



NEDEPLANDSE ORDE VAN ADVOCATEN

Uitsluitend per e-mail
Ministerie van Justitie en Veiligheid
t.a.v. de heer dr. mr. F.B.J. Grapperhaus

Den Haag, 4 juni 2020
dossiernummer: 109023
uw kenmerk: n.v.t.
telefoonnummer: [redacted]
e-mail: [redacted]@advocatenorde.nl

Betref: wetsvoorstel: tijdelijke bepalingen in verband met maatregelen ter bestrijding van de epidemie van covid-19 voor de langere termijn (tijdelijke wet maatregelen covid-19)

Geachte minister,

Bij brief van 29 mei 2020 heeft u de Nederlandse orde van advocaten (NOvA) ter consultatie voorgelegd het concept wetsvoorstel 'tijdelijke bepalingen in verband met maatregelen ter bestrijding van de epidemie van covid-19 voor de langere termijn (tijdelijke wet maatregelen covid-19)'. De NOvA voldoet graag aan uw verzoek en heeft zijn adviescommissies rechtsstatelijkheid, strafrecht en bestuursrecht gevraagd te adviseren.

Bijgaand stuur ik u de adviezen van de adviescommissies. De algemene raad sluit zich aan bij de overwegingen van de adviescommissies en verzoekt u deze bij de verdere uitwerking te betrekken. Op basis van deze adviezen plaatst de NOvA vraagtekens bij de wenselijkheid en noodzakelijkheid van dit wetsvoorstel en ziet voldoende ruimte in de noodverordeningen dan wel het bestaand instrumentarium. Nieuwe wetgeving is dan ook niet nodig.

Hierbij komen de zorgen over de werkingsduur en de mogelijkheid van verlenging van dit wetsvoorstel. Deze maken de voorgestelde maatregelen de facto van onbepaalde tijd en zijn daarmee te lang gelet op de diverse grondrechten beperkende bepalingen van dit wetsvoorstel.

Aandacht vraagt de NOvA ook voor de voorgestelde straffen. De proportionaliteitstoets wordt daar in veel gevallen niet doorstaan.

De NOvA heeft vanwege de huidige uitzonderlijke omstandigheden begrip voor gewenste spoedeisendheid. Een dergelijk belangrijk wetsvoorstel moet evenwel ook zorgvuldig worden bestudeerd en becommentarieerd. De gegeven reactietermijn, mede gezien de omvang van het wetsvoorstel, leidde er toe dat op hoofdlijnen moest worden gereageerd. De NOvA maakt zich in dit verband dan ook zorgen over de

Bezoekadres
Neuhuyskade 94
2596 XM Den Haag
Tel. 070 300 0000


Postadres
Postbus 30851
2500 GW Den Haag

www.advocatenorde.nl

NEDERLANDSE ORDE VAN ADVOCATEN

zorgvuldigheid en kwaliteit van wetgeving. Een langere reactietermijn was in dit verband dan ook aan te bevelen.

Met de meeste hoogachting,
namens de algemene raad,

mw. 
algemeen secretaris

bijlage: advies van de adviescommissies

ADVIES

Van:	adviescommissie rechtsstatelijkheid
Datum:	3 juni 2020
Betreft:	tijdelijke bepalingen in verband met maatregelen ter bestrijding van de epidemie van covid-19 voor de langere termijn (tijdelijke wet maatregelen covid-19)

SAMENVATTING**Opmerking vooraf**

- Gezien de korte termijn (tot donderdag 4 juni) die is gegeven om te reageren op het wetsvoorstel heeft de adviescommissie rechtsstatelijkheid zich moeten beperken tot een reactie op hoofdlijnen. De adviescommissie rechtsstatelijkheid heeft vanwege de huidige uitzonderlijke omstandigheden begrip voor de gewenste spoedeisendheid. De commissie meent dat dit evenwel niet te koste mag gaan van zorgvuldigheid en kwaliteit van wetgeving en maakt zich hier zorgen over.
- Dit advies heeft dan ook een voorlopig karakter, dat te zijner tijd uitgebreid of bijgesteld kan worden na rustiger overweging.

Conclusie

- De adviescommissie staat kritisch tegenover de omvang, proportionaliteit en effectiviteit van dit wetsvoorstel. Dit geldt met name ten aanzien van de onbepaalde duur van de diverse grondrechten beperkende bepalingen en bevoegdheden.
- Het wetsvoorstel maakt het mogelijk te veel en te ver gaande beperkingen van bewegings- en vergadervrijheden voor een onbepaalde periode normaal te maken; beperkingen die niet normaal zijn en ook niet behoren te zijn in een democratische samenleving.
- De adviescommissie acht op zichzelf juist dat de beperking van grondrechten en -vrijheden in een wet in formele zin wordt geregeld, maar vraagt zich af waarom de kennelijk beoogde inmenging in grondrechten en -vrijheden niet reeds in voldoende mate geregeld kan worden door het inzetten van tijds- en plaatsgebonden noodverordeningen zoals de noodwetgeving thans mogelijk maakt.
- Voor zover het antwoord op voornoemde vraag is dat de bevoegdheid om noodverordeningen af te kondigen onvoldoende ver gaat om de met dit wetsvoorstel beoogde inmenging in grondrechten en -vrijheden te bereiken, is zulks een reden om dit wetsvoorstel niet, en zeker niet op deze overhaaste wijze, in overweging te nemen zonder een diepgaande kritische toetsing aan de Grondwet en internationale verdragen en een rustig en weloverwogen democratisch debat in het parlement en de samenleving als geheel.

Reactie op hoofdlijnen

- De adviescommissie staat kritisch ten opzichte van dit wetsvoorstel. Niet kan worden ingezien waarom niet kan worden ingezet op in tijd en plaats beperkte noodverordeningen als thans gebeurt met het oog op concrete virusuitbraken, zoals recentelijk in nertsenfokkerijen en slachterijen. Is de verspreiding in beeld en onder controle, dan kan de noodverordening weer ingetrokken.
- De adviescommissie merkt op dat de regulering ten aanzien van grotere evenementen voorlopig een noodzaak zal zijn in het tegengaan van de verspreiding van het coronavirus.

Gedoeld wordt hier op maatregelen betreffende het maximaliseren van het toegestane publiek en het afstand houden teneinde verspreiding van het virus te beperken. Op dit onderdeel acht de adviescommissie de rationale van het wetsvoorstel aanvaardbaar en nodig. Regels met betrekking tot afstand en ook groepsvorming buiten evenementen zouden er evenwel niet moeten komen, zeker niet als daarmee inbreuk wordt gemaakt op de grondrechten van vergadering en het huisrecht. Of voor groepsvorming zou dan in ieder geval in de wet zelf een proportioneel 'minimumaantal' personen (bijvoorbeeld honderd), moeten worden opgenomen waarvoor een en ander zal gelden.

- De adviescommissie heeft de indruk dat de werkingsduur van deze wetgeving één jaar is, met de mogelijkheid van verlenging. De adviescommissie maakt zich hier zorgen over. De werkingsduur en de mogelijkheid tot verlenging maken de maatregelen de facto van onbepaalde tijd en zijn daarmee te lang gelet op de diverse grondrechten beperkende bepalingen. Zie daartoe ook het advies van de adviescommissie bestuursrecht.
- De adviescommissie maakt zich zorgen dat willekeur in de handhaving en het opleggen van sancties op de loer ligt. Het verbod op willekeur is een zeer belangrijk beginsel van algemeen behoorlijk bestuur dat de kern van de rechtsstaat beschermt. De overheid communiceert dat 'we het samen moeten doen' en dat het vanuit de burgers zelf moet komen (draagvlak), maar beoogt met deze wet een instrumentarium in het leven te roepen om handhavend en sanctionerend te kunnen optreden. Ook in de Memorie van Toelichting in paragraaf 1 ("*Regels alleen zullen niet helpen...*") wordt gecommuniceerd dat naleving van de afstandsregels in de eerste plaats een eigen verantwoordelijkheid is. Het is echter niet duidelijk waar de eigen verantwoordelijkheid eindigt en de overheid acht dat zij moet kunnen handhaven en sanctioneren en dat ook daadwerkelijk doet. In deze discrepantie zit teveel risico op willekeur: burgers moeten weten en kunnen begrijpen wat precies van hen wanneer verwacht wordt en wat de consequenties zijn als zij een concrete regel schenden. Indien het zo is dat handhaving buiten de gevallen van evenementen op termijn toch geen enkele prioriteit zal hebben, dan behoort deze wet beperkt te worden tot die evenementen. Maar juist daarvoor is voorhands niet duidelijk wat deze wet toevoegt ten opzichte van het bestaande instrumentarium van noodverordeningen. Zie daartoe ook het advies van de adviescommissie bestuursrecht.
- De Memorie van Toelichting stelt in paragraaf 5.3 dat bij de digitalisering van het bron- en contactonderzoek door de GGD de vrijwilligheid „uitgangspunt" moet zijn (5.3). Dit wordt vastgelegd in artikel 58v lid 2 Wpg (nieuw) dat een ieder verbiedt aan anderen het gebruik van of het geven van inzage in digitale middelen verplicht te stellen. Blijkens art. 68bis lid 3 Wpg (nieuw) zou schending van dit verbod strafbaar worden. De adviescommissie staat daar niet afwijzend tegenover.
- Over de notificatieapp meldt de Memorie van Toelichting op paragraaf 5.5.4 dat de inzet ervan "proportioneel" is 'gelet op de ernst en de gevolgen van de epidemie van het virus'. En de inzet ervan zou ook "noodzakelijk" zijn. De adviescommissie merkt hierbij op dat of iets "proportioneel" (of "noodzakelijk") is afhangt van de omstandigheden, de alternatieven en het gewicht van andere belangen.
- De adviescommissie beveelt aan om vooral in te (blijven) zetten op voorlichting en preventie. Campagnes in de media en op publieke punten, over handen wassen, thuis blijven indien, etc. Daarnaast dus snel ingrijpen als dat in concrete gevallen moet (eventueel met tijdelijke, deugdelijke noodverordening), en snel afbouwen zodra dat kan.

ADVIES

Van:	adviescommissie bestuursrecht
Datum:	3 juni 2020
Betreeft:	tijdelijke bepalingen in verband met maatregelen ter bestrijding van de epidemie van covid-19 voor de langere termijn (tijdelijke wet maatregelen covid-19)

Inleiding

Op 28 mei jl. is het (concept)voorstel van wet "*Tijdelijke bepalingen in verband met maatregelen ter bestrijding van de epidemie van covid-19 voor de langere termijn (Tijdelijke wet covid-19, hierna: de wet)*" ter consultatie voorgelegd. Het voorstel van wet is voor de adviescommissie bestuursrecht van de Nederlandse Orde van Advocaten ("commissie") aanleiding om het volgende advies uit te brengen, dat u hieronder aantreft.

Dit advies is verder als volgt opgebouwd. Na enkele inleidende opmerkingen over de aanleiding tot de wet worden enkele opmerkingen gemaakt over de gekozen systematiek. Ook worden enkele opmerkingen gemaakt over noodzakelijke waarborgen waarin de wet moet voorzien. Hierna volgen artikelsgewijs opmerkingen die vooral zien op de gekozen definities en normeringen. Afgesloten wordt met een conclusie en enkele aanbevelingen.

Aanleiding wet

De recente uitbraak van het coronavirus (covid-19) en de ontdekking van geïnfecteerde personen in Nederland heeft de afgelopen maanden geleid tot een aantal zeer ingrijpende maatregelen om (de gevolgen en verspreiding van) dit virus in te dammen. Publieke gebouwen zijn gesloten, er zijn afstandnormen geïntroduceerd en het dagelijks leven is bevroren. Deze tijdelijke maatregelen zijn neergelegd in opeenvolgende (model)noodverordeningen die hun basis vinden in de Wet publieke gezondheid ("Wpg") en de Gemeentewet.

Inmiddels is duidelijk dat de maatregelen weliswaar nog steeds tijdelijk zijn, voor de duur van de epidemie, maar dat de duur van de epidemie onbekend is en mogelijk nog een jaar of langer zal voortduren. Omdat een noodverordening als instrument per definitie een kortdurend karakter kent is deze niet geschikt voor een langdurige tijdelijke situatie. Dit ook omdat de maatregelen neergelegd in de opvolgende noodverordeningen een inbreuk maken op diverse grondrechten en verdragsbepalingen. Duren deze inbreuken langer voort, dan is een meer solide wettelijke basis vereist gelet op het bepaalde in de Grondwet en de diverse verdragen.

De wet beoogt te voorzien in deze meer solide wettelijke basis terwijl de wet ook het tijdelijke karakter van de diverse maatregelen en de daarmee gepaard gaande inbreuken beoogt te waarborgen.

Systematiek van de wet

Als gezegd is de wet ingegeven vanuit de uitbraak van covid-19 en de dan noodzakelijke maatregelen ter bestrijding van de epidemie en de bestrijding daarvan. De wetgever heeft er niet voor gekozen om gebruik te maken van het bestaande instrumentarium, te weten een gehele of beperkte noodtoestand krachtens de Wet Coördinatiewet uitzonderingstoestanden en bijvoorbeeld de Wet buitengewone bevoegdheden burgerlijk gezag.

In de wet wordt gesteld dat dit bestaande instrumentarium niet toereikend zou zijn. Aan dit standpunt kan worden getwijfeld omdat maatwerk mogelijk is via de Wet Coördinatiewet uitzonderingstoestanden en daarin genoemde (slapende) regelingen die kunnen worden geactiveerd. De commissie geeft in overweging nader te onderbouwen waarom voor een nieuwe wet is gekozen in plaats van het bestaand instrumentarium. Er lijkt sprake te zijn van incidentenwetgeving en niet van meer 'principle-based' wetgeving. Vanuit deze observatie geeft de commissie in overweging het bestaande instrumentarium voor zover nodig aan te passen zodat ook in het geval van een epidemie daarop kan worden teruggevallen en dat dus niet van geval tot geval tot nieuwe wetgeving moet worden gekomen. Dit ook gezien het vervallen van de wet zodra de epidemie is geëindigd. De commissie wijst hierbij ook op de voorlichting door de Afdeling advisering van de Raad van State van 25 mei jl.

De keuze om de Wpg als basis van de wet te laten dienen, met als uitgangspunt dat de maatregelen dienen bij te dragen aan de bestrijding van de epidemie of de dreiging daarvan, maakt dat de maatregelen dus binnen dit meer algemene kader van de Wpg dienen te blijven. Dit houdt onder meer in dat de voorgestelde maatregelen binnen dit kader voorzien moeten zijn van een gedegen onderzoek naar het medisch nut en noodzaak van die maatregelen. Immers, binnen deze kaders moeten de voorgestelde maatregelen ook hieraan bijdragen. De commissie merkt op dat deze gelaagdheid de uitvoerbaarheid van de wet kwetsbaar maakt, vooral indien er geen consensus bestaat binnen de medische wetenschap over (de effectiviteit van) de maatregelen. Wij noemen de discussie over de mondkapjes.

Zoals ook volgt uit (de toelichting op) de wet, voorziet de wet in de op de overheid rustende en afdwingbare positieve verplichtingen om de Nederlandse bevolking te beschermen tegen de effecten van de epidemie. Deze positieve verplichtingen kennen echter ook een nadrukkelijke spiegelzijde. De overheid kan onder deze positieve verplichtingen ook gehouden worden om bepaalde inbreuken op grondrechten te voorkomen of de uitoefening van grondrechten mogelijk te maken. De wet wijdt hier slechts summier aandacht aan en voorziet niet in maatregelen om – ook gedurende een epidemie – invulling te geven aan deze positieve verplichting. Volstaan wordt immers met verbodsbepalingen. Dit vraagt om een nadere weging van de wet en de daarin neergelegde maatregelen. Voorzien moet worden in een 'fair balance' in lijn met de rechtspraak van het EHRM.

Een en ander klemmt te meer nu de wetgever heeft gekozen voor een 'raamwet' waarin de maatregelen slechts in algemene zin worden omschreven en dus slechts in algemene zin wordt voorzien in een wettelijke basis voor de inbreuk die een maatregel met zich brengt. De concrete invulling van een maatregel – en dus ook de aard en omvang van een inbreuk – vindt plaats bij Algemene maatregel van bestuur, ministeriële regeling of door besluitvorming van het lokale bevoegde gezag (burgemeester of voorzitter van de veiligheidsregio). Of en in welke mate dan democratische controle op dit proces kan en zal plaatsvinden is onduidelijk en behoeft volgende de commissie uitdrukkelijk aandacht. Het klassieke staatsnoodrecht voorziet namelijk wel in deze controle.

Het decentrale karakter van de maatregelen waarin de wet voorziet, valt verder op zichzelf te billijken omdat er lokale verschillen bestaan en dan maatwerk nodig is. Echter, niet alle maatregelen lenen zich voor decentraal maatwerk (leeftijd). Daar waar sprake is van differentiatie zal de wet daarvoor de basis moeten vormen en mag snelheid niet ten koste gaan van de

democratische legitimatie. De commissie benadrukt daarbij dat het van groot belang is dat eenzelfde situatie ook tot eenzelfde aanpak leidt en er dus geen verschillen per regio of stad ontstaan tenzij die niet te rechtvaardigen zijn. De commissie wijst op de discussie over regionale verschillen en willekeur bij handhaving van de diverse noodverordeningen, en op bijvoorbeeld de recente demonstratie in Amsterdam. Een strak en duidelijk handhavingkader is wat de commissie betreft vanuit rechtszekerheid en het Lex Certa beginsel een vereiste bij de voorgestelde decentrale uitvoering van de wet. Deze decentrale aanpak en de mogelijke problematiek werpt wat de commissie betreft al in zoverre haar schaduw vooruit dat de bijlage "Schema handhaving Tijdelijke maatregelen covid-19) moeilijk leest, en het beeld schetst van een lappendeken aan toezichhouders en bevoegde gezagen.

Specifiek ten aanzien van de grond- en verdragsrechten die met de in de wet voorziene maatregelen worden ingeperkt, valt op dat de toelichting op de wet vrij summier is en ook niet alle betrokken rechten en bijbehorende inbreuk- en afwegingskaders worden besproken. De commissie wijst op het eerdergenoemde advies van de Afdeling advisering dat op dit punt vollediger en uitvoeriger valt te noemen en op het advies van het College voor de rechten van de mens van 18 mei jl. De commissie acht dit een omissie en geeft in overweging om deze paragraaf aan te vullen in lijn met deze adviezen. Dit ook gelet op de aard en impact van de wet voor de samenleving als geheel en het individu in het bijzonder. Gegeven het in haar ogen te korte tijdsbestek is de commissie niet in staat deze analyse zelf te maken. De commissie volstaat bij wijze van voorbeeld dan ook met een enkele opmerking over de (reikwijdte van de) vrijheid van godsdienst en de beperking daarvan.

De viering van kerkdiensten valt onweersproken onder de vrijheid van godsdienst. De wetgever heeft terecht oog gehad voor deze specifieke status en de dan mogelijke beperkingen. Bedacht moet echter worden dat naast vieringen vele andere activiteiten plaatsvinden in een kerkgebouw (van welke gezindte dan ook) zonder dat sprake is van een viering van een kerkdienst. Wel zijn deze activiteiten vaak direct verbonden aan het kerkgebouw en hebben zij soms – in meer of mindere mate – een godsdienstig karakter (zondagsschool). Welk regime is op dit actieve verenigingsleven nu van toepassing en welke inbreuken en beperkingen zijn dan mogelijk?

Artikelsgewijze opmerkingen

Hieronder volgen in staccato en artikelsgewijs opmerkingen en vragen naar aanleiding van de wet.

Definities

- De commissie werpt de vraag op of de definitie van gemeenschappelijke huishouding nu voldoet en afdoende dekkend is voor alle situaties. De commissie wijst op de vraag of de definitie ook voldoet in het geval van woongroepen (met afzonderlijke adressen), studentenhuizen met gedeelde voorzieningen maar eigen kamers en huisvesting voor arbeidsmigranten.
- De commissie valt op dat een specifieke regeling/bepaling voor zeeschepen en hun bemanning ontbreekt. Voor schepen onder – kort gezegd – de Nederlandse vlag geldt dat zij behoren tot het grondgebied van Nederland en zij over die band onderworpen zijn aan de wet. Dit vraagt echter nog wel een verduidelijking. Voor schepen onder buitenlandse vlag in Nederlandse wateren geldt echter (vaak) dat de Nederlandse wet- en regelgeving daarop niet van toepassing is, maar wel de regels van de betreffende vlagstaat die anders

kunnen zijn.

- De commissie merkt op dat een definitie van hetgeen onder een 'groep' moet worden verstaan ontbreekt. Verder is niet duidelijk hoe een groep bestaande uit personen die niet behoren tot een gemeenschappelijke huishouding zich verhoudt tot een groep waarvan wel leden van een gemeenschappelijke huishouding deel uitmaken. Dit levert handhavingsvraagstukken op en een risico van willekeur. Zie daartoe ook het advies van de adviescommissie rechtsstatelijkheid. Zo geldt voor leden van een gemeenschappelijke huishouding de veilige afstand niet. Binnen een groep geldt die norm weer wel. Als een groep wordt gedefinieerd als 4 of meer personen, dan heeft dat tot gevolg dat een gezin van 4 personen zich niet met anderen kan ophouden; ook niet als iedereen (inclusief de gezinsleden onderling) zich aan de veilige afstand houdt. Omdat de gezinsleden zich onderling niet aan de veilige afstand hoeven te houden, lijkt dat zijn doel voorbij te schieten.

Artikelsgewijs

- In artikel 58d van de wet wordt voorzien in een stelsel van rechtsbescherming. De commissie begrijpt dat de wetgever er voor heeft gekozen om aan te sluiten bij de systematiek ex artikel 176 van de Gemeentewet. Ziet de commissie het goed dan kan het besluit van de Minister slechts worden voorgelegd aan de burgerlijke rechter. De vraag is of dit gelet op de aard van de materie wenselijk is. Ook vraagt de commissie aandacht voor de democratische controle op de Minister in dit verband.
- Specifiek ten aanzien van het houden van (een veilige) afstand vraagt de commissie aandacht voor (kleine) kinderen en hun rol bij de verspreiding van covid-19. Als ook (jonge) kinderen een afstandsnorm in acht moeten nemen is daarvoor een dragende medische noodzaak vereist. Deze lijkt te ontbreken. Ook de verantwoordelijkheid voor kinderen bij het in acht nemen van de veilige afstand is niet uitgewerkt in de wet. Wie houdt toezicht en wie is (juridisch gezien) verantwoordelijk en aanspreekbaar?
- De wet kent in diverse artikelen een verantwoordelijkheid en zorgplicht toe aan degene die bevoegd is tot het aanbrengen van voorzieningen of openstellen van publieke en besloten plaatsen. De commissie mist een duidelijke omschrijving van hetgeen wordt verstaan onder bevoegdheid. In het geval van bijvoorbeeld een sportkantine, is vaak een gemeente of stichting eigenaar, is de vereniging beheerder en zijn diverse leden bewaarder van sleutels. Wie is in dat geval bevoegd en valt dus aan te spreken? Deze vraag doet zich ook voor in het geval van bijvoorbeeld een besloten compagnonsvergadering van een zekere omvang (groot internationaal advocatenkantoor). Welke compagnon is dan bevoegd en gehouden de zorgplicht in acht te nemen?
- Artikel 58n van de wet voorziet in een inbreuk op het huisrecht, eventueel op te volgen door maatregelen als bedoeld in de artikelen 174a en 151d Gemeentewet. De rechtvaardiging voor deze inbreuk wordt uitsluitend gegeven vanuit het voorkomen van onmiddellijke verspreiding van covid-19 door gedragingen in deze besloten plaats. De vraag is of deze (beperkte) rechtvaardiging deze inbreuk kan rechtvaardigen. De commissie wijst op de ruimere doelstelling en reikwijdte van de wet. Ook wijst de

commissie op noodzakelijke weging naar de proportionaliteit en subsidiariteit die in het geval van een inbreuk ook moet worden gemaakt maar die ontbreekt in dit artikel (fair balance). Niet ieder direct gevaar voor verspreiding kan een inbreuk rechtvaardigen.

- De commissie vraagt aandacht voor het ontbreken van een controlemechanisme in het geval van informatieverstrekking ex artikel 58t van de wet. Wie ziet nu toe op de naleving door de burgemeester van de (rand)voorwaarden waaronder deze structurele informatieverstrekking kan plaatsvinden en de vraag of de verplichting tot verstrekking van deze informatie ook wordt gerechtvaardigd door het doel van de wet.
- In artikel 68 bis wordt de strafrechtelijke sanctionering van de wet neergelegd. De commissie merkt op dat wordt afgeweken van het systeem van het bestaande wettelijke systeem (Wetboek van Strafrecht en de Wet op de economische delicten). Niet duidelijk is op grond waarvan tot deze afwijking is gekomen en of het doel van de wet deze afwijking rechtvaardigen kan. Ook zijn de effecten van deze afwijking op de rechtsbescherming die open moet staan in het geval van een strafsancie niet duidelijk en onvoldoende uitgewerkt. Bedacht moet worden dat de maatregelen voorzien in de wet al een forse inbreuk maken op grondrechten met de nodige gevolgen, en de proportionaliteit van deze inbreuken onder druk komt te staan indien daarnaast nog een forse strafsancie wordt opgelegd. Ook dit is een kwestie van fair balance. Zie daartoe ook het advies van de adviescommissie strafrecht.
- Ten slotte merkt de commissie op dat de in de wet genoemde termijn van 1 jaar arbitrair is bij gebreke aan een onderbouwing. Weliswaar voorziet de wet in een systematiek waarbij kan worden meebewogen met ontwikkelingen, maar een rechtvaardiging voor de voorgestelde duur ontbreekt. Met de Afdeling advisering is de commissie van oordeel dat het de voorkeur verdient om in de wet zelf een beredeneerde vervaldatum op te nemen. Zie daartoe ook het advies van de adviescommissie rechtsstatelijkheid.

Conclusie

De commissie concludeert dat de wet wat betreft de systematiek en de rechtvaardiging van de inbreuken op grond- en verdragsrechten in ieder geval noopt tot een nadere toelichting en verduidelijking, en eigenlijk op sommige punten tot een aanpassing. Dit is tevens nodig ten aanzien van enkele specifieke artikelen in de wet, als aangegeven in het advies.

ADVIES

Van:	adviescommissie strafrecht
Datum:	3 juni 2020
Betreft:	tijdelijke bepalingen in verband met maatregelen ter bestrijding van de epidemie van covid-19 voor de langere termijn (Tijdelijke wet maatregelen covid-19)

Reactie op hoofdlijnen

Naar aanleiding van het consultatiewetsvoorstel Tijdelijke Wet Maatregelen Covid-19 (d.d. 29 mei 2020) plaatst de adviescommissie strafrecht de volgende kanttekeningen:

- De adviescommissie is van oordeel dat de voorgestelde straffen in veel gevallen de proportionaliteitstoets niet doorstaan. Zie met betrekking tot de proportionaliteit ook de adviezen van de adviescommissies rechtsstatelijkheid en bestuursrecht.
- Overtreding van de noodverordeningen levert, via artikel 443 Sr, een maximale straf op van 3 maanden hechtenis en een maximale geldboete van de derde categorie (Euro 8.700). Indien de betreffende verdachte een rechtspersoon is, dan heeft de rechter de mogelijkheid om een boete op te leggen uit de naast hogere categorie, dat wil zeggen maximaal Euro 21.750. Uit de Memorie van Toelichting begrijpt de adviescommissie dat de minister bij bestraffing primair aan het opleggen van een geldboete denkt (*"Primair wordt gedacht aan de geldboete"*; MvT, pagina 37). Daarnaast begrijpt de adviescommissie dat de minister de mogelijkheid van een hechtenisstraf vooral van belang acht omdat via die lijn het opleggen van een taakstraf tot de mogelijkheden behoort (MvT, pagina 37: *"Op overtreding van de huidige noodverordeningen (art. 443 Sr). staat ook hechtenis, en daarmee ook de mogelijkheid van een taakstraf (art. 9, tweede lid Sr). Het is van belang dat die mogelijkheid behouden blijft."*). De adviescommissie kan zich met deze uitgangspunten in beginsel verenigen: vrijheidsbeneming moet te allen tijde een ultimum remedium blijven.

Met betrekking tot de uitwerking plaatst de adviescommissie strafrecht de volgende opmerkingen.

- Uit het schema in Bijlage 1 bij de MvT blijkt dat de bedoeling is om de maximale straffen die thans – via artikel 443 Sr – op overtreding staan waar de proportionaliteit daarom vraagt naar beneden bij te stellen. Het wetsvoorstel is daarin niet steeds geslaagd.
- Allereerst vermeldt het schema (p. 68-69) waar het gaat om overtreding van artikel 184 Sr (opzettelijk negeren van een ambtelijk bevel) dat de maximale geldboete op overtreding van artikel 184 Sr Euro 8.700 bedraagt (het schema refereert aan dit derde categorie bedrag). Vervolgens wordt op de niet-opzettelijke variant een hechtenis van (eveneens) drie maanden gesteld en een maximale geldboete van de tweede categorie. Artikel 184 Sr kent echter een maximale geldboete uit de *tweede* categorie, derhalve een maximale geldboete van Euro 4.350. Uitgaande van deze tweede categorie voor de opzettelijke variant, zou de niet-opzettelijke variant (het voorgestelde artikel 68bis lid 2 Wpg) met een maximale geldboete uit de *eerste* categorie bestraft moeten worden. Voorts eist het proportionaliteitsbeginsel dat voor de opzet variant en de overtreding een onderscheid wordt gemaakt in de maximaal mogelijke hechtenis. In het voorstel zou in beide gevallen een maximale hechtenis van 3 maanden mogelijk zijn. De adviescommissie adviseert derhalve in

deze gevallen te bepalen dat overtreding van het voorgestelde artikel 68bis lid 2 een maximale hechtenis van een maand en een maximale boete uit de eerste categorie kan opleveren.

De adviescommissie merkt overigens op dat een boete van maximaal Euro 435 voor een individu al een fors bedrag is, zeker in aanmerking genomen dat de corona crisis voor velen een economische achteruitgang betekent.

- Uitgaande van het opleggen van een hechtenis als ultimum remedium geeft de adviescommissie voorts met klem in overweging om de maximale hechtenis in een aantal gevallen te verlagen van de nu voorgestelde 3 maanden naar maximaal 1 maand. Dit geldt bijvoorbeeld voor de strafbaarstelling via het voorgestelde artikel 68 bis lid 2 Wpg van alle overtredingen van regels van de minister VWS over hygiëne maatregelen (58j lid 1 en 2 Wpg). De verhouding met andere overtredingen die krachtens het wetboek van strafrecht strafbaar zijn gesteld, dient ook in acht te worden genomen. Zo is voor brandgevaar veroorzaakt door vuurwerk (artikel 429 Sr) een maximale hechtenis van 14 dagen mogelijk.
- Gelet op het primaat van de geldboete en op het feit dat het hier veelal een overtreding betreft die door een individu wordt begaan, beveelt de adviescommissie dan ook aan om de maximale hechtenis op overtreding van de voorgestelde artikelen 58f en 58g te beperken tot 14 dagen hechtenis. Twee weken hechtenis voor het eenmalig niet in acht nemen van een veilige afstand is op zich al een forse straf. Om dezelfde reden zou een maximale hechtenis van drie maanden op overtreding van het voorgestelde artikel 58v lid 2 Wpg wel voldoen aan de eis van proportionaliteit terwijl dat naar het oordeel van de adviescommissie niet het geval is bij een maximum van 6 maanden hechtenis.

Rapid prototyping and immunogenicity of SARS-CoV-2 DNA vaccine candidates formulated with the Fusogenix proteo-lipid vehicle delivery system.

Arun Raturi^{1,2}, Ping Wee^{1,2}, Prakash Bhanduri^{1,2}, Manoj Parmar^{1,2}, Douglas Brown³, Maryam Hejadi³, Liliya Grin^{1,2}, Hector Vega^{1,2}, Jennifer Gyoba^{1,2}, Jailal Ablack^{1,2}, Katia Carmine-Simmon³, Perrin H Beatty^{1,2}, Alyson Kelvin⁴, Roy Duncan⁴, John D Lewis^{1,2,3} **

Affiliations

¹ Entos Pharmaceuticals, 4550 - 10230 Jasper Avenue, Edmonton, Alberta, Canada, T5J 4P6

² Aegis Biodefense, 3033 Science Park Road, San Diego, California, 92121

³ Department of Oncology, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada, T6G 2E1

⁴ Department of Immunology, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada, T6G 2E1

**Correspondence to: John D. Lewis. University of Alberta, Katz Group Centre, 5-142, Edmonton, Canada. Phone: 780.492.6113, Fax: 780-492-8160, Email: 5.1.2e@ualberta.ca

Subject Areas: Vaccine development, Infectious diseases

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, DNA vaccine, Fusogenix, Proteo-lipid vehicle, neutralizing antibodies, preclinical

One sentence summary: Rapid prototyping and selection of pan-coronavirus DNA vaccine candidates optimized to maximize neutralizing antibody and balanced T helper cell response and minimize antibody-dependent enhancement.

Abstract

Here we describe the development and evaluation of a panel of DNA vaccine candidates (Covigenix) formulated with the Fusogenix proteo-lipid vehicle (PLV) platform, a nanoparticle formulation that utilizes fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins to drive direct fusion of lipid-encapsulated plasmid DNA with the plasma membrane of target cells. A rapid prototyping approach was employed to evaluate sequences encoding the full-length SARS-CoV-2 spike (S) protein, native and secreted versions of the receptor binding domain (RBD), or the full-length nucleocapsid (N) protein. The addition of genetic-encoded adjuvants RIG-I and CpG was evaluated, with the overall goal of stimulating potent neutralizing antibody and/or balanced cell-mediated responses while minimizing the risk of antibody-dependent enhancement.

In preclinical immunogenicity studies at doses ranging from 5 µg to 100 µg, it was found that candidates encoding SARS-CoV-2 full length spike stimulated the most robust neutralizing antibody titers, and that incorporation of genetic RIG-I and CpG adjuvants significantly improved responses. The secreted RBD also stimulated a strong neutralizing antibody response compared to the non-secreted version, while the N protein-encoded candidates did not stimulate a strong antibody-mediated response. Serum from mice immunized with a 25 µg dose of the Covigenix full length spike candidate with genetic adjuvants produced a neutralizing titration curve similar to that derived from a panel of COVID-19 convalescent patients.

Several of the vaccine candidates elicited a robust and sustained expansion of the B cell compartment in the spleen, as assessed by immunophenotyping of cell-mediated immune cell populations following vaccination. The Covigenix N-protein vaccines produced the strongest T-cell responses, with significant activated CD8⁺ cells in the peripheral blood and the spleen 3 days and 14 days post-immunization, while the full length spike vaccines showed a significant increase in antigen-specific IFN-gamma producing T cells as well as activated CD8⁺ lymph node cells.

Based on this preclinical data, Covigenix candidates encoding full length S and N proteins will be advanced to human clinical trials. While the S vaccine simulates both an antibody and T-cell response, the N vaccine seems to be a potent T-cell vaccine that has the potential for pan—coronavirus activity. These candidates will now be evaluated in SARS-CoV-2 animal challenge studies and advanced to phase 1/2 human clinical trials starting this summer, leading towards phase 3 trials shortly afterwards.

Introduction

SARS-CoV-2, the causative agent of COVID-19, has infected over 12.4M people, caused over 557K deaths, over-burdened healthcare systems, and led to unemployment and food shortages in various regions of the world. The global impact of the current coronavirus (CoV) pandemic is unprecedented, and without vaccine protection, is predicted to continue. Currently, the only countermeasures to reduce SARS-CoV-2 infection rates are mobility restriction and social distancing. However, these measures are not sustainable and do not provide protection from COVID-19 like a vaccine can. Besides SARS-CoV-2, our enemy is time: every day without a protective COVID-19 vaccine means more deaths, worldwide (1).

SARS-CoV-2 is the third most recent betacoronavirus zoonosis, after the initial 2003 SARS (9.6% fatality rate) and the 2012 MERS (35% fatality rate) coronavirus outbreaks, to cause human-to-human transmission and acute respiratory distress syndrome (ARDS). Betacoronaviruses are enveloped viruses with four major structural proteins, spike surface glycoprotein (S), envelop (E), membrane (M), and nucleocapsid (N), encasing the 29.9 Kbp positive sense RNA genome (Figure 1) (2). Homotrimers of the S protein form the spikes on the CoV surface that bind to host cell receptors, such as the angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) receptors with SARS-CoV-2. Therefore, CoV S proteins initiate virus – host cell fusion and entry, which ultimately determines host range and zoonosis. spike proteins comprise two subunits (S1 and S2). S1 contains the highly variable host-specific receptor binding domain while S2 is highly conserved across CoV strains and carries the fusion peptide, transmembrane domain and cytoplasmic domain. The spike protein also has a polybasic amino acid sequence that acts a cleavage site for the human protease furin. Spike protein cleavage by the furin protease is essential for effective SARS-CoV-2 binding, fusion and host cell entry (3). The N abundantly expressed, and highly conserved, CoV N protein binds, packages and maintains the viral RNA genome in long helical ribonucleoprotein structures that are also in proper conformation for viral genomic replication and transcription to occur (4). Recent studies also show N protein involvement in regulation of host cell processes like actin reorganization, cell cycle progression, and apoptosis (5).

SARS and SARS-CoV-2 immune studies show that the N protein can induce protective immune responses against these viruses during infection and as a vaccine antigen with predominant B cell epitopes (6-9). SARS immune studies with spike protein stimulated host

system neutralizing antibody production, making it a promising antigen candidate for neutralizing antibody vaccines. However, this protein also elicited non-neutralizing antibodies that promoted an antibody-dependent enhancement (ADE) of disease upon re-infection with SARS (10). ADE was also observed after vaccination for respiratory syncytial virus (RSV) (11-14). In these cases there was a skewed T helper cell response after vaccination and viral challenge which lead to increased eosinophil pathology in the respiratory tract and hepatitis at challenge (8). Recent studies show that antigens eliciting a balanced T helper cell type 1 (Th1) and T helper cell type 2 (Th2) directed immune response have a reduced likelihood of ADE.

We initiated a rapid prototyping protocol to generate nanoplasmid (NTC) or p10 expression vector DNA encoded SARS-CoV-2 and pan-coronavirus full length (FL) S protein, S protein wildtype receptor binding domain (RBD1, 2, 3) and secreted RBD (sRBD), and FL N protein epitopes as the payload optimized to maximize neutralizing antibody and balanced T helper cell response to minimize ADE. Retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) and unmethylated CpG motifs were also included as payloads for codelivery to host cells to act as nucleic acid adjuvants to stimulate innate immune responses and drive adaptive Th1 responses (15). RIG-I is a cytoplasmic double-stranded RNA pattern receptor. Activation of RIG-I leads to type I interferon (IFN) and inflammatory cytokine production (16-18). Unmethylated CpG motifs can also stimulate innate immunity and improve adaptive immunity against the antigen gene product (19-22).

The plasmid DNA payload was encapsulated within Fusogenix, a proprietary proteo-lipid vehicle (PLV) formulated with well-tolerated neutral lipids and proprietary p14 protein that ensures highly efficient fusion and intracellular delivery of nucleic acid payloads directly into cells to drive potent immune responses (Figure 1A,E) (23-29). Fusogenix has undergone extensive pre-clinical studies in rodents and non-human primates and been shown to be safe and highly effective for *in vivo* nucleic acid delivery. Fusogenix is non-immunogenic, allowing for repeat dosing with no reduction in efficacy, delivers payloads to a wide variety of extra-hepatic tissues and cell types (including antigen presenting cells), and is well tolerated at doses 10x the expected human efficacious dose (30). The technology is also inexpensive and scalable, making it ideal for vaccine production.

In total, we evaluated 24 potential COVID-19 DNA vaccine candidates for levels of neutralizing antibody and T cell immunity measured in a 1 or 2-dose vaccine candidate regimen

over 28 days in preclinical mouse studies. Two DNA vaccine candidates showed potent neutralizing antibody and balanced T helper cell responses and inhibition of viral infection. These preclinical results demonstrate that our lead Fusogenix DNA vaccines, encoding a combination of SARS-CoV-2 FL-S, FL-N, and conserved coronavirus antigens that enhance the vaccine's potency and provides broad based immunogenicity to SARS-CoV-2, are promising DNA vaccine candidates against COVID-19.

Results

Covigenix DNA vaccine candidates were assessed for their safety, immunogenicity, and efficacy against SARS-CoV-2 in mouse models. Based on the results reported here two vaccine candidates were selected to advance to CTA-enabling, preclinical safety/tolerability studies and GLP toxicity studies in non-human primates (NHP) at multiple dose levels and schedules.

Design and construction of Covigenix plasmid DNA vaccines

We selected the SARS-CoV-2 spike glycoprotein, the spike RBD, and the nucleocapsid for the Covigenix vaccine candidate antigens (31). Human codon optimized full length DNA sequences were synthesized based on the published amino acid sequences (QHD43416) of the SARS-Cov2 spike protein and N protein and cloned into either our standard p10 expression vector or one of two nanoplasmid vectors from Nature Technologies either without adjuvant sequences (NTC) or with un-methylated CpG sequences and a RIG-I agonist element (NTC-RIG-I). The sequence encoding the wildtype SARS-CoV2 spike Receptor Binding Domain (RBD) was also cloned into the p10 vector as well with the following modifications: 1) Addition of IgG heavy chain signal sequence resulted in a secreted RBD (sRBD-1) or 2) point mutations intended to stabilize the RBD conformation (RBD-2 and RBD-3).

Humoral Immunity Induced by Covigenix Vaccine Candidates

The aforementioned plasmid DNA vectors were encapsulated with the Fusogenix delivery platform. A group of mice were immunized IM with each candidate using a prime (day 0)-boost (day 14) regimen. Seven days following the boost dose (day 21) serum anti-spike IgG concentration was measured by ECLIA assay with recombinant spike protein. spike-NTC with RIG-I elicited nearly 6000 ng/ml of anti-spike antibody, versus approximately 3000 ng/ml of

anti-spike antibody from spike-NTC lacking the nucleic acid adjuvant and 2000ng/ml from sRBD-CpG at similar doses (Figure 2A, B). The p10 vector expressing full length spike also enabled anti-spike antibody production but at a lower level. Even at 4 times the dose (100ug) the p10 vector was unable to stimulate antibody production equivalent to the NTC vectors. The addition of unmethylated CpG oligo nucleotides (co-formulated) with the plasmid DNA vector improved antibody production but again not to level of the NTC vectors (Figure 2A). Vaccine formulations encoding the wild type RBD domain of SARS-Cov2 spike protein elicit a lower concentration of anti-spike antibodies compared to vectors encoding the full length spike protein. A secreted RBD domain stimulated the best response among RBD constructs at dose of only 25ug (Figure 2B). The sRBD construct performed as good as or better than the FL-spike protein in the same vector backbone (Figure 2B). The NTC-spike candidates elicit the most robust spike antibody responses, achieving serum antibody concentrations equivalent to the primed and boosted p10 vectors (both FL-spike and RBD constructs) after a single dose for the RIG-I version (Figure 2C). Furthermore, antibody production prior to the booster dose with spike NTC-RIG-I was nearly equivalent to the boosted level using spike-NTC and the RIG-I nucleic acid adjuvant resulted in an even greater increase following the boost dose (Figure 2C). Consistent with the robust serum antibody concentrations from spike protein expressed from NTC vectors, the spike-NTC Covigenix candidates also elicit robust and sustained expansion of the B cell compartment in the spleen following the booster dose (Figure 2C). The B cell expansion induced by Covigenix spike protein candidates was indistinguishable from that of a known model immunogen, firefly luciferase (NTC-Luc) (Figure 2D).

Neutralizing Antibody Production

Pseudotyped high risk group (RG-3 and 4) viruses are a safe viral entry model to perform antibody screens and neutralizing titer assays because they do not produce infectious progeny (32). Vesicular Stomatitis Virus (VSV), entry is dependent on its surface glycoprotein (G protein). Replacement of the VSV G gene with a green fluorescence protein (GFP) reporter in the VSV genome renders VSV entry dependent on glycoproteins from other viruses, such as SARS-CoV-2 spike, supplied in trans during virus growth and provides a convenient reporter for infected cells. A recent preprint measured the neutralizing titer from COVID-19 convalescent patient sera with an *in vitro* SARS-CoV-2 pseudotyped assay and reported good correlation with

live SARS-CoV-2 assays (33). Neutralizing properties of the immunized mouse serum was determined using a GFP reporter VSV, pseudotyped with wild-type SARS-CoV-2 spike protein. SARS-CoV-2 FL-spike pseudotyped recombinant VSVdG-GFP was incubated with serial dilutions of heat inactivated serum from immunized mice and used to infect permissive 293TT-ACE2 overexpressing cells (17). The neutralizing antibody titer is measured by counting the GFP positive cell numbers after 12 hours of infection. The serum from spike-NTC RIG-I, spike plus CpG, and sRBD plus CpG immunized mice was tested for neutralizing titer in parallel with 19 convalescent human serum samples and a Sars-Cov-2 negative human serum control sample. Non-immunized control and the negative human serum showed no detectable inhibition compared to uninfected cells. Serum from mice immunized with spike-NTC-RIG-I showed a neutralizing titration curve similar to convalescent patients both with an IC50 titer greater than 1 in 100. Serum from p10 spike-CpG and sRBD-1-CpG immunized animals showed lower titers with IC50 values around 1 in 10. Thus, spike-NTC+RIG-I Covigenix vaccine elicits a similar neutralizing antibody profile to that of convalescent patients (Figure 3).

Induction of cytotoxic T lymphocyte (CTL) response

Next, we examined cell mediated immunity with our lead candidates. Mice were injected intramuscularly with a 25µg dose of Fusogenix with a payload encoding FL-spike-NTC with or without RIG-I or saline control on day 1 (prime) and day 14 (boost). At 21 days post immunization (7 days following the booster), mouse splenocytes were stimulated *ex vivo* with overlapping peptide pools (15mers overlapping by 11) spanning the entire SARS-CoV2 spike protein open reading frame in (ORF) in two pools to determine the frequency of antigen specific spot forming cells (SFC) per million \pm SEM from each immunized animal. The FL-spike-NTC+RIG-I DNA vaccine candidate showed a significant increase in IFN γ -expressing spot forming cells per million splenocytes compared to the unimmunized control for both peptide pools (Figure 4A). The spike-NTC vaccinated animals produced a detectable increase in the frequency of antigen-specific IFN gamma producing T cells that trended toward significance. Immunophenotyping of CTL populations following vaccination with spike-NTC+RIG-I, spike-NTC and the model antigen Luc-NTC showed an increase in activated (CD69+) CD8+ CTLs present in the lymph nodes 3 days (day17) and 14 days (day 28) post immunization (Figure 4B). There is a concurrent expansion of the CD8 T cell compartment in the spleen 3 days (day 17) and

14 days (day 28) post boost (Figure 4C). Covigenix spike-NTC vaccine candidates elicit a balanced humoral and cell mediated response.

Nucleocapsid-protein as a pan-Coronavirus Vaccine candidate.

The CoV N is an attractive pan coronavirus vaccine candidate because it is the most highly conserved (91%) protein among beta-coronaviruses (4). Furthermore, in other RNA viruses, including VSV, the nucleocapsid protein is effectively present via MHC class I and targeted by CTLs. Based on the ability for Covigenix vaccines to elicit cell mediated immunity we also developed Covigenix vaccine candidates expressing the SARS-CoV-2 N protein expressed from NTC vectors. Consistent to spike protein candidates, Covigenix N-protein vaccines activate CD8 cells in the periphery (CD69+) and also in the spleen 3 days and 14 days post immunization similar to that of model antigen (fig5A,B). Therefore, the Covigenix vaccine platform could elicit a pan coronavirus vaccine targeting cell mediated immunity against N protein.

Discussion

In terms of infection, mortality, and economic disruption, the global impact of the COVID-19 pandemic is unprecedented. We need effective and safe vaccines that induce neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and protect against pan- coronavirus threats. The World Health Organization (WHO) global vaccine candidate landscape and the Milken Institute vaccine tracker list 160 and 192 COVID-19 vaccines in development around the world, respectively (Table 1) (34, 35). The majority of these are protein subunit vaccines, which is unsurprising considering that this type of antigen platform has been used before to make Hepatitis B and shingles vaccines and, along with virus-like particle (VLP), are considered safer than using live-attenuated virus or inactivated virus as antigenic platforms (36-38). However, these four antigen platform types all take a lengthy amount of time to develop and validate, which is detrimental to developing a vaccine against an emergent, pandemic virus. The next major antigen platform types being used in development of COVID-19 vaccines involve using either non-replicating or replicating viral vectors for SARS-CoV-2 antigen delivery. Although these platforms are faster to develop than protein subunit vaccines, they have the disadvantage that the viral vector is immunogenic, therefore these vaccines cannot be effectively re-administered after one dose. Interestingly, 40 of the developmental COVID-19 vaccines

recognized by the Milken Institute are RNA or DNA vaccines; both types introduce a plasmid encoding antigens able to promote an immune response, directly into the recipient's cells so that the target antigen is produced by those cells. These platforms are next-generation, disruptive technologies that are poised to revolutionize medicine, but have not been approved for human vaccine use yet (39-49).

Both RNA and DNA vaccine platforms offer many advantages over traditional platforms; optimization of gene-encoded epitopes to eliminate ADE, rapid development time, ease of large-scale manufacturing, absence of any infectious agent, and the stimulation of both humoral and cell-mediated responses. However, DNA vaccines offer further advantages over RNA vaccines such as expression of multiple epitopes, more stable and less costly to develop (Table 1). Proof-of-concept has been established in nonhuman primates with pan-influenza virus DNA vaccines(50, 51). Clinical trials show that DNA vaccines are safe and that they can evoke cellular and humoral immune responses(52). A major barrier to DNA vaccine development is the method of intracellular delivery. Some DNA vaccines use an adenovirus vector for delivery, which has been proven to be immunogenic, limiting the vaccine to single dose use and other viral vector vaccines cannot be used by the recipient(21, 53, 54). Other DNA vaccines require recipient electroporation with a handheld electric device for effective delivery.(55). However, our Fusogenix delivery platform removes that barrier by allowing for efficient, non-immunogenic, and non-toxic delivery of DNA payload directly into the host cell cytoplasm(17, 18, 24, 29, 41, 56-70).

We initiated a rapid prototyping and iterative optimization of a pan-coronavirus DNA vaccine payload to maximize the neutralizing antibody and balanced Th-response and minimize ADE response. A panel of 24 recombinant plasmid DNA vaccines were engineered to encode combinations of FL-S, secreted S, sRBD, optimized S epitopes from CoV and SARS-COV-2, retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) and unmethylated CpG motifs. FL-spike with RIG-I at 25 ug dose elicited nearly 6000 ng/ml of anti-spike antibody, as did a two-dose (prime plus boost) vaccination regime. The Covigenix DNA vaccine with nanoplasmid encoding FL-spike with RIG-I produced equivalent neutralizing antibody titer to convalescent COVID-19 patients. The same Covigenix candidate showed significant increase in IFN γ -expressing spot forming cells per million splenocytes indicating that it is a potent generator of T cells that have the potential to destroy SARS-CoV-2 infected host cells.

Materials and Methods

Recombinant Plasmid Construction

Antibiotic free nanoplasmid NTC9395R-eRNA41H-CpG RNA (NTC, Lincoln, NE) was used as the vector for cloning the 3822bp human codon optimized SARS-CoV-2 FL-spike (S) gene (synthesized by Integrated DNA technology; Iowa, USA) using *Safl* and *BglII* restriction sites. Transgene expression was driven by the chimeric CMV promoter, with a rabbit beta-globin intron and splice enhancer for efficient RNA export. Rabbit beta-globin polyA signal was used for mRNA transcriptional termination and polyadenylation. RNA Pol III-expressed eRNA41H serves as a pathogen-associated molecular pattern (PAMP) recognized by cytoplasmic retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I) receptor (16). RNA pol II driven CpG RNA is efficient activator of NF- κ B and p38 MAPK (22).

Covigenix DNA vaccine formulation

To manufacture Covigenix DNA vaccines, plasmid DNA was encapsulated by Fusogenix. Plasmid DNA was diluted in 10 mM sodium acetate buffer (pH 4.0) containing 5 nM Fusogenix p14 protein. Separately, the Fusogenix lipid components was dissolved in ethanol. Microfluidic mixing of the DNA-protein fraction with the lipid fraction was performed by NanoAssemblr Benchtop (Precision Nanosystems Inc, Vancouver, BC) at a ratio of 3:1 at 12 mL/min. Formulations were dialyzed in 8000 MWCO dialysis membranes (BioDesign, Carmel, New York) against phosphate-buffered saline (pH 7.4) for 3 hours with 3X buffer changes, then concentrated by Amicon ultracentrifuge filters (EMD Millipore, Burlington, Massachusetts) before being passed through a 0.22 μ m filter (EMD Millipore). The resulting Covigenix DNA vaccine candidates were stored at 4°C until use. Covigenix DNA candidates were also tested for particle size, zeta potential, and plasmid DNA encapsulation. PLV mean size was between 80-120 nm, zeta potential was between -0.1 and -0.2 mV, and encapsulation efficiency was >85%.

Animal Experiments: Ethics and Study Design

All animal studies were carried out according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care (CCAC) and approved by the University of Alberta Animal Care and Use Committee. *In vivo* studies were done using 8-20 weeks old, 25 to 35 g body weight, male and female C57BL/6 (Charles River Laboratories, Saint-Constant, QC, Canada). Animals were group housed in IVCs

under SPF conditions, with constant temperature and humidity with lighting on a fixed light/dark cycle (12-hours/12-hours).

Mice were immunized intramuscularly (IM) in the musculus tibialis with 50 μ l of test agent, unless otherwise stated. Baseline blood was collected via tail vein prior to immunization. Blood was collected again 14 days after initial immunization immediately prior to booster administration. Twenty-one days after immunization mice were euthanized and terminal blood was collected. For the ELISpot experiments animals are sacrificed 21 days after initial immunization. Spleens are removed and dissociated into single cell suspensions using Spleen Dissociation Kit (Miltenyi Biotec; Auburn, CA) by following the manufacturer protocol.

Anti-spike Antibody Titer: Indirect ELISA with Sera from Immunized Mice

Recombinant SARS-CoV-2 spike S1 Protein (ABclonal, Wuhan, China) was coated on the standard binding plate (Meso Scale Discovery; MSD, Rockville, MD) at 1 μ g/mL for 1 h at room temperature (RT) on shaker. The plate was washed three times with 0.05% Tween-20 in PBS (PBS-T, In-house prepared) followed by addition of Blocker A (blocking buffer, MSD). After 30 min of incubation, the plate was washed again with PBS-T. Serially diluted SARS-CoV-2/SARS-CoV spike Antibody Standards (Cat. No. 3223, ProSci Inc, San Diego, CA) were prepared in Blocker A. Covigenix DNA candidate-immunized mouse serum samples were diluted 1:100 in Blocker A. The antibody standards and diluted mouse serum samples were loaded to plates and incubated for 1 h at RT on shaker. The plate was washed again with PBS-T followed by addition of 1 μ g/mL Sulfo-tag Anti-Rabbit Secondary Antibody in standards (Meso Scale Discovery; MSD, Rockville, MD), and 1 μ g/mL Sulfo-tag Anti-Mouse Secondary Antibody in Mouse serum samples (Meso Scale Discovery; MSD, Rockville, MD). Read buffer (Meso Scale Discovery; MSD, Rockville, MD) was added to the plate after washing with PBS-T, and the plate was read in MESO QuickPlex SQ 120 (Meso Scale Discovery; MSD, Rockville, MD).

Preparation of VSV-S pseudotyped virus

Neutralizing antibody responses were assessed using vesicular stomatitis virus (VSV) lacking the VSV G receptor binding protein and pseudotyped with the SARS-CoV-2 S protein. To generate the pseudotyped virus 293T cells were transfected with plasmid pMD2.G (Addgene) expressing

the VSV-G protein and 24 h later transduced with a VSV-G pseudotyped VSVdeltaG-GFP virus. The supernatant from cells containing VSV virions pseudotyped with VSV-G was harvested at 24 h post-transduction, clarified by centrifugation at 500 × g for 5 min and aliquots stored at -80°C. This virus was used to infect 293T cells transfected the previous day with pcDNA3 expressing a codon-optimized version of the SARS-CoV-2 S protein (accession #YP_009724390.1) with a truncated cytoplasmic tail missing the C-terminal 19 amino acids. Virus inoculum was removed after 1 h at 37°C, cells were washed twice with PBS, incubated in growth medium for 24 h and the supernatant removed and clarified by centrifugation at 500 × g for 5 min before freezing the stock aliquots at -80°C. These stocks of VSV-S pseudotyped virions were subsequently used for antibody neutralization assays.

Pseudotype neutralization assay

Vero cells were seeded in 96-well plates at 5×10³ cells/well and incubated overnight at 37°C. Mouse serum from vaccinated animals and human convalescent serum from SARS-CoV-2 infected patients, previously heat inactivated at 56°C for 30 min and stored at -80°C, was serially diluted in serum free media (1:5, 1:10, 1:30, 1:80, 1:150) and 50ul aliquots mixed with 50 ul of the VSV-S pseudotyped virus inoculum, sufficient to produce ~200 infected cells per field of view at 200x magnification. Virus-antibody mixtures were incubated at 37°C for 1 h, added to the Vero cells for 1 h at 37°C, and then the virus inoculum was removed, cells were washed with PBS and incubated in growth medium for 10 h at 37°C. Cell monolayers were imaged at 200X using an EVOS model cell imaging system (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) and the number of fluorescent cells in 3 random fields from each well quantified using ImageJ software.

Interferon-Gamma ELISpot

Spleens from immunized mice were collected aseptically and homogenized into single cell suspensions in complete media (RPMI1640 media supplemented with 10% FBS, penicillin/streptomycin and 1x BME). Cells were collected by centrifugation at 1500 × g for 5 minutes and pellets were re-suspended in 1 mL of ACK lysis buffer (Life Technologies, Carlsbad, CA). Following an 8 min incubation at RT, complete media was added to stop the reaction. Cells were again collected by centrifugation at 1500 × g for 5 min and resuspended in fresh complete media and passed through a 70 μm nylon filter. Single cell suspensions were

counted and resuspended at 2×10^6 cells/ml for use in the ELISpot assay. Mouse IFN- γ ELISpot assays were performed using the Mouse IFN- γ ELISpot Kit (R&D systems, Minneapolis, MN) according to the manufacture's directions.

Briefly, 96-well ELISpot plates pre-coated with capture antibody were hydrated with complete media for 2 hours at room temperature, followed by incubation with streptavidin-AP concentrate for 2 hours at room temperature. Color is developed with BCIP/NBT substrate addition for one hour at room temperature. 2.0×10^5 mouse splenocytes were plated into each well and stimulated at 37°C for 18 h with PepMix™ SARS-Cov-2 spike peptide pools at a final concentration of 1.5nM (JPT, Berlin, Germany). PepMix™ pools consist of 15-mer peptides overlapping by 11 amino acids spanning the entire open reading frame of SARS-COV2 spike protein divided into two peptide pool. Unstimulated cells served as control. Plates were allowed to dry for 2 days then spots were scanned and quantified by ImmunoSpot S6 MACRO Analyzer (CTL, Cleveland, Ohio). Assays were performed in duplicate (for each donor mouse). To calculate Spot-Forming Cells (SFC) per million \pm SEM, mean spot counts from control unstimulated splenocytes were subtracted from the representative SARS-CoV-2 spike stimulated splenocyte sample.

Statistical analyses

The statistics were calculated using GraphPad Prism 5.0 program. Statistical differences between the control and experimental groups were analysed using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test and were considered significant for $p < 0.05$.

Figures and Tables

Figure 1 Sequence features of SARS-CoV-2. A) Depiction of p14 Fusion-Associated Small Transmembrane (FAST) protein. B) The complete whole genomic features of SARS-CoV-2 isolate Wuhan-Hu-1 (Genebank: MN908947). UTR: untranslated region; orf/ORF: open reading frame; TRS: transcriptional regulatory sequences; S: spike glycoprotein encoding region; E: envelope protein encoding region; M: membrane protein encoding region; N: nucleocapsid protein encoding region. The figure is illustrated by SnapGene Viewer. C) 2D Domain architectures and 3D ribbon diagrams of SARS-CoV-2 spike and D) nucleocapsid proteins. NTD: N-terminal RNA binding domain; CTD: C-terminal dimerization domain.(4) E) Diagram

of Fusogenix PLVs fusing with the target cell and delivering the DNA payload directly into the cytoplasm. F) Flow diagram of the Covigenix DNA vaccine candidates with FL-spike, spike RBD, and FL-N genes encoded on nanoplasmid vectors.

Figure 2. Induction of antibody responses by Candidate Covigenix vaccines. Mice were immunized intramuscularly (IM) on Day 1 and 14 with either a 25 ug or 100 ug dose of candidate plasmid DNA vaccines with the Fusogenix platform. The concentration of elicited anti-spike protein antibodies was measured by immunoassay on the meso-scale discovery (MSD) Platform. A) Inset: schematic diagram of SARS-CoV2 spike protein. Graph of plasmid DNA candidates encoding full length spike protein expressed with and without the Nanoplasmid cassette (NTC) and with or without the RIG-I sequence. B) Inset: schematic diagram of SARS-CoV-2 spike protein Receptor Binding Domain (sRBD). Graph with plasmid DNA candidates encoding sRBD with and without CpG sequence. C) Antibody production by Covigenix candidates 14 days following a single dose (Prime) or 7 days following a second dose (Prime+Boost). D) Percent CD19 plus TCR-Beta- cells at Days 14, 17 and 28 in the Covigenix spike protein candidates versus a known model immunogen, firefly luciferase (NTC-Luc).

Figure 3. The neutralizing titer of serum from spike-NTC RIG-I, spike plus CpG, and sRBD plus CpG immunized animals (n=1 each) was determined using VSV-deltaG-GFP backbone pseudotyped with SARS-CoV-2 S protein neutralization assays in permissive 293TT-ACE2 cells. For comparison convalescent human serum samples were tested in parallel (n=19). A Sars-Cov-2 negative human serum sample was used as a control. The graph depicts the percent change from the Covigenix DNA vaccine candidates compared to untreated control as the percent infection reduction \pm SEM.

Figure 4: Induction of cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses from Covigenix DNA vaccine candidates were evaluated using ELISpot assays. A) Mice were immunized with either spike-NTC-RIG-I, spike-NTC or Control (n=3 per group) on day 1 (prime) and day 14 (boost). At 21 days post immunization (7 days following the booster), the mouse splenocytes were stimulated ex vivo with overlapping peptides spanning the entire SARS-CoV2 spike protein open reading frame (ORF). Interferon gamma producing cells were measured by enumerating the antigen

specific spot forming cells (SFC) per million \pm SEM for each peptide pool. * denotes significant difference from control $P < 0.05$ by One-Way ANOVA and Tukeys multiple comparison test. Inset: scale diagram of the Sars-Cov2 spike protein indicating the regions covered by each peptide pool. B) Immunophenotyping of CTL populations following vaccination with spike-NTC+RIG-I, spike-NTC and the model antigen Luc-NTC showed an increase in activated (CD69+) CD8+ CTLs present in the lymph nodes 3 days (day17) that dropped off by 14 days (day 28) post immunization. C) There was a concurrent expansion of the CD8 T cell compartment in the spleen 3 days (day 17) and 14 days (day 28) post boost.

Figure 5: Immunophenotyping of CTL populations following vaccination with A) N Protein-NTC+RIG-I N Protein-NTC, and the model antigen Luc-NTC showed an increase in activated (CD69+) CD8+ CTLs present in the lymph nodes 3 days (day17) but not 14 days (day 28) post immunization. C) There was a concurrent expansion of the CD8 T cell compartment in the spleen 3 days (day 17) and 14 days (day 28) post boost.

Table 1. COVID-19 vaccines in development. The number of vaccines at the stage of: Preclinical (PRE), Human Clinical Trial I, II, or III, Regulatory Review (RR), or Clinical Phase IV as of July 12, 2020. References listed for vaccine candidates in any clinical stage with a preprint or peer reviewed publication. Adapted from the WHO COVID-19 draft vaccine landscape and the Milken Institute (35, 71).

Platform	Advantages/Examples	Limitations/Challenges	Stages							Total
			PRE	I	II	III	RR	IV	Ref	
Protein subunit	Non-infectious Examples: Hepatitis B and shingles.	Take considerable time to develop and validate, not timely for pandemic response.	59	3						62
RNA	Can be developed more quickly and easily than other vaccines	RNA vaccines are expensive, unstable (must be stored at -80C), and toxic (positive charges). No RNA vaccines have been approved for human use.	21	3	1				(72, 73)	25
Non-Replicating Viral Vector	Cannot cause disease.	Immune response against the delivery platform; cannot repeat dose and other viral vector vaccines cannot be used by the recipient. No approved product of this kind has resulted to date.	20	1	1	1			(74)	23
Replicating Viral Vector	Examples: Ebola and Dengue.	Immune response against the delivery platform; cannot repeat dose and other viral vector	17							17

		vaccines cannot be used by the recipient.											
DNA	Can be developed more quickly and easily than other vaccine types. Fusogenic DNA vaccines are nonimmunogenic and non-toxic, allowing for multiple dosing of the same vaccine and repeated use for other vaccines.	DNA vaccines using a viral vector can cause an immune response – no repeat dosing and other viral vector vaccines cannot be used by the recipient. Some DNA vaccines need electroporation with a handheld device (massive electric charge) to allow DNA entry into the cell. No DNA vaccines have been approved for human use yet.	13	2							(75)	15	
Virus-Like Particle (VLP)	Safer alternative to attenuated viruses. Example: HPV vaccine.	Take considerable time to develop and validate, not timely for pandemic response.	14									14	
Inactivated virus	Can be given to people with weakened immune systems. Examples: polio and influenza	Take considerable time to develop and validate, not timely for pandemic response. Could cause disease if not fully inactivated.	8		4						(76, 77)	12	
Live attenuated virus	Elicit a strong immune response. Examples: measles, mumps, and tuberculosis.	Take considerable time to develop and validate, not timely for pandemic response. Causes weak disease symptoms	4									4	
Other Types		Chimeras/Unknown	20									20	
TOTAL			176	9	6	1	0	0	0	0		192	

References

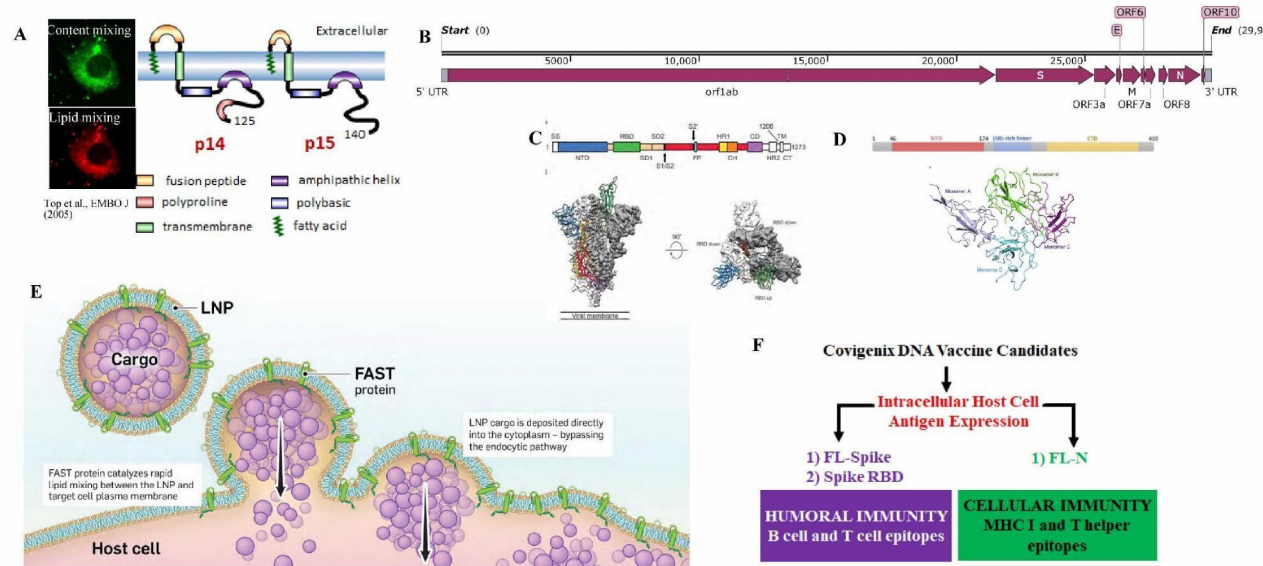
1. E. Dong, H. Du, L. Gardner, An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *The Lancet infectious diseases*, (2020).
2. R. A. Khailany, M. Safdar, M. Ozaslan, Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Rep* **19**, 100682-100682 (2020).
3. I. Astuti, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, (2020)
4. S. Kang *et al.*, Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, (2020).
5. L. Du *et al.*, Priming with rAAV encoding RBD of SARS-CoV S protein and boosting with RBD-specific peptides for T cell epitopes elevated humoral and cellular immune responses against SARS-CoV infection. *Vaccine* **26**, 1644-1651 (2008).
6. S.-F. Wang *et al.*, Antibody-dependent SARS coronavirus infection is mediated by antibodies against spike proteins. *Biochemical and biophysical research communications* **451**, 208-214 (2014).
7. S.-J. Liu *et al.*, Immunological characterizations of the nucleocapsid protein based SARS vaccine candidates. *Vaccine* **24**, 3100-3108 (2006).
8. M. Czub, H. Weingartl, S. Czub, R. He, J. Cao, Evaluation of modified vaccinia virus Ankara based recombinant SARS vaccine in ferrets. *Vaccine* **23**, 2273-2279 (2005).
9. S. F. Ahmed, A. A. Quadeer, M. R. McKay, Preliminary identification of potential vaccine targets for the COVID-19 coronavirus (SARS-CoV-2) based on SARS-CoV immunological studies. *Viruses* **12**, 254 (2020).
10. Y. Wan *et al.*, Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry. *Journal of Virology* **94**, (2019).
11. C.-T. Tseng *et al.*, Immunization with SARS coronavirus vaccines leads to pulmonary immunopathology on challenge with the SARS virus. *PloS one* **7**, e35421-e35421 (2012).
12. L. Liu *et al.*, Anti-spike IgG causes severe acute lung injury by skewing macrophage responses during acute SARS-CoV infection. *JCI Insight* **4**, e123158 (2019).
13. S. B. Halstead, Dengvaxia sensitizes seronegatives to vaccine enhanced disease regardless of age. *Vaccine* **35**, 6355-6358 (2017).
14. P. L. Acosta, M. T. Caballero, F. P. Polack, Brief History and Characterization of Enhanced Respiratory Syncytial Virus Disease. *Clin Vaccine Immunol* **23**, 189-195 (2015).
15. D. Tudor *et al.*, TLR9 pathway is involved in adjuvant effects of plasmid DNA-based vaccines. *Vaccine* **23**, 1258-1264 (2005).

16. J. M. Luke *et al.*, Coexpressed RIG-I Agonist Enhances Humoral Immune Response to Influenza Virus DNA Vaccine. *Journal of Virology* **85**, 1370 (2011).
17. F. Le Boeuf *et al.*, Reovirus FAST Protein Enhances Vesicular Stomatitis Virus Oncolytic Virotherapy in Primary and Metastatic Tumor Models. *Ther Oncolytics* **1**, 5.1.26 (2015).
18. C. W. Brown *et al.*, The p14 FAST protein of reptilian reovirus increases vesicular stomatitis virus neuropathogenesis. *J Virol* **83**, 552-561 (2009).
19. P. Leblanc *et al.*, VaxCelerate II: rapid development of a self-assembling vaccine for Lassa fever. *Hum Vaccin Immunother* **10**, 3022-3038 (2014).
20. C. J. Mann *et al.*, Molecular signature of the immune and tissue response to non-coding plasmid DNA in skeletal muscle after electrotransfer. *Gene Therapy* **19**, 1177-1186 (2012).
21. N. Bessis, F. J. GarciaCozar, M. C. Boissier, Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Therapy* **11**, S10-S17 (2004).
22. T. Sugiyama *et al.*, CpG RNA: identification of novel single-stranded RNA that stimulates human CD14+CD11c+ monocytes. *J Immunol* **174**, 2273-2279 (2005).
23. R. Duncan, Fusogenic Reoviruses and Their Fusion-Associated Small Transmembrane (FAST) Proteins. *Annual Review of Virology* **6**, 341-363 (2019).
24. J. Read *et al.*, Reovirus FAST Proteins Drive Pore Formation and Syncytiogenesis Using a Novel Helix-Loop-Helix Fusion-Inducing Lipid Packing Sensor. *PLoS Pathog* **11**, e1004962 (2015).
25. M. Ciechonska, R. Duncan, Reovirus FAST proteins: virus-encoded cellular fusogens. *Trends in microbiology* **22**, 715-724 (2014).
26. D. Top, J. A. Read, S. J. Dawe, R. T. Syvitski, R. Duncan, Cell-cell membrane fusion induced by p15 fusion-associated small transmembrane (FAST) protein requires a novel fusion peptide motif containing a myristoylated polyproline type II helix. *J Biol Chem* **287**, 3403-3414 (2012).
27. S. Dawe, J. A. Corcoran, E. K. Clancy, J. Salsman, R. Duncan, Unusual topological arrangement of structural motifs in the baboon reovirus fusion-associated small transmembrane protein. *J Virol* **79**, 6216-6226 (2005).
28. S. Dawe, R. Duncan, The S4 genome segment of baboon reovirus is bicistronic and encodes a novel fusion-associated small transmembrane protein. *J Virol* **76**, 2131-2140 (2002).
29. J. A. Corcoran *et al.*, The p14 fusion-associated small transmembrane (FAST) protein effects membrane fusion from a subset of membrane microdomains. *J Biol Chem* **281**, 31778-31789 (2006).
30. H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui, J. Yan, Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *Journal of Controlled Release* **114**, 100-109 (2006).

31. Z. Liu *et al.*, Composition and divergence of coronavirus spike proteins and host ACE2 receptors predict potential intermediate hosts of SARS-CoV-2. *Journal of medical virology* **92**, 595-601 (2020).
32. J. Nie *et al.*, Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2. *Emerging microbes & infections* **9**, 680-686 (2020).
33. H.-L. Xiong *et al.*, Robust neutralization assay based on SARS-CoV-2 S-bearing vesicular stomatitis virus (VSV) pseudovirus and ACE2-overexpressed BHK21 cells. *bioRxiv*, 2020.2004.2008.026948 (2020).
34. T. Thanh Le *et al.*, The COVID-19 vaccine development landscape. *Nature Reviews Drug Discovery* **19**, 305-306 (2020).
35. . (The Milken Institute, 2020).
36. F. Amanat, F. Krammer, SARS-CoV-2 Vaccines: Status Report. *Immunity* **52**, 583-589 (2020).
37. A. A. Aljabali, A. Berardi, D. J. Evans, in *Fundamentals of Nanoparticles*, A. Barhoum, A. S. Hamdy Makhoulouf, Eds. (Elsevier, 2018), pp. 29-50.
38. J. F. C. Steele *et al.*, Synthetic plant virology for nanobiotechnology and nanomedicine. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **9**, (2017).
39. J. A. Kulkarni *et al.*, Design of lipid nanoparticles for in vitro and in vivo delivery of plasmid DNA. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **13**, 1377-1387 (2017).
40. C. F. Cho *et al.*, Viral nanoparticles decorated with novel EGFL7 ligands enable intravital imaging of tumor neovasculature. *Nanoscale* **9**, 12096-12109 (2017).
41. J. Mriouah *et al.*, Abstract 5143: Fusogenic targeted liposomes: novel nanotherapy for specific treatment of prostate cancer. *Cancer Research* **77**, 5143-5143 (2017).
42. R. J. Paproski *et al.*, Porphyrin Nanodroplets: Submicron Ultrasound and Photoacoustic Contrast Imaging Agents. *Small In Press*, (2015).
43. C. F. Cho *et al.*, Molecular targeted viral nanoparticles as tools for imaging cancer. *Methods Mol Biol* **1108**, 211-230 (2014).
44. C. Perez-Medina *et al.*, A modular labeling strategy for in vivo PET and near-infrared fluorescence imaging of nanoparticle tumor targeting. *J Nucl Med* **55**, 1706-1711 (2014).
45. P. H. Beatty, J. D. Lewis, Cowpea mosaic virus nanoparticles for cancer imaging and therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, (2019).
46. F. M. Brunel *et al.*, Hydrazone ligation strategy to assemble multifunctional viral nanoparticles for cell imaging and tumor targeting. *Nano Lett* **10**, 1093-1097 (2010).
47. H. S. Leong *et al.*, Intravital imaging of embryonic and tumor neovasculature using viral nanoparticles. *Nature protocols* **5**, 1406-1417 (2010).
48. J. D. Lewis *et al.*, Viral nanoparticles as tools for intravital vascular imaging. *Nat Med* **12**, 354-360 (2006).

49. A. L. Martin *et al.*, Synthesis of bombesin-functionalized iron oxide nanoparticles and their specific uptake in prostate cancer cells. *Journal of nanoparticle research : an interdisciplinary forum for nanoscale science and technology* **12**, 1599-1608 (2009).
50. Jazayeri, Poh, Development of Universal Influenza Vaccines Targeting Conserved Viral Proteins. *Vaccines* **7**, 169 (2019).
51. M. T. Koday *et al.*, Multigenic DNA vaccine induces protective cross-reactive T cell responses against heterologous influenza virus in nonhuman primates. *PLOS ONE* **12**, e0189780 (2017).
52. D. Hobernik, M. Bros, DNA Vaccines—How Far From Clinical Use? *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 3605 (2018).
53. J. van Haasteren, S. C. Hyde, D. R. Gill, Lessons learned from lung and liver in-vivo gene therapy: implications for the future. *Expert opinion on biological therapy* **18**, 959-972 (2018).
54. C. S. Lee *et al.*, Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes & Diseases* **4**, 43-63 (2017).
55. P. R. Cullis, M. J. Hope, Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies. *Molecular Therapy* **25**, 1467-1475 (2017).
56. H. B. Parmar, R. Duncan, A novel tribasic Golgi export signal directs cargo protein interaction with activated Rab11 and AP-1-dependent Golgi-plasma membrane trafficking. *Mol Biol Cell* **27**, 1320-1331 (2016).
57. H. B. Parmar, C. Barry, R. Duncan, Polybasic trafficking signal mediates golgi export, ER retention or ER export and retrieval based on membrane-proximity. *PLoS One* **9**, e94194 (2014).
58. M. Ciechonska, R. Duncan, Lysophosphatidylcholine reversibly arrests pore expansion during syncytium formation mediated by diverse viral fusogens. *J Virol* **88**, 6528-6531 (2014).
59. J. A. Corcoran, E. K. Clancy, R. Duncan, Homomultimerization of the reovirus p14 fusion-associated small transmembrane protein during transit through the ER-Golgi complex secretory pathway. *J Gen Virol* **92**, 162-166 (2011).
60. E. K. Clancy, R. Duncan, Helix-destabilizing, beta-branched, and polar residues in the baboon reovirus p15 transmembrane domain influence the modularity of FAST proteins. *J Virol* **85**, 4707-4719 (2011).
61. E. K. Clancy, C. Barry, M. Ciechonska, R. Duncan, Different activities of the reovirus FAST proteins and influenza hemagglutinin in cell-cell fusion assays and in response to membrane curvature agents. *Virology* **397**, 119-129 (2010).
62. C. Barry, R. Duncan, Multifaceted sequence-dependent and -independent roles for reovirus FAST protein cytoplasmic tails in fusion pore formation and syncytiogenesis. *J Virol* **83**, 12185-12195 (2009).

63. D. Top, C. Barry, T. Racine, C. L. Ellis, R. Duncan, Enhanced fusion pore expansion mediated by the trans-acting Endodomain of the reovirus FAST proteins. *PLoS Pathog* **5**, e1000331 (2009).
64. E. K. Clancy, R. Duncan, Reovirus FAST protein transmembrane domains function in a modular, primary sequence-independent manner to mediate cell-cell membrane fusion. *J Virol* **83**, 2941-2950 (2009).
65. D. Top *et al.*, Liposome reconstitution of a minimal protein-mediated membrane fusion machine. *The EMBO journal* **24**, 2980-2988 (2005).
66. J. Salsman, D. Top, J. Boutilier, R. Duncan, Extensive syncytium formation mediated by the reovirus FAST proteins triggers apoptosis-induced membrane instability. *J Virol* **79**, 8090-8100 (2005).
67. R. Duncan, J. Corcoran, J. Shou, D. Stoltz, Reptilian reovirus: a new fusogenic orthoreovirus species. *Virology* **319**, 131-140 (2004).
68. J. A. C. Duncan, Reptilian Reovirus Utilizes a Small Type III Protein with an External Myristylated Amino Terminus To Mediate Cell-Cell Fusion. (2004).
69. J. A. Corcoran *et al.*, Myristoylation, a protruding loop, and structural plasticity are essential features of a nonenveloped virus fusion peptide motif. *J Biol Chem* **279**, 51386-51394 (2004).
70. J. A. Corcoran, R. Duncan, Reptilian reovirus utilizes a small type III protein with an external myristylated amino terminus to mediate cell-cell fusion. *J Virol* **78**, 4342-4351 (2004).
71. . (The World Health Organization), vol. 2020.
72. M. J. Mulligan *et al.*, Phase 1/2 Study to Describe the Safety and Immunogenicity of a COVID-19 RNA Vaccine Candidate (BNT162b1) in Adults 18 to 55 Years of Age: Interim Report. *medRxiv*, 2020.2006.2030.20142570 (2020).
73. K. S. Corbett *et al.*, SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Development Enabled by Prototype Pathogen Preparedness. *bioRxiv*, 2020.2006.2011.145920 (2020).
74. F.-C. Zhu *et al.*, Safety, tolerability, and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vectored COVID-19 vaccine: a dose-escalation, open-label, non-randomised, first-in-human trial. *The Lancet* **395**, 1845-1854 (2020).
75. T. R. F. Smith *et al.*, Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19. *Nature Communications* **11**, 2601 (2020).
76. Q. Gao *et al.*, Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science*, (2020).
77. H. Wang *et al.*, Development of an inactivated vaccine candidate, BBIBP-CorV, with potent protection against SARS-CoV-2. *Cell*, (2020).



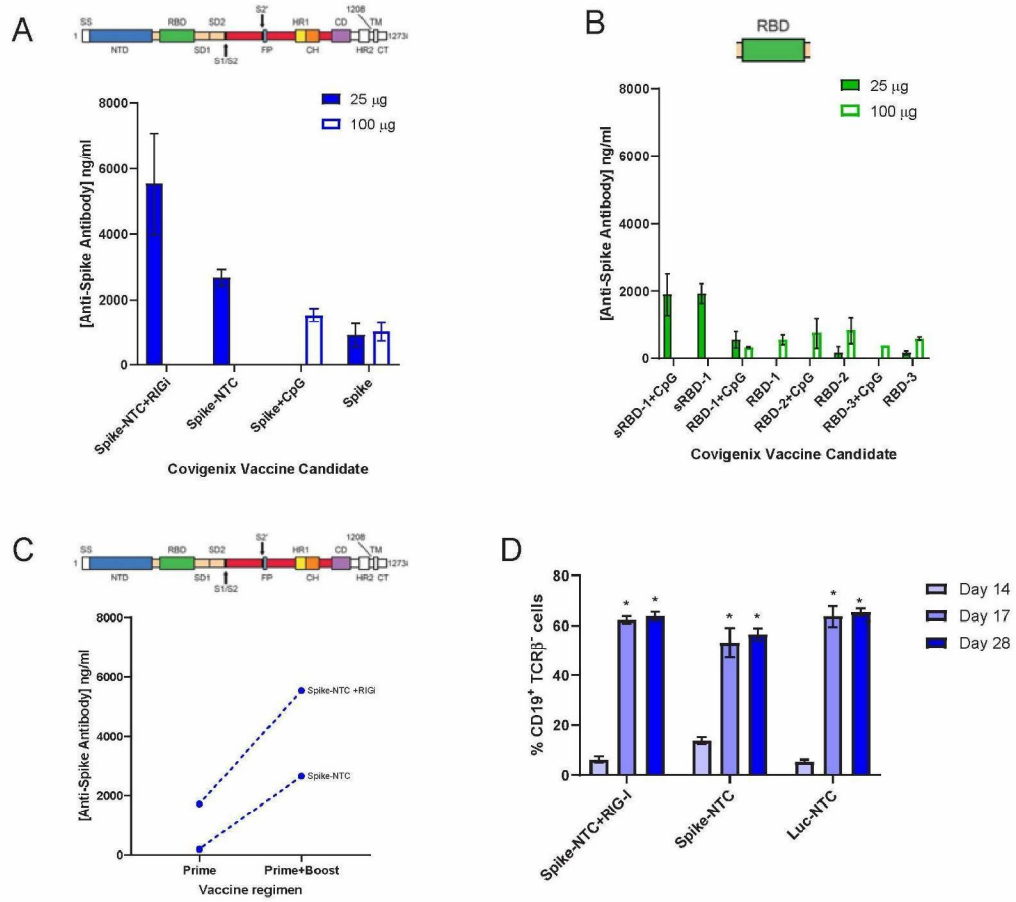


Fig 2. Antibody production induced by Covigenix vaccine candidates.

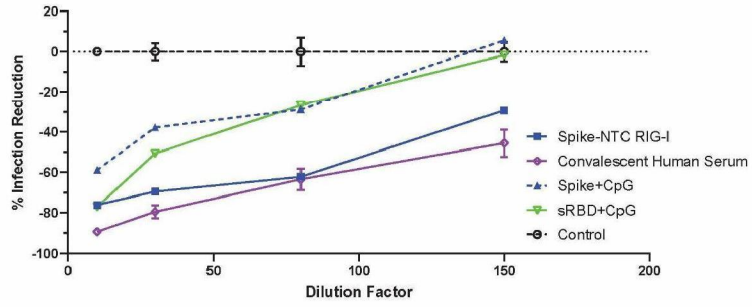


Fig.3. Pseudotyped VSV-GFP neutralization.

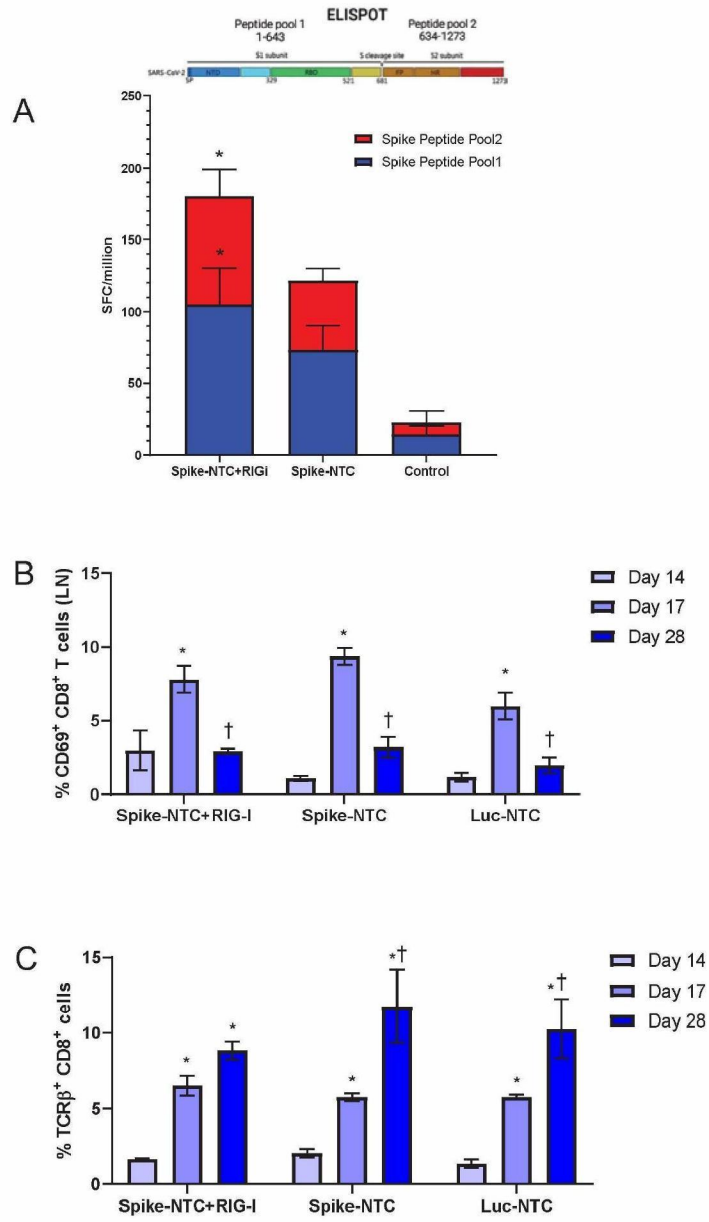


Fig 4. IFN- gamma ELISPOT.

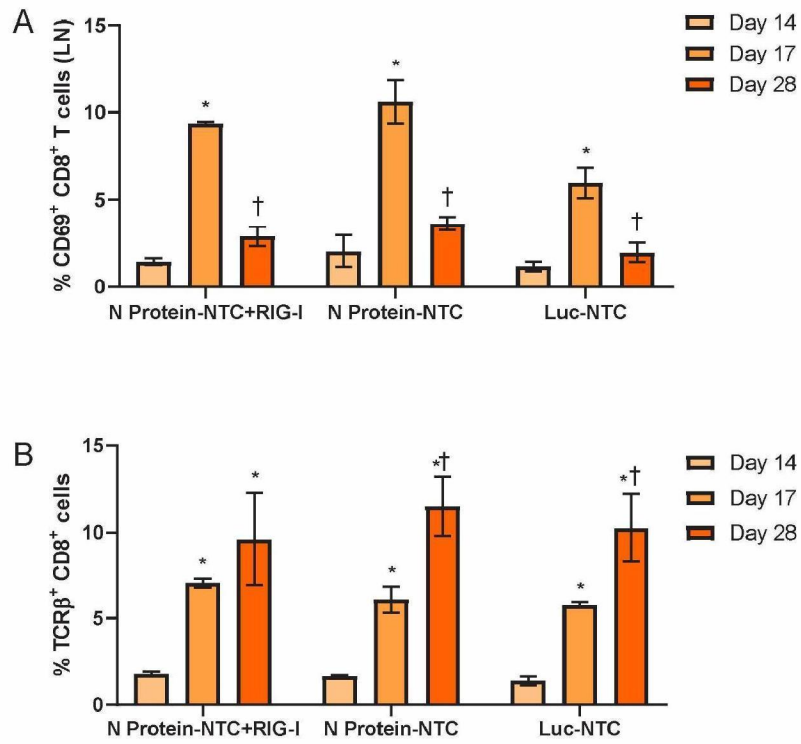


Fig 5.