

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
dhr. J.J. Atsma
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 12 juli 2011
KENMERK CGM/110712-01
ONDERWERP Advies: Inschaling van productie van gg-*V. cholerae*

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 11-019 met de titel 'Productie van een gemodificeerd micro-organisme dat dient als geattenuerd, levend vaccin tegen cholera' van SynCo Bio Partners BV, deelt de COGEM u het volgende mee.


Samenvatting

De aanvrager wil een genetisch gemodificeerde (gg-) *Vibrio cholerae* bacterie gaan produceren als vaccin tegen een cholera infectie. De productie zal grotendeels plaatsvinden op MI-III niveau. Een specifiek onderdeel van het productieproces, het zogenaamde vriesdrogen van het product, verzoekt de aanvrager echter op ML-I niveau uit te mogen voeren. Daarvoor wil hij gebruik maken van zogenaamde 'Gore Lyoguard trays'. Deze trays zijn speciaal ontwikkeld om een pharmaceutisch product tijdens het vriesdrogen steriel te houden en het vrijkomen van het product in de omgeving in te perken. De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van deze specifieke handeling.

Cholera wordt veroorzaakt door een infectie van de dunne darm met de *V. cholerae* bacterie en wordt gekenmerkt door ernstige diarree. Als de patiënt niet op tijd water en zouten krijgt toegediend kan hij overlijden aan de gevolgen van dehydratie. Zonder behandeling sterft ongeveer 60% van de cholera patiënten. De *V. cholerae* bacterie is alleen pathogeen in mensen.

Het te produceren gg-*V. cholerae* vaccin mist een belangrijke virulentie factor en is getest in vele klinische studies in verschillende bevolkingsgroepen. Het gg-*V. cholerae* vaccin is tien jaar verkocht in Zwitserland, Oostenrijk, Canada en Australië. Op basis van de aard van de aangebrachte wijzigingen en de uitgebreide ervaring met het gg-*V. cholerae* vaccin acht de COGEM het vaccin niet pathogeen voor mens, dier of plant.

Door de aard van het ggo en het gebruik van de 'Gore Lyoguard trays' kan de COGEM er mee instemmen dat het vriesdrogen van het gg-*V. cholerae* vaccin op ML-I inperkingsniveau wordt uitgevoerd. Op dit inperkingsniveau is de COGEM van mening dat de risico's van de voorgenomen vriesdrooghandeling voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.



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

Hoogachtend,



Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c.

Drs. H.P. de Wijs

Dr. I. van der Leij

Inschaling van vriesdrogen tijdens productie van gg-*Vibrio cholerae* vaccin

COGEM advies CGM/110712-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van het vriesdrogen van het gg-*Vibrio cholerae* vaccin, CVD 103-HgR. Het vriesdrogen maakt onderdeel uit van het productieproces van dit vaccin. De aanvrager, SynCo Bio Partners BV, verzoekt deze handeling uit te mogen voeren op ML-I niveau.

Het gg-*V. cholerae* vaccin is afgeleid van de wildtype *V. cholerae* stam 569B (Inaba stam) en is vervaardigd door een deletie van het *ctxA* gen, dat codeert voor de A subunit van het cholera toxine. Daarnaast is, voor identificatie van de vaccinstam, een kwikresistentie ingebouwd door introductie van een zogenaamde MER operon.

Cholera

Cholera wordt veroorzaakt door de gram-negatieve, staafvormige bacterie *V. cholerae*. Sinds 1817 zijn er zeven grote cholera pandemieën te onderscheiden. De laatste en huidige pandemie begon in 1961 in Indonesië op het eiland Sulawesi. De andere pandemieën hadden hun oorsprong op het Indiase subcontinent en verspreidden zich van daaruit over andere continenten.¹⁻³ Cholera is een endemische ziekte in Afrika, Zuid-Oost Azië en in delen van Latijns en Centraal Amerika. Cholera komt vooral voor in gebieden met slechte riolering en waterzuivering. Jaarlijks worden er naar schatting enkele miljoenen mensen getroffen door een cholera infectie en gemiddeld overlijden er 100.000 tot 130.000 aan de gevolgen.⁴

De mens is de enige bekende gastheer van de *V. cholera* bacterie, maar de bacterie kan ook in een waterige omgeving, in brak en zout water overleven en hecht zich aan plankton en schelp- en schaaldieren.^{1,3} De *V. cholera* bacterie wordt voornamelijk verspreid via inname van besmet water en voedsel. Verspreiding via direct persoonlijk contact is ongewoon, aangezien de bacterie gevoelig is voor een lage pH. Hierdoor is een hoog inoculum (meer dan 10^8 bacteriën) nodig om de maag van een gezond persoon te kunnen passeren en de dunne darm te koloniseren.^{1,5}

Na infectie met de cholera bacterie kan een asymptomatische kolonisatie of milde diaree ontstaan, maar ook ernstige en fatale diaree. De klinische symptomen starten gemiddeld 2 tot 3 dagen na ingestie van de bacterie met plotselinge diarree en overgeven. Zonder behandeling sterft ongeveer 60% van de patiënten.¹ Door een adequate aanvulling van de uitgescheiden vloeistoffen en elektrolyten kan het sterftepercentage teruggebracht worden tot minder dan 1%. In Nederland komt de ziekte uitsluitend voor als importziekte.

Vibrio cholerae

De *V. cholerae* bacterie wordt getypeerd op basis van de lipopolysacchariden in de celwand. Op dit moment zijn er meer dan 200 verschillende serotypen beschreven waarvan alleen het serotype O1 en O139 verantwoordelijk zijn voor het ontstaan van cholera.¹ De stammen behorend tot het O1 serotype kunnen weer onderverdeeld worden in de biotypen 'El Tor' en 'klassiek'. De stammen behorend tot het O139 serotype worden niet gesubtypeerd.^{1,3} De *V. cholerae* O1 stammen komen wereldwijd voor, de O139 stammen zijn tot nu toe alleen aangetroffen in Zuid-Azië.⁵

Na inname en passage van de maag penetreren de *V. cholerae* bacteriën de mucuslaag van de dunne darm. Aan het darmoppervlak vermenigvuldigt de bacterie zich en produceert deze het cholera toxine. Het cholera toxine bestaat uit een A-subunit en vijf B-subunits en is de belangrijkste virulentie factor van *V. cholerae*.⁵ De B subunit van het cholera toxine bindt aan de epitheelcellen van de darm, waarna de A subunit wordt geïnternaliseerd. In de cel activeert de A-subunit het enzym adenylaatcyclase, waardoor de secretie van chloride ionen, bicarbonaat en water uit de epitheelcellen in de dunne darm toeneemt. Dit leidt tot de kenmerkende waterige diaree met hoge concentraties elektrolyten. Ernstig geïnfecteerde patiënten kunnen tot wel 1 liter water per uur verliezen.⁵ In de diaree worden ook hoge concentraties van de bacterie (10^8 /ml) uitgescheiden.³

Het gg-V. cholerae vaccin

Het gg-*V. cholerae* vaccin, CVD 103-HgR is afgeleid van de *Vibrio cholerae* 569B stam (classical Inaba) en mist een deel van het gen dat codeert voor de enzymatisch actieve A subunit van het cholera toxine.⁶ Door het ontbreken van subunit A wordt er geen actief cholera toxine geproduceerd en mist de vaccinstam een belangrijke virulentie factor. De niet-toxische B subunit van het cholera toxine wordt nog wel aangemaakt en is van belang voor het opwekken van de gewenste afweer tegen *V. cholerae*. Naast de verwijdering van coderende sequenties voor subunit A is aan het ggo ook een gen toegevoegd. Het betreft een zogenaamd MER operon waardoor het vaccin resistent is tegen kwik. Dit gen is geïnserteerd in het *hlyA* gen, dat codeert voor hemolysine A. Door de kwikresistentie is de vaccinstam eenvoudig te onderscheiden van wildtype *V. cholerae* stammen.

Het CVD 103-HgR is voor het eerst beschreven in 1988.⁷ Inmiddels is het gg-vaccin getest in verschillende klinische studies waaraan meer dan 80.000 volwassenen en kinderen hebben deelgenomen.^{3,8-10} Op basis van deze studies wordt het CVD 103-HgR in de wetenschappelijke literatuur beschouwd als een veilig vaccin dat goed wordt verdragen. In de klinische studies zijn wel enkele gevallen van diarree, buikpijn en hoofdpijn gerapporteerd na toediening van doses tot 10^{10} CFU van het vaccin. Deze bijwerkingen werden echter met een vergelijkbare frequentie

aangetroffen in de controle groepen en werden aangemerkt als mild.^{3,8} Tevens blijkt uit de klinische studies dat het vaccin door een klein deel (20-30%) van de vrijwilligers uitgescheiden wordt in zeer beperkte hoeveelheden ($\leq 2 \times 10^2$ CFU/g ontlasting).¹¹

In de periode van 1994 tot 2004 is het vaccin in Zwitserland, Oostenrijk, Canada en Australië in de handel geweest. De aanvrager geeft aan dat er meer dan 500.000 doses van het vaccin zijn verkocht. Voor zover bekend heeft de post-marketing surveillance geen andere bijwerkingen aan het licht gebracht, dan die beschreven zijn bij de klinische studies.¹¹ Op dit moment wordt het vaccin niet meer geproduceerd om de COGEM onbekende redenen.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over gg-*V. cholera* vaccins. In de Regeling ggo is wildtype *V. cholera* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.¹²

Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager zal het gg-*V. cholerae* vaccin CVD103-HgR produceren op MI-III niveau. Voordat het vaccin in sachets uitgevuld kan worden, dient het gelyophiliseerd te worden. Dit specifieke onderdeel wil de aanvrager uitvoeren op ML-I niveau. Daartoe wordt de oogst op MI-III niveau uitgevuld in zogenaamde Gore Lyoguard trays.¹³ Deze trays worden afgesloten met een waterdamp-permeabel ePTFE membraan. Volgens de aangeleverde informatie laat dit membraan geen micro-organismen door. De gesloten Gore Lyoguard trays worden vervolgens overgebracht naar de vriesdroger op ML-I niveau. Na voltooiing van de vriesdroogcyclus worden de Gore Lyoguard trays afgesloten in waterdamp impermeabel laminaat en opgeslagen bij -20°C voor verder gebruik.

Overweging

*Eigenschappen van gg-*V. cholerae**

De wildtype *V. cholerae* bacterie is van nature alleen pathogeen voor mensen. De bacterie wordt wel aangetroffen op onder andere groene algen, plankton en schaaldieren, maar is apathogeen voor deze en andere organismen.¹⁴

Door de deletie van een groot deel van het *ctxA* gen produceert het CVD 103-HgR geen actief toxine meer. Hierdoor is het ggo geattenuëerd ten opzicht van de uitgangsstam. Sinds de ontwikkeling van deze deletiemutant zijn er vele klinische studies met het ggo uitgevoerd en is het tien jaar in Zwitserland, Oostenrijk, Canada en Australië als vaccin tegen cholera verkocht. Dit grootschalige gebruik heeft aangetoond dat het vaccin veilig is en dezelfde bijwerkingen heeft als een placebo behandeling. In theorie zou het ggo het *ctxA* gen weer op kunnen nemen door uitwisseling van het betreffende gen met wildtype *V. cholerae* stammen. Afgezien van het feit dat

V. cholerae in Nederland niet voorkomt, is dit niet waargenomen onder verschillende *in vivo* en *in vitro* condities.¹⁵

Naast de deletie van een deel van de coderende sequentie van het cholera toxine is er aan het genoom van CVD 103-HgR een kwikresistentie marker toegevoegd. Onder laboratoriumomstandigheden levert dit het ggo een groeivoordeel op ten opzichte van de uitgangsstam. Op basis van de kwik concentratie waarop dit groeivoordeel zichtbaar wordt en de kwik concentratie die hetzij in schoon oppervlaktewater of vervuild oppervlakte water aanwezig is, wordt door Viret *et al.* geconcludeerd dat de kwikresistentie het CVD 103-HgR in deze ecosystemen geen groeivoordeel zal opleveren.¹¹ Tevens blijkt uit wetenschappelijk onderzoek dat de overleving van het ggo in aarde en in waterig milieu niet significant afwijkt van de *V. cholerae* uitgangsstam.¹¹

Op basis van de uitgebreide ervaring met dit vaccin leidt de COGEM af dat het gg-*V. cholerae* vaccin apathogeen is voor mensen. Door de aard van de aangebrachte mutaties is zij tevens van mening dat het ggo net als de uitgangsstam apathogeen zal zijn voor andere organismen.

Vriesdrogen van gg-V. cholerae vaccin

De aanvrager wil voor het vriesdrogen van het gg-*V. cholerae* vaccin gebruik maken van een zogenaamde 'Gore Lyoguard tray'. Deze tray is speciaal ontwikkeld voor het vriesdrogen van onder andere farmaceutische producten die steriel moeten blijven en ter voorkoming van contaminatie van de vriesdroger met het product.¹³ Om dit te realiseren wordt gebruik gemaakt van een zogenaamd ePTFE membraan. De aanvrager geeft aan dat het vriesdrogen wordt uitgevoerd door getraind personeel.

Op basis van de specificaties en kwaliteitscontrole van de Gore Lyoguard trays acht de COGEM de kans zeer klein dat het gg-*V. cholerae* vaccin bij regulier gebruik van deze trays door getraind personeel vrij zal komen tijdens een vriesdroogcyclus. Zij kan evenwel niet geheel uitsluiten dat voor, tijdens of na het vriesdrogen de integriteit van bijvoorbeeld het membraan aangetast wordt. Door het hanteren van de algemeen voorgeschreven veilige microbiologische technieken acht de COGEM de kans zeer klein dat een dergelijke situatie leidt tot directe orale ingestie van significante hoeveelheden van het vaccin. Gezien het apathogene karakter van het ggo, de zeer kleine kans op directe orale ingestie van significante hoeveelheden van het vaccin en het hoge inoculum wildtype *V. cholerae* dat nodig is voor passage van de maag en kolonisatie van de dunne darm acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat het betreffende vriesdrogen zal leiden tot risico's voor mens en milieu.

Advies

Op basis van bovenstaande overweging is de COGEM van mening dat het gg-*V. cholerae* vaccin, CVD 103-HgR apathogeen is voor mens, dier en plant en kan zij ermee instemmen het vriesdrogen van betreffend gg-*V. cholera* vaccin in te schalen op ML-I inperkingsniveau. Op dit inperkingsniveau is de COGEM van mening dat de risico's van voorgenomen lyophilisatie van het geproduceerde gg-*V. cholerae* vaccin voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Murray PR *et al.* (2002). Chapter 30: *Vibrio*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas*. In: Medical Microbiology, Edited by Schmitt W & Grigg LL, Mosby, Inc. USA, 281-287
2. Meehan CD and Markel H (2009). Cholera, Historical. In: Encyclopedia of Microbiology, Edited by Schaechter M, Academic Press, Amsterdam, vol 4: 24-29
3. CSL vaccines (2000). Orochol®; (Recombinant live oral CV. Cholerae CVD 103-HgR vaccine) MediMedia Communications, Australia
4. World Health Organization (WHO). Cholera vaccines: WHO position paper <http://www.who.int/wer/2010/wer8513.pdf> (06-07-2011)
5. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). Cholera <http://www.rivm.nl/cib/infectieziekten-A-Z/infectieziekten/> (06-07-2011)
6. Ketley JM *et al.* (1993). Construction of genetically marked *Vibrio cholerae* O1 vaccine strains. FEMS Microbiol. Lett. 111: 15-22
7. Levine MM *et al.* (1988). Safety, immunogenicity, and efficacy of recombinant live oral cholera vaccines, CVD 103 and CVD 103-HgR. Lancet 2: 467-470
8. Tacket CO *et al.* (1999). Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentered trial of the efficacy of a single dose of oral cholera vaccine CVD 103-HgR in preventing cholera following challenge with *Vibrio cholerae* O1 El Tor Inaba three months after vaccination. Infect. Immun. 67: 6341-6345
9. Richie E *et al.* (2000). Efficacy trial of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in North Jakarta, Indonesia a cholera-endemic area. Vaccine 18: 2399-2410
10. Calain P *et al.* (2004). Can oral cholera vaccination play a role in controlling a cholera outbreak? Vaccine 22: 2444-2451
11. Viret JF *et al.* (2004). Biosafety aspects of the recombinant live oral *Vibrio cholerae* vaccine strain CVD 103-HgR. Vaccine 22:2457-2469
12. Regeling genetisch gemodificeerde organismen en Richtlijnen van de COGEM bij deze regeling (1998)
13. Gore: Product Specifications for the GORE® LYOGUARD® Freeze-Drying Tray. http://www.gore.com/en_xx/products/pharmaceutical/lyophilization/technical_specifications_lyoguard_freeze_drying_tray.html (07-07-2011)
14. Reidl J and Klose KE (2002). *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. FEMS Microbiol. Rev. 26: 125-139
15. Kaper JB *et al.* (1994). Potential for reacquisition of cholera enterotoxin genes by attenuated *Vibrio cholerae* vaccine strain CVD 103-HgR. Infect. Immun. 62: 1480-1483