

Aan de minister van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. B. Visser
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 08 december 2021
KENMERK CGM/211208-01
ONDERWERP Advies grootschalige productie van chimeer LCMV

Geachte mevrouw Visser,

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag betreffende het dossier getiteld 'Grootschalige productie van chimeer LCMV' (IG 21-167_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-) *Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus* (LCMV). Het gg-virus is samengesteld uit twee verschillende LCMV-stammen, waarvan er één verzwakt is. Hierdoor is het gg-virus, vergeleken met het wildtype virus, verzwakt en minder ziekteverwekkend. Kleinschalige productiewerkzaamheden met dit gg-virus zijn voor de aanvrager reeds vergund op inperkingsniveau ML-II. In onderhavige vergunningaanvraag wenst de aanvrager de productiewerkzaamheden met dit gg-virus op te schalen tot een maximumvolume van 250 liter in een bioreactor voor eenmalig gebruik op inperkingsniveau MI-III.

De COGEM is van oordeel dat de te gebruiken bioreactor in combinatie met de door de aanvrager voorgestelde werkwijze, voldoende ingeperkt is. Onder inachtneming van dit inperkingsniveau en onder de door de aanvrager gestelde aanvullende voorwaarden, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden verwaarloosbaar klein.



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

Hoogachtend,

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

c.c. - Drs. Y. de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's
 DG Milieu en Internationaal

Grootschalige productie van *Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus* in een bioreactor voor eenmalig gebruik

COGEM advies CGM/211208-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag (IG 21-167) getiteld 'Grootschalige productie van chimeer LCMV', ingediend door Halix B.V. De vergunningaanvraag betreft de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) replicatiecompetent *Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus* (LCMV).¹ 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 is voornemens de gg-LCMV deeltjes met behulp van dierlijke cellen op grote schaal te produceren met een volume tot maximaal 250 liter in een bioreactor voor eenmalig gebruik (SUB, 'single use bioreactor'). De aanvrager verzoekt de voorgenomen werkzaamheden uit te voeren op inperkingsniveau MI-III.

2. *Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus* (LCMV)

Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus (LCMV) behoort tot het genus *Mammarenavirus* binnen de familie *Arenaviridae*.¹ 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.²

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 posttranslationale klieving van het 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.³

2.2 Eigenschappen van LCMV

De natuurlijke gastheer van LCMV is de muis.⁴ LCMV kan daarnaast andere knaagdieren, kippen, honden, apen en mensen infecteren.⁵ In muizenpopulaties wordt het virus verticaal van generatie op generatie via intra-uteriene infectie (in de baarmoeder) overgedragen.⁶ Bij muizen kan LCMV een persistente infectie veroorzaken, waarbij de muizen het virus gedurende hun gehele leven uitscheiden in uitwerpselen en lichaamsvloeistoffen zonder dat zij zelf ziektesymptomen vertonen.⁷ LCMV is enzoötisch in Europa, Azië, Noord- en Zuid-Amerika, en mogelijk ook op andere continenten.^{5,9}

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.⁸ De seroprevalentie van LCMV onder de

humane bevolking ligt rond de 2-5%.⁹ LCMV veroorzaakt geen chronische infectie bij de mens, na een acute fase van de ziekte wordt het virus geklaard uit het lichaam.⁹ 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).^{10,11} Ook in nagenoeg alle ernstige gevallen treedt volledig herstel op na een LCMV-infectie.¹² De mortaliteit bij gezonde mensen is minder dan 1%.⁴

Met uitzondering van verticale transmissie en orgaandonatie zijn er geen aanwijzingen dat LCMV van mens op mens kan worden overgedragen.^{5,10,13} 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.^{5,6} 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.¹⁴ De WE-stam is oorspronkelijk geïsoleerd uit een patiënt met de initialen WE in 1935.^{15,16} De nucleotidensequenties van ARM en WE komen voor ongeveer 84% overeen, de aminozuursequenties voor 91%.¹⁷ De ARM-stam heeft een neurotropisme en de WE-stam heeft een tropisme voor viscera (ingewanden).¹⁷ WE is virulent en ARM 'goedaardig' (benign).¹⁸ In tegenstelling tot ARM, veroorzaakt WE leverziekte bij muizen en resusapen, en systemische hemorragische verschijnselen bij apen en cavia's.^{17,19,20} Infectie van resusapen met de ARM-stam veroorzaakt geen ziekteverschijnselen.²⁰

LCMV Clone-13 is een variant van de ARM-stam en geïsoleerd uit de milt van een geïnfecteerde muis met een persistente LCMV-infectie.²¹ Clone-13 verschilt slechts 5 nucleotiden van de oorspronkelijke ARM-stam²², 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.²³

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager is voornemens het gg-LCMV te vermeerderen als product voor klinische studies. Het gg-LCMV betreft een reassortant dat bestaat uit het L-segment van LCMV-stam Armstrong, Clone-13 en het S-segment van LCMV-stam WE. De productie van de gg-LCMV virussen vindt plaats via een 'reverse genetics' systeem waarbij HEK293 en/of BHK21 cellen getransfecteerd worden met vier plasmiden. Twee plasmiden leveren na transcriptie beide virale RNA-genoomsegmenten (een plasmide bevat de cDNA sequentie voor het S-segment van WE en het andere plasmide de cDNA sequentie van het L-segment van Clone-13) en twee helperplasmiden brengen het NP-eiwit en de L-polymerase tot expressie.²⁴

De werkzaamheden beslaan het opkweken van cellen en het maken van een 'virus seed'. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een SUB van het type HyPerforma 5:1 vessel, en er wordt voor de productie van het gg-LCMV een maximaal volume van 250 liter gehanteerd. De werkzaamheden zullen plaatsvinden in ruimtes met onderdruk. Als aanvullende maatregelen stelt de aanvrager voor open

handelingen (voor zover van toepassing) uit te voeren in een veiligheidskabinet klasse II, te werken met handschoenen en zwangere vrouwen uit te sluiten van de werkzaamheden.

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft wildtype LCMV en LCMV-WE ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3 en de stam LCMV-ARM op basis van langdurig veilig gebruik en de afwezigheid van het vermogen ziekte te veroorzaken in resusapen, ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.²⁵

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 2021 heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden van dezelfde aanvrager en met hetzelfde gg-LCMV als in onderhavige aanvraag, waarbij de aanvrager het gg-LCMV op kleine schaal (< 100 liter) wilde produceren in een SUB. De COGEM was van oordeel dat het gg-LCMV met het L-segment van LCMV-stam Clone-13 en S-segment van LCMV-stam WE geattenuëerd en minder pathogeen is dan de wildtype WE-stam. Zij adviseerde dat de voorgenomen ontwikkel- en productiewerkzaamheden op inperkingsniveau ML-II uit te voeren, met als voorwaarden dat zwangere vrouwen worden uitgesloten van deelname aan de werkzaamheden en er handschoenen tot over de mouw van de werkkleding worden gedragen.²⁷

5. Overweging

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden meteen SUB van het type HyPerforma 5:1 voor de productie van replicatiecompetent gg-LCMV op inperkingsniveau MI-III.²⁸

5.1 Inperking van de SUB

De aanvrager is voornemens gebruik te maken van een HyPerforma 5:1 SUB voor het produceren van gg-LCMV tot een maximumvolume van 250 liter. Deze bioreactor is een gesloten systeem waarbij aerosolvorming wordt voorkomen door het gebruik van 'biosealers' en 'welders'. De ingevoerde lucht wordt gefilterd alvorens het wordt afgevoerd. De aanvrager heeft gegevens aangeleverd van een onderzoek waaruit blijkt dat de gebruikte filter 99,999988% van de virusdeeltjes filtert voorafgaand aan het afvoeren. Voor het gebruik van de SUB wordt de kweekzak getest op lekkage. Bij deze lekttest wordt druk op de zak gezet, wordt de zak afgesloten en wordt er over een bepaalde tijdsperiode bekeken of de zak druk verliest. Tevens wordt er na het vullen van het medium, en voorafgaand aan de inoculatie met cellen en virus, gecontroleerd of er sprake is van lekkage of eventuele besmetting door te letten op veranderingen in de kleur van het medium en het zuurstofgehalte. Een toename van zuurstofverbruik vóór inoculatie en verkleuring van medium kan duiden op microbiële contaminatie en/of lekkage. Onder de reactor bevindt zich een lekbak. In het geval er lekkage optreedt, heeft de aanvrager een calamiteitenplan opgesteld en zijn er 'spill kits' aanwezig met beschermings- en ontsmettingsmiddelen

om de lekkage op te ruimen. De ruimten waar de werkzaamheden worden uitgevoerd, bevinden zich op onderdruk en op inperkingsniveau MI-III, en eventuele open handelingen zullen in dezelfde ruimte worden uitgevoerd in een veiligheidskabinet van klasse II.

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.

Het gg-LCMV dat de aanvrager wenst te produceren in de onderhavige vergunningaanvraag, is geattenuëerd en minder pathogeen dan de wildtype LCMV WE-stam, en kleinschalige productiewerkzaamheden met het gg-LCMV zijn reeds ingeschaald op inperkingsniveau ML-II.²⁷ De te gebruiken bioreactor is een gesloten systeem. De COGEM wijst er op dat er bij een ‘spill’ de kans bestaat dat een medewerker onbedoeld wordt blootgesteld aan replicatiecompetent gg-LCMV. 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

Zoals in de Regeling ggo voorgeschreven voor MI-III kan het volledige volume van de SUB opgevangen worden in de productieruimte zodat eventuele lekkages niet tot verspreiding van het ggo in of uit de MI-III ruimte kan leiden.²⁸ Gezien de aard van het ggo en de door de aanvrager voorgestelde controleprocedures, werkzaamheden, aanvullende voorwaarden en het calamiteitenplan, stemt de COGEM in met de inschaling van de werkzaamheden met gg-LCMV op inperkingsniveau MI-III, met de door de aanvrager voorgestelde aanvullende maatregelen. De COGEM merkt hierbij op dat handschoenen tot over de mouwen van de werkkleding gedragen dienen te worden. Zij is van oordeel dat de risico's van de voorgenomen werkzaamheden op dit inperkingsniveau met inachtneming van de aanvullende voorwaarden, voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus*. https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=202002586 (bezocht: 30 november 2021)
2. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/bunyavirales/w/arenaviridae/1117/genus-mammarenavirus (bezocht 26 april 2021)
3. 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
4. Buchmeier MJ *et al.* (2013). *Arenaviridae*. In: Fields virology, 6th edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
5. 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)
6. Wright R *et al.* (1997). Congenital lymphocytic choriomeningitis virus syndrome: a disease that mimics congenital toxoplasmosis or Cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 100:E9
7. 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
8. 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)
9. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Lymphocytic Choriomeningitis (LCM). <https://www.cdc.gov/vhf/lcm/pdf/factsheet.pdf> (bezocht: 29 april 2021)
10. Bonthius DJ (2012). Lymphocytic choriomeningitis virus: an underrecognized cause of neurologic disease in the fetus, child, and adult. *Semin. Pediatr. Neurol.* 19: 89-95
11. Barton LL & Mets MB (2001). Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection: decade of rediscovery. *Clin. Infect. Dis.* 33: 370-374
12. Verhaegh EM *et al.* (2014). Meningitis na muizenbeet. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 158: A7033
13. Fischer SA *et al.* (2006). Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation. *N. Engl. J. Med.* 354: 2235-2249
14. 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
15. Rivers TM & Scott TF (1935). Meningitis in man caused by a filterable virus. *Science* 81: 439-440
16. 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
17. 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
18. Zapata JC *et al.* (2011). Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection of macaques: a model for Lassa fever. *Antiviral Res.* 92: 125-138

19. 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
20. 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
21. 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.
22. 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
23. 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
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. COGEM (2021). Advies inschaling van werkzaamheden met gg-LCMV. COGEM advies CGM/210504-01
28. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013.
<https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2020-07-01> (bezocht: 2 december 2021)