

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw S.A.M. Dijkma
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 07 juni 2016
KENMERK CGM/160607-01
ONDERWERP Advies grootschalige productie van genetisch gemodificeerd Canine parvovirus
in een Single-Use bioreactor

Geachte mevrouw Dijkma,

Naar aanleiding van vergunningaanvraag IG-16-091_III-000 getiteld: '*Gebruik van single use bioreactoren voor het kweken van genetisch gemodificeerde micro-organismen*' van Intervet International B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de grootschalige kweek van een levend verzwakte, genetisch gemodificeerde (gg-) Canine parvovirus vaccinstam (CPV 630att) in een bioreactor voor eenmalig gebruik. De adviesvraag betreft een SUB van het type Hyclone HyC^R CX5-14 van 500 liter. De aanvrager verzoekt om de werkzaamheden op MI-III uit te mogen voeren.

Bij de risicoanalyse van de huidige aanvraag zijn twee aspecten van belang: de kans op lekkage van het genetisch gemodificeerde organisme (ggo) en de aard van het ggo.

De COGEM raadt aan de integriteitstest van het SUB systeem onder de maximaal toelaatbare druk te laten plaatsvinden, daarbij zoveel mogelijk leidingen en sensoren aan te sluiten, de roerpeddel in werking te stellen en de druktest bij voorkeur te verrichten met het volume waarmee de kweek wordt uitgevoerd. Zoals voorgeschreven voor MI-III is een lek- of opvangbak aanwezig zodat eventuele lekkages niet tot verspreiding van het ggo in of uit de MI-III ruimte kan leiden. De COGEM is van mening dat de SUB veilig gebruikt kan worden voor de productie van de gg-CPV 630att onder MI-III condities. Zij uit echter haar twijfel over de validatie van de inactivatie van het gg-afval. Echter ook indien het afval niet goed geïnactiveerd zou worden of er onverhoopt lekkage van ggo's zou optreden, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat het gg-virus zich verder verspreidt. Het betreft hier een geattenuerde vaccinstam en het gastheerbereik is beperkt tot honden en mogelijk ook katten.

Concluderend acht de COGEM de risico's bij 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. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

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

Grootschalige productie van genetisch gemodificeerd Canine parvovirus in een Single-Use bioreactor

COGEM advies CGM/160607-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag van Intervet International B.V. voor de grootschalige productie van levend geattenuëerd, genetisch gemodificeerd (gg-) Canine parvovirus (CPV). Het doel van de werkzaamheden is het opkweken van een gg-stam, genaamd gg-CPV 630att die zal worden toegepast als levend vaccin. De aanvrager gebruikt voor het opkweken van de vaccinstam een bioreactor voor eenmalig gebruik (een zogenoemde 'Single-Use Bioreactor' of SUB) van 500 liter van het type Hyclone HyC^R CX5-14 van Thermo Scientific. De aanvrager wil de werkzaamheden uitvoeren op MI-III niveau.

Eerdere COGEM adviezen

De Single-use bioreactor

De COGEM heeft verschillende keren geadviseerd over vergunningaanvragen waarin een SUB is gebruikt van het type Hyclone HyC^R CX5-14. In 2010 betrof de aanvraag een wijziging van een bestaande vergunning waarin grootschalige productie (tot 1000 liter) in dierlijke gg-cellen was vergund met behulp van conventionele stalen reactievaten.¹ Om de kans op lekkage te minimaliseren, adviseerde de COGEM het SUB systeem voor de ingebruikname aan een integriteitstest te onderwerpen. Zij raadde daarvoor aan om de SUB onder maximale druk te plaatsen en daarbij zoveel mogelijk leidingen en sensoren aan te sluiten en de roerpeddel in werking te stellen. Zij gaf aan dat deze druktest bij voorkeur gedaan diende te worden met het kweekvolume waarmee de productie werd uitgevoerd. Met betrekking tot de aard van het ggo was de COGEM van mening dat de toegepaste ggo's apathogeen zijn en niet in staat zijn om buiten de SUB te overleven of te vermenigvuldigen. Concluderend achtte de COGEM de risico's van voorgenomen grootschalige productie op MI-III inperkingsniveau voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

In 2011 heeft de COGEM geadviseerd over de de grootschalige productie van virale eiwitten met behulp van een zogenaamd baculovirusexpressiesysteem in een 500 liter SUB van het type Hyclone Hyc^R CX5-14.² Omdat baculovirussen als klasse 2 pathogeen zijn ingedeeld en de ggo's in deze vergunningaanvraag geen IA of IAB erkenning hadden, moesten de werkzaamheden op inperkingsniveau MI-III plaatsvinden.

De COGEM was van mening dat de door de aanvrager voorgestelde maatregelen en werkprocedures adequaat waren om te voorkomen dat gg-baculovirus in het milieu terecht zou komen. Conform de inrichting- en werkvoorschriften voor een MI-III procesinstallatie was er een opvangbak voor eventuele lekkages aanwezig. Besmet materiaal zoals de gebruikte SUB zouden

via gevalideerde methoden worden gedesinfecteerd. Indien in het uitzonderlijke geval toch baculovirus vrij zou komen uit het productiesysteem, achtte de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat het gg-virus zich verder zou verspreiden. Het gastheerbereik van het baculovirus is beperkt tot enkele vlindersoorten en de recombinante virussen waren sterk verminderd infectieus ten opzichte van het wildtype virus.

Concluderend was de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu van de voorgenomen werkzaamheden op MI-III niveau verwaarloosbaar klein waren.

gg-CPV

In 2012 heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van CPV en de inschaling van werkzaamheden met gg-CPV 630att.³ CPV veroorzaakt acute en soms fatale darmontsteking in honden. Daarnaast zijn er aanwijzingen dat CPV pathogeen is voor katten. Mede op basis van bewezen pathogeniteit in honden, de aanwezigheid van commerciële vaccins en het feit dat er geen aanwijzingen zijn voor pathogeniteit in mensen, heeft de COGEM CPV als een klasse 2 dierpathogeen geïnclassificeerd.

Er waren volgens de COGEM geen aanwijzingen dat de gebruikte gg-CPV 630att stam een hogere pathogeniteit heeft dan het uitgangsvirus. Op basis van aangeleverde gegevens, waaruit bleek dat het gg-CPV 630att vaccin veilig is voor Beagle pups afkomstig van ongevaccineerde moeders, was de COGEM van mening dat gg-CPV 630att geattenuëerd is.

Op grond van de inschaling van CPV in pathogeniteitsklasse 2 kon de COGEM instemmen met de door de aanvrager voorgestelde inschaling van de werkzaamheden met gg-CPV 630att op ML-II inperkingsniveau. Omdat het virus mogelijk via gebruiksvoorwerpen verspreid kan worden, vond de COGEM dat open handelingen in een veiligheidskabinet uitgevoerd moeten worden. Daarnaast is het dragen van handschoenen tijdens de werkzaamheden verplicht.

Overwegingen

De aanvrager wil op grote schaal replicatiecompetent gg-CPV 630att produceren met behulp van animale cellen afkomstig van hond en kat. Voor de risicoanalyse zijn de volgende aspecten van belang: de aard van het ggo en de kans op lekkage en verspreiding van het ggo uit de MI-III ruimte.

Aard van het ggo

Het gg-CPV 630att is een levende, geattenuëerde vaccinstam bedoeld voor de vaccinatie van honden tegen een CPV infectie. Het gg-virus is niet infectieus voor de mens. Het ggo is samengesteld uit het manteleiwitgen van een virulent veldisolaat van CPV-2c en de geattenuëerde backbone van vaccinstam CPV 154att. Een deel van het manteleiwitgen is chemisch gesynthetiseerd waarbij gericht mutaties zijn aangebracht voor verdere attenuatie van het virus. Werkzaamheden met gg-CPV 630att zijn eerder vergund op ML-II inperkingsniveau onder toepassing van enkele aanvullende voorschriften.

De SUB

De productie van gg-CPV zal plaatsvinden in een SUB van 500 liter van het type Hyclone HyC^R CX5-14. Het betreft een systeem met ingebouwde magneetroerder, waarbij de zak wordt geplaatst in een stalen omhulsel. De COGEM heeft in 2010 en 2011 de veiligheid van deze bioreactor als voldoende beoordeeld voor werkzaamheden op MI-III niveau. Het systeem is nog niet eerder beoordeeld in combinatie met niet-biologisch ingeperkte gg-virussen.

Integriteitstest

In theorie bestaat er bij gebruik van een kweekstelsel bestaande uit kunststofzakken een verhoogde kans op lekkage (vergeleken met een conventioneel stalen systeem) waarbij het ggo kan vrijkomen. Deze lekkage kan bijvoorbeeld optreden als gevolg van scheurtjes in de zak. Volgens de aanvrager zal er voorafgaand aan de productie een integriteitstest uitgevoerd worden door de SUB overnacht bloot te stellen aan de maximaal toelaatbare druk. Voorafgaand aan het toevoegen van het ggo wordt de SUB gevuld met medium. Het is niet duidelijk of het medium al in de SUB aanwezig is als de druktest plaatsvindt.

De aanvrager geeft verder aan dat er binnen het bedrijf ruime ervaring is met het gebruik van SUBs voor opschalingsdoeleinden en de kweek van wild-type virussen. Tot op heden zijn er nog nooit lekkages aangetroffen in de SUB zelf. Wel heeft de aanvrager geobserveerd dat de probes een zwak punt zijn, waardoor er bij verkeerde assemblage mogelijk lekkage kan optreden. Door training van het personeel wordt dit probleem volgens de aanvrager tot een minimum beperkt.

Op grond van bovenstaande gegevens adviseert de COGEM om het systeem voorafgaand aan het kweekproces met medium te vullen en onder de maximaal toelaatbare druk overnacht te testen waarbij zoveel mogelijk leidingen en sensoren zijn aangesloten en de roerpeddel in werking is gezet. De druktest moet bij voorkeur uitgevoerd worden met het kweekvolume waarmee de productie wordt uitgevoerd. Op deze manier kunnen kleine druppeltjes die op minieme lekkages duiden beter worden opgespoord. Zoals voorgeschreven voor MI-III is een lek- of opvangbak aanwezig zodat eventuele lekkages niet tot verspreiding van het ggo in of uit de MI-III ruimte kan leiden.

Inactivatie van het ggo

Bij het toevoegen van het ggo aan het kweekmedium, het nemen van monsters en het verversen van kweekmedium worden er geen open handelingen verricht. Na afloop van de productie wordt het supernatant afgepompt naar een afvalvat en vervolgens geïnactiveerd door middel van hitte-inactivatie voordat het afgevoerd wordt. De aanvrager heeft een validatieprotocol overlegd met betrekking tot deze hitte-inactivatie. Hieruit blijkt dat het gg-virus wordt geïnactiveerd door verhitting tot 80⁰C gedurende 40 minuten of 90⁰C gedurende 20 minuten. De probes, de zak en al het overige materiaal dat met het ggo in aanraking is geweest, worden in een lekdichte container geautoclaveerd.

De COGEM merkt op dat uit de aangeleverde informatie niet duidelijk is hoe en hoelang de hitte-inactivatie wordt uitgevoerd bij een volume van 500 liter. Daarnaast is de te inactiveren hoeveelheid virus hoog ten opzichte van de inactivatie-factor ($4.5 \log^{10} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$) die in het validatieprotocol wordt weergegeven. Hierdoor kan niet met zekerheid worden gezegd dat al het virus wordt afgedood. Verder is de validatie van de hitte-inactivatiemethode uitgevoerd met virussuspensie, maar is het niet duidelijk in hoeverre hier nog celresten in zaten. Op grond van deze gegevens kan niet met zekerheid worden geconcludeerd dat het gg-virus effectief geïnactiveerd zal worden.

Advies

De COGEM raadt aan om de integriteitstest van het SUB systeem onder de maximaal toelaatbare druk te laten plaatsvinden, daarbij zoveel mogelijk leidingen en sensoren aan te sluiten, de roerpeddel in werking te stellen en de druktest bij voorkeur te verrichten met het volume waarmee de kweek wordt uitgevoerd. Indien er onverhoopt toch lekkage van ggo's zou optreden, acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat het gg-virus zich verder verspreid. Het gastheerbereik van het gg-CPV 630att is beperkt tot honden en mogelijk ook katten en het gg-virus is geattenuëerd ten opzichte van het wildtype virus. Zoals voorgeschreven voor MI-III is een lek- of opvangbak aanwezig zodat eventuele lekkages niet tot verspreiding van het ggo in of uit de MI-III ruimte kan leiden.

De COGEM is van mening dat de SUB veilig gebruikt kan worden voor de productie van de gg-CPV 630att onder MI-III condities. Waarbij ze erop wijst dat de validatie van de inactivatiemethode beter onderbouwd moet worden. Echter ook bij een onvolledige inactivatie acht de COGEM de kans op verdere verspreiding van het ggo verwaarloosbaar klein.

Concluderend acht de COGEM de risico's bij de voorgenomen werkzaamheden voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. COGEM (2010). Grootschalige kweek van genetisch gemodificeerde dierlijke cellen in een 'Single-Use Bioreactor.' COGEM advies CGM/101028-03
2. COGEM (2011). Productie van CSFV E2 en PCV manteleiwit met behulp van een baculovirusexpressiesysteem in een Single-Use Bioreactor. COGEM advies CGM/111128-02
3. COGEM (2012). Classificatie van Canine parvovirus . COGEM advies CGM/120125-01