

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

DATUM 04 mei 2021
KENMERK CGM/210504-01
ONDERWERP Advies Inschaling van werkzaamheden met gg-LCMV

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag betreffende het dossier getiteld 'Werkzaamheden met Lymphocytic Choriomeningitis Virus voor farmaceutische doeleinden' (IG 21-054_2.8-000), ingediend door Halix B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) replicatiecompetent Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus (LCMV). Het betreft een reassortant virus dat het L-segment van LCMV-stam Clone-13 en het S-segment van LCMV-stam WE bevat. Het gg-virus bevat additionele mutaties die het tumortropisme en de anti-tumor activiteit vergroten. De aanvrager wil een 'viral seed' produceren voor farmaceutische doeleinden en verzoekt om de voorgenomen werkzaamheden uit te mogen voeren op inperkingsniveau II.

De COGEM is van oordeel dat het reassortante gg-LCMV virus verzwakt (geattenuerd) en minder pathogeen is dan de wildtype WE-stam. Er zijn geen aanwijzingen dat de additionele mutaties van invloed zijn op de attenuering en leiden tot een verhoging van de pathogeniteit ten opzichte van het oorspronkelijke reassortante virus.

De COGEM adviseert de voorgenomen werkzaamheden met replicatiecompetent gg-LCMV uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. Onder inachtneming van dit inperkingsniveau en onder de door de vergunningaanvrager gestelde aanvullende voorwaarden, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.



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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke.

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

- c.c.
- Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's, DG Milieu en Internationaal

Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd replicatiecompetent *Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus*

COGEM advies CGM/210504-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag (IG 21-054) getiteld ‘Werkzaamheden met Lymphocytic Choriomeningitis Virus voor farmaceutische doeleinden’, ingediend door Halix B.V. Dit betreft de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) replicatiecompetent *Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus* (LCMV). Het betreft een reassortant virus dat het L-segment van LCMV-stam Clone-13 en het S-segment van LCMV-stam WE bevat. De aanvrager wil een ‘viral seed’ produceren en verzoekt de werkzaamheden op ML-II niveau uit te voeren.

2. *Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus* (LCMV)

Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus (LCMV) behoort tot het genus *Mammarenavirus* binnen de familie *Arenaviridae*. Het is een enkelstrengs gesegmenteerd ‘ambisense’ RNA-virus waarvan het virusdeeltje door een lipidenmembraan wordt omhuld. In het membraan zijn glycoproteïnen (GP) verankerd. De RNA-segmenten zitten ingepakt in het nucleocapside (NP) eiwit.¹

2.1 Genomische organisatie van LCMV

Het genoom van LCMV bestaat uit twee ambisense enkelstrengs RNA moleculen, een zogenaamd klein (S) en groot (L) RNA segment. Het Z-gen, dat codeert voor het matrixeiwit, is gelegen op het 5'-einde van het L segment in de sense-oriëntatie. Het L-gen codeert voor het RNA polymerase en bevindt zich eveneens op het L-segment in de antisense-oriëntatie. Op het 5'-einde van het S-segment bevindt zich in de sense-oriëntatie het glycoproteïne ‘precursor’ (GPC) gen. Na posttranslationele klieving van GPC worden de GP1 en GP2 eiwitten gevormd. Het NP-gen, dat codeert voor het nucleoproteïne, ligt in de antisense-oriëntatie op het 3'-einde van het S-segment.²

2.2 Eigenschappen van LCMV

De natuurlijke gastheer van LCMV is de muis.³ LCMV kan daarnaast andere knaagdieren, kippen, honden, apen en mensen infecteren.⁴ In muizenpopulaties wordt het virus verticaal van generatie op generatie via intra-uteriene infectie (in de baarmoeder) overgedragen.⁵ Bij muizen kan LCMV een persistente infectie veroorzaken, waarbij de muizen het virus gedurende hun leven uitscheiden in uitwerpselen en lichaamsvloeistoffen zonder dat zij zelf ziektesymptomen vertonen.⁶ LCMV is enzoötisch in Europa, Azië, Noord- en Zuid-Amerika en mogelijk ook op andere continenten.^{4,8}

Mensen kunnen geïnfecteerd raken met LCMV door direct contact met besmette knaagdieren, via beten of door blootstelling aan besmette urine, ontlasting, nestmateriaal of speeksel. Ook kunnen mensen geïnfecteerd worden door de inademing van virusdeeltjes.⁷ De seroprevalentie van LCMV onder de humane bevolking ligt rond de 2-5%.⁸ LCMV veroorzaakt geen chronische infectie bij de mens, na een acute fase van de ziekte wordt het virus geklaard uit het lichaam.⁸ Een derde van de infecties verloopt subklinisch, een derde leidt tot milde griepachtige verschijnselen en een derde van de infecties veroorzaakt ernstigere ziekteverschijnselen zoals meningitis (hersenvliesontsteking) of meningo-encephalitis (hersenen- en hersenvliesontsteking).^{9,10} Ook in nagenoeg alle ernstige gevallen treedt volledig herstel op na een LCMV infectie.¹¹ De mortaliteit bij gezonde mensen is minder dan 1%.³

Met uitzondering van verticale transmissie en orgaandonatie zijn er geen aanwijzingen dat LCMV van mens op mens kan worden overgedragen.^{4,9,12} Een congenitale LCMV infectie kan optreden als een vrouw tijdens de zwangerschap een primaire LCMV infectie oploopt. Verticale transmissie naar het ongeboren kind kan leiden tot abortus, neonatale meningitis of ernstige geboortefwijkingen. In ongeveer 35% van de gevallen is verticale transmissie van moeder op foetus fataal voor het ongeboren kind.^{4,5} Er is geen vaccin of specifieke profylaxe voor LCMV beschikbaar.

2.3 LCMV stammen Armstrong, Clone-13 en WE

Veel bestudeerde isolaten van LCMV zijn de stammen Armstrong (ARM) en WE. LCMV-ARM is in 1934 door Charles Armstrong uit een patiënt geïsoleerd.¹³ De WE stam is oorspronkelijk geïsoleerd uit een patiënt met de initialen WE in 1935.^{14,15} De nucleotidensequenties van ARM en WE komen voor ongeveer 84% overeen, de aminozuursequenties voor 91%.¹⁶ De ARM stam heeft een neurotropisme en de WE stam heeft een tropisme voor viscera (ingewanden).¹⁶ WE is virulent en ARM 'benign'.¹⁷ In tegenstelling tot ARM, veroorzaakt WE leverziekte bij muizen en resusapen, en systemische hemorrhagische verschijnselen bij apen en cavia's.^{16,18,19} Infectie van resusapen met de ARM stam veroorzaakt geen ziekteverschijnselen.¹⁹

LCMV Clone-13 is een variant van de ARM-stam en geïsoleerd uit de milt van een geïnfecteerde muis met een persistente LCMV-infectie.²⁰ Clone-13 verschilt slechts 5 nucleotiden met de oorspronkelijke ARM-stam²¹, waarvan twee mutaties belangrijk zijn voor het persistente fenotype: de substitutie van een lysine naar een glutamine op positie 1079 in het RNA polymerase (L-eiwit) en een fenylalanine naar een leucine substitutie op positie 260 in het GPC-glycoproteïne.²²

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens een gg-LCMV virus, ABX-001, te produceren en te vermeerderen voor farmaceutische doeleinden. Het gg-LCMV is een reassortant virus dat bestaat uit het L-segment van LCMV-stam Clone-13 en het S-segment van LCMV-stam WE. Daarbij beoogt de aanvrager een vector te produceren die geattenuëerd is, maar die de anti-tumoractiviteit zoals beschreven voor de WE-stam²³, behouden heeft.

De productie van gg-LCMV virussen vindt plaats via 'reverse genetics' waarbij cellen getransfected worden met vier plasmides: twee plasmides leveren na transcriptie beide virale RNA genomsegmenten en twee helperplasmides brengen het NP-eiwit en de L-polymerase tot expressie.²⁴

Het reassortante gg-LCMV virus is verkregen door cellen te transfecteren met het plasmide met de cDNA sequentie voor het S-segment van WE te combineren met het plasmide met cDNA sequentie van het L-segment van Clone-13.

De aanvrager geeft aan dat de te gebruiken LCMV reassortant ABX-001 additionele mutaties bevat die het tumortropisme vergroten. Deze mutaties zijn gevonden na het passeren van wildtype virus op verschillende humane tumorcellijnen.

De werkzaamheden beslaan het opkweken van cellen en het maken van een ‘virus seed’. Daarbij zal gebruik worden gemaakt van ‘single use’ bioreactoren (< 100 liter). Zowel de grootschalige productie als de ontwikkelingswerkzaamheden zullen plaatsvinden in ruimtes op onderdruk en er zal worden gewerkt in gesloten systemen. Open handelingen worden in een veiligheidskabinet klasse II uitgevoerd. Daarnaast geeft de aanvrager als aanvullende maatregelen aan te werken met handschoenen en worden zwangere vrouwen uitgesloten van werkzaamheden.

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft wildtype LCMV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.²⁵ In dit advies uit 2016 heeft de COGEM LCMV-ARM op basis van langdurig veilig gebruik, en omdat deze stam in tegenstelling tot het wildtype geen ziekte veroorzaakt in resusapen, geherclassificeerd en ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2. Verder adviseerde zij om de indeling van de LCMV stammen Docile en WE in pathogeniteitsklasse 3 te handhaven.²⁵

In hetzelfde advies heeft de COGEM eveneens geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden waarbij muizen geïnfecteerd werden met replicatie-incompetent gg-LCMV gebaseerd op LCMV-ARM, Docile of WE. Op basis van de biologische inperking van de betreffende ggo's adviseerde de COGEM de productie van de gg-virussen en de infectie van cellen met gg-LCMV op ML-II inperkingsniveau uit te voeren. De werkzaamheden met gg-LCMV in combinatie met muizen adviseerde zij op DM-II inperkingsniveau uit te voeren.²⁵

In 2019 heeft de COGEM geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met replicatiecompetent gg-LCMV, gebaseerd op de LCMV-ARM. In plaats van het ‘eigen’ glycoproteïne (GP) brachten de gg-virussen het GP van de LCMV stam WE tot expressie. Door de aangebrachte modificaties zijn de gg-LCMV virussen verzwakt. De COGEM was van oordeel dat de gg-LCMV virussen qua pathogeniteit vergelijkbaar zijn met LCMV-ARM en adviseerde de voorgenomen laboratoriumwerkzaamheden op ML-II inperkingsniveau uit te voeren, met als voorwaarde dat zwangere vrouwen worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden.²⁶

In beide adviezen signaleerde de COGEM dat eventuele nadelige gevolgen voor de medewerker ten gevolge van een onbedoelde infectie van gg-LCMV niet geheel uitgesloten kon worden. Om de kans op besmetting van de medewerker te minimaliseren, gaf de COGEM de aanvrager in overweging om tijdens voorgenomen handelingen handschoenen tot over de mouw te dragen. Voor handelingen in combinatie

met (gg-) muizen voegde de COGEM daaraan toe om de muizen in filtertopkooien te huisvesten en de besmette filtertopkooien alleen te openen in een veiligheidskabinet klasse II.^{25,26}

5. Overweging

5.1 *Attenuering en virulentie van gg-LCMV ABX-001*

De aanvrager geeft aan een LCMV vector te produceren die geattenuerd en minder pathogeen is, met behoud van de anti-tumor activiteit. Om dit te bereiken heeft de aanvrager een reassortant gg-LCMV virus gemaakt, bestaande uit het L-segment van LCMV-stam Clone-13 en het S-segment van LCMV-stam WE. Tevens zijn additionele mutaties aangebracht in ABX-001 die het tumortropisme vergroten. De aanvrager verwijst voor onderbouwing van de attenuering en verminderde pathogeniteit naar de literatuur en levert vertrouwelijke experimentele data aan die door de COGEM zijn ingezien.

De aanvrager verwijst naar eerdere studies waarin genetische reassortanten zijn gemaakt tussen het S- en L-segment van LCMV-stammen ARM en WE.^{27,28} Deze studies wijzen er op dat de virulentie van LCMV voor een belangrijk deel bepaald wordt door factoren gelegen op het L-segment en niet door het GP of andere elementen op het S-segment.^{27,28} Op basis van experimentele data concludeert de aanvrager dat het reassortante gg-LCMV een sterk verminderde replicatiecapaciteit (>100 keer) heeft op cellen van verschillende oorsprong, zoals humane en muizentumorcellen, dendritische cellen en neuronen. Daarnaast leidt infectie met het reassortante virus tot een sterk verminderde inductie van ‘pathogene’ cytokines in naïeve dieren, zoals IFN- α en IL-6 waarvan eerder is aangetoond dat deze tot orgaanschade kunnen leiden.^{29,30,31} In verschillende proefdieren (niet-humane primaten, knaagdieren en cavia’s) is het reassortante virus niet langer in staat LCMV-specifieke ziekteverschijnselen te induceren. Zo leidt infectie met het reassortante virus niet tot gewichtsverlies, leverschade of andere tekenen van hemorrhagische koorts in FVB muizen, die zeer gevoelig zijn voor LCMV infectie.³⁰ In tegenstelling tot de hierboven beschreven data, is de ‘omgekeerde’ mutant die bestaat uit het S-segment van LCMV-stam Clone-13 en het L-segment van LCMV-stam WE niet geattenuerd. De aanvrager stelt dat de additionele mutaties in ABX-001 het tumortropisme en de anti-tumor activiteit van de vector vergroten, maar dat het geattenuerde fenotype vergelijkbaar is aan het reassortante virus waarvan ABX-001 is afgeleid.

Alles in ogenschouw nemende is de COGEM van oordeel dat het reassortante gg-LCMV virus, bestaande uit het S-segment van LCMV-stam WE en het L-segment van LCMV-stam Clone-13, geattenuerd en minder pathogeen is dan de wildtype WE-stam. De additionele mutaties in ABX-001 zijn verkregen na passeren van wildtype LCMV op tumorcellen en er zijn geen aanwijzingen dat deze van invloed zijn op de attenuering en leiden tot een verhoging van de pathogeniteit ten opzichte van het oorspronkelijke reassortante virus.

5.2 *Risico van blootstelling aan gg-LCMV virussen*

Infectie bij de mens met wildtype LCMV kan optreden door direct contact met besmette knaagdieren, via beten of door blootstelling aan besmette urine, ontlasting, nestmateriaal, speeksel of aerosolen van geïnfecteerde knaagdieren.

De COGEM wijst erop dat, indien een medewerker onbedoeld wordt blootgesteld aan replicatiecompetent gg-LCMV, dit mogelijk nadelige gevolgen kan hebben voor de medewerker. Er zijn geen aanwijzingen dat LCMV van mens op mens kan worden overgedragen, met uitzondering van verticale transmissie en orgaandonatie. Verticale transmissie naar het ongeboren kind kan leiden tot abortus, neonatale meningitis of ernstige geboortefwijkingen. De aanvrager sluit zwangere medewerkers daarom uit van de voorgenomen werkzaamheden met gg-LCMV. Om besmetting van medewerkers te voorkomen stelt de aanvrager dat medewerkers handschoenen zullen dragen. De COGEM wijst erop dat handschoenen over de mouwen van de werkkleding gedragen moeten worden om de kans op overdracht via wondjes te minimaliseren.

6. Advies

De COGEM adviseert de voorgenomen werkzaamheden met replicatiecompetent gg-LCMV uit te voeren op ML-II inperkingsniveau. Onder inachtneming van dit inperkingsniveau en onder de door de vergunningaanvrager gestelde aanvullende voorwaarden, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/bunyavirales/w/arenaviridae/1117/genus-mammarenavirus (bezocht 26 april 2021)
2. King AMQ *et al.* (2012). Family *Arenaviridae*. In Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
3. Buchmeier MJ *et al.* (2013). *Arenaviridae*. In: Fields virology, 6th edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
4. Public Health Agency Canada (2011). Lymphocytic choriomeningitis virus. Pathogen Safety Data Sheet – Infectious Substances. www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/lymp-cho-eng.php (bezocht: 26 april 2021)
5. Wright R *et al.* (1997). Congenital lymphocytic choriomeningitis virus syndrome: a disease that mimics congenital toxoplasmosis or Cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 100:E9
6. Salvato MS *et al.* (2012). Family *Arenaviridae*. In Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Inc., Amsterdam
7. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV). <https://www.rivm.nl/wilde-knaagdieren-en-zo-nosen/ziekteverwekkers/lymphocytic-choriomeningitis-virus-lcmv> (bezocht: 26 april 2021)
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Lymphocytic Choriomeningitis (LCM). <https://www.cdc.gov/vhf/lcm/pdf/factsheet.pdf> (bezocht: 29 april 2021)
9. Bonthuis DJ (2012). Lymphocytic choriomeningitis virus: an underrecognized cause of neurologic disease in the fetus, child, and adult. *Semin. Pediatr. Neurol.* 19: 89-95

10. Barton LL & Mets MB (2001). Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection: decade of rediscovery. *Clin. Infect. Dis.* 33: 370-374
11. Verhaegh EM *et al.* (2014). Meningitis na muizenbeet. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 158: A7033
12. Fischer SA *et al.* (2006). Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation. *N. Engl. J. Med.* 354: 2235-2249
13. Armstrong C & Lillie RD (1934). Experimental Lymphocytic Choriomeningitis of Monkeys and Mice Produced by a Virus Encountered in Studies of the 1933 St. Louis Encephalitis Epidemic. *Public Health R.* 49: 1019-1027
14. Rivers TM & Scott TF (1935). Meningitis in man caused by a filterable virus. *Science* 81: 439-440
15. Rivers TM & Scott TF (1936). Meningitis in man caused by a filterable virus. II. Identification of the etiological agent. *J. Exp. Med.* 63: 415-432
16. Bergthaler A *et al.* (2007). Contributions of the lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein and polymerase to strain-specific differences in murine liver pathogenicity. *J. Gen. Virol.* 88: 592-603
17. Zapata JC *et al.* (2011). Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection of macaques: a model for Lassa fever. *Antiviral Res.* 92: 125-138
18. Lukashovich IS *et al.* (2002). Hemorrhagic fever occurs after intravenous, but not after intragastric, inoculation of rhesus macaques with lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Med. Virol.* 67: 171-186
19. Lukashovich IS *et al.* (2004). LCMV-mediated hepatitis in rhesus macaques: WE but not ARM strain activates hepatocytes and induces liver regeneration. *Arch. Virol.* 149: 2319-2336
20. Ahmed R *et al.* (1984). Selection of genetic variants of lymphocytic choriomeningitis virus in spleens of persistently infected mice. Role in suppression of cytotoxic T lymphocyte response and viral persistence. *J. Exp. Med.* 160: 521-540.
21. Salvato M *et al.* (1991). Molecular basis of viral persistence: A single amino acid change in the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus is associated with suppression of the antiviral cytotoxic T-lymphocyte response and establishment of persistence. *J. Virol.* 65: 1863–1869
22. Matloubian M *et al.* (1993). Molecular determinants of macrophage tropism and viral persistence: Importance of single amino acid changes in the polymerase and glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* 67: 7340–7349
23. Kalkavan, H *et al.* (2017) Spatiotemporally restricted arenavirus replication induces immune surveillance and type I interferon-dependent tumour regression. *Nat Commun* 8, 14447. <https://doi.org/10.1038/ncomms14447>
24. Lee KJ *et al.* (2000). NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. *J. Virol.* 74: 3470–3477
25. COGEM (2016). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus. COGEM advies CGM/160513-01
26. COGEM (2019). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd replicatiecompetent Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus. COGEM advies CGM/190703-02
27. Riviere Y *et al.* (1985). Genetic mapping of lymphocytic choriomeningitis virus pathogenicity: virulence in guinea pigs is associated with the L RNA segment. *J. Virol.* 55: 704-709
28. Riviere, Y & Oldstone, MB (1986). Genetic reassortants of lymphocytic choriomeningitis virus: Unexpected disease and mechanism of pathogenesis. *J. Virol.* 59: 363–368

29. Lang P, A, Recher M, Häussinger D, Lang K, S: Genes Determining the Course of Virus Persistence in the Liver: Lessons from Murine Infection with Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *Cell Physiol Biochem* 2010;26:263-272. doi: 10.1159/000320549
30. Schnell FJ *et al.* (2012). Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection in FVB Mouse Produces Hemorrhagic Disease. *PLOS Path.* 8(12):e1003073. doi: 10.1371/journal.ppat.1003073
31. Oldstone MBA *et al.*(2012). Lymphocytic choriomeningitis virus Clone 13 infection causes either persistence or acute death dependent on IFN-1, cytotoxic T lymphocytes (CTLs), and host genetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 115: E7814-E7823