



COMMISSIE  
**COGEM**

GENETISCHE  
MODIFICATIE

Aan de Staatssecretaris van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke  
Ordening en Milieubeheer  
De heer drs. P.L.B.A. van Geel  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 4 juli 2006  
**KENMERK** CGM/060704-02  
**ONDERWERP** Advies grootschalige productie van een meningokokkenvaccin (IG 05-074)

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag van Bureau GGO betreffende de grootschalige productie van een meningokokkenvaccin door het Nederlands Vaccin Instituut te Bilthoven, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van grootschalige productie van zogenaamde porine A eiwitten met behulp van de bacterie *Neisseria meningitidis*. De bacterie is genetisch gemodificeerd door het inbrengen van twee additionele kopieën van het endogene *porine A* gen. Daarnaast zijn de genen coderend voor het kapsel van de bacterie verwijderd. Na inactivatie van de gg-bacteriën en zuivering, zijn de geproduceerde eiwitten geschikt voor toepassing als vaccin tegen *N. meningitidis*.

Risico's zouden kunnen ontstaan wanneer de gg-bacteriën bij een calamiteit vrijkomen uit het gesloten productiesysteem, met een eventuele verspreiding in het milieu tot gevolg. Om het vrijkomen van ggo's tijdens werkzaamheden te voorkomen heeft de aanvrager maatregelen en werkprocedures opgesteld. De COGEM is van mening dat deze voorschriften adequaat zijn.

De deletie van het kapsellocus maakt *N. meningitidis* minder virulent omdat bescherming tegen inactivatie door het immuunsysteem en tegen uitdroging ontbreekt. Hoewel de gehanteerde gg-bacteriën verminderd virulent zijn, bestaat de kans dat een medewerker besmet raakt indien contact plaatsvindt met een grote hoeveelheid ggo's bij een eventuele calamiteit. In een dergelijk geval is een eventuele ziekte goed bestrijdbaar.

Gezien het bovenstaande acht de COGEM de risico voor mens en milieu bij uitvoering van de werkzaamheden op inperkingsniveau MI-III verwaarloosbaar klein.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

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

c.c. Dr. ir. B.P. Loos  
Dr. R.C. Zwart

# Grootschalige productie van een meningokokkenvaccin op inperkingsniveau MI-III

COGEM advies CGM/060704-02

## Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde (gg-) bacterie *Neisseria meningitidis* (ook meningokok genoemd). Deze bacterie kan ernstige aandoeningen zoals bloedvergiftiging of hersenvliesontsteking veroorzaken. De vergunningaanvrager is voornemens om een vaccin tegen *N. meningitidis* te ontwikkelen. Voor dit doeleinde worden twee additionele kopieën van het gen coderend voor het endogene buitenmembraaneiwit porine A ingebracht. Porine A is een geschikte vaccinkandidaat omdat het immuunsysteem antistoffen aanmaakt tegen dit eiwit. Naast de ingebrachte genen, zijn de genen coderend voor het kapsel van de bacterie verwijderd waardoor de bacterie verminderd virulent is. Na grootschalige productie in bioreactoren worden de ggo's geïnactiveerd en de eiwitten gezuiverd waarna deze geschikt zijn voor toepassing als vaccin.

Bureau GGO schaalte de werkzaamheden in op inperkingsniveau MI-III.

Tijdens de werkzaamheden zouden eventueel risico's kunnen ontstaan. De risico's die in ogenschouw genomen moeten worden, hebben betrekking op het vrijkomen van de genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) uit de bioreactoren in de productieruimte. Dit zou tot een eventuele infectie van betrokken medewerkers kunnen leiden indien het ggo pathogeen is. Daarnaast zou het ggo zich bij onvoldoende inperkende maatregelen verder kunnen verspreiden vanuit de productieruimte naar het milieu.

Om de kans op het vrijkomen en daarnaast het risico van verspreiding van het ggo te bepalen, zijn de mate van fysieke inperking van het productiesysteem én de eigenschappen van het ggo beoordeeld door de COGEM. Gezien de uitkomsten van de risicoanalyse, welke hieronder is uitgewerkt, stemt de COGEM in met de voorgestelde inschaling op MI-III niveau.

## Overweging en advies

Om tot een risico-beoordeling te komen, wordt afzonderlijk ingegaan op het productiesysteem, op kenmerken van het ggo en op de kans dat medewerkers besmet raken met meningokokken en ziek worden.

### ***Risico's gerelateerd aan het productiesysteem zijn verwaarloosbaar klein***

Alvorens te starten met de grootschalige productie, worden genetisch gemodificeerde (gg-) bacteriën in het laboratorium (inperkingsniveau ML-II) opgekweekt. Met deze bacteriën wordt voedingsmedium in de bioreactor geënt waarna opschaling tot 2000 liter plaatsvindt. Tijdens en na deze grootschalige productie dient het vrijkomen van infectieuze ggo's vermeden te worden. Om te bepalen of er risico's zijn tijdens de werkzaamheden, beoordeeld de COGEM of de procesinstallaties voldoet aan gestelde eisen en of de inactivatie van het ggo efficiënt is. In geval van een calamiteit zouden ggo's kunnen vrijkomen ondanks de genomen voorzorgsmaatregelen. Verspreiding dient dan beperkt te worden middels een adequate calamiteitenprocedure.

### ***Procesinstallatie voldoet aan de gestelde eisen***

De procesinstallatie voldoet aan de inrichtingsvoorschriften geldende voor MI-III ruimtes zoals beschreven in de Regeling ggo (1). Dit betekent onder meer dat HEPA filters geplaatst zijn in de aan- en afvoerkanalen van gassen en dat de gehele inhoud van een bioreactor geïnactiveerd kan worden door afvoer naar zogenaamde killtanks.

Om te voorkomen dat ggo's eventueel zouden kunnen vrijkomen in het milieu, vormt het gehele productieproces een gesloten systeem. De bioreactor wordt voorafgaand aan de productie door middel van een drukttest gecontroleerd op lekdichtheid. Daarnaast wordt een zogenaamd Sterile Connection Device gehanteerd voor het toevoegen van de entcultuur aan de bioreactor. Een dergelijk instrument maakt een steriele verbinding tussen twee slangen mogelijk met behoud van inwendige steriliteit.

Na afloop van de grootschalige productie wordt het productiesysteem gereinigd. Bioreactoren worden gedesinfecteerd via in-situ sterilisatie. Materialen die mogelijk geïnfecteerd zijn worden geautoclaveerd. Verder worden alle mogelijk geïnfecteerde vloeistoffen door middel van killtanks afgedood met behulp van een gevalideerde behandeling (verhitting gedurende één uur bij 121°C). Overige apparatuur die levende ggo's bevat of daarmee in aanraking is geweest, wordt na de werkzaamheden vrijgemaakt van ggo's door autoclaveren of door desinfectie met 0.1N NaOH.

De COGEM acht zowel de fysische inperking als de beschreven reinigingsmaatregelen na afloop van de werkzaamheden voldoende om te voorkomen dat ggo's vrijkomen uit de procesinstallatie en terechtkomen in het milieu.

### *Inactivatieprocedure is efficiënt*

Na opschaling in de bioreactoren wordt het vaccineiwit opgezuiverd waardoor verdere processtappen vrij zijn van ggo's. De zuiveringsstappen behelzen onder andere het inactiveren van levende bacteriën. Hiertoe wordt de cultuur in eerste instantie gedurende tien minuten verhit bij 56°C. Uit een studie, uitgevoerd door de aanvrager, blijkt dat deze hittebehandeling het aantal levende bacteriën reduceert met minimaal een factor  $2.9 \times 10^6$ . Vervolgens wordt de cultuur 20x geconcentreerd, gevolgd door vijf minuten homogenisatie met desoxy-cholaat (DOC; eindconcentratie 0.25%). Op deze manier worden de buitenmembraaneiwwitten, die als vaccin gaan dienen, geëxtraheerd en worden de eventueel nog levende bacteriën gedood. De aanvrager heeft een kleinschalig experiment uitgevoerd om te bepalen wat de efficiëntie van DOC is. Hij heeft drie verschillende *N. meningitidis* stammen gedurende één minuut geïncubeerd met 0,25% DOC waarna het aantal nog levende cellen bepaald is. Het experiment wijst uit dat bij een incubatieduur van één minuut het aantal levende bacteriën wordt gereduceerd met minimaal een factor  $2.8 \times 10^6$ . Dit betekent dat incubatie gedurende vijf minuten leidt tot een reductiefactor die vele malen hoger is. Voor zuivering van de buitenmembraaneiwwitten bedraagt de bacteriedichtheid in de bioreactor  $10^9$  kolonievormende eenheden (KVE) per milliliter. In theorie kan één bacterie uitgroeien tot één kolonie vormende eenheid. In een maximale batch van 2000 liter, zullen uiteindelijk  $2 \times 10^{15}$  KVE aanwezig zijn. Hieruit volgt dat na tien minuten verhitting en één minuut incubatie met 0,25% DOC uiteindelijk nog maximaal 246 KVE in de bioreactor aanwezig zijn. Aangezien de aanvrager in plaats van één minuut, vijf minuten incubeert met DOC, is de COGEM van mening dat het zeer aannemelijk is dat het aantal levende bacteriën na afdoding teruggebracht is naar nul. De COGEM is daarom van mening dat verhitting en het hanteren van DOC een effectieve manier vormt om meningokokken af te doden.

De beschreven validatiestudies zijn uitgevoerd met hoeveelheden die veel kleiner zijn dan het maximale productievolume. Aangezien de grootschalige productie nog niet vergund is, kunnen grootschalige validatiegegevens nog niet overlegd worden. De aanvrager is echter voornemens om grootschalige validatiestudies uit te voeren wanneer de vergunning afgegeven is. Uiteindelijk dient het vaccin vrij te zijn van levende ggo's om te kunnen voldoen aan de voorschriften die gesteld zijn in het kader van de vaccinproductie. Naar de mening van de COGEM volstaat tot die tijd het hanteren van de kleinschalige validatiestudies naar de inactivatie van gg-bacteriën omdat het mogelijk is om een inschatting van de effectiviteit van afdoding te maken. Zij merkt hierbij op dat voor een effectieve werking, DOC goed vermengd moet zijn met de bacteriesuspensie. Vanwege de grote volumina en viscositeit bij de opschaling vergt menging meer tijd dan bij kleinere volumina.

### *Calamiteitenprocedure is adequaat*

Ingeval zich onverhoopt een calamiteit voordoet, zouden ggo's kunnen vrijkomen. De aanvrager heeft procedures opgesteld om risico's in een dergelijke situatie te beperken. De aanvrager beschikt hiertoe over een Hazard and Operability (HAZOP) analyse voor de bioreactoren en killtanks. Met deze analyse wordt een beeld gevormd van veiligheidsrisico's met betrekking tot de bioreactoren en killtanks. Verder bestaat er een calamiteitenprocedure en is een incidentenregeling aanwezig indien een medewerker in aanraking komt met genetisch gemodificeerde meningokokken. Deze procedures bevatten onder andere instructies over de wijze van handelen bij lekkages van zowel kleine als grote hoeveelheden ggo's en bij besmetting van huid en kleding. In noodgevallen kan desgewenst de volledige inhoud van de bioreactoren worden opgevangen en afgedood in de killtanks. De werknemer die belast is met opruimingswerkzaamheden zal ademhalingsbescherming dragen.

De COGEM is van mening dat de instructies voldoende omschreven zijn. Gezien het bovenstaande, en de overige door de aanvrager opgestelde maatregelen, is de COGEM van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is dat ggo's tijdens het productieproces uit het gesloten systeem vrijkomen. Indien, als gevolg van een calamiteit, ggo's vrijkomen in de productieruimte dan is tevens de kans dat deze organismen buiten de ingeperkte ruimte, en dus in het milieu, terechtkomen, verwaarloosbaar klein.

Concluderend is de COGEM van mening dat de kans dat ggo's vrijkomen in het milieu verwaarloosbaar klein is.

### ***Het ggo is verminderd virulent***

Om te bepalen of een medewerker die onverhoopt in contact komt met gg-meningokokken een risico op infectie en ziekte loopt, wordt de pathogeniteit van de bacterie beoordeeld. Hieronder wordt eerst ingegaan op enkele kenmerken van wildtype *N. meningitidis*, vervolgens op kenmerken van de gg-bacterie.

Voor de vaccinproductie maakt de aanvrager gebruik van de bacterie *N. meningitidis* (pathogeniteitsklasse 2) welke behoort tot de familie van de *Neisseriaceae*. Deze Gram-negatieve, bolvormige bacterie is een commensaal (een organisme dat in of op de gastheer leeft zonder deze te schaden) van de bovenste luchtwegen en heeft als enige gastheer de mens (2;3;4). Ongeveer 10% van de bevolking is drager van meningokokken (3;5). De bacteriën worden overgedragen door direct contact met nasale of orale afscheiding of door inademing van aërosolen (5). In enkele gevallen is het mogelijk dat de bacteriën zich verspreiden van de luchtwegen naar de bloedbaan en eventueel via de

bloedhersenbarrière naar de hersenruggenmergsvloeistof. Verschillende aandoeningen kunnen het gevolg zijn. Veel voorkomende ziektebeelden zijn longontsteking, bloedvergiftiging en hersenvliesontsteking (6).

Wildtype meningokokken beschikken over een kapsel welke een belangrijke virulentiefactor is. Het maakt de organismen minder gevoelig voor de werking van het immuunsysteem en beschermt de bacteriën tevens tegen uitdroging. Op basis van de structuur van het aanwezige kapsel worden meningokokken ingedeeld in ten minste dertien verschillende serogroepen. Van slechts enkele serogroepen, waaronder de in Nederland voorkomende serogroepen B en C, is bekend dat ze pathogeen zijn (3;5). De aanvrager maakt voor de productie van het vaccin gebruik van een bacteriestam behorende tot serogroep B.

Meningokokken brengen twee belangrijke buitenmembraaneiwitten tot expressie, porine A (PorA) en porine B (PorB). Deze eiwitten vormen poriën die noodzakelijk zijn voor de passieve opname van kleine moleculen en zijn daarnaast onder andere betrokken bij de hechting van meningokokken aan de gastheercel (6;7). De door de aanvrager gehanteerde stam is een spontane *porine B (porB)*-deficiënte mutant van een wildtype meningokok. Door de mutatie heeft de bacterie het vermogen tot de aanmaak van het eiwit PorB verloren.

Voor de grootschalige productie van buitenmembraaneiwitten zijn aan de PorB-deficiënte, kapselloze meningokokkenstam twee extra *porA* genen (afkomstig uit *N. meningitidis*) toegevoegd. PorA is een geschikte vaccinkandidaat omdat het immuunsysteem bactericide antistoffen opwekt tegen dit eiwit (5;6).

Niet alleen zijn genen toegevoegd aan de gehanteerde meningokokkenstam, er zijn ook genen verwijderd. Door een deletie van 18.5 kb is namelijk het kapsellocus afwezig. Hierdoor zijn de genen coderend voor de synthese van het kapsel, alsmede de genen die het transport van het kapsel naar het oppervlak verzorgen, verwijderd en is de bacterie niet meer in staat om een kapsel te vormen (8). Op de plaats van de deletie is een erythromycine-resistentie marker gen (donor is *Bacillus subtilis*) ingebouwd. Als gevolg van de deletie is de kapseldeficiënte bacterie gevoeliger voor uitdroging en daarnaast zal inactivatie door het immuunsysteem (door middel van zogenaamde fagocytose) sneller plaatsvinden (6;8). Uit de literatuur blijkt een dergelijke meningokok minder virulent te zijn. Een studie met ratten laat zien dat de kapseldeficiënte meningokokken, na injectie van  $10^6$  KVE/dier, na negen uur verwijderd zijn uit de bloedcirculatie van de dieren. Wanneer een dier echter grote hoeveelheden ( $10^8$  KVE/dier) gg-bacteriën geïnjecteerd krijgt, is het immuunsysteem niet meer in staat om alle bacteriën te doden. Dit heeft tot

gevolg dat een bloedvergiftiging optreedt bij een dosis van  $10^9$  KVE/dier. Daarentegen zijn van de wildtype bacterie slechts maximaal 100 KVE/dier nodig om een bloedvergiftiging te veroorzaken en is een dosis van  $10^8$  KVE/dier dodelijk (9).

Concluderend is de COGEM van mening dat kapseldeficiëntie de bacterie *N. meningitidis* verminderd virulent maakt.

### ***De kans op infectie bij medewerkers is sterk verminderd***

Uit het voorgaande blijkt dat de maatregelen die genomen zijn om het productieproces veilig te laten verlopen adequaat zijn en dat een medewerker daarom slechts in geval van een calamiteit in contact kan komen met de ggo's. Overigens moet worden opgemerkt dat de overlevingstijd van de meeste meningokokkenstammen in aërosolen slechts enkele minuten bedraagt (10).

Hoewel het ggo verminderd virulent is, blijkt uit de eerder genoemde rattenstudie dat infectie wel zou kunnen plaatsvinden bij contact met een grote hoeveelheid ggo's (9). In de productiebatch is de uiteindelijke bacteriedichtheid circa  $1 \times 10^9$  KVE/ml. Uit studies blijkt dat een dergelijke concentratie bij ratten kan leiden tot infecties. Mogelijkerwijs geldt dit ook voor mensen. Medewerkers zouden daarom bij direct contact met grote hoeveelheden van verzwakte ggo's toch kans lopen op een besmetting. Hierbij wordt opgemerkt dat personen met deficiënties in het immuunsysteem of met een verzwakt immuunsysteem een risicogroep vormen (6).

Om risico op een infectie te minimaliseren, hanteert de aanvrager een incidentenregeling. Hierin staat vermeld dat een reëel infectiegevaar bestaat wanneer een medewerker, in onvoorziene omstandigheden, in aanraking komt met de meningokokkencultuur. Bij mogelijke aërosolinhalatie of besmetting van wonden dient daarom een arts te worden geraadpleegd voor een profylactische behandeling. De arts krijgt tevens relevante gegevens over het werk en de mogelijk gevaren verstrekt. Daarnaast wordt de arts informatie gegeven over het antibioticumgevoeligspectrum van de meningokokken. Overigens blijkt uit testen dat de kapseldeficiënte meningokokkenstammen gevoelig zijn voor antibiotica als penicilline, chlooramphenicol en rifampicine welke als behandeling kunnen worden toegepast (6;11). Kanamycine en erythromycine zijn volgens de aanvrager klinisch niet relevant bij een meningokokkeninfectie. Dit wordt onderbouwd door literatuur welke de betreffende antibiotica niet vermelden als behandeling van een meningokokkeninfectie (6;11).

Indien een medewerker onverhoopt in contact komt met de ggo's, dan is het optreden van ziekteverschijnselen naar de mening van de COGEM goed te voorkomen door een behandeling met antibiotica.



Indien een medewerker die drager is van wildtype meningokokken in contact komt met de kapselloze ggo's dan zou de kapsellocus mogelijk overgedragen kunnen worden van het wildtype naar de gg-bacteriën. Uit de literatuur blijkt namelijk dat wildtype *N. meningitidis* 'natuurlijk transformeerbaar' is. Dit betekent dat de bacterie vanuit zijn omgeving DNA kan opnemen. Er zijn aanwijzingen dat uitwisseling van een deel van het kapsellocus tussen meningokokken van verschillende serogroepen kan plaatsvinden. Het betreft de genen coderend voor de synthese van het kapsel (12;13). Een bacterie kan kleine DNA fragmenten efficiënter opnemen dan grote fragmenten. Het uit *N. meningitidis* verwijderde kapsellocus is 18.5 kb en betreft een groot fragment. De COGEM is van mening dat het theoretisch mogelijk zou kunnen zijn dat het ggo een compleet kapsellocus opneemt vanuit zijn omgeving. Het is aangetoond dat een andere gram-negatieve bacterie, *Campylobacter jejuni*, DNA met een lengte van meer dan 10 kb kan overdragen naar andere stammen. Echter, naar de mening van de COGEM is de kans op uitwisseling of complementatie van een compleet kapsellocus tussen wildtype meningokokken en gg-bacteriën uitermate klein. Indien een medewerker in contact is gekomen met de ggo's dan volgt een behandeling met antibiotica waardoor een eventuele verdere verspreiding van het ggo wordt voorkomen.

Concluderend is de COGEM van mening dat de kans op een ernstige ziekte van een medewerker na contact met de verzwakte meningokokken verwaarloosbaar klein is.

### **Conclusie**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een ontwerpbeschikking van Bureau GGO betrekking hebbende op de grootschalige productie van een vaccin tegen *N. meningitidis*. Bureau GGO schaalde de werkzaamheden in op MI-III niveau. De COGEM is van mening dat deze inschaling de veiligheid van mens en milieu waarborgt omdat de kans dat het ggo tijdens de werkzaamheden vrijkomt en het risico dat medewerkers lopen als gevolg hiervan, verwaarloosbaar klein is.

### **Referenties**

1. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerd organismen. Mei 2004.
2. Harrewijn, G.A. (1994). Elementaire microbiologie. Bohn Stafleu Van Loghum, Houten/Zaventem.
3. Girard, M.P., Preziosi, M.P., Aguado, M.T., en Kieny, M.P. (2006). A review of vaccine research and development: Meningococcal disease. *Vaccine* 24: 4692-4700.

4. Davidsen, T. en Tonjum, T. (2005). Meningococcal genome dynamics. *Nat Rev Microbiol* 4: 11-22.
5. Van Alphen, L. en Berbers, G. (2001). Microbiologie van meningokokken en vaccins tegen meningokokkenziekten voor het Rijksvaccinatieprogramma. *Infectieziekten Bulletin* 12 (8): 257-263.
6. Stephens, D.S. en Zimmer, S.M. (2002). Pathogenesis, therapy, and prevention of meningococcal sepsis. *Curr Infect Dis Rep* 4(5): 377-386.
7. Steeghs, L., De Cock, H., Evers, E., Zomer, B., Tommassen, J. Van der Ley, P. (2001). Outer membrane composition of a lipopolysaccharide-deficient *Neisseria meningitidis* mutant. *The EMBO Journal* 20 (24): 6937-6945.
8. Frosch, M., Schultz, E., Glenn-Calvo, E. en Meyer, T.F. (1990). Generation of capsule-deficient *Neisseria meningitidis* strains by homologous recombination. *Mol. Microbio.* 4(7): 1215-1218.
9. Vogel, U., Hammerschmidt, S. en Frosch, M. (1996). Sialic acids of both the capsule and the sialylated lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup B are prerequisites for virulence of meningococci in the infant rat. *Med Microbiol immunol* 185: 81-87.
10. West Lincolnshire Primary Care Trust. Hazard analysis and risk assessment, occupationally acquired meningococcal disease. Internet:  
<http://www.westlincspct.nhs.uk/Policies&manuals/Infection%20control%20manual/Part%205/5.2%20Hazard%20analysis%20and%20risk%20assessment%20%20Occup%20Acquired%20Meningococcal%20Disease.pdf> (12 juni 2006).
11. Rosenstein, N.E., Perkins, B.A., Stephens, D.S., Popovic, T. en Hughes, J.M. (2001). Meningococcal disease. *N Engl J Med* 344(18): 1378-1388.
12. Kahler, C.M., Blum, E., Miller, Y.K., Ryan, D., Popovic, T. en Stephens, D.S. (2001). *Exl*, an exchangeable genetic island in *Neisseria meningitidis*. *Infect immun* 69(3): 1687-1696.
13. Swartley, J.S., Marfin, A.A., Edupuganti, S., Liu, L.J., Cieslak, P., Perkins, B., Wenger, J.D. en Stephens, D.S. (1997). Capsule switching of *Neisseria meningitidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 271-276.