

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

**DATUM** 14 augustus 2012  
**KENMERK** CGM/120814-02  
**ONDERWERP** Advies: Grootschalige productie van antigeen tegen West Nile virus op MI-III inperkingsniveau

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 12-023 getiteld 'Productie in roller bottles van Yellow Fever-West Nile chimeer virus' van Intervet International B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

### **Samenvatting**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de grootschalige productie van een vaccin tegen het *West Nile virus* bij paarden. De aanvrager gebruikt hiervoor een genetisch gemodificeerd (gg-) *Yellow Fever virus* dat de oppervlakte-eiwitten van het *West Nile virus* bevat. De aanvrager wil dit gg-virus vermenigvuldigen in speciale kweekflessen (rolflessen) in een MI-III ruimte. Bij deze werkzaamheden moeten inperkende maatregelen genomen worden om te voorkomen dat het virus zich kan verspreiden. Tevens moet het virus na afloop van de werkzaamheden worden geïnactiveerd voordat kweekmateriaal ed. geloosd mag worden.

De kans op verspreiding van het ggo is het grootst bij het begin van de kweek tijdens de toediening van het virushoudend medium, en tijdens het oogsten van de viruskweek door middel van het leeggieten van de kweekflessen. Dit zijn open handelingen die plaats zullen vinden in een unit met een schone neerwaartse luchtstroom, in een cleanroom met onderdruk en HEPA gefilterde lucht. Deze ruimte is alleen te betreden via sluizen en alle medewerkers dragen lichaamsbedekkende kleding. De COGEM acht de voorgestelde maatregelen voldoende om eventueel contact met het virus en verspreiding van het virus te beperken. Indien een medewerker toch in contact komt met het virus, acht de COGEM de risico's verwaarloosbaar klein, omdat het virus net zo verzwakt is als de ouderstam die al geruime tijd als vaccin wordt toegepast.

De COGEM is van mening dat de grootschalige productie van antigeen voor een vaccin tegen het West Nile virus veilig kan plaatsvinden op MI-III inperkingsniveau. Op dit inperkingsniveau zijn de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

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

# Grootschalige productie van antigeen tegen West Nile virus op MI-III inperkingsniveau

## COGEM advies CGM/120814-02

### Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de grootschalige productie van antigeen voor een vaccin tegen het *West Nile virus* bij paarden. De aanvrager, Intervet International B.V., gebruikt hiervoor een genetisch gemodificeerd (gg-) virus dat gebaseerd is op de *Yellow Fever virus* vaccinstam 17D (YF-17D) waarin de *prM* en *E* genen zijn vervangen door de *prM* en *E* genen van het *West Nile virus* (WNV). Deze genen coderen voor oppervlakte-eiwitten die een essentiële rol spelen bij de afweer tegen het WNV.

De aanvrager wil het virus produceren in Vero cellen in rolflessen. Na enkele dagen van kweek wordt het virus geoogst en chemisch geïnactiveerd. Vervolgens wordt het antigeen, oftewel het geïnactiveerde virus, geconcentreerd door middel van ultrafiltratie. De aanvrager wil de werkzaamheden op MI-III inperkingsniveau uitvoeren.

### *Yellow Fever virus (YFV)*

Het *Yellow Fever virus* (YFV) is een positiefstrengs RNA virus dat behoort tot de familie van *Flaviridae*, genus *Flavivirus*.<sup>1</sup> Het virus wordt verspreid via muggen en veroorzaakt een tropische infectieziekte die voorkomt onder apen in Afrika ten zuiden van de Sahara en in Zuid-Amerika. YFV kan ook worden overgedragen naar mensen door de mug *Aedes aegyptii* en kan dan gele koorts veroorzaken. Jaarlijks zijn er ongeveer 200.000 gevallen van gele koorts, waarvan ongeveer 90% in Afrika optreedt.<sup>2</sup> Symptomen van gele koorts bij de mens zijn koorts, hoofdpijn, rugpijn, misselijkheid, geelzucht en stoornissen in de nierfunctie. Daarbij kunnen ook bloedingen in de mond en in de darmen optreden. Gele koorts is een ernstige ziekte die in ongeveer 60% van de gevallen een dodelijke afloop heeft.<sup>3</sup> Een effectieve langdurige bescherming is mogelijk door middel van een vaccinatie met de geattenuerde YF-17D stam. Deze YFV stam is verzwakt door een serie mutaties die verspreid liggen over het gehele genoom van het virus.<sup>3,4,5</sup> De YF-17D stam is 65 jaar geleden ontwikkeld en meer dan 350 miljoen mensen zijn er inmiddels mee gevaccineerd.<sup>6</sup>

### *West Nile virus (WNV)*

Ook het *West Nile virus* behoort tot de familie van de *Flaviridae*. Dit positiefstrengs RNA virus werd in 1937 voor het eerst ontdekt in Oeganda en werd daarna ook gesignaleerd in andere delen van Afrika, West-Azië, Oost-Europa en het Midden Oosten. In 2002 is er een uitbraak van het virus geweest in New York en sindsdien verspreidt het zich verder in de Verenigde Staten. Het virus komt voor bij mensen, vogels en andere gewervelde dieren zoals katten, paarden, vleermuizen, wangzakeekhoorns en konijnen. Verspreiding van het virus vindt voornamelijk plaats via muggen (*Culex spp.*), terwijl trekvogels een van de belangrijkste reservoirs vormen.<sup>7</sup>

Een infectie met WNV veroorzaakt symptomen als lichte koorts, hoofdpijn, pijn, huiduitslag en gezwollen lymfeklieren. In enkele gevallen komt het virus in de hersenen terecht en kan het dodelijke encefalitis (hersenenontsteking) veroorzaken. Vooral mensen met een verzwakt immuunsysteem of mensen van boven de vijftig lopen hierop een verhoogd risico.<sup>8</sup> Een vaccin of effectieve profylaxe tegen het WNV is niet beschikbaar.

### **Eerder COGEM advies**

In 2003 heeft de COGEM geadviseerd de recombinante YF-WNV vaccinstam als pathogeniteitsklasse 3 virus te beschouwen.<sup>9</sup> Belangrijkste reden hiervoor was het ontbreken van gegevens over de genetische stabiliteit, weefseltropisme en replicatie van het gg-virus. De aanvrager heeft vervolgens aanvullende gegevens overlegd. De COGEM was op basis van deze gegevens in 2007 van mening dat het recombinante YF-WNV virus tenminste net zo geattenuëerd is als de YF-17D ouderstam, die is ingedeeld is in pathogeniteitsklasse 2 en al geruime tijd als vaccin wordt toegepast. Laboratoriumexperimenten werden daarom omlaageschaald naar ML-II niveau.<sup>10</sup> De aanvullende gegevens toonden ook aan dat er geen veranderingen optreden in weefseltropisme of replicatiekinetiek van het YF-WNV. Bovendien achtte de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat het recombinante virus zich kan verspreiden via muggen.

### **Inrichtingsvoorschriften en werkzaamheden in procesinstallaties**

De aanvrager wil de werkzaamheden op MI-III inperkingsniveau uitvoeren. De grootschalige kweek van ggo's is gebonden aan regels die worden voorgeschreven in bijlage 4 van de Regeling ggo.<sup>11</sup> Op MI-III inperkingsniveau moeten werkzaamheden in een fysisch inperkend systeem worden uitgevoerd, bijvoorbeeld een bioreactor. Het fysisch inperkende systeem moet zo geconstrueerd zijn dat de verspreiding van de ggo's wordt beperkt. Bij toevoeging van materiaal aan het systeem of overdracht van materiaal naar een ander systeem moet de vorming en verspreiding van aërosolen worden vermeden. Ook moeten de ggo's na afloop van de werkzaamheden volgens een gevalideerde methode zijn geïnactiveerd alvorens de inhoud van het fysisch inperkende systeem geloosd mag worden. Er moeten noodmaatregelen opgesteld zijn in het geval van grote of ongebruikelijke verliezen.

De laboratoriumwerkzaamheden met de recombinante YF-WNV vaccinstam zijn vergund op ML-II inperkingsniveau.<sup>10</sup> Grootschalige werkzaamheden met erkende en veilig bevonden 'groep I' organismen mogen volgens de Regeling GGO op MI-I of MI-II niveau plaatsvinden.<sup>11</sup> De recombinante YF-WNV vaccinstam behoort echter niet tot de 'groep I' organismen. Grootschalige werkzaamheden met deze vaccinstam worden daarom ingeschaald op MI-III niveau.

### **Voorgenomen werkzaamheden**

Het virus wordt geproduceerd in Vero cellen in rolflissen. In eerste instantie worden de Vero cellen in 100 rolflissen met een kweekvolume van 700ml opgekweekt. Zodra de gewenste celdichtheid is bereikt, wordt het kweekmedium uit de fles gegoten en wordt er eenzelfde hoeveelheid virushoudend medium toegevoegd. Dit medium wordt gemaakt door viraal inoculum uit de vriezer te nemen, te ontdooien en toe te voegen aan een vat met kweekmedium. Nadat dit is

gemengd, wordt uit dit vat de juiste hoeveelheid medium per rolflles toegevoegd. Na een aantal dagen van kweek wordt de inhoud van de rolfllessen verzameld in een steriel vat met een maximaal volume van 750 liter oogstvloeistof. Vervolgens zal de aanvrager het genetisch gemodificeerde virus in de oogstvloeistof inactiveren met behulp van binair ethylenimine (BEI). De gehele inhoud van het vat wordt daarna overgepompt naar een tweede vat en nogmaals met BEI vermengd om er zeker van te zijn dat de gehele inhoud met de chemische stof in aanraking is geweest. Daarna wordt het inactivatieproces chemisch gestopt met behulp van natriumthiosulfaat. De duur van de inactivatiestap is door de aanvrager ingesteld op 18 tot 24 uur. Als laatste wordt het antigeen geconcentreerd door middel van ultrafiltratie, afgevuld in flacons en opgeslagen. Al deze handelingen vinden plaats in een MI-III ruimte.

### **Overweging en advies**

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van de grootschalige productie van antigeen voor een vaccin tegen het West Nile virus bij paarden. Voor de risicoanalyse is onder andere de kans op verspreiding van het ggo van belang.

#### *Vero cellen*

Het gg-virus wordt gekweekt in Vero cellen. Dit is een continue, aneuploïde cellijn die algemeen gebruikt wordt voor de ontwikkeling van virale vaccins, waaronder het poliovaccin voor mensen.<sup>12</sup> De cellijn is bijna volledig vrij van virale sequenties met uitzondering van defectief proviraal DNA afkomstig uit het *Simian retrovirus* (SRV).<sup>13</sup> Deze sequenties vormen geen risico voor de vaccinproductie, omdat er geen contaminatie met SRV kan optreden. De cellijn vertoont verder geen retrovirale reverse transcriptase activiteit en wordt volgens de aanvrager regelmatig gecontroleerd op de aanwezigheid van 'extraneous agents'. De geïnfecteerde cellen kunnen niet buiten het celkweekmedium overleven. De COGEM acht daarom de kans op het ontstaan van een recombinant virus of verspreiding van de geïnfecteerde Vero cellen tijdens de productiefase verwaarloosbaar klein.

#### *Verspreiding van het ggo*

De kans op verspreiding van het ggo is het grootst tijdens de toediening van het virushoudend medium en het oogsten van de viruskweek door middel van het leeggieten van de rolfllessen. Dit zijn open handelingen die volgens de aanvrager plaatsvinden onder een kamerhoge laminaire downflow unit in een cleanroom met onderdruk en HEPA gefilterde lucht. De ruimte is alleen te betreden via sluisen. De medewerkers in de ruimte dragen speciale kleding die het hele lichaam bedekt met inbegrip van hoofdkap en bril. Deze kleding blijft bij het verlaten van de ruimte in de sluis achter en wordt gedesinfecteerd. Materialen worden via een speciale desinfectiesluis getransporteerd. De opzet van de ruimte is zo dat de totale vloeibare inhoud van het productiesysteem altijd binnen het ingeperkte gebied kan worden opgevangen. Indien er door onvoorziene omstandigheden virusbevattende vloeistof in de ruimte vrijkomt, wordt er een 'spillprocedure' gevolgd waarbij het materiaal wordt ingedamd, chemisch gedesinfecteerd en opgeruimd.

De COGEM acht deze maatregelen voldoende om eventueel contact met het virus en verspreiding van het virus te beperken. Indien een medewerker toch in contact komt met het virus, acht de COGEM de risico's verwaarloosbaar klein. Het gg-virus is geattenuëerd ten opzichte van het wildtype virus en vertoont geen veranderingen in weefseltropisme of replicatiekinetiek. Het YF-WNV vaccin is sinds 2006 geregistreerd bij de APHIS/USDA en toegelaten als levend vaccin bij paarden in de Verenigde Staten. De kans dat het virus zich vanuit een eventueel besmette medewerker verder verspreidt acht de COGEM eveneens verwaarloosbaar klein, omdat hier vectoren (muskieten) voor nodig zijn die niet in Nederland voorkomen.

### *Inactivatie*

Na afloop van de virusproductie wordt de oogst opgevangen in een steriel vat en met BEI geïnactiveerd. Vervolgens wordt de oogst overgepompt naar een tweede inactivatievat en nogmaals met BEI behandeld. Dit is een gesloten handeling. Volgens de aanvrager duurt de inactivatie van de virusoogst maximaal vier uur en inactivatie van een tien keer geconcentreerde virusoplossing maximaal acht uur. Om er zeker van te zijn dat het virus volledig geïnactiveerd is heeft de aanvrager de duur van de inactivatiestap ingesteld op 18 tot 24 uur. Hierna worden de batches gecontroleerd op afwezigheid van infectieus virus.

BEI is een erkend en effectief inactivatiemiddel, dat ook wordt gebruikt voor inactivatie van het virus dat mond- en klauwzeer (MKZ) veroorzaakt. Hoewel de COGEM van mening is dat de duur van de inactivatie waarschijnlijk ruim voldoende is om het virus te inactiveren, merkt zij op dat er enkele van de onderbouwende gegevens over de effectiviteit van de inactivatie ontbreken die nodig zijn voor een goede beoordeling van het inactivatieproces. Zo worden er bijvoorbeeld geen titergegevens en afstervingscurven overlegd van inactivatie van een virusbatch, en worden er onvoldoende gegevens verstrekt over de reproduceerbaarheid van het inactivatieproces. Daarnaast wordt niet gespecificeerd wat de te verwachten virusconcentratie is. Echter, de onderhavige vergunningaanvraag betreft de grootschalige productie van het ggo onder MI-III inperking en niet de toepassing van het (al dan niet geïnactiveerde) ggo. De COGEM is van mening dat de milieurisico's bij de grootschalige productie van WNV antigeen op MI-III niveau verwaarloosbaar klein zijn, maar wijst erop dat voor een mogelijke toekomstige marktaanvraag meer gegevens nodig zijn betreffende de inactivatie van het ggo.

### **Conclusie**

Overwegende dat de werkzaamheden in een MI-III ruimte zullen plaatsvinden, waarbij open handelingen onder een laminaire downflow unit uitgevoerd worden en medewerkers beschermd zijn tegen infectie met het geattenuëerde virus door lichaamsbedekkende kleding, is de COGEM van mening dat de grootschalige productie van antigeen voor een vaccin tegen het West Nile virus bij paarden veilig kan plaatsvinden onder de beschreven condities op MI-III inperkingsniveau. Op dit inperkingsniveau en onder de beschreven condities zijn de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

## Referenties

1. King AMQ *et al.* (editors) (2012). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Elsevier Academic Press
2. Barnett ED (2007) Yellow Fever: Epidemiology and prevention. Clin Infect Dis. 44: 850-856
3. Monath TP (2001). Yellow fever: an update. Lancet Infectious Disease 1: 11-20
4. Arya SC (2002). Yellow fever vaccine safety: a reality or a myth? Vaccine 20: 3627-3628.
5. Dos Santos CN *et al.* (1995). Complete nucleotide sequence of yellow fever virus vaccine strains 17DD and 17D-213. Virus Research 35: 35-41
6. Centers for Disease Control and Prevention. Internet: <http://www.cdc.gov/yellowfever/> (juli 2012)
7. Grant L *et al.* (2002). West Nile virus. Lancet Infectious Disease 2: 519-529
8. Lim SM *et al.* (2011). West Nile Virus: Immunity and pathogenesis. Viruses 3: 811-828
9. COGEM (2003). Evaluatie van een Yellow fever virus (YFV) recombinant met M/E-geninsertie van het West Nile virus (WNV) in proefdieren. Advies CGM/030930-04
10. COGEM (2007). Evaluatie van een recombinant Yellow Fever virus vaccin. Advies CGM/070724-01
11. Regeling genetisch gemodificeerde organismen. <http://bggo.rivm.nl/Paginas/doc-reg.htm> (augustus 2012)
12. History and Characterization of the Vero Cell Line  
[www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/00/backgrd/3616b1a.pdf](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/00/backgrd/3616b1a.pdf) (juli 2012)
13. Victoria JG *et al.* (2010). Viral Nucleic Acids in Live-Attenuated Vaccines: Detection of Minority Variants and an Adventitious Virus. J Virol. 84: 6033-40