

Advies betreffende: **Aseptic filling and lyophilisation of *Salmonella typhi* Δ aroC Δ ssaV ZH9**

Kennisgever: **Synco Biopartners B.V.**

COGEM kenmerk
CGM/010702-01

BGGO nummer
GGO 01-084

Datum advies
2 juli 2001

Beschrijving van het experiment

De aanvragers voeren handelingen uit met een door de firma Microscience Ltd, in Groot Britannië, vervaardigd Genetisch Gemodificeerd Organisme (GGO). Het betreft hier een geattenueerde stam van *Salmonella typhi*. De door de aanvragers uit te voeren handelingen betreffen het afvullen en vriesdrogen van de bovengenoemde stam. Wild type *Salmonella typhi* is een pathogeen dat tot de pathogeniteitsklasse 3 behoort. De kennisgever verzoekt tot een verlaging van de inschaling van de *Salmonella typhi* Δ aroC Δ ssaV ZH9 stam met als doel de betreffende stam af te vullen en te vriesdrogen in de beschikbare ruimte. Hiertoe is de mate en de stabiliteit van attenuatie van de betreffende stam door de COGEM beoordeeld.

De kennisgever geeft aan dat het afvullen en vriesdrogen plaatsvindt in een speciale ruimte onder GMP condities, welke voldoet aan de kwalificatie A en B volgens de Europese farmaceutische richtlijnen. In deze aseptische afvulruimte heerst een overdruk. Binnenkomende lucht is gefiltreerd over HEPA filters. Het aseptisch afvullen vindt onder laminaire luchtstroom plaats (LAF kast). De afvulmachine is zodanig geconstrueerd dat deze fungeert als clean bench met verticale luchtstroom. Het afvulproces wordt geautomatiseerd uitgevoerd. De lege steriele flacons worden onder LAF condities in het afvulgedeelte van de machine geplaatst. De suspensie wordt automatisch in de flacon gepompt en vervolgens wordt direct een dop op de vials geplaatst. De afvulprocedure wordt zodanig uitgevoerd dat aërosol vorming tot het minimum wordt teruggebracht. De luchtkwaliteit wordt tijdens de afvulprocedure bepaald middels een deeltjes teller, die ook eventueel gevormde aërosol vorming detecteert.

De vriesdroger heeft een 6 m² plaatoppervlak waarop de flacons worden geplaatst. De tijdens de procedure ontstane waterdamp wordt weggevangen op condensatoren van -70°C. Additionele maatregelen in de vorm van Steaming in Place (SIP) en Cleaning in Place (CIP) worden in de aanvraag beschreven.

De ruimte waar het afvullen en vriesdrogen plaatsvindt is niet als een VMT ruimte gekwalificeerd. Echter het gebruik van LAF condities kan mogelijk voldoende inperking geven. Deze inperking zou echter alleen voldoende zijn voor een organisme behorend tot pathogeniteitsklasse 1. In haar advisering heeft de COGEM beoordeeld of een verlaging van de *Salmonella typhi* stam van pathogeniteitsklasse 3 naar pathogeniteitsklasse 1 gerechtvaardigd is.

Overwegingen

Het *aroC* gen codeert voor het enzym chorismate synthetase. Dit enzym is verantwoordelijk voor de productie van chorismate, dat een rol speelt in de biosynthese van aromatische aminozuren en enkele andere aromatische verbindingen. In afwezigheid van een functioneel chorismate synthetase is *Salmonella typhi* niet in staat om de synthese van een aromatische ring uit te voeren met als gevolg dat deze bacteriën voor groei afhankelijk zijn van drie aromatische aminozuren (tryptofaan, fenylalanine en tyrosine), para-aminobenzoïc acid (PABA) en 2,3 dihydroxybenzoate (DHB).

Zoogdieren zijn niet in staat om aromatische metabolieten te synthetiseren. Door de afwezigheid van dergelijke metabolieten in zoogdieren is complementatie van de *aroC* mutatie in de geattenueerde *Salmonella typhi* stam in zoogdieren niet mogelijk. Vergelijkbare *aroC* mutanten welke afhankelijk zijn van in vivo afwezige metabolieten worden effectief toegepast in vaccins voor muizen, schapen, kippen en kalveren. Het gebruik van diverse *Salmonella typhi* stammen met deleties in *aro*-genen is in het verleden bij een groot aantal mensen getest en veilig gebleken^{1 2}.

Een versterkte attenuatie wordt bereikt door naast een deletie in het *aroC* gen ook een deletie in het *ssaV* gen aan te brengen. Het *ssaV* gen maakt deel uit van het zogenaamde *Salmonella* pathogeniteits eiland twee (SP12). SP12 bevat een aantal genen welke coderen voor een type III secretie systeem. Dit secretie systeem speelt een rol bij het transport van door SP12 gecodeerde virulente geassocieerde eiwitten die effector eiwitten worden genoemd. De effector eiwitten worden uit de bacteriën getransporteerd en komen waarschijnlijk terecht in onder andere macrofagen. Bekend is dat het SP12 essentieel is voor de pathogenese en de virulentie van salmonella. Het *ssaV* genproduct maakt deel uit van het SP12 complex. Dergelijke mutanten blijken sterk geattenuerd, hoewel zij beschikken over een normale groei. In kweekmedia is aangetoond dat hun groei in eukaryotische cellen, waaronder macrofagen, gereduceerd is ten opzichte van het wild type *Salmonella*.

Conclusie

De COGEM acht de attenuatie van de *Salmonella typhi* Δ *ssaV* ZH9 stam gezien de bij de aanvraag geleverde informatie over de effecten van het vaccin bij mensen voldoende bewezen. Gezien de aard van de attenuatie is de COGEM van mening dat de stabiliteit ervan gewaarborgd is. De COGEM acht het acceptabel deze *Salmonella typhi* Δ *aroC* Δ *ssaV* ZH9 stam in te schalen in klasse 1.

De door de aanvragers geleverde informatie inclusief de Standard Operating Procedures betreffende het afvullen en vriesdrogen zijn toereikend voor de handelingen met een

¹ Levine, M.M. et al (1997) Progress in the development of new attenuated strains of *Salmonella Typhi* as live oral vaccines against typhoid fever. In *New Generation Vaccins*, second edition, Woodrow, Kaper and Cobon, Published by Marcel Dekker Inc New York

² Chatfield, S.N. et al (1994), Progress in the development of multivalent oral vaccines based on live attenuated salmonella. In *Modern Vaccinology*, Plenum Medical, New York

organisme behorend tot pathogeniteitsklasse 1, waartoe de mutant *Salmonella typhi* Δ aroC Δ ssaV ZH9 stam gerekend mag worden. De COGEM is van mening dat de aanvragers in hun informatie alleen aangetoond hebben op een verantwoorde wijze het afvullen en vriesdrogen van deze stam uit te kunnen voeren. Hiertoe dienen zij de door hen aangegeven Standard Operating Procedures op te volgen. Wellicht ten overvloede adviseert de COGEM handelingen anders dan het afvullen en vriesdrogen niet in de beschikking op te nemen daar voor een beoordeling hierover niet voldoende informatie beschikbaar is.