



COMMISSIE
COGEM

GENETISCHE
MODIFICATIE

BEZOEKADRES:
A. VAN LEEUWENHOEKLAAN 9
3721 MA BILTHOVEN

POSTADRES:
POSTBUS 578
3720 AN BILTHOVEN

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
dhr. J.J. Atsma
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

TEL.: 030 274 2777
FAX: 030 274 4476
INFO@COGEM.NET
WWW.COGEM.NET

DATUM 22 december 2011
KENMERK CGM/111222-02
ONDERWERP Advies: Klinische studie met een *Semliki forest virus* vaccin tegen
baarmoederhalskanker

Geachte heer Atsma,


Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM 11-002 met de titel 'Cancer immunotherapy of human papillomavirus-induced (pre)-malignant lesion using replication-incompetent Semliki Forest Virus replicon particles encoding human papillomavirus antigens' van het Universitair Medisch Centrum Groningen, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is verzocht te adviseren over een klinische studie fase I en II waarbij patiënten met premaligne laesies van de cervix behandeld zullen worden met een therapeutisch vaccin, dat codeert voor eiwitten van het *Humaan papillomavirus* (HPV) en dat na toediening een immuunrespons zal induceren. Het vaccin is gebaseerd op het *Semliki forest virus* (SFV).

Risico's die bij deze studie op kunnen treden hebben betrekking op de eventuele vorming en de verspreiding van replicatiecompetent virus (RCV). De COGEM acht de kans op het ontstaan van RCV door recombinatie tijdens productie van de virale vector, mede door de onwaarschijnlijkheid dat recombinatie en terugmutatie tot een volledig replicatiecompetent virus zullen leiden, verwaarloosbaar klein. De vectorbatch wordt door de aanvragers geproduceerd en gecontroleerd. Hoewel de COGEM van mening is dat de berekende kans verwaarloosbaar klein is dat de vectorbatch RCV zal bevatten, acht zij een gevalideerde test op de virusbatches noodzakelijk om dit in de praktijk te bevestigen. De aanvrager toont echter geen gegevens waaruit blijkt dat de gevoeligheid van de door de aanvrager uitgevoerde test wordt bereikt. Hierdoor ontbreekt de onderbouwing en kan de COGEM niet verifiëren dat de vectorbatch vrij is van RCV.

Op basis van de bovenstaande gegevens adviseert de COGEM in dit geval positief over de voorgenomen klinische studie fase I en II, mits de gegevens voor validatie van de test op RCV in de virusbatches ter verificatie aan de vergunningverlener kunnen worden overlegd.



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

Hoogachtend,

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

c.c.

Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM lid prof. dr. G.A.P. Hospers niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Klinische studie met een *Semliki forest virus* vaccin tegen baarmoederhalskanker

COGEM advies CGM/111222-02

Inleiding

De vergunningaanvraag betreft een klinische studie fase I en II met een therapeutisch vaccin gericht tegen wefelselafwijkingen (laesies) veroorzaakt door *Humaan papillomavirus* infectie. Voor het vaccin wordt een vector gebruikt die is gebaseerd op het *Semliki forest virus* (SFV). De viruspartikels bevat een fusie van twee genen van het *Humaan papillomavirus* (HPV) die voor de E6 en E7 HPV eiwitten coderen. Na vaccinatie komt dit fusie-gen tot expressie en induceert het een therapeutische immuunrespons waardoor HPV-geïnduceerde kankercellen door het immuunsysteem opgeruimd worden. Het vaccin zal gebruikt worden bij patiënten met het tweede en derde voorstadium van baarmoederhalskanker (cervicale intra-epitheliale neoplasie (CIN) II en III). Deze voorstadia worden gekenmerkt door premaligne laesies in de cervix (baarmoederhals). Het derde voorstadium kan in baarmoederhalskanker overgaan.

Het doel van de studie is om het vaccin te testen in patiënten en te bekijken of immunisatie fungeert als behandeling van HPV-geïnduceerde laesies. In de fase I studie wordt de veilige dosis met immunologische activiteit van het vaccin bepaald. In de fase II studie wordt daarna de effectiviteit van het vaccin getest.

Baarmoederhalskanker

HPV is een belangrijke oorzaak van wefelselafwijkingen en van tumoren van de cervix (baarmoederhals). Wereldwijd zijn tumoren veroorzaakt door HPV de op één na grootste oorzaak van sterfte door kanker in vrouwen. De kans dat een vrouw een infectie met een hoog-risico variant van HPV oploopt is groter dan 80%.¹ Veelal verlopen deze infecties zonder symptomen. In 20% van de gevallen leidt een doorgaans langdurige infectie tot CIN laesies van de cervix. Van deze premaligne laesies ontwikkelt minder dan 5% zich zonder ingrijpen tot baarmoederhalskanker.²

De huidige voorkeursbehandeling van CIN II en III premaligne laesies van de cervix door langdurige HPV infectie bestaat uit het verwijderen van het oppervlakteweefsel op de overgang tussen de baarmoederhals en baarmoedermond (lisexcisie).¹ Daarnaast wordt exconisatie toegepast, waarbij zowel oppervlakte- als dieperliggend weefsel wordt verwijderd. Dit leidt doorgaans tot een vernauwing van de baarmoederhals. Bij de constatering van baarmoederhalskanker kan overgegaan worden tot operatie en bestraling, waarbij het verwijderen van (delen van) de voortplantingsorganen mogelijk nodig is. Problemen rond zwangerschap en andere complicaties kunnen voorkomen bij de behandeling van baarmoederhalskanker, maar spelen nauwelijks bij lisexcisie van premaligne laesies.³

De virale vector

De aanvrager maakt voor de studie gebruik van een virale vector gebaseerd op het *Semliki forest virus* (SFV). De virusdeeltjes van SFV zijn omgeven door een membraan en bevatten een positief enkelstrengs RNA molecuul als genoom. Een SFV virusdeeltje is opgebouwd uit vier structurele eiwitten, C, E1, E2 en E3 en een membraan. Het C-eiwit vormt een capsid rond het virale genoom. De eiwitten E1, E2 en E3 zijn aanwezig in het membraan van het virusdeeltje.^{4,5,6} E1 en E2 zijn beide membraanglycoproteïnen en vormen samen met E3 een heterotrimeer.⁷ Het complex vormt de zogenaamde ‘spike’ op het virusoppervlak en is verantwoordelijk voor de binding van SFV aan het celmembraan van doelwitcellen. De non-structurele eiwitten nsP1-4 zorgen voor transcriptie en replicatie van het virale RNA.

Voor productie van de virale vector worden drie plasmiden gebruikt. In het plasmide coderend voor de SFV vector zijn de genen voor de vier structurele eiwitten verwijderd en vervangen door het fusie-gen afkomstig van HPV. De structurele eiwitten zijn gecodeerd op twee aparte helperplasmiden. De virale sequenties zijn geplaatst achter de SP6 promotor. De helperplasmiden worden elk *in vitro* afgeschreven tot RNA moleculen, die worden gebruikt voor transfectie van animale Vero cellen. Zowel de helper-RNA moleculen als het recombinante SFV vector RNA bevatten de 5’ en 3’ genomische sequenties noodzakelijk voor replicatie, maar het packagingsignaal is niet aanwezig in de helper-RNA moleculen. Na transfectie worden de helper-RNAs in de cel gebruikt voor transcriptie en replicatie, maar ze worden niet opgenomen in het virusdeeltje zoals het recombinante SFV vector RNA. De resulterende virale vectordeeltjes zijn in staat om de cellen van de gevaccineerde patiënten te infecteren. Hierna kunnen door de deletie van de structurele genen geen nieuwe virusdeeltjes geproduceerd worden. Hoewel de recombinante SFV vectoren nog wel in staat zijn tot RNA replicatie, kunnen deze zich niet verder verspreiden omdat er geen virusdeeltjes gevormd kunnen worden. Daarom zal de virale vector in het verdere advies als ‘replicatiedeficiënt’ worden aangemerkt in navolging van gangbare literatuur.

Daarnaast is in het capsidegen het codon van één aminozuur veranderd, waardoor de protease-activiteit van het capsid-eiwit is verwijderd. In de virale levenscyclus is het protease verantwoordelijk voor de splitsing van het gemeenschappelijke polyproteïne in capsid- en membraaneiwitten. Het protease is niet nodig in het productiesysteem omdat de capsid- en membraangenen gescheiden zijn op verschillende plasmiden. Ook zorgt de mutatie ervoor dat in geval van recombinatie van de structurele genen met het recombinante SFV genoom het resulterende virus nog steeds replicatiedeficiënt is.

De virale vector brengt het HPV fusie-gen tot expressie in geïnfecteerde cellen van de patiënt. Het transgen in de vector is een fusie van de E6 en E7 genen afkomstig van HPV type 16. HPV-16 is een hoog-risico HPV variant die bij langdurige infectie tot kanker kan leiden. E6 en E7 zijn virale oncogenen en inactiveren de celcycluscontrolerende cellulaire eiwitten p53 en pRb. Integratie van de E6 en E7 genen in het genoom van de gastheercel verhoogt de kans dat de cel in een kankercel verandert (cellulaire transformatie). In de virale vector zijn E6 en E7 aanwezig als fusie-eiwit, waardoor de functionaliteit van de eiwitten volgens de aanvrager is verminderd. De aanvrager

meldt dat in (niet-gepubliceerde) experimenten waarbij het E6/E7 fusie-eiwit door middel van een retrovirale vector in het DNA van humane keratinocyten werd geïntegreerd, hij kon aantonen dat de proliferatie van deze cellen sterk verminderd was ten opzichte van het effect van ongefuseerde E6 en E7. Na injectie van de virale vector zal de aanwezigheid van het E6/E7 fusie-eiwit in cellen van de patiënt een immuunrespons induceren, die zich ook zal richten op de HPV-geïnduceerde laesies in de cervix van de patiënt.

Het E6/E7 fusie-gen is op de plek van de structurele genen in het SFV genoom ingebouwd, voorafgegaan door een autoprotease van het *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV). Het 17 aminozuren lange autoprotease klieft het E6/E7 fusie-eiwit los van de translatie-enhancer, zodat het correct tot expressie komt.

De SFV vector bevat dus additionele sequenties afkomstig van HPV en FMDV. Hieronder worden SFV, HPV en FMDV kort besproken.

Semliki forest virus

SFV is een positief enkelstrengs RNA virus dat behoort tot het *Alphavirus* genus van de *Togaviridae* familie.⁴ In tegenstelling tot de meeste andere togavirussen wordt SFV beschouwd als weinig gevaarlijk voor mensen. Het virus heeft een breed gastheerbereik, waaronder vogels, zoogdieren en insecten. SFV wordt overgebracht door muggen en kan via deze vector ook mensen infecteren. De infectie resulteert in een subklinisch, mild ziektebeeld met onder andere koorts en hoofdpijn als kenmerken. In paarden, muizen, ratten, hamsters en cavia's veroorzaakt SFV encephalitis. Het ziektebeeld is afhankelijk van de leeftijd van het dier, de route van inoculatie en de virulentie van de specifieke SFV stam.⁸ SFV kan veel verschillende celtypen infecteren, waarbij geïnfecteerde cellen afsterven.

SFV is in Nederland ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.⁹ Ook volgens de Europese ARBO wetgeving is SFV een pathogeniteitsklasse 2 virus.¹⁰

Humaan papillomavirus

HPV is een dubbelstrengs DNA virus in het *Alphapapillomavirus* genus van de familie *Papillomaviridae*. HPV virussen infecteren vooral slijmvliezen in de mond- en keelholte of rond de anus en genitaliën van de mens en andere primaten. HPV type 16 wordt beschouwd als een hoog-risico virus binnen de papillomavirussen vanwege de mate waarin met HPV-16 geïnfecteerde cellen transformeren tot kankercellen. Het virus kan zeer lang in geïnfecteerde cellen aanwezig blijven als een circulair viraal DNA molecuul.

HPV wordt volgens de Europese ARBO wetgeving ingedeeld als pathogeniteitsklasse 2 virus.¹⁰ De Belgische Adviesraad schaaft HPV ook op pathogeniteitsklasse 2 in.¹¹

Foot-and-mouth disease virus

FMDV is een positief enkelstrengs RNA virus in het *Aphthovirus* genus van de familie *Picornaviridae*. Het virus is een van de meest besmettelijke diervirussen en is door de COGEM ingedeeld in de hoogste dierpathogeniteitsklasse.¹² FMDV infecteert herkauwers en varkens en kan via zowel indirect als direct contact overgedragen worden. Het ziektebeeld kan zeer ernstig

zijn en bestaan uit blaarvorming in de mondholte en aan de hoeven, uiers of snuiten. Jonge dieren kunnen aan de infectie sterven.

Voorgenomen werkzaamheden

De productie en controle van het vaccin zal door de aanvrager zelf uitgevoerd worden. Deze werkzaamheden vallen niet onder de huidige vergunningsaanvraag voor een introductie in het milieu.

Het vaccin zal gebruikt worden in patiënten met CIN II of III premaligne laesies van de cervix. De patiënten in de fase I klinische studie zullen twee maal intramusculair geïnjecteerd worden met een interval van drie weken. De dosis bedraagt hierbij minimaal 5×10^5 en maximaal 5×10^8 infectieuze units. Bij de klinische studie fase II wordt eerst op dezelfde wijze tweemaal een dosis van maximaal 5×10^8 infectieuze units toegediend. Tot een jaar hierna kan nog een derde of vierde injectie worden toegediend. Volgens de vergunning kunnen maximaal 1000 patiënten worden behandeld, maar in eerste instantie zullen er 18 patiënten nodig zijn voor de fase I studie en 17 patiënten voor de fase II studie.

De patiënten zullen worden gevaccineerd in de polikliniek. Het preparaat van het vaccin zal ter plaatse in een veiligheidskabinet plaatsvinden. Door middel van intramusculaire injectie wordt het vaccin toegediend. De injectieplaats wordt ontsmet met 70% alcohol en 24 uur lang bedekt met een pleister. De patiënt wordt hierna nog vier uur gemonitord en mag dan naar huis. Monsters worden op latere tijdstippen genomen en behandeld als ggo-materiaal. De analyse van de genomen monsters zal in het laboratorium gebeuren en valt niet onder de huidige vergunningsaanvraag.

Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in 2003 een advies uitgebracht voor ingeperkt gebruik van rhesusapen gevaccineerd tegen HIV-1 met een vector gebaseerd op SFV.¹³ Voor de productie van deze vector werd hetzelfde systeem gebruikt als in de huidige vergunningaanvraag. Om een replicatiecompetent virus (RCV) te vormen moeten twee recombinaties plaatsvinden en een terugmutatie. De COGEM achtte de kans op het ontstaan van RCV op deze wijze tijdens de productie zeer onwaarschijnlijk. Omdat rhesusapen geen natuurlijk reservoir zijn voor SFV en de mug die als vector fungeert voor SFV niet in Nederland voorkomt, concludeerde de COGEM dat de kans verwaarloosbaar klein is dat er replicatiecompetente virussen ontstaan door recombinatie met alphavirussen na vaccinatie van de apen. Terugplaatsing van de apen naar D-I niveau kon plaatsvinden indien de test op virusdeeltjes negatief bleek.

In 2007 heeft de COGEM geadviseerd over een SFV vector systeem dat geproduceerd werd door middel van twee plasmiden.¹⁴ De structurele eiwitten werden gecodeerd op één helperplasmide. Als extra veiligheidsmaatregel kon de gezamenlijke precursor voor de structurele eiwitten E2 en E3 slechts door een behandeling met chymotrypsine resulteren in de functionele eiwitten. De COGEM achtte de kans op replicatiecompetent SFV bij gebruik van dit systeem zeer klein.

Overweging

In de onderhavige aanvraag worden SFV virusdeeltjes met HPV genen toegediend aan patiënten met cervicale weefselafwijkingen. Risico's die hierbij kunnen optreden hebben betrekking op de eventuele vorming en de verspreiding van replicatiecompetent virus en effecten van de mogelijke verspreiding van de vector in het milieu, zoals transformatie van geïnfecteerde cellen door de HPV eiwitten E6 en E7 tot kankercellen.

De eventuele vorming en de verspreiding van replicatiecompetent virus

Vorming van RCV tijdens productieproces

Het productiesysteem maakt gebruik van drie plasmiden; één voor het recombinante SFV genoom en twee voor respectievelijk de capsid- en membraangenomen. De virale sequenties zijn onder de controle van de SP6 promotor geplaatst. De plasmiden worden elk apart *in vitro* afgeschreven tot RNA. Hierna wordt het RNA getransfecteerd in animale cellen. De aanvrager heeft niet expliciet aangegeven of en hoe het plasmide DNA wordt verwijderd uit het gesynthetiseerde RNA. Echter, door het ontbreken van het SP6 polymerase in animale cellen kunnen de waardoor de vector sequenties niet worden afgelezen.

Tijdens productie van de virale partikels worden de drie RNA moleculen afgelezen en gerepliceerd, waardoor de kans op RNA recombinatie aanwezig is. Er zijn in principe twee verschillende recombinatiestappen nodig om de nsP1-4, C en E sequenties van SFV te combineren. Het capsid-protease zou in dat geval echter nog gemuteerd zijn, zodat het capsid eiwit niet afgesplitst kan worden van de overige structurele membraaneiwitten E1, E2 en E3.

De aanvrager geeft een berekening voor de theoretische frequentie van het ontstaan van replicatiecompetent SFV door middel van een dubbele RNA recombinatie en herstel van de protease mutatie. Recombinatie tussen twee RNA moleculen vindt met een frequentie van 1 op de 10^6 plaats. Aangezien er een dubbele recombinatie plaats moet vinden, zou de frequentie hiervan $10^{-6} \times 10^{-6} = 10^{-12}$ zijn. In een test op de aanwezigheid van RCV in het betreffende SFV productiesysteem met twee helperplasmiden werden door Smerdou en Liljeström (1999) geen 'plaque-forming units' (PFU) gevonden in een 'plaque-forming assay' met $4,6 \times 10^9$ virusdeeltjes.¹⁵ Dit betekent dat de frequentie van de vorming van replicatiecompetent virus tijdens vectorproductie lager was dan $4,6 \times 10^9$. De geschatte frequentie op basis van experimenten van herstel van de protease mutatie is $4,2 \times 10^{-5}$.¹⁵ Gecombineerd met de experimenteel geobserveerde RNA recombinatie frequentie van minder dan $4,6 \times 10^{-9}$ komt men uit op een frequentie voor het ontstaan van RCV tijdens vectorproductie van maximaal $(4,2 \times 10^{-5}) \times (4,6 \times 10^{-9}) = 1,9 \times 10^{-13}$ replicatiecompetente virusdeeltjes per vector deeltje.

Uit het bovenstaande kan de COGEM concluderen dat de kans op het ontstaan van RCV tijdens de productie van de virale vector verwaarloosbaar klein is.

Test op afwezigheid van RCV in de vectorbatch

In het productieproces worden verschillende algemene kwaliteitscontroles uitgevoerd. Hiervoor wordt onder andere de 'master cell bank' van Vero cellen, getransfecteerd met de drie RNA moleculen, getest op virale besmettingen. Hierbij zal niet specifiek naar alphavirussen gekeken

worden. Indien de master cell bank door een alphavirus geïnfecteerd zou zijn, zou dit snel opgemerkt worden doordat de groei van de cellijn stagneert. Omdat alphavirusinfecties tot celdood leiden, zal de celcultuur afsterven. Een test op de aanwezigheid van alphavirusinfecties bij de Vero cellen is daarom volgens de COGEM niet nodig.

De eerste drie batches worden uit voorzorg getest op replicatie-competent virus in een 'plaque-forming assay'. De detectiegrens is één 'plaque-forming unit' (PFU) per humane dosis (maximum 5×10^8 infectieuze units of PFU's). Als positieve controle wordt aan het vaccin replicatiecompetent SFV toegevoegd. De aanvrager toont geen gegevens waaruit blijkt dat de 'plaque-forming assay' de gevoeligheid van minder dan 1 SFV per 5×10^8 infectieuze units haalt. De hoeveelheid replicatiecompetent SFV in de positieve controle is niet vermeld. Ook is niet duidelijk wat de exacte criteria zijn waarop een batch goed of afgekeurd wordt na de verschillende controles.

In Nederland is het de eerste keer dat er een klinische studie wordt uitgevoerd met een vaccin gebaseerd op SFV. De COGEM acht een gevalideerde test op replicatiecompetent SFV noodzakelijk voordat de vectorbatch in patiënten wordt toegepast om experimenteel te bevestigen dat er geen RCV kan ontstaan tijdens productie van het ggo door de aanvrager. Gegevens over de validatie voor de voorgestelde test ontbreken in de aanvraag en daarom kan de COGEM niet op basis van praktijkgegevens verifiëren of de vectorbatch, zoals hierboven is uitgerekend, vrij is van RCV.

Vorming van RCV in patiënt

Na toediening van de virale vector zouden wildtype alphavirussen mogelijk met de toegediende SFV vector in de patiënt kunnen recombineren. Dit zou in theorie kunnen leiden tot een recombinant replicatiecompetent SFV virus met daarin HPV sequenties. Dit is echter een zeer onwaarschijnlijk scenario, omdat recombinatie in het meest waarschijnlijke geval zal leiden tot een SFV sterk gelijkend op wildtype SFV. Beide virussen (virale vector en wildtype alphavirus) moeten hiervoor op een manier in de cel aanwezig zijn die recombinatie faciliteert, bijvoorbeeld beide als RNA molecuul. Echter, de kans dat een alphavirus voorkomt in een patiënt is zeer klein, omdat humane alphavirusinfecties in Europa niet tot nauwelijks voorkomen. Daarnaast worden de viruspartikels lokaal via intramusculaire injectie toegediend en verspreiden ze beperkt door het lichaam. Het celtropisme van het SFV is volgens de aanvragers gelijk gebleven met de toevoeging van het E6/E7 fusie-eiwit. De COGEM acht de kans op dubbelinfectie van de virale vector en wildtype alphavirus, en daarmee vorming van RCV in de patiënt, om deze redenen, verwaarloosbaar klein.

Effecten van de mogelijke verspreiding van de vector in het milieu

Verspreiding van de vector naar een derde persoon

Tijdens de toediening en bij de afname van monsters is de kans aanwezig dat het ggo vrijkomt en zich verspreidt in het milieu. Gezien de experimentele resultaten van Colmenero *et al.* (2001) zal verspreiding beperkt blijven.¹⁶ De verspreiding van 2×10^7 infectieuze units van rSFV-LacZ in muizen na intramusculaire injectie bleef beperkt tot de plaats van injectie, de lymfeknopen en in

twee van de vier gevallen de milt en het hart. Shedding van het ggo via speeksel, urine of feces zou een productieve infectie vereisen. Echter, de vector kan zich na infectie van cellen niet verder verspreiden, omdat de cellen geen nieuwe virusdeeltjes kunnen aanmaken.

Het toegediende ggo kan zich wel verspreiden via de injectieplaats en mogelijk de behandelaar bereiken. In het theoretische geval dat het ggo cellen van de behandelaar bereikt en ook infecteert, kan het ggo niet tot een tweede ronde van infectie leiden. De gevolgen van expressie van de HPV transgenen in een derde persoon zijn beperkt tot een immuunreactie tegen het HPV E6/E7 fusie-eiwit. Een replicatiecompetent SFV dat een derde persoon infecteert, zou een milde ziekte veroorzaken.

De hygiënische maatregelen getroffen door de aanvrager minimaliseren de kans op verspreiding. De injectieplaats wordt met 70% alcohol gedept en afgedekt met een pleister. Deze desinfectiemethode is geschikt om een virus met een membraan zoals SFV te inactiveren. Volgens de COGEM is het risico van verspreiding van het ggo verwaarloosbaar klein.

Transformatie van geïnfecteerde cellen door de HPV eiwitten E6 en E7 tot kankercellen

E6 en E7 zijn de virale oncogenen van HPV type 16. Het fusie-gen E6/E7 zoals dat in de virale vector tot expressie komt, is volgens de aanvrager geattenuëerd. Het fusie-eiwit is minder in staat tot transformatie van geïnfecteerde cellen tot kankercellen zoals dit bij een wildtype HPV-infectie zou gebeuren. De aanvragers melden dat zij dit experimenteel hebben aangetoond, door de E6/E7 fusie met ongefuseerde E6 en E7 genen te vergelijken in humane keratinocyten. Retrovirale integratie van de E6/E7 fusie had minder proliferatie van de keratinocyten tot gevolg. Integratie van de E6 en E7 genen in het genoom van de gastheercel verhoogt de kans op cellulaire transformatie. Echter, integratie in het genoom is vanwege het RNA karakter van de vector zeer onwaarschijnlijk. Hier is omgekeerde transcriptie van E6/E7 RNA tot DNA voor nodig, gevolgd door integratie van E6/E7 DNA in het cellulaire DNA. Bovendien is voor cellulaire transformatie van geïnfecteerde cellen langdurige expressie van E6 en E7 nodig. Dit wordt verhinderd door de cytolytische eigenschappen van SFV, waardoor geïnfecteerde cellen afsterven. De COGEM acht de kans op transformatie van geïnfecteerde cellen tot kankercellen daarom verwaarloosbaar klein.

Conclusie

De aanvrager is voornemens een klinische studie fase I en II uit te voeren waarbij patiënten met premaligne laesies van de cervix behandeld zullen worden met een therapeutisch vaccin dat codeert voor HPV eiwitten en na toediening een immuunrespons zal induceren. Het vaccin is gebaseerd op *Semliki forest virus*.

Risico's die hierbij kunnen optreden hebben betrekking op de eventuele vorming en de verspreiding van replicatiecompetent virus en effecten van de mogelijke verspreiding van de vector in het milieu, zoals transformatie van geïnfecteerde cellen door de HPV eiwitten E6 en E7 tot kankercellen.

De COGEM acht de kans op het ontstaan van replicatiecompetent virus door recombinatie tijdens productie van de virale vector verwaarloosbaar klein. De kans op recombinatie met

alphavirussen na toediening in de patiënt is volgens de COGEM verwaarloosbaar klein. Het risico van verspreiding van het ggo is eveneens verwaarloosbaar klein.

De vectorbatch wordt door de aanvragers geproduceerd en gecontroleerd. Hoewel de COGEM van mening is dat de berekende kans verwaarloosbaar klein is dat de vectorbatch replicatiecompetent virus zal bevatten, acht zij een gevalideerde test op de virusbatches noodzakelijk om dit in de praktijk te bevestigen. De aanvrager toont echter geen gegevens waaruit blijkt dat de gevoeligheid van de door de aanvrager uitgevoerde test van 1 RCV per 5×10^8 infectieuze units wordt bereikt. Hierdoor ontbreekt de onderbouwing en kan de COGEM niet verifiëren dat de vectorbatch vrij is van RCV.

Op basis van de bovenstaande gegevens adviseert de COGEM in dit geval positief over de voorgenomen klinische studie fase I en II, mits de gegevens voor validatie van de test op RCV in de virusbatches ter verificatie aan de vergunningverlener kunnen worden overlegd.

Referenties

1. RIVM (2011). Baarmoederhalskanker, versie 4.5 van 22 september 2011. In: Volksgezondheid Toekomst Verkenning, Nationaal Kompas Volksgezondheid. Internet: www.nationaalkompas.nl/gezondheid-en-ziekte/ziekten-en-aandoeningen/kanker/baarmoederhalskanker (2 december 2011)
2. Centrum Infectieziektenbestrijding/Gezondheidsraad (2010). Richtlijn Humaan papillomavirusinfectie.
3. Maatschap Gynaecologie IJsselland Ziekenhuis en Nederlandse Vereniging voor Obstetrie en Gynaecologie. Internet: www.ysl.nl/fileadmin/ijsselland/folders_patientenvoorlichting/GYN/031-Uitstrijkje_en_vervolgonderzoeken.pdf (12 december 2011)
4. Flint SJ *et al.* (editors) (2004). Principles of Virology. Second edition
5. Regenmortel van MHV *et al.* (editors) (2000). Virus Taxonomy
6. Atkins GJ, Sheahan BJ en Liljestrom P (1999). The molecular pathogenesis of Semliki Forest virus: a model virus made useful? *Journal of General Virology* 80:2287-2297
7. Lobigs M (1990). Function of Semliki Forest Virus E3 peptide in virus assembly: Replacement of E3 with an artificial signal peptide abolishes spike heterodimerization and surface expression of E1. *Journal of Virology* 64:4346-4355
8. Knipe DM & Howley PM (editors) (2001). Fields Virology. Fourth edition
9. Bureau GGO (2010). Lijst van pathogene micro-organismen en agentia. November 2010. Internet: <http://bggo.rivm.nl/Documenten/Documenten%20IG/Lijst%20van%20pathogene%20micro-organismen%20en%20agentia%20BGGO%20niet%20cursief.pdf>
10. Richtlijn 2000/54/EG van het Europees parlement en de raad van 18 september 2000 betreffende de bescherming van de werknemers tegen de risico's van blootstelling aan biologische agentia op het werk (2000)
11. Belgian Biosafety Server. List of viruses and unconventional agents presenting at the wild state a biological risk for immunocompetent humans and/or animals and corresponding maximum biological

- risk. Internet: www.biosafety.be/PDF/2009_classification_lists/H_A_virus.pdf (12 december 2011)
12. COGEM (2006). Inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd *Mond-en-klauwzeervirus*. Advies CGM/060711-01
 13. COGEM (2003). Combinatie vaccines voor HIV-1. Advies CGM/030604-02
 14. COGEM (2007). Semliki forest virus vector met een transgen voor de lichte keten van botuline neurotoxine. Advies CGM/070723-02
 15. Smerdou C & Liljeström P (1999). Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki forest virus particles. *Journal of Virology* 73:1092-1098
 16. Colmenero P *et al.* (2001). Recombinant Semliki Forest virus vaccine vectors: the route of injection determines the localization of vector RNA and subsequent T cell response. *Gene Therapy* 8:1307-1314