

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 16 juli 2015
KENMERK CGM/150716-01
ONDERWERP Advies 'classificatie en inschaling van een op *Salmonella* Typhi gebaseerd vaccin'

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag met de titel 'Vriesdrogen en sproeidrogen van genetisch gemodificeerde vaccinstam *Salmonella typhi* Ty21a (VXM01) en hulpstoffen' van het Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de classificatie van de bacteriestam *Salmonella* Typhi Ty21a. Tevens is zij verzocht advies uit te brengen over de inschaling van laboratoriumwerkzaamheden met een genetisch gemodificeerd *S. Typhi* Ty21a die een expressiecassette bevat voor het humane VEGFR2. Het betreffende ggo is ontwikkeld als mogelijk vaccin tegen kanker. De aanvrager verzoekt onder andere het vries- en sproeidrogen van dit ggo op ML-I niveau uit te mogen voeren. De vaccinstam *S. Typhi* Ty21a is ten opzichte van de uitgangstam *S. Typhi* sterk verzwakt en kent een lange historie van veilig gebruik als vaccin tegen tyfus in de mens. De in deze vaccinstam aanwezige mutaties zijn goed gedocumenteerd en genetisch stabiel. Op basis van deze argumenten adviseert de COGEM *S. Typhi* Ty21a in pathogeniteitsklasse 1 in te delen en is zij van mening dat deze stam in aanmerking komt voor plaatsing op lijst A1 van Bijlage 2 van de Regeling ggo. Het humane eiwit VEGFR2 speelt een rol bij de aanleg van nieuwe bloedvaten. Gezien deze functie ziet de COGEM geen reden om aan te nemen dat het gg-*S. Typhi* Ty21a een andere overleving en verspreiding in het milieu laat zien dan de vaccinstam *S. Typhi* Ty21a. Gezien de mogelijk hoge concentratie ggo waaraan de medewerker blootgesteld kan worden bij voorgenomen werkzaamheden, wijst de COGEM echter op een mogelijk risico voor de medewerker. Zij adviseert deze werkzaamheden daarom op inperkingsniveau ML-II in een veiligheidskabinet klasse II uit te voeren. Indien bij de werkzaamheden aerogene transmissie naar de medewerker uitgesloten kan worden, is de COGEM van mening dat de veiligheid van mens en milieu ook op ML-I niveau gewaarborgd is.



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. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenM

Classificatie en inschaling van werkzaamheden met een op ‘*Salmonella Typhi*’ gebaseerde vaccinstam

COGEM advies CGM/150716-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over de pathogeniteitsclassificatie van de bacteriestam *Salmonella Typhi* Ty21a en over de mogelijke plaatsing van deze stam op Bijlage 2 lijst A1 van de Regeling ggo. Daarnaast is de COGEM gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met het van de vaccinstam afgeleide genetisch gemodificeerde organisme (ggo) *S. Typhi* Ty21a VXM01.

1.1 Pathogeniteitsclassificatie Regeling Genetisch Gemodificeerde Organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen. Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met ggo's van die klasse.

Apathogene micro-organismen worden ingedeeld in **pathogeniteitsklasse 1**. Dergelijke micro-organismen dienen minimaal aan één van de volgende criteria te voldoen:

- a) het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant
- b) het micro-organisme heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen worden getroffen;
- c) het micro-organisme behoort tot een soort die vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie;
- d) van het micro-organisme is het niet-virulente karakter door middel van adequate tests aangetoond.

Een indeling in **pathogeniteitsklasse 2** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is, alsmede een micro-organisme dat bij planten een ziekte kan veroorzaken.

Een indeling in **pathogeniteitsklasse 3** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

Een indeling in **pathogeniteitsklasse 4** is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

1.2 Bijlage 2 lijst A1 Regeling ggo

Bijlage 2 lijst A1 bestaat uit een lijst van micro-organismen die apathogeen zijn voor mens, dier of plant. Opname in Lijst A1 betekent dat een gebruiker - zonder risicobeoordeling - onder ML-I laboratoriumcondities ggo's mag vervaardigen die zijn samengesteld uit elke combinatie van onderdelen op de A-lijsten (veilige vectoren en inserties).

2. Salmonella

Het bacteriegenus *Salmonella* behoort tot de familie *Enterobacteriaceae*.¹ *Enterobacteriaceae* zijn gramnegatieve staven die voorkomen in het maag-darmkanaal van warmbloedige dieren. De meesten zijn commensalen die deel uitmaken van de normale darmflora.² Alle *Enterobacteriaceae* hebben een enkel chromosoom van 4.3-5.0 Mb. Verschillende stammen bezitten daarnaast ook extrachromosomaal DNA in de vorm van plasmiden. Deze plasmiden bevatten veelal genen die betrokken zijn bij virulentie en antibioticaresistentie.²

Door de grote antigene verscheidenheid onder *Salmonellae* zijn er meer dan 2500 verschillende serotypen (serovars) aan dit genus toegewezen.² Op basis van DNA-homologie is het genus *Salmonella* in twee soorten onderverdeeld. Dit zijn de soorten *Salmonella enterica* en *Salmonella bongori*. De soort *S. enterica* is verder onderverdeeld in zes ondersoorten, waarvan *S. enterica* subsp. *enterica* de meeste humaan pathogenen bevat.¹

2.1 S. Typhi

S. Typhi behoort tot het species *S. enterica* subsp *enterica* serovar Typhi en wordt gezien als de verwekker van tyfus.³ Naast vermoeidheid en stapsgewijze verhoging van de lichaamstemperatuur wordt deze ernstige ziekte gekenmerkt door hoesten, overgeven, hoofdpijn en een verhoogde hartslag.⁴ Eén van de met tyfus geassocieerde complicaties betreft darmperforatie.⁵ Volgens de laatste schattingen van de World Health Organization (WHO) worden wereldwijd elk jaar ongeveer 21 miljoen mensen door deze ziekte getroffen en sterven 222.000 mensen aan de gevolgen.⁶

Voor zover bekend is de mens de enige natuurlijke gastheer van *S. Typhi*.⁷ Onder laboratoriumcondities kunnen hogere primaten wel geïnfecteerd worden met een hoge dosis *S. Typhi*, met vergelijkbare symptomen tot gevolg.^{8,9} In de muis en andere zoogdieren is *S. Typhi* weinig infectieus.^{10,11}

Bij de mens vindt besmetting met *S. Typhi* hoofdzakelijk plaats na consumptie van gecontamineerd voedsel of water. Aangezien de infectieuze dosis voor *S. typhi* laag is (ongeveer 10^4 colony forming units (cfu)), is verspreiding van mens-op-mens relatief eenvoudig. Na inname dringen de bacteriën de darmmucosa binnen, verspreiden ze zich systemisch, en kunnen ze worden aangetroffen in bloed en

beenmerg. Het pathogeen is invasief maar veroorzaakt gewoonlijk geen snelle ontstekingsreactie of diarree. Dit wordt mede veroorzaakt door het *S. Typhi* specifieke Vi polysachcharide. Dit Vi kapsel heeft anti-inflammatoire eigenschappen. Het beperkt onder andere de afzetting van complement op het oppervlak van de bacterie en vermindert de activatie van het immuunsysteem.⁴ Gedurende subklinische en de vroege stadia van tyfus wordt *S. Typhi* met tussenpozen in de ontlasting uitgescheiden. Als een patiënt niet wordt behandeld, wordt de uitscheiding van *S. Typhi* meer persistent van aard. Zogenaamde ‘tyfus dragers’, die zelf geen symptomen van tyfus vertonen, kunnen hoge concentraties *S. Typhi* uitscheiden. In deze individuen is de galblaas door *S. Typhi* gekoloniseerd en komt de bacterie via de gal in de darm terecht. Onlangs is de chronische infectie van de galblaas door *S. Typhi* in verband gebracht met het ontstaan van galblaascarcinoom.¹²

Ongeveer 90 % van het genoom van *S. Typhi* is gerelateerd aan sequenties die ook in andere *Salmonella* serovars voorkomen. Dit deel van het genoom faciliteert vermoedelijk kolonisatie, infectie en transmissie. Het *S. Typhi* specifieke deel van het genoom bevat 300-400 genen en ligt vooral op zogenaamde ‘*Salmonella* pathogenicity islands’ (SPIs). De coderende sequentie voor het voor *S. Typhi* specifieke Vi kapsel is gelegen op SPI-7.¹³

Een opmerkelijke eigenschap van het genoom van *S. Typhi* is de accumulatie van onderbroken of geïnactiveerde genen, zogenaamde pseudogenen. Het genoom van *S. Typhi* bevat ongeveer 200 pseudogenen. De aanwezigheid van deze pseudogenen wordt in verband gebracht met de aanpassing van *S. Typhi* aan zijn gastheer de mens.⁴

2.2 Vaccinstam *S. Typhi* Ty21a

Bacteriestam *S. Typhi* Ty21a is met behulp van chemische mutagenese vervaardigd uit wild type stam *S. Typhi* Ty2 en voor het eerst beschreven in 1975.¹⁴ In de stam is ten gevolge van vele mutaties het galactosemetabolisme gewijzigd. Tevens is de stam niet meer in staat de essentiële aminozuren isoleucine en valine te synthetiseren, en is deze Vi kapsel-deficiënt.¹⁵ Het RNA-polymerase sigma factor (*rpoS*) gen is gemuteerd.¹⁶ Deze mutaties hebben gezamenlijk geresulteerd in een bacteriestam die niet virulent is en niet goed in het milieu kan overleven.^{14,15,17,18,19,20,21} In de afgelopen 40 jaar is geen reversie naar virulentie waargenomen.

Het genoom van stam Ty21a is bekend en bedraagt net als ouderorganisme *S. Typhi* Ty2 4,8 Megabaseparen (Mb).^{18,22,23} In de stam zijn 679 ‘single nucleotide polymorphisms’ geïdentificeerd ten opzichte van ouderorganisme *S. Typhi* 2.¹⁸ Het fenotype en de mutaties relevant voor het geattenuerde fenotype van de stam, zijn geïdentificeerd en (genetisch) stabiel.^{15,24}

Wegens het beschermend vermogen van stam Ty21a tegen tyfus, zijn eind jaren tachtig op Ty21a gebaseerde levende orale vaccins op de markt gebracht.²⁵ Verschillende klinische en post-marketing studies bij kinderen en volwassenen hebben aangetoond dat het vaccin geen of milde (buik)griepachtige verschijnselen van voorbijgaande aard laten zien.^{25,26,27,28,29} Na toediening blijven bloedkweken negatief.^{29,30} De incidentie van een nadelig effect bij een totaal van 38 miljoen gevaccineerde mensen over de periode 1990-2000 bedroeg 0,002%.¹⁵ Sinds 2008 heeft de WHO deze

vaccins als veilig onderkend en beveelt zij aan deze toe te passen voor de bestrijding van endemische tyfus.^{6,31}

Na orale toediening van het vaccin wordt bij een dosis van $2 - 7 \times 10^9$ cfu geen of nauwelijks uitscheiding van Ty21a via de faeces waargenomen.^{29,30} Bij de eerste klinische studie met een 10-voudige dosis van het vaccin, is bacteriestam Ty21a in de ontlasting aangetroffen.²⁴ Als Ty21a via het maagdkanaal wordt uitgescheiden, is dit van voorbijgaande aard. Tevens is er geen overdracht van de vaccinstam van mens naar mens waargenomen.³²

2.3 Ggo S. Typhi Ty21a VXM01

De genetisch gemodificeerde (gg) bacteriestam VXM01 is verkregen door *S. Typhi* Ty21a te transformeren met de eukaryote expressievector 'pVAX/pBR322/kana^R/VEGFR2'. De backbone van deze vector bestaat uit een combinatie van de pVAX en pBR322 plasmides. Beide plasmidevectoren zijn erkend als veilig en opgenomen op Bijlage 2 lijst A2 van Regeling ggo.

In de vector is een kanamycine resistentiegen aanwezig. Daarnaast is in de vector een gencassette gekloneerd die de humane lichaamseigen 'vascular endothelial growth factor receptor 2' (VEGFR2) tot expressie brengt. De cassette bevat een CMV-promoter en een 'bovine growth hormone' (BGH) polyadenylerings-signaalsequentie. De DNA-sequentie van 'pVAX/pBR322/kana^R/VEGFR2' is bekend en omvat 7575 bp.

VEGFR2 is van belang bij de aanmaak van bloedvaten en komt verhoogd tot expressie bij bloedvaten in tumorweefsel. Door een immuunrespons tegen VEGFR2 op te wekken, wordt beoogd de bloedvatvorming in tumoren te bestrijden waardoor de bloedvoorziening van de tumor vermindert en deze afsterft. Daarnaast wordt er naar gestreefd uitzaaiingen van kankercellen te voorkomen.^{33,34}

De VXM01 stam is ontwikkeld om als mogelijk DNA-vaccin bij de mens toe te passen. In een Duitse klinische fase 1 studie bij 30 patiënten met alvleesklierkanker is het vaccin oraal toegediend en effectief gebleken.^{35,36} Er zijn daarbij geen ernstige schadelijke effecten gemeld.³⁶ Milde ziekteverschijnselen (diarree) waren van voorbijgaande aard. De toegediende doses varieerden van 10^6 - 10^{10} cfu VXM01. Uitscheiding van VXM01 in ontlasting werd beperkt waargenomen na toediening van de hoogste dosis van het vaccin en was zelflimiterend. De VXM01 stam werd niet in andere lichaamsvloeistoffen (bloed, urine, traanvocht) aangetroffen.³⁶

In proeven met muizen is aangetoond dat er, na toediening van een DNA vaccin tegen VEGFR2, als nadelig neveneffect een licht verminderde wondheling optrad.³³

3. Aard van de voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager geeft aan dat de werkzaamheden laboratoriumhandelingen betreffen waaronder het vriesdrogen en sproeidrogen van kleinschalige kweekvolumina (< 10 L). De VXM01 stam wordt door derden aangeleverd.

De aanvrager stelt dat binnen de instelling vriesdrogen en sproeidrogen standaard onder ML-II inperking plaatsvindt. Daarbij worden bril, laboratoriumjas en handschoenen gedragen. Open

handelingen betreffende het vriesdrogen worden zoveel mogelijk in een ‘bioveiligheidskabinet’ uitgevoerd. Werkzaamheden betreffende het sproeidrogen worden in een ‘biosafety booth’ uitgevoerd. De aanvrager geeft aan dat de bescherming van de biosafety booth vergelijkbaar is met die van een bioveiligheidskabinet, en dat de lucht in de booth na filtratie over een HEPA filter wordt gerecirculeerd.

De aanvrager verzoekt werkzaamheden met het van *S. Typhi* Ty21a afgeleide ggo VXM01 in te schalen op inperkingsniveau ML-I.

4. Eerder COGEM advies

Wegens zijn pathogene eigenschappen, is *S. Typhi* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.^{37,38} In 2001 heeft de COGEM advies uitgebracht over de stam *S. Typhi* Δ -aroC Δ -ssaV ZH9. Deze stam bezit niet-functionele *aroC*- en *ssaV*-genen, waardoor deze niet in staat is bepaalde aromatische metabolieten te synthetiseren en minder goed in staat is om in eukaryotische cellen (waaronder macrofagen) te overleven. Omdat *S. Typhi* Δ aroC Δ ssaV ZH9 sterk geattenuëerd is, heeft de COGEM geadviseerd deze deletiemutant in pathogeniteitsklasse 1 in te delen.³⁹

5. Overweging en advies

5.1 Classificatie *S. Typhi* Ty21a

Vaccinstam *S. Typhi* Ty21a is niet goed in staat in het milieu te overleven en kent een lange historie van veilig gebruik waarbij het niet-virulente karakter van de bacteriestam is aangetoond. De vaccinstam is bij meer dan 200 miljoen mensen gebruikt als vaccin tegen tyfus. Dit grootschalige gebruik heeft voor zover bekend niet geleid tot chronische infectie met Ty21a en de ontwikkeling van tyfus dragerschap. De COGEM heeft daarom geen redenen om aan te nemen dat *S. Typhi* Ty21a in staat is galblaascarcinoom te veroorzaken.

De in de stam aanwezige mutaties zijn genotypisch en fenotypisch goed gedocumenteerd en blijken stabiel te zijn. In het genoom zijn nog verschillende virulentiegenen aanwezig maar deze veroorzaken geen pathogeniteit door de diverse mutaties die de stam verzwakken. Een verhoging van de infectiedosis met een factor 10^5 veroorzaakt milde ziekteverschijnselen van voorbijgaande aard. Het gastheerbereik van ouderorganisme *S. Typhi* is beperkt tot de mens. De COGEM heeft geen redenen om aan te nemen dat de aangebrachte mutaties in *S. Typhi* Ty21a een uitbreiding van het gastheerbereik bewerkstelligen.

Op basis van het bovenstaande concludeert de COGEM dat *S. Typhi* Ty21a sterk geattenuëerd is. Zij is van mening dat de stam niet pathogeen is voor mens, dier of plant, en adviseert *S. Typhi* Ty21a op te nemen in pathogeniteitsklasse 1. Tevens is zij van mening dat de stam in aanmerking komt voor plaatsing op Lijst A1 Bijlage 2 van Regeling ggo.

5.2 Inschaling werkzaamheden met ggo *S. Typhi* VXM01

Bacteriestam VXM01 is afgeleid van de sterk geattenuëerde vaccinstam *S. Typhi* Ty21a. Het ouderorganisme Ty21a is zonder de aanwezigheid van bepaalde voedingsstoffen niet in staat in het milieu te overleven doordat een aantal belangrijke stofwisselingsroutes niet meer operationeel zijn.

In de vaccinstam is een eukaryotische expressievector ingebracht die een voor VEGFR2 coderende gencassette bevat. VEGFR2 is aanwezig op endotheelcellen van het humane bloedvatstelsel en is betrokken bij de ontwikkeling van nieuw vaatbed. Ook bij de aanleg van bloedvaten in tumoren is het expressieniveau van VEGFR2 verhoogd. Gezien de functie van dit eiwit heeft de COGEM geen redenen om aan te nemen dat de ingebrachte expressievector de overleving van VXM01 in het milieu verhoogt.

Op basis van de genoemde argumenten is de COGEM van mening dat, indien de werkzaamheden met het ggo VXM01 op ML-I inperkingsniveau uitgevoerd worden, de milieurisico's verwaarloosbaar klein zijn.

VXM01 is ontwikkeld om als (oraal) vaccin ter bestrijding van kanker toe te passen. Het werkingsmechanisme van het vaccin berust op het opwekken van een immunreactie het lichaamseigen eiwit VEGFR2 ten einde bloedvatvorming in tumoren te bestrijden en de doorbloeding van tumoren te verminderen.

In een preklinische studie werden muizen gevaccineerd met een DNA-vaccin dat voor VEGFR2 codeerde. De gevaccineerde muizen lieten een verminderde wondheling zien.³³ De VXM01 stam is toegepast in een fase 1 studie met 30 patiënten die lijden aan alveeskliekkanker.³⁶ Daarbij zijn geen schadelijke effecten gemeld. Bij de COGEM zijn geen klinische studies met vaccinstam VXM01 bij gezonde mensen bekend.

De COGEM kan niet uitsluiten dat tijdens werkzaamheden met de VXM01 stam waarbij open handelingen plaatsvinden, de medewerker via inademing van aerosolen met het vaccin in contact komt. Daardoor zou het vaccin ongewenst een immunreactie kunnen opwekken waarbij bijvoorbeeld in de medewerker een auto-immunreactie tegen VEGFR2 opgewekt wordt. De COGEM wijst erop dat dit geen milieurisico betreft maar, gezien het uitscheidingsprofiel van VXM01, beperkt is tot een risico voor de medewerker.

De aanvrager geeft aan de vaccinstam onder meer te willen vriesdrogen of sproeidrogen maar heeft verder geen documentatie aangeleverd over dit proces. Ook de eigenschappen van het materiaal dat gevriesdroogd of gesproeidroogd zal worden, zijn niet bekend. Aangezien het hier de productie van het vaccin betreft gaat de COGEM er vanuit dat het materiaal hoge concentraties VXM01 vaccin kan bevatten.

Daar de COGEM geen inzicht heeft in het proces van vriesdrogen en sproeidrogen, kan zij geen inschatting maken of, en zo ja aan welke hoeveelheid, de medewerker via de lucht aan het ggo blootgesteld wordt. De COGEM adviseert daarom handelingen waarbij VXM01 bevattende aerosolen ontstaan, of waarbij gevriesdroogd materiaal in de lucht terecht kan komen, uit te voeren onder ML-II inperking in een veiligheidskabinet van klasse II (VK-II kabinet).

6. Conclusie

Samengevat adviseert de COGEM vaccinstam *S. Typhi* Ty21a in te delen in pathogeniteitsklasse 1 en deze stam op te nemen in Bijlage 2, Lijst A1. Werkzaamheden met het ggo VXM01 waarbij geen aerogene transmissie kan plaatsvinden, adviseert zij uit te voeren op inperkingsniveau ML-I. Werkzaamheden waarbij de kans bestaat dat de medewerker blootgesteld wordt aan grote hoeveelheden van de VXM01 vaccinstam, adviseert zij uit te voeren op inperkingsniveau ML-II in een VK-II kabinet. Onder deze voorwaarden acht de COGEM de risico's van de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. Murray PR *et al.* (2002). *Enterobacteriaceae*. In: Medical Microbiology. Ed. Schmitt W & Grigg L, Mosby Inc., St Louis
2. Baker S & Dougan G (2007). The genome of *Salmonella enterica* serovar Typhi. Clin Infect Dis 45: S29-33
3. Porwollik S *et al.* (2004). Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. J Bac 186: 5883-5898
4. Dougan G & Baker S (2014). *Salmonella enterica* serovar Typhi and the pathogenesis of typhoid fever. Annu Rev Microbiol 68: 317-36
5. Neil KP *et al.* (2012). A large outbreak of typhoid fever associated with a high rate of intestinal perforation in Kasese District, Uganda 2008-2009. Clin Infect Dis 54: 1091-99
6. World Health Organization. Immunization, vaccines, biologicals. Typhoid. <http://www.who.int/immunization/diseases/typhoid/en/> (bezoekt 9 juli 2015)
7. Deng L *et al.* (2014). Host adaptation of a bacterial toxin from the human pathogen *Salmonella* Typhi. Cell 159: 1290–1299
8. Edsall J *et al.* (1960). Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever I. Typhoid fever in chimpanzees orally infected with *Salmonella typhosa*. J Exp Med 112: 143-66
9. Gaines S *et al.* (1968). Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever VII. The distribution of *Salmonella typhi* in chimpanzee tissue following oral challenge, and the relationship between the numbers of bacilli and morphologic lesions. J Infect Dis 118: 293-306
10. Metcalf ES *et al.* (2000). Experimental *Salmonella typhi* infection in the domestic pig, *Sus scrofa domestica*. Microb Pathog 29: 121-126
11. Pasetti MF *et al.* (2003). Animal models paving the way for clinical trials of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi live oral vaccines and live vectors. Vaccine 21: 401-418
12. Scanu T *et al.* (2015). Salmonella manipulation of host signalling pathways provokes cellular transformation associated with gallbladder carcinoma. Cell Host Microbe 17: 763-774
13. Pickard D *et al.* (2003). Composition, acquisition, and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding *Salmonella enterica* pathogenicity island SPI-7. J Bacteriol 185: 5055-5065
14. Germanier R & Fürer E (1975). Isolation and characterization of gal B mutant Ty21a of *Salmonella typhi*; a candidate strain for a live oral typhoid vaccine. J Infect Dis 141: 553-558

15. Kopecko DJ *et al.* (2009). Genetic stability of vaccine strain *Salmonella* Typhi Ty21a over 25 years. *Int J Med Microbiol* 299: 233-246
16. Robbe-Saul V & Norel F (1999). The *rpoS* mutant allele of *Salmonella typhi* Ty2 is identical to that of the live typhoid vaccine Ty21a. *FEMS Microbiol Lett* 170: 141-143
17. Cryz SJ *et al.* (1988). Attenuated, live, oral typhoid vaccine. *Drugs Today* 24: 349-353
18. Xu DQ *et al.* (2013). Genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhi oral vaccine strain Ty21a. *Genome Announcements* 1(4) e00650-13
19. Germanier R & Fürer E (1983). Characteristics of the attenuated oral vaccine strain *S. Typhi* Ty21a. *Dev Biol Stand* 53: 3-7
20. Robbe-Saul V *et al.* (1995). The live oral typhoid vaccine Ty21a is a *rpoS* mutant and is susceptible to various environmental stresses. *FEMS Microbiol Lett* 126(2): 171-176
21. Coynault C *et al.* (1996). Virulence and vaccine potential of *Salmonella typhimurium* mutants deficient in the expression of the RpoS (sigma S) regulon. *Mol Microbiol* 22(1): 149-160
22. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi str. Ty21a, complete genome. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP002099> (website bezocht 9 juli 2015)
23. Deng W *et al.* (2003). Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *J Bacteriol* 185(7): 2330-2337
24. Gilman RH *et al.* (1977). Evaluation of a UDP-glucose-4-epimerase-less mutant of *Salmonella typhi* as a live oral vaccine. *J Infect Dis* 136: 717-723
25. Levine MM *et al.* (1987). Large-scale field trial of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsule formulation. *Lancet* 1: 1049-1052
26. Begier EM *et al.* (2004). Postmarketing safety surveillance for typhoid fever vaccines from the Vaccine Adverse Event Reporting System, July 1990 through June 2002. *Clin Infect Dis* 38: 771-779
27. Levine MM *et al.* (1999). Duration of efficacy of T21a, attenuated *Salmonella* Typhi live oral vaccine. *Vaccine* 17: S22-S27
28. Cryz JR *et al.* (1993). Safety and immunogenicity of *Salmonella* Typhi Ty21a vaccine in young Thai children. *Infect Immun* 61(3): 1149-1151
29. Levine MM *et al.* (2001). Host – *Salmonella* interaction: human trials. *Microbes Infect* 3: 1271-1279
30. Black R *et al.* (1983). Immunogenicity of Ty21a attenuated *Salmonella typhi* given with sodium bicarbonate or in enteric-coated capsules. *Dev Biol Stand* 53: 9-14
31. WHO (2008). Typhoid vaccines: WHO position paper. *Weekly epidemiological record* 6(83): 49-60
32. Wahdan MH *et al.* (1982). A controlled field trial of live *Salmonella typhi* strain Ty21a oral vaccine against typhoid: three year results. *J Infect Dis* 145: 292-295
33. Niethammer AG *et al.* (2002). A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth. *Nature Medicine* 8(12): 1369-1375
34. Miyazawa M *et al.* (2009). Phase I clinical trial using peptide vaccine for human vascular endothelial growth factor receptor 2 in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Science*: doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01416.x

35. Niethammer AG *et al.* (2012). Double-blind, placebo-controlled first in human study to investigate an oral vaccine aimed to elicit an immune reaction against the VEGF-receptor 2 in patients with stage IV and locally advanced pancreatic cancer. *BMC Cancer* 12: 361- 369
36. Schmitz-Winnenthal FH *et al.* (2014). Anti-angiogenic activity of VXM01, an oral T-cell vaccine against VEGF receptor 2, in patients with advanced pancreatic cancer: a randomized placebo-controlled, phase 1 trial. *Oncoimmunology* 4: e1001217-2
37. Bijlage 4, behorende bij artikel 16 van de regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. Staatscourant 2014 (11317). <https://zoek.officielebekendmakingen.nl/stcrt-2014-11317.html> (website bezocht 9 juli 2015)
38. COGEM (2014). Actualisatie van de lijsten met de indeling in pathogeniteitsklassen van een groot aantal apathogene en pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/141218-01
39. COGEM (2001). Aseptic filling and lyophilisation of *Salmonella typhi* Δ -aroC Δ -ssaV ZH9. COGEM advies CGM/010702-01