



Commissie Genetische Modificatie

Voorzitter: prof.dr.ir. B.C.J. Zoeteman

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

Uw kenmerk	Uw brief van	Kenmerk	Datum
	22-09-2004	CGM/050211-01	11 februari 2005
Onderwerp	Advies ontwerpbeschikking IG 04-203		

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van ontwerpbeschikking IG 04-203, betreffende “Grootschalige productie van een niet-toxische derivaat van het dermonecrotisch toxine van *Pasteurella multocida* in *Escherichia coli*”, van Intervet International B.V. te Boxmeer, adviseert de COGEM als volgt.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de grootschalige productie van een vaccincomponent met behulp van genetisch gemodificeerde *Escherichia coli*. Het vaccin is gericht tegen snuffelziekte bij varkens; ook wel progressieve atrofische rhinitis genoemd.

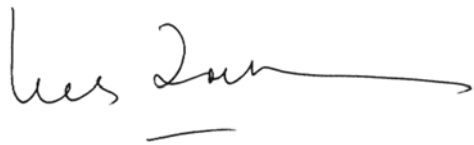
Van de vaccincomponent (gedetoxificeerd dermonecrotisch toxine van *Pasteurella multocida*) is aangetoond dat het geen toxische eigenschappen meer bezit. Hiernaast is de gebruikte *E. coli* K12 stam, waarin het DNA-fragment tot expressie wordt gebracht, zodanig verzwakt dat deze niet buiten het laboratorium kan overleven.

Het vaccin wordt geproduceerd in fermentoren met een maximaal volume van 3000 liter. Uit de kweekvloeistof wordt in verschillende stappen de vaccincomponent gezuiverd. De afvalstromen die tijdens het proces vrijkomen worden opgevangen in een afdodigingstank en vervolgens 15 minuten bij 80 °C verhit. Gezien de door de aanvrager overlegde gegevens acht de COGEM deze afdodingsmethode afdoende om de afvalstromen met daarin de resten van de genetisch gemodificeerde *E. coli* te inactiveren.

Concluderend is de COGEM van mening dat met de inschaling van handelingen op MI-II niveau, de veiligheid voor mens en milieu gewaarborgd is.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'B.C.J. Zoeteman', with a long horizontal flourish extending to the right.

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

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. I. van der Leij

Titel: Grootschalige productie van een vaccincomponent met behulp van genetisch gemodificeerde *Escherichia coli*.

COGEM advies: CGM/050211-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag betreffende de grootschalige productie van een vaccincomponent met behulp van genetisch gemodificeerde *Escherichia coli* K12. De vaccincomponent zal bestaan uit een niet-toxische derivaat van dermonecrotisch toxine (dO-antigeen) van *Pasteurella multocida*. *P. multocida* is medeveroorzaker van progressieve atrofische rhinitis; een aandoening bij varkens, ook wel snuffelziekte genoemd. Om de vaccincomponent te kunnen produceren wordt het DNA-fragment wat codeert voor het dO-antigeen tot expressie gebracht in *E.coli* PC2958 (POP2136).

De productie van het vaccin zal worden uitgevoerd in fermentoren met een maximaal volume van 3000 liter. Hierna worden de cellen geconcentreerd door middel van centrifugatie en gekraakt in een homogenisator. Het homogenisaat zal daarna worden gefiltreerd. Het filtraat met daarin het dO-antigeen wordt vervolgens gezuiverd met behulp van twee chromatografische stappen. Het restafval wat bij het productieproces vrij komt, wordt afgedood.

Het inschalingsvoorstel van Bureau GGO betreffende onderhavige werkzaamheden is gebaseerd op de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (1). Uit deze regeling volgt dat de werkzaamheden in de procesinstallatie moeten worden uitgevoerd op MI-II niveau

Eerder uitgebracht COGEM advies

De COGEM heeft in 1994 over een soortgelijke aanvraag geadviseerd (CGM/941007-12). Het betrof destijds de productie van hetzelfde dO-antigeen als in onderhavige aanvraag. Het verschil ligt in het feit dat er gebruik gemaakt werd van een andere bacteriestam als gastheer. Er werd eveneens gebruik gemaakt van *E. coli* K12 maar dan van de stam LB229. De COGEM heeft destijds geadviseerd de handelingen in de procesinstallatie uit te voeren onder GILSP met afdoding van biomassa (huidige MI-II niveau).

Kenmerken van het GGO

De kennisgever is voornemens een vaccincomponent te produceren gericht tegen progressieve atrofische rhinitis. Hiertoe wordt het DNA-fragment wat codeert voor het dO-antigeen tot expressie gebracht in *E. coli* PC2958 (POP2136).

Gastheer

Voor de productie van de vaccincomponent wordt gebruik gemaakt van *Escherichia coli* als gastheer. *E. coli* behoort tot de familie van de *Enterobacteriaceae* en komt voor in de darm van warmbloedige dieren (2).

In de dikke darm voorkomt de bacterie uitgroei van schadelijke andere bacteriën. Buiten de darm zijn enkele *E. coli* soorten pathogeen waardoor ze een voedselinfectie kunnen veroorzaken. *E. coli* vermenigvuldigt zich bij temperaturen tussen de 10 en 40 °C. De groei van de bacterie is optimaal bij 37 graden. De bacterie kan maanden in de bodem en weken in water overleven.

In onderhavige aanvraag wordt de stam *E. coli* K12 gebruikt. Dit is een niet-pathogene stam van de bacterie, die wordt gebruikt als modelorganisme in de moleculaire biologie (3). De bacteriestam is auxotroof en vitamine B deficiënt waardoor ze alleen kan overleven onder laboratoriumcondities. Bovendien bevat ze geen genen die coderen voor toxinen.

Vector

In de aanvraag wordt gebruik gemaakt van de niet zelfoverdraagbare vector pUN121. De vector is 4.4 kilobase (kb) groot en bevat een ampicilline en tetracycline resistentiegen (4). Hiernaast bevat de vector het c1 gen van faag lambda (λ). Het c1 gen reguleert de genexpressie van het tetracycline resistentiegen (4).

Donorsequentie

In de vector wordt een DNA-fragment gekloneerd wat codeert voor het niet-toxische derivaat van dermonecrotisch toxine (dO-antigeen) van *P. multocida* met een eigen promotor. *P. multocida* is een gram-negatieve bacterie en behoort tot de familie van de *Pasteurellaceae* (2). Ze is een belangrijke ziekteverwekker bij vele diersoorten waaronder varkens, kippen en vee. Bij mensen is het de meest voorkomende infectie na een honden- of kattenbeet (5).

Het dermonecrotisch toxine wat geproduceerd wordt door *P. multocida* is de veroorzaker van progressieve atrofische rhinitis bij varkens (6). Bij deze ziekte wordt eerst het slijmvlies van de neus aangetast en later de neusschelp waardoor de neus scheef gaat staan. Dit heeft als gevolg dat de varkens langzamer groeien en hun slachtgewicht niet bereiken (7).

De bacterie *P. multocida* is niet alleen verantwoordelijk voor het verloop van progressieve atrofische rhinitis. Ook de gram-negatieve bacterie *Bordetella bronchiseptica* speelt een rol. Deze bacterie is bij dieren een voornaamste veroorzaker van aandoeningen aan de luchtwegen. Indien het varken geïnfecteerd is met *B. bronchiseptica* wordt de kolonisatie van het neusslijmvlies door *P. multocida* bevorderd (8).

In het gen, coderend voor het dermonecrotisch toxine, dat tot expressie wordt gebracht, is een deletie aangebracht welke leidt tot inactivatie van de toxische activiteit (8).

Productieproces

De vaccincomponent wordt geproduceerd in fermentoren met een inhoud van maximaal 3000 liter. Na afloop van de kweek worden de cellen geconcentreerd door middel van centrifugatie. De cellen worden vervolgens gekraakt met behulp van een “French press”. Door het kraken van de cellen komt het intracellulaire dO-antigeen beschikbaar voor verdere opwerking.

Na het kraken wordt het materiaal onder steriele condities gefiltreerd waarbij gebruik gemaakt wordt van een filter met een poriegrootte van 0.2 µm. Door gebruik van deze filters is het filtraat vrij van intacte *E. coli* cellen. De betreffende filters worden door de fabrikant gevalideerd. De kennisgever heeft aangegeven de intactheid van het filter na filtratie altijd te controleren. Uit het filtraat wordt het uiteindelijke product, het dO-antigeen, gezuiverd via twee chromatografische stappen.

De afvalstoffen die bij het proces vrijkomen, worden verzameld in een afdodingstank. Afdoding vindt plaats door de afvalstoffen 15 minuten bij 80 °C te verhitten. Hierdoor dalen de “colony forming units” per milliliter (cfu/ml) van 2×10^9 naar 0. In theorie kan één bacterie uitgroeien tot één “colony forming unit”.

De apparatuur die gebruikt is tijdens het proces wordt na afloop van de productie gesteriliseerd met behulp van stoom. Verder zullen eventueel gebruikte disposables of besmet glaswerk worden geautoclaveerd.

De aanvrager heeft een handboek biologische veiligheid opgesteld waarin beschreven wordt hoe om te gaan met eventuele calamiteiten en ongevallen. Hierin worden ondermeer procedures beschreven wat te doen na het morsen van ggo's of na lekkages waarbij meer dan 1 liter ggo-bevattende kweekvloeistof vrijkomt. Alle werknemers zijn verplicht kennis te nemen van deze procedures.

Overweging en Advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over de vergunningaanvraag betreffende de grootschalige productie van een vaccincomponent tegen progressieve atrofische rhinitis bij varkens, met behulp van een genetisch gemodificeerde *E.coli*. In 1994 heeft de COGEM over nagenoeg dezelfde procedure positief geadviseerd. Destijds werd in plaats van de huidige bacteriestam, *E. coli* LB229 gebruikt.

Door de aanvrager wordt voor de productie van het vaccincomponent gebruik gemaakt van de *E. coli* K12 stam (POP2136). Deze stam is auxotroof en vitamine B deficiënt waardoor deze buiten laboratoriumcondities niet kan overleven.

Het recombinante *E. coli* bevat een insertie dat codeert voor het dO-antigeen. Het insert is volledig gekarakteriseerd. Experimenten hebben aangetoond dat het dO-

antigeen geen toxische eigenschappen meer bezit. Bovendien wordt het dO-antigeen niet uitgescheiden door *E. coli*.

Na de grootschalige kweek wordt de fermentatievloeistof geoogst, gecentrifugeerd en gehomogeniseerd. De gebruikte filters worden door de fabrikant gevalideerd en de intactheid van het filter wordt voor aanvang van de filtratie door de kennisgever gecontroleerd. De gebruikte poriegrootte van het membraan van 0.2µm zorgt ervoor dat het filtraat vrij is van intacte *E. coli* cellen.

De afvalstoffen die bij het proces vrijkomen worden volgens een gevalideerde methode afgedood. De COGEM acht de gebruikte methode afdoende om de afvalstromen met daarin de resten van de genetisch gemodificeerde *E. coli* te inactiveren.

De voorgestelde protocollen aangaande het morsen en lekken van ggo's zijn naar de mening van de COGEM adequaat om de risico's voor mens en milieu tot een minimum te beperken.

Concluderend is de COGEM van mening dat met de inschaling van handelingen op MI-II niveau, de veiligheid voor mens en milieu gewaarborgd is.

Referenties

1. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerd organismen. Mei 2004
2. Prescott LM, Harley JP, Klein DA (1996). Microbiology third edition. Wm. C. Brown Publishers
3. Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y (1997). The complete genome of *Escherichia coli* K-12. Science **277**: 1453-1474
4. Nilsson B, Uhlen M, Josephson S, Gatenbeck S, Philipson L (1983). An improved positive selection plasmid vector constructed by oligonucleotide mutagenesis. Nucleic acids Research **11**: 8019-8030
5. May BJ, Zhang Q, Li LL, Paustian ML, Whittam TS, Kapur V (2001). Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. PNAS **98**: 3460-3465
6. Pedersen KB, Elling F (1984). The pathogenesis of atrophic rhinitis in pigs induced by toxigenic *Pasteurella Multocida*. Journal of comparative pathology: **94**: 203-214
7. Snuffelziekte bij varkens. Provinciaal verbond voor dierenziektenbestrijding van West-Vlaanderen. www.agris.be/nl/vark/gezondheid/ziekten/snuffelziekte.html (27 januari 2005)
8. Petersen SK, Foged NT, Bording A, Nielsen JP, Riemann HK, Frandsen PL (1991). Recombinant derivatives of *Pasteurella multocida* Toxin: Candidates for a vaccine against progressive atrophic rhinitis. Infection and immunity **59**: 1387-1393