

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

DATUM 28 september 2012
KENMERK CGM/120928-01
ONDERWERP Advies: aanvullende informatie klinische studie met gg-MVA-HA vaccin

Geachte heer Atsma,

Naar aanleiding van een adviesvraag over aanvullende informatie betreffende de vergunningaanvraag IM 12-001 met de titel 'MVA-based recombinant influenza vaccines encoding influenza virus hemagglutinins' van het Erasmus MC, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over aanvullende informatie betreffende een vergunningaanvraag voor een klinische studie met een vaccin dat bescherming moet bieden tegen een infectie door het griepvirus. Het vaccin (gg-MVA-HA) bestaat uit een genetisch gemodificeerd Modified Vaccinia virus Ankara dat codeert voor het zogenaamde hemagglutinine (HA) eiwit van het griepvirus. De aanvrager verzoekt daarbij alle van nature voorkomende HA varianten te mogen gebruiken. In de studie wordt gekeken naar de veiligheid van dit vaccin in de mens en de afweerreactie die het vaccin initieert.

In haar eerste advies over deze vergunningaanvraag was de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu bij voorgenomen klinische studie met gg-MVA-HA waarschijnlijk verwaarloosbaar klein zijn. Op basis van de beperkte informatie over de moleculaire karakterisering van het ggo was de COGEM echter niet in staat de identiteit van het te testen vaccin te verifiëren. Derhalve kon zij geen eendoordeel geven over de milieurisico's van de voorgenomen klinische studie.

Naar aanleiding van dit advies heeft de aanvrager experimentele gegevens aangeleverd met betrekking tot de moleculaire karakterisering van een reeds geproduceerde gg-MVA-HA variant. Gebaseerd op deze nieuwe gegevens concludeert de COGEM dat het geproduceerde gg-MVA-HA moleculair overeenkomt met het door de aanvrager beschreven ggo. Voor nog te produceren gg-MVA-HA varianten is deze informatie nog niet beschikbaar. De COGEM acht het noodzakelijk dat voorafgaand aan het gebruik van deze varianten dezelfde analyses worden uitgevoerd en de aanvrager zich ervan vergewist dat de sequentie van deze varianten, afgezien van het HA gen, overeenkomt met de reeds geproduceerde gg-MVA-HA versie. Als daaraan is voldaan, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu aan voorgenomen klinische studie met gg-MVA-HA vectoren die coderen voor een van de verschillende HA varianten verwaarloosbaar klein.

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, Hoofd Bureau ggo
Dr. I. van der Leij, Ministerie IenM

Met het oog op eventuele belangverstrengelingen is het COGEM lid prof. dr. R.A.M. Fouchier niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.

Aanvullende informatie voor klinische studie met gg-MVA-HA vaccin

COGEM advies CGM/120928-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over nieuwe informatie die is aangeleverd met betrekking tot een vergunningaanvraag voor een fase I klinische studie met een genetisch gemodificeerd Modified Vaccinia virus Ankara (gg-MVA-HA). In deze studie worden de vrijwilligers gevaccineerd met het gg-MVA-HA dat codeert voor het Hemagglutinine eiwit (HA) van een van de 16 *Influenza-A-virus* HA subtypes. De aanvraag omvat in principe de mogelijkheid om iedere in de natuur voorkomende HA variant te testen, maar het gg-MVA-HA zal slechts één HA subtype tegelijkertijd herbergen en de verschillende vaccins worden in deze studie niet gecombineerd. De aanvrager wil met behulp van voorgenomen studie inzicht krijgen in de veiligheid van deze vaccins in de mens. Daarnaast wil de aanvrager in deze studie ook de afweerreactie bestuderen die het vaccin induceert.

1.1 Modified Vaccinia virus Ankara

MVA is een zeer verzwakte vorm van het Vaccinia virus Ankara, dat behoort tot de familie van de *Poxviridae*.¹ Het genoom bestaat uit één lineair dubbelstrengs DNA molecuul. Pokkenvirussen repliceren als één van de weinige DNA virussen in het cytoplasma van de gastheercel, onafhankelijk van de kern van de geïnfecteerde cel.²

Het MVA is in de jaren zeventig ontwikkeld als veilig pokkenvaccin door het Vaccinia virus Ankara 570 keer te passeren op kippenembryofibroblasten (CEF). Dit heeft geleid tot zes belangrijke deleties, met een totale grootte van 31.000 basenparen (ongeveer 9% van het genoom), in verschillende regio's van het genoom.^{3,4,5} Door deze deleties is MVA niet meer in staat om te repliceren in de meeste zoogdiercellen waaronder humane cellen.^{5,6} Het virus kan nog wel recombinante genen tot expressie brengen in humane cellen, zodat het een geschikte vector voor genterapie is.

MVA is veelvuldig getest en gebruikt als vaccin en heeft zijn veiligheid bewezen in meer dan 120.000 gevaccineerde personen.⁷ De veiligheid van MVA is tevens aangetoond in HIV-geïnfecteerde personen en kankerpatiënten.^{8,9,10,11} In onderhavige studie wordt een afgeleide gebruikt van de oorspronkelijke MVA stam. Het betreft het zogenaamde MVA-F6-sfMR dat is verkregen na 13 opeenvolgende passages van MVA op CEFs waaronder een aantal passages onder serum-vrije condities.

1.2 Influenza A virus

Het *Influenza A virus*, in de volksmond beter bekend als het griepvirus, is een negatief-strengig RNA virus dat behoort tot de familie *Orthomyxoviridae*.¹² Deze familie is onderverdeeld in vijf genera, waaronder *Influenzavirus A*, *B* en *C*. Alleen het *Influenzavirus A* kan zowel mensen, als

vogels en zoogdieren infecteren.^{12,13} Het genoom van het *Influenzavirus A* bestaat uit acht unieke genomsegmenten die coderen voor tien eiwitten, waaronder hemagglutinine (HA) en neuraminidase (NA).¹³

Typering van influenzavirussen vindt plaats op basis van de aanwezige HA en NA subtypen. In totaal zijn er voor het *Influenzavirus A* 16 verschillende hemagglutinine subtypen (H1 t/m H16) en 9 verschillende neuraminidase subtypen (N1 t/m N9) bekend. Bij vogels komen alle subtypen voor. Bij de mens komen voor zover bekend alleen de H1, H2, H3, H5, H7, H9, N1 en N2 subtypen inheems voor.^{14,15,16}

In de studie wordt alleen gebruik gemaakt van de HA coderende sequenties. Het HA zorgt voor binding van het virusdeeltje aan de gastheer cel en membraanfusie van het virusmembraan en het endosomale membraan. Het HA speelt ook een belangrijke rol bij de aanmaak van antistoffen tegen het virus.^{17,18}

2. Eerder COGEM advies

Aangezien de COGEM het gg-MVA-HA als apathogeen voor mens en dier aanmerkt en zij de kans verwaarloosbaar klein acht dat er door recombinatie andere ggo's kunnen ontstaan, was zij van mening dat de risico's voor mens en milieu bij deze klinische studie met gg-MVA-HA waarschijnlijk verwaarloosbaar klein zijn.¹⁹ Op basis van de beperkte informatie over de moleculaire karakterisering was zij echter niet in staat de identiteit van het te testen vaccin te verifiëren. De aanvrager gaf in beperkte mate aan op welke wijze de identiteit van de gg-MVA-HA vectoren vastgesteld zou worden en aan welke criteria de batch moest voldoen. De resultaten van de beschreven analyses werden echter niet overlegd. Door de breedte van de aanvraag waren ook nog niet alle te testen klinische batches geproduceerd.

In het advies heeft de COGEM aangegeven dat zij het van belang acht dat het te testen gg-MVA-HA in voldoende detail moleculair is gekarakteriseerd. Daarvoor acht zij een gedegen sequentieanalyse van het insert en de flankerende sequenties in het te testen ggo noodzakelijk. Bovendien werd het ontbreken van de gegevens niet voldoende gecompenseerd door een uitvoerige beschrijving van de assays die gebruikt zouden worden om de vectorbatch te karakteriseren en de criteria waaraan de batch moest voldoen. Daarnaast heeft de COGEM erop gewezen dat het mogelijk was dat 10% van de virusbatch uit andere (MVA) virusdeeltjes kon bestaan dan het ggo. De oorsprong en identiteit van deze virusdeeltjes werden echter niet nader gespecificeerd. Door de beperkte mate van moleculaire karakterisering was het niet duidelijk of de milieurisicoanalyse kon worden beperkt tot de beschreven ggo's, waardoor de COGEM geen eendoordeel heeft gegeven over de milieurisico's van voorgenomen klinische studie.

3. Overweging

Bij de introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde (gg) virussen acht de COGEM het voor de milieurisico-analyse van belang dat de genetische samenstelling van een recombinant virus in voldoende detail experimenteel is gekarakteriseerd en dat overtuigend bewijs hiervan wordt overlegd. Op basis van deze informatie kan vastgesteld worden of het ggo overeenkomt met zijn theoretische beschrijving. Een eerste vereiste vormt een nauwkeurige beschrijving van de

wijze waarop de constructie heeft plaatsgevonden. Vervolgens dient onder meer vastgesteld te worden op welke locatie het insert is geïntegreerd, hoeveel kopieën van het insert aanwezig zijn, of er naast de ingebrachte eigenschap al dan niet herschikkingen van het virale genoom hebben plaatsgevonden, en of er vectorsequenties onbedoeld zijn geïnsereerd.

3.1. Constructie van het ggo

De gg-MVA-HA vectoren die de aanvrager wil bestuderen in de onderhavige klinische studie worden alle op eenzelfde wijze door middel van twee homologe recombinaties geconstrueerd. Daarvoor wordt gebruik gemaakt van een zogenaamde ‘shuttle-vector’ die het HA gen van interesse en een marker gen bevat. Deze genen zijn in de shuttle-vector omgeven door Del-III flankerende domeinen afkomstig uit MVA. Door de shuttle-vector samen met MVA in CEF cellen te brengen kan door homologe recombinatie de expressiecassette met zowel het HA gen als het marker gen in het MVA worden geïnsereerd. Door een tweede homologe recombinatie met een tussen het HA gen en het marker gen gelegen Del-III flankerende ‘repeat’ wordt het marker gen verwijderd en ontstaat het uiteindelijke gg-MVA-HA.

3.2 Moleculaire karakterisering van geproduceerd gg-MVA-HA

Naar aanleiding van het eerdere COGEM advies heeft de aanvrager aanvullende informatie aangeleverd met betrekking tot de moleculaire karakterisering van een reeds geproduceerde gg-MVA-HA variant. Ten eerste is het insert en de flankerende MVA sequenties van het gg-MVA-HA gesequenced. Op basis van deze sequentie-informatie concludeert de COGEM dat het gehele insert in het ggo aanwezig is en op de verwachte plaats in de deletie III site van het MVA genoom terecht is gekomen. Daarnaast heeft de aanvrager het resultaat overlegd van een analyse van het genoom van het gg-MVA-HA op aanwezigheid van zogenaamde ‘backbone’ sequenties van de gebruikte shuttle-vector. Hieruit kan worden afgeleid dat het gg-MVA-HA geen backbone DNA bevat. Bovendien blijkt uit de aangeleverde informatie dat er slechts één kopie van het insert in het genoom van het ggo aanwezig is.

De aanvrager heeft ook een alignement tussen het genoom van gg-MVA-HA en MVA uitgevoerd. Uit deze alignement blijkt dat er geen grote rearrangements of deleties zijn opgetreden. Op basis van deze aanvullende informatie heeft de COGEM afdoende kunnen verifiëren dat het ggo dat de aanvrager voornemens is te gebruiken in de klinische studie overeenkomt met het beschreven gg-MVA-HA.

In haar eerdere advies over deze vergunningaanvraag heeft de COGEM opgemerkt dat op basis van de opgegeven specificaties 10% van de te testen virusbatch uit andere (MVA) virusdeeltjes kan bestaan dan het beschreven gg-MVA-HA. De oorsprong en identiteit van deze virusdeeltjes werden niet nader gespecificeerd. In reactie op deze opmerking geeft de aanvrager aan dat de 10% zijn oorsprong heeft in de foutenmarge van de gebruikte test en het een vervuiling van het preparaat betreft met MVA viruspartikels met het oorspronkelijke MVA genoom. Door het gebruik van een gevoeliger PCR assay is de foutenmarge lager waardoor het theoretische niveau van mogelijk aanwezige MVA virusdeeltjes in het preparaat is teruggebracht. De COGEM is van

mening dat als het alleen MVA virusdeeltjes betreft dit geen invloed heeft op de milieurisicobeoordeling. Zij acht deze opmerking hiermee afdoende afgehandeld.

Op basis van de aanvullende informatie voor de moleculaire karakterisering van het ggo is de COGEM van mening dat de milieurisico's van de introductie in het milieu van het op dit moment geproduceerde en geanalyseerde gg-MVA-HA verwaarloosbaar klein zijn.

3.3 Moleculaire karakterisering van andere gg-MVA-HA varianten

Naast het gebruik van de bovengenoemde gekarakteriseerde gg-MVA-HA variant verzoekt de aanvrager ook gg-MVA-HA vectoren in de studie te mogen gebruiken die een ander van nature voorkomend subtype HA bevatten. Deze varianten worden op eenzelfde manier door middel van twee homologe recombinaties verkregen, waardoor de expressiecassette van het HA gen in het zogenaamde deletie gebied III van MVA wordt gecloneerd. De te testen klinische batches van deze varianten zijn echter nog niet geproduceerd en er zijn geen experimentele gegevens met betrekking tot de moleculaire karakterisering aangeleverd.

Op basis van alle aangeleverde informatie is de COGEM van mening dat de milieurisico's van deze varianten verwaarloosbaar klein zijn, mits betreffende gg-MVA-HA's voldoen aan dezelfde specificaties als bovenstaande variant en tijdens de productie geen veranderingen in het genoom optreden. Dat betekent dat er één kopie van de HA expressiecassette in de deletie gebied III site van het MVA genoom aanwezig dient te zijn, het ggo geen backbone DNA van de shuttle vector bevat en het gg-MVA-HA geen deleties of rearrangements laat zien ten opzichte van het oorspronkelijke MVA genoom. De vector moet daarom op eenzelfde wijze worden gekarakteriseerd als de reeds geproduceerde variant.

De COGEM acht het niet noodzakelijk de moleculaire karakterisering van deze gg-MVA-HA varianten vooraf aan haar ter beoordeling wordt voorgelegd. Zij is van mening dat net als andere werkzaamheden met ggo's het de verantwoordelijkheid is van de vergunninghouder dat de werkzaamheden niet buiten de vergunning vallen. Voorafgaand aan het gebruik van een gg-MVA-HA variant dient de aanvrager zich ervan te vergewissen dat het ggo voldoet aan gestelde specificaties. Het is daarbij de taak van de inspectie erop toe te zien dat dit ook daadwerkelijk gebeurt.

4. Conclusie

De aanvrager heeft aanvullende informatie aangeleverd met betrekking tot de moleculaire karakterisering van het gg-MVA-HA. Op basis van deze informatie is de COGEM van mening dat het geproduceerde gg-MVA-HA moleculair overeenkomt met het verwachte ggo. Voor nog te produceren gg-MVA-HA varianten acht zij het noodzakelijk dat voorafgaand aan het gebruik van deze nieuwe varianten dezelfde analyses worden uitgevoerd en dat daaruit blijkt dat de sequentie van deze varianten, afgezien van het HA gen, overeenkomt met de reeds geproduceerde gg-MVA-HA variant. Conform iedere andere ggo-vergunning dienen de gegevens over de moleculaire karakterisering beschikbaar te zijn voor de inspectie.

De COGEM is van mening dat de risico's voor mens en milieu bij voorgenomen klinische studie met gg-MVA-HA vectoren die coderen voor één van de 16 HA subtypen verwaarloosbaar klein zijn. Daarom adviseert zij positief over de vergunningaanvraag voor deze klinische studie.

5. Referenties

- 1 Skinner MA *et al.* (2012). The Double Stranded DNA Viruses, family *Poxviridae*. In: Virus Taxonomy, Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Edited by King AMQ *et al.* Elsevier Academic Press, Amsterdam 291-309
- 2 Esposito JJ and Fenner F (2001). Poxviruses. In: Fields Virology, volume 2, fourth edition. Edited by Knipe DM *et al.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia. 2885-2921
- 3 Antoine G *et al.* (1998). The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* 244: 365-396
- 4 Mayr A *et al.* (1978). The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* 167: 375-390
- 5 Sutter G & Moss B (1992). Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10847-10851
- 6 Drexler I *et al.* (1998). Highly attenuated modified vaccinia virus ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J. Gen. Virol.* 79: 347-352
- 7 Mayr A *et al.* (1978). Vaccination against pox diseases under immunosuppressive conditions. *Dev Biol Stand* 41: 225-234
- 8 Greenough TC *et al.* (2008). Safety and immunogenicity of recombinant poxvirus HIV-1 vaccines in young adults on highly active antiretroviral therapy. *Vaccine* 26:6883-6893
- 9 Cosma A *et al.* (2007). Evaluation of modified vaccine virus Ankara as an alternative vaccine against smallpox in chronically HIV type 1-infected individuals undergoing HAART. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23:782-793
- 10 Harrop R *et al.* (2010). Cross-trial analysis of immunologic and clinical data resulting from phase I and II trials of MVA-5T4 (TroVax) in colorectal, renal, and prostate cancer patients. *J Immunother* 33:999-1005
- 11 Oudard S *et al.* (2011). A phase II study of the cancer vaccine TG4010 alone and in combination with cytokines in patients with metastatic renal clear-cell carcinoma: clinical and immunological findings. *Cancer Immunol Immunother* 60:261-271
- 12 McCauley JW *et al.* (2012). The Negative Sense Single Stranded RNA viruses, family *Orthomyxoviridae*. In: Virus Taxonomy, Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Edited by King AMQ *et al.* Elsevier Academic Press, Amsterdam. 749-761
- 13 Wright PF and Webster RG (2001). Orthomyxoviruses. In: Fields Virology, volume 2, fourth edition. Edited by Knipe DM *et al.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia. 1533-1579
- 14 Flint, SJ *et al.* (2004). Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis and Control. ASM Press, Washington, D.C.
- 15 Lewis, DB (2006). Avian flu to human influenza. *Annu Rev Med* 57: 139-154
- 16 Belser JA *et al.* (2009). Past, present, and possible future human infection with *Influenza A virus* subtype H7. *Review Em Inf Dis* 15(6): 859-865
- 17 Brown, EG (2000). Influenza virus genetics. *Biomed Pharmacother* 54: 196-209
- 18 Zambon, MC (2001). The pathogenesis of influenza in humans. *Rev Med Virol* 11: 227-241

- 19 COGEM (2012). Klinische studie met genetisch gemodificeerd Modified vaccinia virus Ankara vaccin dat codeert voor het Hemagglutinine van *Influenza A virus* (CGM/120625-01)