, is geen transmissie van mens op mens waargenomen.²⁷

VISV kan uiteenlopende diersoorten infecteren. Coronavirussen kunnen vogels en verschillende zoogdiersoorten infecteren, waaronder de mens. Opname van het S-eiwit van verschillende coronavirussen in de gg-VSIVΔG-CoV-S virusdeeltjes zou in theorie kunnen leiden tot binding van de virusdeeltjes aan de receptoren van verschillende zoogdieren en vogels. Het is derhalve niet geheel uit te sluiten dat gg-VSIVΔG-CoV-S meerdere diersoorten zou kunnen infecteren. Of blootstelling van gevoelige dieren aan gg-VSIVΔG-CoV-S daadwerkelijk zal leiden tot een volwaardige infectie waarbij uitscheiding en transmissie op kan treden, is mogelijk mede afhankelijk van het gebruikte S-eiwit. In een eerder advies heeft de COGEM geconcludeerd dat het onwaarschijnlijk is dat opname van het S-eiwit van SARS-CoV-2 in rVSIVΔG-CoV2-S virusdeeltjes kan leiden tot een volwaardige infectie en ziekte in katten en honden. Of dit ook opgaat voor dieren die zowel vatbaar zijn voor coronavirussen als VISV (i.e., runderen, schapen, varkens en paarden) is vooralsnog onduidelijk.

7. Conclusie

De COGEM acht het aannemelijk dat het gg-VSIVΔG-CoV-S voldoende geattenuëerd is ten opzichte van het wild-type VSIV om omlaagschaling van de voorgenomen werkzaamheden van ML-III naar ML-II niveau te rechtvaardigen.

De COGEM kan niet uitsluiten dat een eventueel besmette medewerker infectieus virus in het milieu zal uitscheiden. Om te voorkomen dat de medewerker besmet raakt met het gg-VSIVΔG-CoV-S en om eventuele verspreiding in het milieu te minimaliseren, adviseert de COGEM de volgende aanvullende werkvoorschriften in acht te nemen:

- Open handelingen worden uitgevoerd in een VK-II kabinet;
- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- Laboratoriummedewerkers mogen geen contact hebben met runderen, schapen, varkens en paarden tot 3 dagen na het werken met gg-VSIVΔG-CoV-S;
- De te produceren gg-VSIVΔG-CoV-S virusdeeltjes zullen uitsluitend sequenties bevatten van de coronavirussen die op het moment van schrijven op Bijlage 4 van de Regeling ggo vermeld worden.

Op genoemd inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende werkvoorschriften acht de COGEM de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

8. Aanvullende opmerking

De COGEM heeft als aanvullend werkvoorschrift geadviseerd dat er alleen chimereën geproduceerd mogen worden met de thans geclassificeerde coronavirussen. De onderhavige vergunningaanvraag betreft een brede aanvraag waarbij de S-sequenties van alle coronavirussen opgenomen op Bijlage 4 van de Regeling ggo in het gg-VSIVΔG construct geïnsereerd kunnen worden. Met betrekking tot de huidige geclassificeerde coronavirussen, met name uit pathogeniteitsklasse 3 (i.e., MERS-CoV, SARS-CoV en SARS-CoV2), zijn er op dit moment voldoende (pre)klinische gegevens beschikbaar om tot een advies te komen voor de inschaling van werkzaamheden met VSIVΔG-chimereën die sequenties van deze coronavirussen bevatten. Het is op voorhand niet uit te sluiten dat nog niet geïdentificeerde

coronavirussen eigenschappen hebben die afwijken van de thans bekende coronavirussen. Daarom is de COGEM van oordeel dat voor nieuwe nog niet geïdentificeerde coronavirussen eerst meer gegevens overlegd dienen te worden alvorens werkzaamheden met VSIVΔG-chimeren die sequenties van een dergelijk nieuw coronavirus bevatten, op ML-II plaats kunnen vinden.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 3 maart 2023)
2. International Committee on Taxonomy of Viruses. The online (10th) report of the ICTV. *Indiana vesiculovirus*. https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20171794 (bezocht: 3 maart 2023)
3. Lichty BD *et al.* (2004). Vesicular stomatitis virus: re-inventing the bullet. *Trends Mol. Med.* 10: 210-216
4. Letchworth GJ *et al.* (1999). Vesicular stomatitis. *Vet. J.* 157: 239-60
5. Lyles DS *et al.* (2013). *Rhabdoviridae*. In: Fields Virology, 6th ed.. Ed. Knipe MD & Howley PM. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
6. Rozo-Lopez P *et al.* (2018). Vesicular stomatitis virus transmission: A comparison of incriminated vectors. *Insects* 9: 190
7. International Committee on Taxonomy of Viruses. *Genus: Vesiculovirus*. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/mononegavirales/w/rhabdoviridae/805/genus-vesiculovirus (bezocht: 24 september 2020)
8. Quiroz E *et al.* (1988). A human case of encephalitis associated with vesicular stomatitis virus (Indiana serotype) infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 39: 312-314
9. Public Health Agency of Canada (2012). www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/vesicular-stomatitis-virus.html (bezocht: 24 september 2020)
10. Ahmed M *et al.* (2003). Ability of the matrix protein of vesicular stomatitis virus to suppress beta interferon gene expression is genetically correlated with the inhibition of host RNA and protein synthesis. *J. Virol.* 77: 4646-4657
11. von Kobbe C *et al.* (2000). Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell gene expression by targeting the nucleoporin Nup98. *Mol. Cell* 6: 1243-1252
12. Finkelshtein D *et al.* (2013). LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 110: 7306–7311.
13. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy: 2019 Release. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht op 06-03-2022)
14. 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)
15. 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

16. COGEM (2011). Classificatie van Vesicular stomatitis virus en inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde VSV deeltjes. COGEM advies CGM/110815-03
17. COGEM (2021). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificatielijsten met humaan- en dierpathogene RNA- en DNA-virussen (2021). COGEM advies CGM/211117-01
18. COGEM (2003). Toekenning pathogeniteitsklasse voor het aan SARS geassocieerde coronavirus. COGEM advies CGM/030429-01
19. COGEM (2020). Pathogeniteitsclassificatie en inschaling van werkzaamheden met het nieuwe coronavirus 2019-nCoV uit Wuhan. COGEM advies CGM/200211-01
20. COGEM (2013). Inschaling van werkzaamheden met gg- Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus. COGEM advies CGM/130822-01
21. COGEM (2016). Omlaagschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg)-Vesicular stomatitis Indiana virus. COGEM advies CGM/160310-01
22. COGEM (2018). Inschaling van werkzaamheden met Vesicular stomatitis Indiana virus voorzien van het oppervlakte-eiwit van Lassa virus. COGEM advies CGM/181025-01
23. COGEM (2020). Inschaling productiewerkzaamheden met het rVSIVΔG-CoV2-S vaccin tegen COVID-19. COGEM advies CGM/201006-03
24. COGEM (2020). Vervolgadvies over de inschaling van productiewerkzaamheden met het rVSIVΔG-CoV2-S vaccin tegen COVID-19. COGEM advies CGM/201209-04
25. Lui R *et al.* (2018). A recombinant VSV-vectored MERS-CoV vaccine induces neutralizing antibody and T cell responses in rhesus monkeys after single dose immunization. *Antiviral Res.* 150: 30-38
26. Mire CE *et al.* (2012). Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Vaccine Vectors Expressing Filovirus Glycoproteins Lack Neurovirulence in Nonhuman Primates. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6: e1567
27. Monath TP *et al.* (2019). rVSVΔG-ZEBOV-GP (also designated V920) recombinant vesicular stomatitis virus pseudotyped with Ebola Zaire Glycoprotein: Standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment. *Vaccine: X* 1: 100009
28. Garbutt M *et al.* (2004). Properties of Replication-Competent Vesicular Stomatitis Virus Vectors Expressing Glycoproteins of Filoviruses and Arenaviruses. *J. Virol.* 78: 5458-5465
29. Van den Pol AN *et al.* (2017). Chikungunya, Influenza, Nipah, and Semliki Forest Chimeric Viruses with Vesicular Stomatitis Virus: Actions in the Brain. *J. Virol.* 91: e02154-16.
30. Muik A *et al.* (2014). Re-engineering vesicular stomatitis virus to abrogate neurotoxicity, circumvent humoral immunity, and enhance oncolytic potency. *Cancer Res.* 74: 3567-3578
31. Wollmann G *et al.* (2015). Lassavesicular stomatitis chimeric virus safely destroys brain tumors. *J. Virol.* 89: 6711– 6724
32. Yahalom-Ronen Y *et al.* (2020). A single dose of recombinant VSV-ΔG-spike vaccine provides protection against SARS-CoV-2 challenge. *Nat. Commun.* 11: 6402
33. Case JB *et al.* (2020). Replication-competent vesicular stomatitis virus vaccine vector protects against SARS-CoV-2-mediated pathogenesis in mice. *Cell Host Microbe* 28: 465-474.e4
34. Robbins JA *et al.* (2022). Safety and immunogenicity of intramuscular, singledose V590 (rVSV-SARS-CoV-2 Vaccine) in healthy adults: Results from a phase 1 randomised, doubleblind, placebo-controlled, dose-ranging trial. *eBio Medicine* 82: 104138

35. Roberts A *et al.* (1998). Vaccination with a Recombinant Vesicular Stomatitis Virus Expressing an Influenza Virus Hemagglutinin Provides Complete Protection from Influenza Virus Challenge. *J. Virol.* 72: 4704-4711
36. Roberts A *et al.* (1999). Attenuated Vesicular Stomatitis Viruses as Vaccine Vectors. *J. Virol.* 73: 3723-3732
37. Whelan SPJ *et al.* (2000). Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 8388-8392
38. Martinez I *et al.* (2003). Vesicular stomatitis virus glycoprotein is a determinant of pathogenesis in swine, a natural host. *J. Virol.* 77: 8039-8047
39. Madar-Balakirski N *et al.* (2022). Preliminary nonclinical safety and immunogenicity of an rVSV-ΔG-SARS-CoV-2-S vaccine in mice, hamsters, rabbits and pigs. *Arch. Toxicol.* 96: 859-875
40. Simon-Loriere E & Holmes EC (2011). Why do RNA viruses recombine? *Nat. Rev. Microbiol.* 9:617-626
41. Hastie E *et al.* (2013). Understanding and altering cell tropism of vesicular stomatitis virus. *Virus Res.* 176: doi:10.1016/j.virusres.2013.06.003
42. Walls AC *et al.* (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell* 181: 281–292
43. 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
44. 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
45. Jackson CB *et al.* (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23: 3–20
46. Wang N *et al.* (2013). Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4. *Cell Res.* 23: 986-993
47. Yeager C. L. *et al.* (1992) Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature* 357: 420–422
48. Van den Broek MF *et al.* Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol Rev* 1995;148:5–18