



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
GGO 05-141.co1

Uw brief van
13 februari 2005

Kenmerk
CGM/060228-02

Datum
28 februari 2006

Onderwerp
Advies IG 05-141

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van de adviesvraag over kennisgeving IG 05-141 betreffende de grootschalige productie van influenza vaccins van Nobilon International B.V., en het voorstel tot inschaling dat is opgesteld door Bureau GGO, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over een inschalingsvoorstel voor de grootschalige productie op MI-III inperkingsniveau van genetisch gemodificeerde influenza A vaccins tegen het H5N1 influenzavirus. De virusvaccins zijn gebaseerd op de niet-pathogene influenza A stam A/PuertoRico/8/34 en enkele delen van hoogpathogene influenza A virussen.

Risico's tijdens de vaccinproductie kunnen ontstaan wanneer recombinante virussen bij een calamiteit vrijkomen. De COGEM acht de door de aanvrager genomen maatregelen en werkprocedures voldoende om te voorkomen dat de virussen vanuit de productieruimte in het milieu terechtkomen.

Bij een eventuele calamiteit zouden medewerkers met het virus geïnfecteerd kunnen raken via contact of aërosolen. De COGEM acht de kans dat medewerkers vervolgens ernstig ziek worden zeer gering. De virusstam A/PuertoRico/8/34 is avirulent en sterk geattenuëerd voor mensen. Tevens is aangetoond dat de recombinante virussen bestaande uit zes gensegmenten van A/PuertoRico/8/34 en twee segmenten HA en NA van wild-type humaan influenza virus, niet virulent zijn voor mensen. Bovendien leidt verwijdering van de basische klievingsplaats in het HA eiwit van het hoogpathogene H5N1 influenzavirus tot een sterke vermindering van de pathogeniteit. Een gelimiteerde infectie aan bijvoorbeeld ogen is echter niet uit te sluiten. De COGEM wijst er op dat een aantal maatregelen ter beschikking staan om mogelijke risico's verder te minimaliseren.

Concluderend stemt de COGEM in met het inschalingsvoorstel omdat de inrichtingsvoorschriften van een MI-III ruimte, alsmede de aanvullende voorschriften, voldoende fysische inperking geven om de veiligheid voor mens en milieu te waarborgen.

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, stylized loop followed by a horizontal line that ends in a small hook.

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

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

Grootschalige productie van influenza vaccins

COGEM advies CGM/060228-02

Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een inschalingsvoorstel van Bureau GGO voor de grootschalige productie van genetisch gemodificeerde influenza A vaccins. De aanvrager is voornemens om voor commerciële doeleinden influenza vaccins (NIBRG-12 en NIBRG-14) te produceren tegen influenzavirustype H5N1. De vaccinstammen zijn gebaseerd op de niet-pathogene influenza A virusstam A/PuertoRico/8/34. Deze zijn beschikbaar gesteld door referentielaboratoria van de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO). De vaccins zullen grootschalig (tot 3000 liter) opgekweekt worden met behulp van animale cellen in bioreactoren. Om te voorkomen dat het uiteindelijke vaccin infectieus virus bevat, wordt het virus chemisch afgedood met beta-propiolacton (BPL).

Het COGEM advies CGM/050201-01 stelt dat kleinschalige handelingen met de genoemde virusstammen plaats kunnen vinden op ML-II inperkingsniveau (handelingen in laboratoria) met inachtneming van aanvullende voorschriften. De onderhavige vergunningaanvraag heeft betrekking op grootschalige productie. Het ministerie heeft een voorstel tot inschaling op MI-III (handelingen in procesinstallaties) gemaakt op basis van extrapolatie van de inschaling van kleinschalige werkzaamheden. Dit voorstel tot inschaling is voorgelegd aan de COGEM.

Influenza A virussen

Het influenzavirus staat ook bekend als het griepvirus. Dit RNA virus behoort tot de familie *Orthomyxoviridae* en is onderverdeeld in drie typen, Influenza A, B en C (1;2). Alleen het *Influenza A virus* kan zowel mensen, vogels als zoogdieren infecteren. Het genoom van het *Influenza A virus* bestaat uit acht unieke gensegmenten die coderen voor tien eiwitten, waaronder haemagglutinine (HA), neuraminidase (NA). De HA en NA eiwitten spelen een belangrijke rol bij de gastheerspecificiteit en de aanmaak van antistoffen tegen het virus (3).

Classificatie van Influenzavirussen vindt plaats op basis van de aanwezige HA en NA subtypen. In totaal zijn er voor het *Influenza A virus*, 16 verschillende haemagglutinine subtypen (H1 t/m H16) en 9 verschillende neuraminidase subtypen (N1 t/m N9) bekend. Bij vogels komen alle subtypen voor, terwijl bij de mens voor zover bekend alleen H1, H2, H3, N1, N2 voorkomen. Recentelijk blijkt dat ook H5, H7 en H9 bij de mens tot infecties kunnen leiden (4;5).

De pathogeniteit van influenza A virussen wordt bepaald door een aantal factoren, waaronder het HA eiwit. Het HA eiwit wordt door een cellulair protease (trypsin-like serine endoprotease) gesplitst op een specifieke klievingsplaats dat bestaat uit een enkel basisch aminozuur. Klieving van het eiwit in HA1 en HA2 vormt een belangrijke stap voor de pathogeniteit van het virus. Aangezien het betreffende protease voornamelijk actief is in epitheelcellen van de luchtwegen, zijn deze cellen vatbaar voor het virus.

Als gevolg van een insertiemutatie van enkele aminozuren in de klievingplaats, ontstaat een polybasische klievingsplaats. Hierdoor kunnen ook andere proteasen (PC1 en furine), die actief zijn in cellen in het hele lichaam, het HA eiwit klieven. Dit heeft tot gevolg dat weefsel in het gehele lichaam geïnfecteerd kunnen raken, met als gevolg een veranderde specificiteit, pathogeniteit en gastheerbereik van het virus (5;6). Uit influenzavirusuitbraken in het verleden blijkt de aanwezigheid van een dergelijke polybasische klievingsplaats in het HA eiwit een belangrijke aanwijzing te zijn voor de pathogeniteit van het virus.

Vogels die geïnfecteerd raken met influenza A virussen (aviaire influenza A) maken doorgaans asymptomatische of milde infecties door. Wanneer overdracht plaatsvindt van wilde watervogels naar pluimvee, kunnen sommige virusstammen evolueren tot hoogpathogene influenzavirussen. De oorzaak hiervan zijn mutaties en uitwisseling van genoomsegmenten tussen influenzavirussen. Aangezien een influenzavirus bestaat uit acht verschillende genoomsegmenten, kunnen er uit twee typen influenzavirussen theoretisch $256 (2^8)$ unieke combinaties gevormd worden. Dit kan tot gevolg hebben dat een pathogeen influenzavirus ontstaat met geheel nieuwe eigenschappen en oppervlakte eiwitten, waartegen in de populatie geen antistoffen aanwezig zijn. Vermenging van een niet-virulent humaan influenzavirus met een pathogeen aviair influenzavirus kan leiden tot het ontstaan van een pathogeen humaan influenzavirus (5).

In het verleden zijn diverse hoogpathogene influenza virussen ontstaan. Recentelijk is het hoogpathogene subtype H5N1 waargenomen in Zuid-Oost Azië, Rusland, Turkije, Roemenië, Kroatië, Iran en Nigeria. Sinds februari van dit jaar is het betreffende virus geconstateerd in een aantal lidstaten van de Europese Unie (EU), waaronder Italië, Duitsland en Frankrijk. In de EU waren per 21 februari nog geen mensen besmet geraakt, maar in Turkije zijn al 4 van de 12 geïnfecteerde personen overleden (7).

Het aviaire influenzavirus wordt verspreid door intensief contact met besmet pluimvee, via besmette ontlasting van pluimvee en geïnfecteerde (trek)vogels en via kleine stofdeeltjes door de lucht (4;5;8). Mensen kunnen besmet raken met het H5N1 influenzavirus, maar tot op heden zijn er geen aanwijzingen dat het virus zich efficiënt kan verspreiden van mens op mens. Indien het virus door mutatie van mens op mens kan verspreiden zou een wereldwijde pandemie kunnen ontstaan. Het is de

verwachting dat niet alleen jonge kinderen, ouderen en mensen met een verzwakt immuunsysteem ziek worden, maar ook gezonde volwassenen aangezien er weinig immuniteit onder het grootste deel van de wereldbevolking heerst tegen het H5 eiwit. (5;8).

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft eerder geadviseerd (CGM/050201-01) over de inschaling van kleinschalige experimenten met influenzavirussen ten behoeve van vaccinontwikkeling (9). De werkzaamheden betreffen de vervaardiging van recombinante virussen bestaande uit minimaal zes gensegmenten afkomstig van een niet-virulente verzwakte laboratoriumstam, zoals A/PuertoRico/8/34 (H1N1), in combinatie met één of twee gensegmenten van andere influenzavirussen. De aanvrager heeft destijds aangegeven dat het HA gen geen basische klievingplaats bevat en dat in de heterologe gensegmenten geen ongedefinieerde mutaties met behulp van recombinante DNA technieken aangebracht zijn.

De COGEM heeft geadviseerd om de productie van de recombinante influenza A virussen, de infectie van geëmbryoneerde kippeneieren en de handelingen met cellen en weefsels van geïnfecteerde dieren, op ML-II inperkingsniveau uitgevoerd kunnen worden met inachtneming van de volgende aanvullende voorschriften:

- medewerkers zijn gevaccineerd tegen humaan *Influenza A virus*;
- medewerkers die symptomen van griep vertonen worden uitgesloten van werkzaamheden;
- handelingen dienen in een veiligheidskabinet klasse-II uitgevoerd te worden;
- het dragen van handschoenen is verplicht;
- het dragen van een mondkapje (model N95 of hogere specificatie) en een beschermende bril is verplicht.

Adviesvraag

De vergunningaanvrager is voornemens om vaccins tegen het virus H5N1 grootschalig te produceren. De vaccinstammen NIBRG-12 en NIBRG-14 zijn beschikbaar gesteld door het WHO referentiecentrum. De stammen zijn vervaardigd met behulp van de techniek 'reverse genetics'.

De vaccinstammen zijn samengesteld uit 6 gensegmenten afkomstig van de niet-pathogene influenza A virusstam A/PuertoRico/8/34 (H1N1). De overige twee gensegmenten coderen voor HA en NA eiwitten. Deze eiwitten zijn afkomstig uit de H5N1 influenza A virussen A/HongKong/213/03 (NIBRG-12) en A/Vietnam/1194/04 (NIBRG-14). Na constructie van de virussen, vindt in eerste instantie vermenigvuldiging van de virussen plaats via een aantal passages in kippeneieren en vervolgens via weefselkweek. Deze handelingen vinden plaats in een ML-III niveau laboratorium.

Grootschalige productie

Wanneer de opgekweekte hoeveelheid virus voldoende is, worden animale cellen in fermentoren geïnfecteerd. Gehanteerd worden ‘Madin Darby Canine Kidney’ (MDCK) cellen, ‘African Green Monkey Kidney’ (Vero) cellen en ‘Madin Darby Bovine Kidney’ (MDBK) cellen. Vervolgens vindt grootschalige productie (tot 3000 liter) van de vaccinvirussen plaats. Wanneer de productie van het virus een optimum bereikt heeft, worden de kweken geogst en wordt het virus gezuiverd tot het uiteindelijke product. Het zuiveringsproces bestaat uit onder meer ‘continuous flow’ centrifugatie en filtratie. Om te voorkomen dat het uiteindelijke vaccin infectieus virus bevat, wordt het virus chemisch afgedood met beta-propiolacton (BPL) via een gevalideerde methode.

Fermentoren

Tijdens de werkzaamheden vinden geen open handelingen plaats. De fermentoren vormen gesloten systemen die met elkaar verbonden zijn. Tevens geschiedt monsterneming via gesloten systemen. De apparatuur is gevalideerd en bevindt zich in een werkruimte met onderdruk. In de aan- en afvoerkanalen zijn absoluut-filters aanwezig. Daarnaast bevinden zich in de afvoer extra absoluut-filters om zodoende elk risico van verspreiding in het milieu te minimaliseren.

Vloeibaar afval wordt via gesloten systemen naar desinfectietanks afgevoerd waarin het materiaal gesteriliseerd wordt met behulp van een gevalideerde hitte behandeling. Besmet vast afval verlaat het gebouw via een destructie autoclaaf. Het schoonmaken en steriliseren van apparatuur geschiedt volgens gevalideerde ‘cleaning in place’ of ‘steam in place’ procedures.

Bij lekkage wordt de desbetreffende ruimte en apparatuur gedesinfecteerd volgens gevalideerde procedures, welke vermeld staan in de werkprocedures (SOP’s).

Alle apparatuur wordt bediend door adequaat opgeleide medewerkers en voor de werknemers geldt een vaccinatiebeleid.

Voorstel tot inschaling

De onderhavige vergunningaanvraag heeft betrekking op grootschalige productie van de virusvaccins. Bureau GGO heeft daarom de ML-II inschaling voor kleinschalige experimenten geëxtrapoleerd naar MI-III niveau, met inachtneming van de volgende aanvullende voorschriften:

- medewerkers zijn gevaccineerd tegen humaan *Influenza A virus*;
- medewerkers die symptomen van griep vertonen worden uitgesloten van werkzaamheden;
- een ventilatiesysteem is aanwezig waardoor in de werkruimte onderdruk ontstaat ten opzichte van de heersende atmosferische druk. In het onafhankelijke luchtafvoerkanaal is een HEPA filter aangebracht.

De COGEM is gevraagd te adviseren over dit voorstel tot inschaling.

Overweging en advies

De COGEM is gevraagd te adviseren over een inschalingsvoorstel betreffende de opschaling van twee vaccinvirussen. Risico's kunnen bij grote uitzondering ontstaan wanneer in geval van onvoorziene omstandigheden, zoals het scheuren van leidingen of afsluitingen, vaccinvirus vrijkomt.

Om te bepalen of het productiesysteem voldoende fysieke inperking biedt, is beoordeeld welke maatregelen getroffen zijn. De COGEM acht de door de aanvrager genomen maatregelen voldoende. Het gehele productieproces, de apparatuur en procedures zijn gevalideerd in het kader van Good Manufacturing Practice (kwaliteitborgingssysteem). De geplaatste filters in aan- en afvoerkanalen van gassen voorkomen het vrijkomen van recombinant vaccinvirus. Het vloeibare afval wordt via gesloten systemen afgevoerd naar desinfectietanks. Tevens wordt het productiesysteem gedesinfecteerd na afloop van de werkzaamheden.

Tijdens de opschaling zouden risico's kunnen ontstaan in geval van een calamiteit waarbij geproduceerd virus vrijkomt vanuit het gesloten systeem in de productieruimte. Dit zou ertoe kunnen leiden dat virussen in het milieu terechtkomen vanuit de ruimte of dat laboratoriummedewerkers geïnfecteerd raken. De COGEM is van mening dat de opgestelde procedures in geval van lekkages voldoende fysieke inperking van het vaccinvirus bieden. Hierbij merkt zij op dat met name de onderdruk in de productieruimte van belang is. Daarnaast beschikt een MI-III ruimte over een voorziening voor de opvang en inactivatie van de totale inhoud van het gesloten systeem (10)

Aangezien er geen open handelingen plaatsvinden, zouden laboratoriummedewerkers slechts in het onwaarschijnlijke geval van een calamiteit direct of indirect in contact kunnen komen met vaccinvirus. De COGEM acht de kans dat medewerkers vervolgens ernstig ziek worden, zeer gering. Op grond van literatuurgegevens blijkt dat de virusstam A/PuertoRico/8/34 avirulent en sterk geattenuëerd is voor mensen (11). Bovendien leidt verwijdering van de polybasische klievingsplaats in het HA eiwit van het hoogpathogene H5N1 influenzavirus tot een sterke vermindering van de pathogeniteit. De Wereldgezondheidsorganisatie is van mening dat recombinante virussen niet pathogeen zijn als ze zijn samengesteld uit zes gensegmenten van A/PuertoRico/8/34, het NA gen van het H5N1 virus en het HA gen zonder de basische aminozuren van het H5N1 virus (11).

Gezien de genetische plasticiteit van de vaccinvirussen en het daarmee gepaard gaande aanpassingsvermogen, is de COGEM van mening dat, ondanks het verzwakte

karakter van de vaccinstammen, niet geheel uit te sluiten is dat het virus een (gelimiteerde) infectie, bijvoorbeeld aan de ogen, kan veroorzaken.

Wanneer een verzwakt influenza vaccinvirus in contact komt met een wild-type influenza virus, zou dit kunnen leiden tot een onderlinge uitwisseling van genoomsegmenten. Dit zou een pathogeen virus tot gevolg kunnen hebben (7). Alhoewel laboratoriummedewerkers gevaccineerd zijn tegen influenza, is het mogelijk dat zij toch drager zijn van wild-type influenza virus. Een griepvaccin is namelijk samengesteld uit HA en NA van influenza A en B stammen waarvan op basis van wereldwijde surveillancegegevens wordt verwacht dat ze zullen gaan circuleren in het betreffende seizoen. Het blijkt dat het vaccin 70-90% bescherming biedt (bij gezonde, immuuncompetente mensen jonger dan 65 jaar) wanneer de vaccinstammen goed overeenkomen met de circulerende stammen (12). Indien een ander virus circuleert dan waarop het vaccin gebaseerd is, is niet uit te sluiten dat een gevaccineerd persoon toch een influenzavirus bij zich draagt.

De mogelijkheid dat virussen genoomsegmenten uitwisselen, bestaat niet alleen bij medewerkers. Zij kunnen het vaccinvirus via de slijmvliezen van ogen, neus en keelholte passief meenemen en overdragen op andere personen in zijn omgeving.

De COGEM is van mening dat bij een eventuele uitwisseling van de bij de opschaling gebruikte vaccinstammen met een wild-type virus, de kans zeer klein is dat een gevaar voor de mens optreedt. In het ergste geval zullen de van oorsprong aviaire HA en NA segmenten terechtkomen in een humane virusstam. De COGEM verwacht niet dat een dergelijk virus hoog pathogeen zal zijn maar een toename van het replicatie- en transmissievermogen is niet geheel uit te sluiten. Dit zou mogelijk kunnen leiden tot lichte griepverschijnselen.

De COGEM wijst er op dat er een aantal maatregelen ter beschikking staan om mogelijke risico's verder te minimaliseren. Zo kan bij een calamiteit besloten worden om neuraminidase remmers, zoals Tamiflu®, beschikbaar te stellen aan betrokken de medewerkers. Wanneer het vermoeden bestaat dat een medewerker besmet is met recombinant virus kan een test, zoals PCR, uitsluitsel geven. Indien de test positief is, kan de medewerker gedurende de behandeling met neuraminidase remmers in sociaal isolement worden geplaatst. Ook de personen in de directe omgeving zouden geen griepverschijnselen mogen vertonen en zouden bij voorkeur ook neuraminidase remmers moeten innemen.

Inactivatie van vaccinvirus

Voordat het vaccin gereed is, wordt infectieus virus chemisch geïnactiveerd met beta-propiolacton (BPL). De aanvrager heeft experimentele data aangeleverd betreffende de inactivatie van enkele influenza virussen. Deze data hebben geen betrekking op de

gehanteerde virussen, maar de inactivatiemethode berust op het inactiveren van het RNA genoom van het virus. De methode is dus niet afhankelijk van het subtype van het virus. Daarom verwacht de COGEM dat de inactivatiemethode voor NIBRG-12 en -14 overeenkomstig is met de geteste influenzastammen. De aanvrager geeft aan dat de inactivatiemethode voor elk virustype gevalideerd moet worden. De COGEM stemt hiermee in en is verder van mening dat de werking van BPL goed te monitoren is en dat de inactivatiemethode, zoals beschreven door de aanvrager, goed gevalideerd is.

Conclusie

Concluderend stemt de COGEM in met het inschalingsvoorstel omdat de inrichtingsvoorschriften van een MI-III ruimte, alsmede de aanvullende voorschriften zoals gesteld door Bureau GGO, voldoende fysieke inperking geven om de veiligheid voor mens en milieu te waarborgen.

Referenties

1. Knipe, M. D. and Howley, P. M. (2001). *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
2. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). *Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses*. Academic Press, San Diego.
3. Brown, E. G. (2000). Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother* **54**, blz. 196-209.
4. Flint, S. J., Enquist, L. W., Racaniello, V. R., and Skalka, A. M. (2004). *Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis and Control*. ASM Press, Washington, D.C.
5. Lewis, D. B. (2006). Avian flu to human influenza. *Annu Rev Med* **57**, blz. 139-54
6. Taubenberger, J. K. (1998). Influenza virus hemagglutinin cleavage into HA1, HA2: no laughing matter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, blz. 9713-5.
7. World Health Organization. Internet: <http://www.who.int/en/> (21 februari 2006).
8. Riedel, S. (2006). Crossing the species barrier: the threat of an avian influenza pandemic. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* **19**, blz. 16-20
9. CGM/050201-01: Pathogeniteitstudies met recombinante Influenza A virussen.
10. Vrom; *Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen* (2004).
11. World Health Organization (WHO), Production of pilot lots of inactivated influenza vaccines from reassortants derived from avian influenza viruses. Interim biosafety risk assessment. (2003), no. WHO/CDS/CSR/RMD/2003.5
12. Landelijke Coördinatiestructuur Infectieziektenbestrijding, februari 2003. Internet: http://www.infectieziekten.info/bestanden/protocollen/Influenza_J10-11_protocol_03.pdf