

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 31 mei 2023
KENMERK CGM/230531-02
ONDERWERP Advies inschaling werkzaamheden gg-poliovirusvaccin in bioreactor

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende dossier IG 17-193_III-004 getiteld 'Genereren en produceren van wildtype en verzwakt poliovirus voor geïnactiveerd poliovaccin productie' afkomstig van Batavia Biosciences B.V., deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met een kleine 'Single-Use' bioreactor (<10 liter) voor het vervaardigen van genetisch gemodificeerde (gg-)poliovirussen op inperkingsniveau ML-III. De gg-poliovirussen die worden vervaardigd zijn verzwakte vaccinstammen; Sabin type 1, 2 en 3. In de onderhavige aanvraag vindt de gg-virusproductie plaats in een systeem dat gesloten is door buizen, flessen en zakken met elkaar te verbinden ('tube welding'), waardoor er geen aerosolen vrij kunnen komen. Als een extra veiligheidsmaatregel, vinden alle activiteiten plaats in een veiligheidskabinet van type II, met uitzondering van chromatografie-activiteiten. Voorafgaand aan de werkzaamheden worden er rooktesten uitgevoerd in het veiligheidskabinet, om te controleren of de aanwezigheid van de bioreactor de luchtstromen in het veiligheidskabinet niet negatief beïnvloedt. De afwezigheid van het veiligheidskabinet voor de chromatografie-activiteiten wordt ondervangen door het dragen van een beschermend pak en volgelaatsmasker door de werknemers. De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau ML-III, onder navolging van aanvullende voorschriften, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.



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. Y de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
- Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal

Inschaling van werkzaamheden met gg-poliovirusvaccins in een Single-Use Bioreactor

COGEM advies CGM/230531-02

1. Inleiding

De COGEM is n.a.v. een verzoek van Batavia Biosciences B.V., door Bureau ggo gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden voor de productie van genetisch gemodificeerde (gg-) poliovirusvaccins (IG 17-193_III-004). Batavia Biosciences is voornemens om geattenuerd gg-poliovirusvaccin Sabin type 1, 2 en 3 te produceren in een kleine (< 10 liter) 'Single-Use Bioreactor' (SUB) op inperkingsniveau ML-III. De COGEM is om advies gevraagd, omdat zij niet eerder heeft geadviseerd over werkzaamheden met een bioreactor op ML-III niveau i.c.m. replicatiecompetente gg-poliovirussen.

2. Poliovirus: poliomyelitis, verspreiding en vaccinatie

Het poliovirus, waarvan drie serotypen worden onderscheiden, behoort tot de soort *Enterovirus C*, het genus *Enterovirus* en de familie *Picornaviridae*.¹ Het virus heeft een enkelstrengs positief RNA genoom van ongeveer 7,5 kb.² Het poliovirus is de veroorzaker van de zeer besmettelijke ziekte poliomyelitis, ook wel polio genoemd, die het zenuwstelsel kan aantasten en verlamming kan veroorzaken.

Het poliovirus wordt primair verspreid via de fecale-orale route, bijvoorbeeld door het binnenkrijgen van met feces besmet water of voedsel. Gedurende een korte periode tijdens infectie kan virus met druppeltjes worden uitgehooft en is besmetting via de orale-orale route mogelijk.^{3,4}

Er zijn twee verschillende soorten vaccins beschikbaar tegen polio; het Sabin levend geattenuerd oraal poliovirus vaccin (OPV) en het Salk geïnactiveerde poliovirus vaccin (IPV).⁵ Het OPV is beschikbaar als trivalent (type 1, 2 en 3), bivalent (alleen type 1 en 3) en monovalent (één van de 3 virustypen) vaccin, en wordt oraal toegediend. Het IPV is een trivalent vaccin dat bescherming biedt tegen de drie typen poliovirus. In Nederland wordt met het IPV gevaccineerd.³

3. Voorgenomen werkzaamheden

De voorgenomen werkzaamheden richten zich op de productie van trivalent OPV: Sabin type 1, 2 en 3. De geattenuerde gg-poliovirussen worden vervaardigd d.m.v. transfectie van full-length RNA-transcripten in animale cellen. De verkregen gg-poliovirussen worden vervolgens vermeerderd in een bioreactor, en eventueel gezuiverd en/of geïnactiveerd.

3.1 Beschrijving van de bioreactor en productieprocessen

Er wordt gebruik gemaakt van een 'Single-Use Bioreactor' (SUB) met een werkvolume van 3,2 liter. Tijdens de 'upstream processing' (USP) wordt het geattenuerde gg-virus geproduceerd/vermeerderd in de bioreactor. Er wordt infectiemedium in de reactor gepompt. Het gg-virus wordt vervolgens toegevoegd aan de bioreactor, en wordt 'geoogst' door het continue doorpompen van het medium over een 'tangential flow filtration' (TFF) filter. Hierbij wordt een eindvolume van 3 liter in de 'harvest bottle' verwacht, met een maximum van 4 liter. Het systeem kan dus maximaal een volume van 7,2 liter

(werkvolume 3,2 liter en 4 liter geogst virus) bevatten. Als de productie van gg-virus compleet is, wordt de 'harvest bottle' afgesloten en overgedragen naar de 'downstream processing' (DSP). Tijdens de DSP wordt het virus in de 'harvest bottle' gezuiverd en geïnactiveerd. Zuivering gebeurt o.a. door het toevoegen van benzonase, het omlaag brengen van de pH, filtratie-stappen en 'cation exchange chromatography'. Voor de chromatografiestap wordt het geogste gg-virus overgebracht in een 'AKTA pilot' systeem. Het verkregen gezuiverde virus wordt geïnactiveerd m.b.v. 0.01% formaldehyde.

3.2 Beschrijving van de voorgenomen maatregelen

De voorgenomen werkzaamheden worden uitgevoerd in een ML-III faciliteit. Er is een ruimte waar uitsluitend met de SUB wordt gewerkt en een ruimte waar uitsluitend DSP-werkzaamheden worden uitgevoerd. De aanvrager heeft verschillende voorzorgsmaatregelen getroffen om mogelijke verspreiding van het gg-poliovirus naar het milieu te voorkomen, die maatregelen zijn hieronder toegelicht.

De integriteit van de bioreactorzak van de SUB wordt bepaald d.m.v. een drukttest en de luchtafvoer van de reactor is voorzien van hydrofobe filters. Het toevoegen van virus aan de bioreactor en het nemen van monsters gebeurt via een 'sterile connection device' (SCD) door een luchtfilter waarbij overdruk wordt toegepast. De SUB is in een klasse II veiligheidskabinet geplaatst. De SUB staat op een plaat die als lekbak functioneert, en dit staat in zijn geheel in het veiligheidskabinet dat zelf ook als lekbak functioneert. Alle USP-stappen vinden plaats in het veiligheidskabinet. Voorafgaand aan de werkzaamheden worden er rooktesten uitgevoerd in het veiligheidskabinet, om te verifiëren dat de SUB de luchtstromen van het veiligheidskabinet niet negatief beïnvloedt.

De DSP-stappen worden uitgevoerd in een gesloten systeem waarin de buizen, flessen en zakken met elkaar verbonden worden ('tube welding'). Bij de werkzaamheden wordt gebruikt gemaakt van een pomp en vloeistoffen onder druk, waarbij de druk gemonitord wordt met drukmeters. De concentratie- en filtratiestappen vinden plaats in een klasse II veiligheidskabinet. De AKTA pilot, voor de chromatografiestap, staat in een lekbak maar past niet in een veiligheidskabinet.

De medewerkers zullen persoonlijke bescherming dragen zoals handschoenen, apart schoeisel, veiligheidsbrillen en mondkapjes (type P3). Bij DSP-werkzaamheden, waaronder de chromatografie-activiteiten, wordt altijd met extra bescherming gewerkt: een Tyvek 800J pak en een Jupiter/Versaflo masker en filtratiesysteem. Tevens zijn alle werknemers gevaccineerd tegen poliomyelitis, waarbij de titer van antistoffen in het bloed is bepaald ter verificatie. Daarnaast zijn er, voor zowel DSP als USP, uitgebreide procedures opgesteld met instructies om bij een incident waarbij het gesloten systeem doorbroken wordt, verspreiding van gg-poliovirus te voorkomen.

4. Voorstel voor inschaling van werkzaamheden

De vergunningverlener stelt voor om de werkzaamheden plaats te laten vinden op inperkingsniveau 3 (ML-III) met inachtneming van de volgende aanvullende voorschriften:

- Medewerkers zijn gevaccineerd tegen poliomyelitis;
- Medewerkers dragen een mond- en neuskapje, P3, en een veiligheidsbril, zoals beschreven in de aanvraag;

- Volledig beschermende kleding en apart schoeisel wordt gedragen zoals beschreven in de aanvraag;
- Voor DSP activiteiten geldt tevens dat een volgelaatsmasker wordt gedragen;
- Activiteiten met de bioreactor vinden in een veiligheidskabinet van klasse II plaats conform de in de aanvraag beschreven procedures waardoor verspreiding wordt voorkomen;
- De integriteit van de zo volledig mogelijk geïnstalleerde bioreactor wordt door middel van een druktest zoals beschreven in de aanvraag aangetoond alvorens de ggo's aan het systeem worden toegevoegd;
- De bemonstering van de bioreactor, de toevoeging van materiaal aan de bioreactor en de overdracht van materiaal naar een ander systeem geschiedt zoals beschreven in de aanvraag;
- In de luchtafvoerleiding van de bioreactor is een hydrofoob absoluut-filter aanwezig;
- Een voorziening voor de opvang en inactivering van de totale inhoud van het gesloten systeem is aanwezig.

5. Eerder COGEM advies

Mede gezien de wereldwijde bestrijding van het poliovirus heeft de COGEM het poliovirus type 1, 2 en 3 in pathogeniteitsklasse 3 geplaatst.^{6,7}

De COGEM heeft verschillende keren geadviseerd over grootschalige productie in SUB's op MI-III inperkingsniveau,^{e.g.,8,9,10,11} en op MI-I.^{12,13,14} Tevens heeft de COGEM in 2016 onderzoek laten uitvoeren naar de kweek van ggo's in SUB's.¹⁵ N.a.v. dit onderzoeksrapport heeft de COGEM o.a. geadviseerd om voorafgaand aan de werkzaamheden de integriteit van de bioreactorzak door middel van een *medium hold test* te controleren.¹⁶ Er zijn namelijk aanwijzingen dat een druktest, die soms wordt uitgevoerd, met name voor grotere SUB's niet accuraat is.¹⁵ Uit het rapport blijkt ook dat als nadeel van een *medium hold test* kleine lekkages (*pinholes*) over het hoofd kunnen worden gezien, waaruit aerosolen mogelijk kunnen verspreiden, waardoor een tweede lijn van inperking nodig is.

6. Overweging

In de onderhavige aanvraag is de aanvrager voornemens om geattenuerd gg-poliovirusvaccin Sabin type 1, 2 en 3 te produceren in een kleine bioreactor (< 10 liter) op inperkingsniveau 3 (ML-III). Voor de overweging van de inschaling van werkzaamheden spelen verschillende aspecten een rol, die hieronder zullen worden behandeld.

6.1 Opzet en validatie van het systeem

6.1.1 Opstelling van de bioreactor in veiligheidskabinet

In de onderhavige aanvraag zijn beide productieprocessen, zowel USP als DSP, beschreven als een gesloten systeem. Dit systeem is gesloten door buizen, flessen en zakken met elkaar te verbinden ('tube welding'), waardoor er geen aerosolen vrij kunnen komen. De overgang tussen de processen vindt plaats door de 'harvest bottle' af te sluiten van de SUB en over te dragen naar de DSP. Als extra veiligheidsmaatregel, vinden alle activiteiten plaats in een veiligheidskabinet van type II, met uitzondering van de chromatografie-activiteiten. Voorafgaand aan de werkzaamheden worden er

rooktesten uitgevoerd in het veiligheidskabinet, om te verifiëren dat de SUB de luchtstromen van het veiligheidskabinet niet negatief beïnvloedt. Hierbij gaat de COGEM er van uit dat de rooktest uitgevoerd wordt wanneer de SUB in het veiligheidskabinet is geplaatst en dat het uitvoeren van de werkzaamheden de luchtstromen niet negatief beïnvloedt.

De COGEM is van oordeel dat het plaatsen van de SUB en uitvoeren van de activiteiten in een geverifieerd veiligheidskabinet, verspreiding van eventuele aerosolen afdoende voorkomt.

6.1.2 Integriteit van de bioreactorzak

De integriteit van de bioreactorzak zal voorafgaand aan de werkzaamheden worden gecontroleerd door middel van een druktest. Bovendien zal de bioreactorzak eerst gevuld worden met infectiemedium en cellen, voordat het virus wordt toegevoegd. Hierbij kan een eventueel defect mogelijk worden opgemerkt. De COGEM heeft in het verleden geadviseerd om een *medium hold test* uit te voeren om de integriteit van de SUB vast te stellen, omdat een druktest met name voor grote SUB's niet accuraat zou zijn. De COGEM is van oordeel dat aangezien er sprake is van een kleine SUB (< 10 liter) in een veiligheidskabinet, in dit geval een druktest volstaat.

6.2 Incidenten

De aanvrager heeft aangegeven ervaring te hebben met deze SUB voor de productie van virussen op inperkingsniveau 2 (ML-II). In het gesloten systeem zouden eventuele lekkages op kunnen treden bij monsternamen of bij foutieve aansluitingen van buizen, flessen en zakken ('tube welding'). De 'welder' die wordt gebruikt bij het maken van de aansluitingen, wordt goed gecontroleerd. Daarnaast is er een protocol opgesteld waarmee bij een eventuele lekkage de verspreiding van het virus wordt voorkomen. Tevens is de SUB in een lekbak geplaatst, en staat dit in zijn geheel in het veiligheidskabinet dat ook als lekbak functioneert. De aanvrager heeft risicoanalyses uitgevoerd en stapsgewijze procedures opgesteld om incidenten zoals lekkages, te verhelpen.

De COGEM is van oordeel dat de instructies en maatregelen van de opgestelde procedures afdoende zijn om verspreiding naar het milieu te voorkomen.

6.3 Blootstelling medewerkers en mogelijke uitsleep

Indien een medewerker onverhoopt wordt blootgesteld aan gg-poliovirus, kan het virus zich mogelijk verspreiden in het milieu. In de aanvraag is aangegeven dat medewerkers om blootstelling te voorkomen tijdens werkzaamheden handschoenen, apart schoeisel, veiligheidsbrillen en mondkapjes dragen. In het geval van DSP-werkzaamheden dragen de werknemers extra bescherming, in de vorm van een Tyvek 800J pak en een Jupiter/Versaflo masker en filtratiesysteem. Deze extra bescherming bij de DSP-werkzaamheden is van belang omdat er gebruik wordt gemaakt van een pomp en vloeistoffen onder druk, en de AKTA pilot buiten een veiligheidskabinet staat opgesteld.

De COGEM is van oordeel dat de beschermende middelen, zoals beschreven door de aanvrager, afdoende zijn om blootstelling van de medewerker aan het gg-virus en daarmee mogelijke verspreiding in het milieu, te voorkomen.

De COGEM merkt tevens op dat in de aanvraag staat aangegeven dat werknemers gevaccineerd dienen te zijn tegen poliomyelitis, waarbij de titer is bepaald ter verificatie. Deze verificatie is niet overgenomen in het voorstel voor inschaling. De COGEM acht deze verificatiestap noodzakelijk.

7. Advies

De aanvrager verzoekt om productiewerkzaamheden met gg-poliovirusvaccin (Sabin type 1, 2, en 3) in een kleine bioreactor uit te mogen voeren op inperkingsniveau 3 (ML-III), waarbij aanvullende maatregelen worden voorgesteld. De COGEM kan instemmen met het uitvoeren van de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau 3 (ML-III) met inachtneming van aanvullende voorschriften. Hierbij is een enkele aanvulling op de aanvullende voorschriften in het voorstel voor inschaling van toepassing; deze zijn onderstreept:

- Medewerkers zijn gevaccineerd tegen poliomyelitis; en worden ter verificatie gecontroleerd op titer tegen elk van de gebruikte serotypen;
- Medewerkers dragen een P3 mond- en neusmasker, en een veiligheidsbril, zoals beschreven in de aanvraag;
- Volledig beschermende kleding en apart schoeisel wordt gedragen zoals beschreven in de aanvraag;
- Voor DSP activiteiten geldt dat een volgelaatsmasker wordt gedragen;
- Activiteiten met de bioreactor vinden in een veiligheidskabinet van klasse II plaats conform de in de aanvraag beschreven procedures waardoor verspreiding wordt voorkomen;
- De integriteit van de zo volledig mogelijk geïnstalleerde bioreactor wordt door middel van een druktest zoals beschreven in de aanvraag, aangetoond alvorens de ggo's aan het systeem worden toegevoegd;
- De bemonstering van de bioreactor, de toevoeging van materiaal aan de bioreactor en de overdracht van materiaal naar een ander systeem geschiedt zoals beschreven in de aanvraag;
- In de luchtafvoerleiding van de bioreactor is een hydrofoob absoluut-filter aanwezig;
- Een voorziening voor de opvang en inactivering van de totale inhoud van het gesloten systeem is aanwezig.

De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op inperkingsniveau ML-III, onder navolging van de hierboven genoemde aanvullende voorschriften, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

8. Additionele opmerking

De aanvrager heeft aan de hand van risicoanalyses procedures opgesteld om incidenten, zoals lekkages, te verhelpen. De COGEM raadt de vergunningaanvrager aan om de procedures om lekkages op een veilige manier op te ruimen door de werknemers te laten oefenen, teneinde het risico op uitsleep van gg-virus te minimaliseren.

Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2020). ICTV Virus Taxonomy: 2020 Release. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezoekt: 25 mei 2023)
2. Racaniello VR (2006). One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Viol.* 344: 9-16
3. Landelijke Coördinatie Infectieziektebestrijding. Richtlijnen Polio. <https://lci.rivm.nl/richtlijnen/polio> (bezoekt: 25 mei 2023)
4. Ghendon Y & Robertson SE (1994). Interrupting the transmission of wild polioviruses with vaccines: immunological considerations. *Bull. World Health Organ.* 72: 973–983
5. Bandyopadhyay AS *et al.* (2015). Polio vaccination: past, present and future. *Future Microbiol.* 10: 791-808
6. COGEM (2017). Herziening pathogeniteitsclassificatie poliovirus. COGEM advies CGM/170511-01
7. COGEM (2021). Herziening pathogeniteitsclassificatie van de poliovirus typen 1 en 3. COGEM advies CGM/210916-01
8. COGEM (2010). Grootschalige kweek van genetisch gemodificeerde dierlijke cellen in een Single-Use bioreactor. COGEM advies CGM/101028-03
9. COGEM (2011). Eiwitproductie in een Single-Use Bioreactor met behulp van baculovirusexpressie-systeem. COGEM advies CGM/111128-02
10. COGEM (2015). Grootschalige kweek van genetisch gemodificeerde dierlijke cellen in de 'Single-Use Bioreactor Sartorius STR'. COGEM advies CGM/150907-01
11. COGEM (2016). Grootschalige productie van genetisch gemodificeerde adenovirale vectoren in een 'Single-Use Bioreactor'. COGEM advies CGM/160607-02
12. COGEM (2011). Grootschalige productie van monoklonale antilichamen met behulp van PER.C6 cellen in een kweekstelsel voor eenmalig gebruik. COGEM advies CGM/110503-01
13. COGEM (2011). Commerciële productie van genetisch gemodificeerde dierlijke cellen in een Single Use Bioreactor onder MI-I condities. COGEM advies CGM/110110-02
14. COGEM (2020). Omlaagschaling van grootschalige productiewerkzaamheden met gg-CHO cellen in een Single Use Bioreactor (SUB). COGEM advies CGM/200918-01
15. Zijlstra G. *et al.* (2016). Updated GMO containment risk evaluation of Single-Use Bioreactors. COGEM report CGM/2016-04
16. COGEM (2016). Aanbiedingsbrief bij onderzoeksrapport 'Updated GMO containment risk evaluation of Single-Use Bioreactors'. COGEM aanbiedingsbrief CGM/160630-03