

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 17 juni 2013
KENMERK CGM/130617-01
ONDERWERP Advies klinische fase 3 studie PROSTVAC-V/F

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de vergunningaanvraag IM-MV 12-008 getiteld 'A randomized double-blind, phase 3 efficacy trial of PROSTVAC ± GM-CSF in men with asymptomatic or minimally metastatic, castrate-resistant prostate cancer' van het UMC St. Radboud te Nijmegen, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over een klinische fase 3 studie met 'PROSTVAC' bij patiënten met prostaatkanker. PROSTVAC is een gecombineerde vaccinatiestrategie waarbij patiënten gevaccineerd worden met een genetisch gemodificeerd (gg) *Vaccinia virus* (PROSTVAC-V) en een *gg-Fowlpox virus* (PROSTVAC-F). In deze virussen zijn sequenties van menselijke genen ingebouwd, die na vaccinatie tot expressie komen en het immuunsysteem ertoe aanzetten prostaattumorcellen te elimineren. PROSTVAC-V is gebaseerd op een vaccin dat gebruikt is tijdens de eradicatie van het pokkenvirus. Bekend is dat bij gebruik van dit vaccin contacttransmissie kan optreden en dat een klein aantal gevaccineerden nadelige gevolgen heeft ondervonden. PROSTVAC-F is afgeleid van een vaccin dat in de pluimvee-industrie wordt toegepast.

De COGEM merkt op dat de moleculaire karakterisering van beide gg-virussen onvolledig is, waardoor onduidelijk is of beide gg-virussen overeenkomen met de beoogde virussen.

Aangezien bij de studie gebruik gemaakt wordt van vaccinstammen, de proefpersonen gevaccineerd zijn tegen het humane pokkenvirus en het contact met kwetsbare risicogroepen wordt voorkomen, is de COGEM van mening dat de kans op een nadelig effect voor mens en milieu zeer klein is. Om de kans op een nadelig effect bij derden verder te verminderen, heeft de COGEM een aantal aanvullende werkvoorschriften opgesteld. Onder navolging van deze werkvoorschriften verwacht de COGEM dat de risico's voor mens en milieu bij deze klinische studie met PROSTVAC-V/F verwaarloosbaar klein zullen zijn. Door de beperkte moleculaire karakterisering van de ggo's is het dossier echter onvolledig. De COGEM acht aanlevering van deze aanvullende informatie noodzakelijk alvorens tot een eindoordeel te kunnen komen.



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 van IenM

Fase 3 studie met een recombinant *Vaccinia virus*- en *Fowlpox virus*-vaccin bij patiënten met prostaatkanker

COGEM advies CGM/130617-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd advies uit te brengen over een vergunningaanvraag met de titel 'A randomized double-blind, phase 3 efficacy trial of PROSTVAC GM-CSF in men with asymptomatic or minimally metastatic, castrate –resistant prostate cancer'. De aanvraag is ingediend door het UMC St. Radboud te Nijmegen en heeft betrekking op een klinische fase 3 studie bij patiënten met metastatische castratie-resistente prostaatkanker (mCRPC). Het doel van de studie is om te bepalen of vaccinatie met het middel PROSTVAC-V/F de levensverwachting van patiënten met mCRPC verlengt.

Tijdens de studie wordt gebruik gemaakt van twee levende genetisch gemodificeerde (gg-) pokkenvirusstammen die afzonderlijk worden toegediend in opeenvolgende vaccinaties, al dan niet gecombineerd met het adjuvans 'granulocyte macrophage colony stimulating factor' (GM-CSF). De gg-virusstammen zijn gebaseerd op een vaccinstam van het *Vaccinia virus* (TBC-Wy) en een vaccinstam van het *Fowlpox virus* (TBC-FPV). Beide gg-virusstammen (respectievelijk PROSTVAC-V en PROSTVAC-F) brengen dezelfde vier humane cDNA-sequenties tot expressie. Deze sequenties coderen voor een antigen specifiek voor humane prostaatcellen, en drie eiwitten die een stimulerende werking hebben op het T-cel gebaseerde immuunsysteem van de mens. Door middel van vaccinatie met PROSTVAC-V/F wordt beoogd de zelf-tolerantie voor PSA expresserende cellen te verbreken en een immuunrespons te induceren die prostaatkankercellen elimineert.

PROSTVAC-V/F is ontwikkeld door 'Therion Biologics Corporation' en is tegenwoordig eigendom van het biotechnologiebedrijf 'Bavarian Nordic'.

2. Uitgangsorganismen *Vaccinia virus* en *Fowlpox virus*

Vaccinia virus en *Fowlpox virus* behoren beiden tot de familie van de *Poxviridae* (pokkenvirussen), subfamilie *Chordopoxvirinae*.¹ Het genoom van pokkenvirussen bestaat uit één lineair dubbelstrengs DNA molecuul.¹ Pokkenvirussen repliceren in het cytoplasma van de geïnfecteerde gastheercel.^{2,3}

2.1 *Vaccinia virus* en vaccinstam TBC-Wy

Het *Vaccinia virus* behoort tot het genus *Orthopoxvirus*.¹ Het genoom omvat 170-250 kilobaseparen (kbp). Analyse van het genoom laat zien dat het virus nauw verwant is aan het *Cowpox virus*.¹

Aan het einde van de 18^e eeuw werd het *Cowpox virus* (eveneens genus *Orthopoxvirus*) voor het eerst met succes gebruikt als vaccin tegen het verwante humane pokkenvirus (*Variola virus*, eveneens genus *Orthopoxvirus*). Hierna werd het *Cowpox virus* gedurende lange tijd gehanteerd als pokkenvaccin in zowel mens als dier en is het virus genetisch geleidelijk veranderd in het virus dat nu aangeduid wordt als *Vaccinia virus*.^{2,3} Van 1967 tot 1975 zijn in het kader van het wereldwijde eradicatieprogramma van het humane pokkenvirus verschillende *Vaccinia virus* stammen als vaccin gebruikt. Eind jaren zeventig is dit eradicatieprogramma beëindigd.⁹

De natuurlijke gastheren van het *Cowpox virus* zijn knaagdieren.² Daarnaast kan het virus mensen, koeien en katten infecteren. *Vaccinia virus* kan mensen, konijnen en koeien infecteren.^{2,3} Varianten van *Vaccinia virus* circuleren onder waterbuffels in India (Buffalopox virus), en ratten, muizen en koeien in Brazilië.^{2,4,5,6}

De eventueel optredende ziekteverschijnselen na vaccinatie met *Vaccinia virus* zijn doorgaans mild en van voorbijgaande aard.^{2,7,8} Soms kunnen erythema multiforme (EM; algemene huiduitslag), 'algemene vaccinia' ten gevolge van verspreiding van het virus via de bloedbaan, of bacteriële superinfecties ter plekke van de vaccinatieplaats optreden.^{2,7,8} Incidenteel vinden ernstige en soms levensbedreigende complicaties plaats zoals Progressieve vaccinia (PV), Eczema Vaccinatum (EV), Postvaccinia encefalitis (PVE) en foetale vaccinia.^{2,7,8}

PV komt voor bij patiënten met een verminderde cellulaire immunrespons waardoor het virus zich via de bloedbaan verspreidt en nieuwe huidlaesies veroorzaakt die niet genezen. Indien PV niet behandeld wordt, heeft de complicatie bijna altijd een fatale afloop. EV komt voor bij patiënten met eczeem en kan, indien onbehandeld, leiden tot op septische shock gelijkende symptomen met de dood als gevolg. Zowel PV als EV kunnen goed met behulp van tegen *Vaccinia virus* gerichte antilichamen (VIG) behandeld worden.⁸ De oorzaak van PVE is niet bekend en wordt vaker bij kinderen dan bij volwassenen waargenomen. De incidentie varieert van 1 op de 4.000 (Nederland) tot 1 op de 100.000 gevaccineerden (VS), en is onder meer afhankelijk van de gebruikte vaccinstam.⁸ Foetale vaccinia kan leiden tot de dood van de ongeboren vrucht.

Na vaccinatie met *Vaccinia virus* ontstaat ter plekke een kleine laesie van de huid en repliceert het virus lokaal in de huid- en lymfklieren. Gedurende maximaal drie weken worden infectieuze partikels gevormd en wordt het virus ter plekke van de injectieplaats uitgescheiden.^{2,8,9} Via direct wondcontact of contact met besmet verbandmateriaal kan transmissie van virus leiden tot nieuwe besmettingsgevallen. Ook zijn enkele gevallen van indirecte overdracht via de handen beschreven.^{10,11} Door zelfinoculatie van het oog kan hoornvlies- of ooglidontsteking ontstaan.^{2,8}

Gedurende het wereldwijde eradicatieprogramma van het humane pokkenvirus in de VS (1967 tot 1975) is de 'New York City Board of Health' (NYCBH of Wyeth) stam als vaccin toegepast. De NYCBH stam dateert oorspronkelijk uit 1856 en is door de firma Wyeth Laboratories onder de naam Dryvax op de markt gebracht.⁹ Dryvax is ook buiten de Verenigde Staten (maar niet in Europa) gebruikt in het eradicatieprogramma. Het vaccin is in de VS tot 1972 gebruikt om de burgerbevolking te vaccineren. Het vaccin werd gemaakt door virus uit laesies op de huid van geïnfecteerde koeien te oogsten en te vriesdrogen.¹² Het vaccin bestond uit een mengsel van virusstammen of varianten.¹³

In 2002 tot 2004 zijn in de VS in twee vaccinatieprogramma's met Dryvax 670.000 gevaccineerden gemonitord. Hoewel regelmatig milde symptomen, als opgezwollen lymfklieren, hoofdpijn en spierpijn werden waargenomen, werden slechts twee keer ernstige bijwerkingen gemeld.¹⁴ Tevens kon een mogelijk oorzakelijk verband bij het optreden van myocarditis en/of pericarditis bij een bepaald type hartpatiënten niet worden uitgesloten.¹⁵ Bij 5-10 op de 100.000 gevaccineerden werd contacttransmissie van de Dryvax stam vastgesteld.^{14,16} In vergelijking met andere wereldwijd

toegepaste *Vaccinia virus* vaccinstammen, zoals EM-63, 'Lister' en 'Temple of Heaven', liet de NYCBH vaccinstam de laagste incidentie van klinische complicaties zien.⁹

Op basis van de monitoringsresultaten hebben Neff *et al.* (2008) een aantal aanbevelingen opgesteld bij het toepassen van Dryvax als vaccinatiestam.¹⁴ Samengevat betreffen deze aanbevelingen: potentieel te vaccineren personen vooraf screenen op bepaalde gezondheidsrisico's en bepaalde risicogroepen van vaccinatie uitsluiten, alle personen betrokken bij de vaccinatie goed instrueren en een goede verzorging van de vaccinatiewond in acht nemen.

Dryvax is tot 1978 geproduceerd door Wyeth Laboratories. Nadat de belangstelling voor vaccinatie in verband met de dreiging van bioterrorisme weer toenam en de voorraden Dryvax geslonken waren, is ACAM2000 ontwikkeld ter vervanging van Dryvax.¹² Dit is een gekloneerd plaque-isolaat van het Dryvax vaccin en wordt vermenigvuldigd in Verocellen. De werkzaamheid van dit vaccin is eender aan Dryvax. Bijwerkingen als PV, EV en foetale vaccinia werden echter voorkomen door bovengenoemde screening van de te vaccineren personen en door immuungecompromitteerden, personen met eczeem of zwangeren niet te vaccineren. Van de 703.580 gevaccineerden werd in 3 gevallen postvacciniale encefalitis waargenomen en in 43 gevallen 'algemene vaccinia'.¹⁷

De TBC-Wy vaccinstam, waarop PROSTVAC-V is gebaseerd, is ook een plaque-isolaat van de *Vaccinia virus* stam NYCBH, en is verkregen door deze stam acht maal te passeren in apencellen (fetal rhesus lung line FRhL-2).

2.2 *Fowlpox virus* en vaccinstam TBC-FPV

Het *Fowlpox virus* behoort tot het genus *Avipoxvirus*.¹ Het genoom omvat 300 kbp.¹ Het gastheerbereik van het *Fowlpox virus* is zeer specifiek, alleen bepaalde vogelsoorten kunnen geïnfecteerd worden (kippen, kalkoenen en duiven).^{2,18,19} Infecties bij zoogdieren zijn tot op heden niet gerapporteerd.^{2,18} Wel is aangetoond dat FPV kan repliceren in babyhamsterzellen.^{20,21} Daarbij werden geen infectieuze viruspartikels geproduceerd.

Het *Fowlpox virus* veroorzaakt pokken bij de hierboven genoemde vogelsoorten. De ziekte uit zich in de vorm van laesies rond de kam, lellen en snavel of ontstekingen aan de slijmvliezen van de mond-, neus- en keelholte.² De laatst genoemde vorm is vaak dodelijk. Overdracht van het virus vindt plaats via aerosolen of beten van geledpotigen (muskieten, mijten).^{2,18} Transmissie van legkippen naar kalkoenen is recent beschreven.¹⁹ Er zijn verschillende vaccins op de markt ter bestrijding van *Fowlpox virus* onder legkippen waaronder het vaccin POXVAC-TC. De TBC-FPV vaccinstam waaruit PROSTVAC-F is geconstrueerd, is een 'plaque'-isolaat van vaccinstam POXVAC-TC, en is verkregen door deze vaccinstam 5x te passeren in kippen embryocellen.

3. Beschrijving van gg-virusstammen PROSTVAC-V en PROSTVAC-F

De gg-virussen PROSTVAC-V en PROSTVAC-F zijn aan de hand van homologe recombinatie geconstrueerd door kippen embryofibroblasten te co-transfecteren met de vaccinstam TBC-Wy dan wel TBC-FPV, en plasmiden pT2240 of pT2246. Daartoe waren in plasmides pT2240 en pT2246 achtereenvolgens gekloneerd: het PSA gen met de vaccinia specifieke 40K promoter, het

lymfocytfunctie-geassocieerd antigeen-3 (LFA-3) gen met de vaccinia specifieke 30K promoter, het intercellulair adhesiemolecuul-1 (ICAM-1) gen met de vaccinia specifieke I3 promoter, en het B7.1 gen met de vaccinia specifieke sE/L promoter. De totale insertie, ongeveer 5 kbp, werd aan weerszijden geflankeerd door het genomische DNA van de TBC-Wy dan wel de TBC-FPV stam.

Het PSA gen codeert voor een antigeen specifiek voor humane prostaatcellen.²² De toegepaste PSA-sequentie is aangepast door op positie 155 het aminozuur isoleucine te wijzigen in het aminozuur leucine ten einde een versterkte immuunrespons te bewerkstelligen.²³ De LFA-3, ICAM-1 en B7.1 genen coderen voor eiwitten aanwezig in humane T-lymfocyten. Deze eiwitten stimuleren de T-cel immuniteit en zijn samen bekend onder de naam TRICOM.²⁴ De toegepaste promotoren zijn afkomstig van het *Vaccinia virus* (TBC-Wy of WR stam).

De site voor homologe recombinatie in de TBC-Wy stam (PROSTVAC-V) is gelegen in de *HindIII* F regio van het *Vaccinia virus*.²⁵ In deze regio bevindt zich het F13L gen, dat codeert voor het 37K envelopeiwit.²⁶ De site voor homologe recombinatie in de TBC-FPV stam (PROSTVAC-F) is gelegen in de *BamHI* J regio van het *Fowlpox virus*.²⁷ In deze regio bevindt zich het FPV246 gen dat codeert voor bepaalde ankyrine 'repeat motifs'.²⁸ Ankyrine is mogelijk betrokken bij het gastheertropisme van pokkenvirussen.²⁸

4. Voorgenomen werkzaamheden

Proefpersonen zullen eerst gevaccineerd worden met PROSTVAC-V (2×10^8 plaque-vormende eenheden (pfu) per dosis) met als doel een immuunrespons op te wekken tegen prostaatkankercellen die PSA tot expressie brengen. Vervolgens wordt beoogd deze immuunrespons te versterken met behulp van 6 opeenvolgende vaccinaties met PROSTVAC-F (1×10^9 pfu per dosis) zodat uiteindelijk de cellen die PSA tot expressie brengen, geëlimineerd worden. Tevens wordt onderzocht of het adjuvans GM-CSF de immuunrespons nog verder kan stimuleren. De injecties met PROSTVAC-V/F \pm GM-CSF zullen subcutaan toegediend worden in de bovenarm of het bovenbeen.

De studie zal uitgevoerd worden met de medewerking van in totaal 1200 proefpersonen verdeeld over drie studiegroepen (400 personen krijgen PROSTVAC-V/F, 400 personen krijgen PROSTVAC-V/F in combinatie met GM-CSF en 400 personen krijgen een placebo toegediend). In Nederland zullen maximaal 40 proefpersonen aan de studie deelnemen waarvan ongeveer 9 in het UMC St. Radboud in Nijmegen. De totale studieduur bedraagt 6 maanden. Vaccinaties zullen poliklinisch zonder ziekenhuis opname om de 2 weken plaatsvinden.

Om eventuele risico's voor het betrokken personeel gedurende de bereiding en toediening van PROSTVAC-V/F, en bij de afname van klinische monsters (bloed en urine) te minimaliseren, zullen er verschillende voorzorgsmaatregelen genomen worden en zal gewerkt worden volgens de WHO 'Guidelines for the prevention of transmission of infectious agents' en de WIP richtlijn 'Veilig werken in de obductiekamer'. Deze maatregelen bestaan uit training en educatie van het personeel, het gebruik van persoonlijke beschermingsmiddelen en procedures voor desinfectie en afvalverwerking. De proefpersonen en de betrokken personeelsleden zullen worden voorgelicht over de verzorging van de PROSTVAC-V injectieplaats. Deze injectieplaats zal met een waterdichte, steriele, niet-adhererende pleister worden afgedekt.

Alle maatregelen zijn vastgelegd in 'Standard Operating Procedures' en voldoen aan de eisen zoals gesteld in de Regeling GGO. Preparatie van zowel PROSTVAC-V als PROSTVAC-F zal plaatsvinden onder ML-II inperking waarbij open handelingen zullen worden uitgevoerd in een veiligheidsklasse II kabinet. Gedurende het hanteren van PROSTVAC-V zullen altijd handschoenen en een beschermende bril worden gedragen. Tijdens de injectie met PROSTVAC-V zal daarbij aanvullend een mond-neusmasker worden gedragen.

5. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft het *Vaccinia virus* geclassificeerd als een klasse 2 pathogeen.^{29,30,31} Daarnaast heeft de COGEM een aantal op de *Chordopoxvirinae* gebaseerde verzwakte vaccinstammen geclassificeerd als een klasse 1 pathogeen.^{29,30,31} Het betreft de vaccinstammen 'modified vaccinia virus Ankara' (MVA) en NYVAC (beiden *Vaccinia virus*), de vaccinstam ALVAC (*Canarypox virus*) en de vaccinstam TROVAC (*Fowlpox virus*). De op het *Vaccinia virus* gebaseerde vaccinstam 'Western Reserve' (WR) is door de COGEM geclassificeerd als een klasse 2 pathogeen.^{29,30,31} Deze WR stam is gebaseerd op de NYCBH vaccinstam.⁹

De COGEM heeft diverse malen geadviseerd over klinische studies waarbij gebruik gemaakt werd van de op *Vaccinia virus* gebaseerde gg-vaccinstammen MVA en NYVAC,^{32,33,34,35} Voor deze studies met apathogene vaccinstammen achtte zij de milieurisico's verwaarloosbaar klein, mits aanvullende informatie met betrekking tot de moleculaire karakterisering aangeleverd werd,^{33,34} of wanneer voldaan werd aan aanvullende voorschriften.³² Deze aanvullende voorschriften betroffen het (op de juiste wijze) toepassen van waterbestendige pleisters.

De COGEM heeft nog niet eerder geadviseerd over een klinische studie met de van NYCBH afgeleide TBC-Wy vaccinstam en de van POXVAC-TC afgeleide TBC-FPV vaccinstam

6. Beoordeling van betreffende klinische studie elders in de wereld.

Volgens de producent 'Bavarian Nordic' zijn in fase 1 en 2 klinische studies met PROSTVAC 850 proefpersonen geïnccludeerd. De onderhavige fase 3 klinische studie met PROSTVAC-V/F is een multicenter studie die uitgevoerd zal worden in verschillende landen verspreid over de wereld. De producent beoogt in deze studie 1200 proefpersonen te includeren. Op dit moment is in Europa voor deze studie een vergunning aangevraagd in België, Estland, Frankrijk, Duitsland, Polen, Spanje, IJsland en het Verenigd Koninkrijk. Buiten Europa is voor deze studie een vergunning aangevraagd in Australië en Canada. De beoordelende instanties van onder ander België, het Verenigd Koninkrijk en Australië zijn allen van mening dat de milieurisico's voor deze studie verwaarloosbaar klein zijn.^{36,37,38}

7. Overwegingen

Bij de introductie in het milieu van gg-virussen zijn voor de milieurisicoanalyse verschillende aspecten van belang zoals de moleculaire karakterisering, pathogeniteit, uitscheiding door de gastheer en de eventuele overleving en verspreiding van het gg-virus in het milieu. De van belang zijnde milieurisico-aspecten betreffende de recombinante virusstammen PROSTVAC-V en PROSTVAC-F worden hieronder puntsgewijze besproken.

7.1 Moleculaire karakterisering

Recent heeft de COGEM een advies uitgebracht waarin zij uiteenzet aan welke voorwaarden de moleculaire karakterisering van een gg-virus moet voldoen indien deze bij een klinische studie in het milieu geïntroduceerd wordt.³⁹ Deze karakterisering dient een goed beeld te geven van de eigenschappen van het betreffende genetisch gemodificeerd organisme (ggo) en vormt een belangrijke basis voor de milieurisicobeoordeling. Als er onvoldoende gegevens worden aangeleverd om de genetische organisatie van het ggo te kunnen verifiëren, kan de COGEM geen conclusies trekken over de milieurisico's. In dat geval rest de 'worst case' benadering wat bij een introductie in het milieu zal leiden tot een negatief advies.

Om de ggo's PROSTVAC-V en PROSTVAC-F moleculair in kaart te brengen, heeft de aanvrager Southern blot analyses en PCR-analyses uitgevoerd. Tevens is de genomsequentie van beide vectoren bepaald. De gegevens van de Southern blot en PCR experimenten zijn niet aangeleverd. Hierdoor is de COGEM niet in staat te beoordelen in hoeverre het ggo overeenkomt met de beoogde ggo's.

De genomsequentie van beide virusvectoren is wel overlegd. Bovendien heeft de aanvrager deze sequenties vergeleken met de sequentie van de *in silico* vervaardigde versies van PROSTVAC-V en PROSTVAC-F. Uit deze analyse blijkt dat de sequenties van de gecreëerde vectoren op verschillende punten afwijkt van de *in silico* vervaardigde beoogde sequenties. Tevens kan uit deze gegevens worden afgeleid dat de sequenties van het 'identieke' insert van beide virusvectoren niet overeenkomen. De aanvrager gaat niet in op deze verschillen en op de mogelijke impact die deze mutaties zouden kunnen hebben op de eigenschappen van beide ggo's. De COGEM is daarom van mening dat de moleculaire karakterisering van zowel PROSTVAC-V als PROSTVAC-F onvolledig is.

7.2 Pathogeniteit uitgangsgesystemen en ggos's

Vaccinia vaccinstam TBC-Wy

De vaccinstam TBC-Wy is een afgeleide van de NYCBH stam Dryvax. Dryvax is veelvuldig gebruikt als vaccin gedurende de eradicatie van het smallpox virus. Tijdens deze periode zijn verschillende bijwerkingen van Dryvax aan het licht gekomen. Naast het voorkomen van milde symptomen als koorts, spierpijn en hoofdpijn, zijn ook ernstigere bijwerkingen gerapporteerd zoals progressieve vaccinia, postvaccinia encefalitis en eczema vaccinatum, en zelfs het overlijden van gevaccineerden. Van de verschillende stammen die tijdens de eradicatie wereldwijd als vaccin zijn toegepast, is Dryvax de meeste veilige stam gebleken. In het geval van Dryvax leidde vaccinatie gemiddeld bij 1,4 op de miljoen gevaccineerden tot overlijden. Voor het in Europa toegepaste Lister vaccin was dit gemiddeld 8,4 op de miljoen gevaccineerden.⁴⁰ Hierbij moet worden opgemerkt dat de frequentie waarin de bijwerkingen worden waargenomen aanzienlijk afneemt in mensen die al eerder tegen pokken gevaccineerd zijn.⁴⁰

Dryvax is een mengsel van *Vaccinia virus* varianten met verschillende virulentie. TBC-Wy is een plaque-gezuiverde kloon van de Dryvax stam en is acht maal gepasseerd op apencellen. Op basis van een neurovirulentietest in muizen claimt de aanvrager dat de virulentie van TBC-Wy 10–100 keer

lager is dan de virulentie van Dryvax. Het gebruik van zogende muizen is een wetenschappelijk geaccepteerd model om de incidentie voor post-vaccinia encefalitis in te kunnen schatten.¹²

Gebaseerd op genoemde gegevens is de COGEM van mening dat de TBC-Wy stam waarschijnlijk niet pathogener is dan de veelvuldig toegepaste Dryvax stam.

Fowlpox vaccinstam POXVAC-TC

Het gastheerbereik van wildtype *Fowlpox virus* is beperkt tot vogels, waaronder kippen en kalkoenen. In zoogdiercellen treedt geen replicatie op na een infectie met het *Fowlpox virus*. Ter bescherming van legkippen tegen de gevolgen van een infectie met het *Fowlpox virus* worden kippen in de VS sinds de jaren 60 van de vorige eeuw gevaccineerd met POXVAC-TC. Tot op heden hebben deze vaccinaties niet geleid tot nadelige effecten voor het milieu, andere vogelsoorten of de diervverzorgers. De aanvrager beschouwt de vaccinstam als laag virulent. Dit baseert hij mede op eigen resultaten van een neurovirulentie assay in knaagdieren waarin de LD₅₀ waarde van TBC-FPV varianten boven de hoogst mogelijke dosis blijkt te liggen.

Op basis van bovengenoemde aspecten is de COGEM van mening dat de vaccinstam PROSTVAC-TC als apathogeen voor de mens aangemerkt kan worden.

PROSTVAC-V en PROSTVAC-F

Het gg-TBC-Wy en gg-PROSTVAC-TC (resp. PROSTVAC-V en PROSTVAC-F) bevatten beiden een expressiecassette voor de eiwitten PSA, LFA-3, ICAM-1 en B7.1. Deze vier eiwitten zijn bedoeld om een afweerreactie te initiëren tegen prostaattumorcellen. Het PSA is een antigeen dat aanwezig is in humane prostaattumorcellen. De andere drie eiwitten stimuleren de humane cellulaire afweer. Eerdere klinische studies met beide vectoren hebben laten zien dat de vaccins goed worden verdragen.^{41,42} De COGEM kent geen gegevens waaruit aannemelijk wordt dat het opnemen van genen die het immuunsysteem stimuleren het weefseltropisme en het gastheer bereik van virussen veranderen. Onder de voorwaarde dat de ggo's voldoen aan de door de aanvrager opgegeven moleculaire specificaties (zie opmerkingen § 6.1 moleculaire karakterisering) en gezien de functie van deze humane eiwitten in de mens ziet de COGEM geen reden om aan te nemen dat de insertie de pathogeniteit van beide ggo's zal verhogen.

7.3 Recombinatie

Recombinatie tussen pokkenvirussen is veelvuldig beschreven.^{1,3,4} Replicerende pokkenvirussen kennen een uitzonderlijk hoge homologe recombinatiefrequentie. Recombinatie beperkt zich tot pokkenvirussen uit hetzelfde genus vanwege de noodzakelijke sequentieovereenkomst tussen de virale genomen. Pokkenvirussen die de mens infecteren zijn naast het *Vaccinia virus*, het *Molluscum contagiosum virus* (MOCV), het *Cowpox virus* en het *Monkeypox virus*. MOCV is een algemeen voorkomend virus, maar behoort tot het genus *Molluscipoxvirus* en is fylogenetisch niet nauw verwant aan de orthopoxvirussen. Cowpox en monkeypox zijn orthopoxvirussen, maar het *Monkeypox virus* komt alleen voor in Centraal Afrika en bij diervverzorgers die geïnfecteerde apen verzorgen. *Cowpox virus* infecties zijn zeer zeldzaam.

Als inclusie criterium voor deze klinische studie geldt dat deelnemende proefpersonen gevaccineerd moeten zijn tegen pokken. Betreffende proefpersonen zullen hierdoor ook immuun zijn voor het *Cowpox virus*. De COGEM acht daarom de kans op en risico's van recombinitie tussen PROSTVAC-V en een ander pokkenvirus verwaarloosbaar klein.

7.4 Shedding en transmissie

PROSTVAC-V is gebaseerd op de *Vaccinia virus* vaccinstam TBC-Wy, die is afgeleid van de vaccinstam Dryvax. Na een grootschalige vaccinatieprocedure in de VS met Dryvax is bij 5-10 op de 100.000 gevaccineerden een vorm van contacttransmissie gerapporteerd. Na vaccinatie werd gedurende maximaal drie weken virus ter plekke van de injectieplaats uitgescheiden.

Proefpersonen die in onderhavige fase 3 studie geïncubeerd worden, dienen gevaccineerd te zijn tegen het humane pokkenvirus. Dit reduceert de kans op uitscheiding van virus, doordat het immuunsysteem de virale infectie sneller kan neutraliseren.

Bepaalde risicogroepen die een verhoogde kans hebben op het ontwikkelen van een virus infectie waarbij een verhoogde kans op uitscheiding bestaat, zullen worden uitgesloten van deelname. In deze studie worden immuungecompromiteerden en personen met acute of chronische aandoeningen van de huid, waarbij de epidermis is aangedaan, uitgesloten van deelname. Tevens worden proefpersonen uitgesloten die voor tenminste 3 weken na de vaccinatie met PROSTVAC-V niet kunnen vermijden dat contact plaatsvindt met de volgende risicogroepen: kinderen jonger dan 3 jaar, individuen met een historie van eczeem of andere acute of chronische huidaandoeningen, individuen met aangeboren of verworven deficiënties van het immuunsysteem, inclusief HIV geïnfecteerden, en zwangere vrouwen of vrouwen die borstvoeding geven.

Na vaccinatie zal de injectieplaats volledig worden afgedekt met een waterdichte niet-vasthechtende pleister.

Een fase 1 studie met PROSTVAC-V/F heeft aangetoond dat uitscheiding van PROSTVAC-V beperkt is.⁴³ Virus-DNA is tot 4 weken na vaccinatie aangetoond ter plekke van de injectie plaats, in serum en in 'peripheral blood mononuclear cells' (PBMC's). Geen viraal DNA kon worden aangetoond in saliva of urine. Opgemerkt moet worden dat het een zeer beperkt experiment betrof waarin slechts vier proefpersonen getest zijn.

De onderhavige fase 3 studie wordt uitgevoerd met 9 personen. Gebaseerd op de data verkregen uit de vaccinaties met Dryvax is de kans op contacttransmissie maximaal 0,01%.

De COGEM wijst erop dat de proefpersonen die deelnemen aan deze fase 3 studie eerder zijn gevaccineerd tegen het pokkenvirus. De aanwezige immuniteit tegen het pokkenvirus zal de kans op contacttransmissie, zoals gezien bij de vaccinatie met Dryvax reduceren. Tevens zal gedurende de periode dat shedding plaatsvindt contact met risicogroepen worden vermeden. De COGEM is derhalve van mening dat de contacttransmissie van PROSTVAC lager zal liggen dan die bij vaccinatie met Dryvax. Gezien de gerapporteerde contacttransmissie bij Dryvax, het beperkte aantal deelnemers aan de klinische studie en de gestelde inclusie- en exclusiecriteria acht de COGEM het zeer onwaarschijnlijk dat transmissie naar derden zal optreden, dit kan echter niet volledig uitgesloten worden.

PROSTVAC-F is afgeleid van de *Fowlpox virus* vaccinstam TBC-FPV. Het *Fowlpox virus* is niet in staat in humane cellen te repliceren. Hierdoor worden in de mens geen nieuwe infectieuze viruspartikels gevormd. Er zijn geen aanwijzingen dat de geïnsereerde sequenties in het virusgenoom van de TBC-FPV stam replicatie in humane cellen mogelijk maakt. Eventuele uitscheiding van PROSTVAC-F kan daarom alleen optreden door reflux na injectie van de proefpersonen met het vaccin. Om dit te voorkomen wordt direct na injectie de injectieplaats afgedekt met een waterbestendige niet-adhererende pleister. De COGEM acht de kans dat pluimvee geïnfecteerd zal worden door virus afkomstig van de injectieplaats verwaarloosbaar klein. De COGEM concludeert dat eventuele milieurisico's door uitscheiding van PROSTVAC-F vanuit de gevaccineerde proefpersonen verwaarloosbaar klein is.

8. Conclusie en advies

Op basis van de aangeleverde informatie betreffende de moleculaire karakterisering blijkt dat de geconstrueerde ggo's PROSTVAC-V en PROSTVAC-F afwijken van de beoogde ggo's. De aanvrager geeft geen toelichting op de impact van deze waargenomen verschillen op de eigenschappen van de ggo's. De COGEM is daarom van mening dat moleculaire karakterisering van PROSTVAC-V en PROSTVAC-F onvoldoende is.

Contact met het *Vaccinia virus* kan tot milde ziekteverschijnselen leiden. Enkele aan het virus gerelateerde complicaties zijn levensbedreigend (eczema vaccinatum, progressieve vaccinia, postvaccinia encefalitis, foetale vaccinia). Sommige vaccinia complicaties (eczema vaccinatum, progressieve vaccinia) kunnen resulteren in een toename van de uitscheiding van het virus in het milieu en daardoor tot een verhoogde kans op contacttransmissie.

Gebaseerd op de nadelige effecten die bij de vaccinatie met Dryvax zijn waargenomen, acht de COGEM het PROSTVAC-V beperkt pathogeen. Hierdoor hangen de risico's van dit ggo voor mens en milieu direct samen met de mogelijkheid dat het uitgescheiden wordt en zich onder de populatie verspreidt. Uit grootschalige vaccinatie met Dryvax is gebleken dat in het ernstigste geval bij 1 op 10.000 gevaccineerden contacttransmissie optreedt. Als de gestelde inclusie- en exclusiecriteria en voorgenomen werkvoorschriften niet in overweging worden genomen, is de COGEM van mening dat de kans op contacttransmissie bij voorgenomen klinische studie met PROSTVAC-V maximaal 0,01% is. Met betrekking tot onderhavige klinische studie worden voorwaarden gesteld om contact van de proefpersoon met risicogroepen te reduceren, waardoor de kans op en de ernst van een nadelig effect wordt beperkt. De COGEM wijst er hierbij tevens op dat deelnemers aan de studie zijn gevaccineerd, waardoor de mate van replicatie en mogelijke uitscheiding van PROSTVAC-V wordt verminderd. Daarbij zal de injectieplaats worden afgedekt met een waterbestendige en niet-adhererende pleister. Onder deze voorwaarden acht de COGEM de kans dat contacttransmissie zal optreden en tot een ernstig effect leidt zeer klein. Zij kan dit ondanks de voorgenomen maatregelen echter niet uitsluiten.

Om de risico's als gevolg van contacttransmissie verder te reduceren, is de COGEM van mening dat aanvullende managementmaatregelen nodig zijn. Zij adviseert de volgende aanvullende managementmaatregelen bij deze studie toe te passen:

- (Ziekenhuis)personeel dat medewerking verleent aan de studie mag niet behoren tot de risicogroepen waarvoor een verhoogde kans op contacttransmissie en/of een ernstig nadelig effect als gevolg van contacttransmissie geldt
- Ter voorkoming van ooginfecties dienen alle in de behandelkamer aanwezige personen een veiligheidsbril te dragen. Verder benadrukt de COGEM het belang van het direct desinfecteren van de handen van de behandelende arts en het verplegend personeel nadat PROSTVAC-V is toegediend
- De toediening dient plaats te vinden in een eenpersoonskamer onder navolging van de WIP richtlijnen.
- De proefpersoon en zijn omgeving (inclusief de huisarts) dient uitgebreid geïnstrueerd te worden over de wijze waarop de pleister vervangen en afgevoerd dient te worden.

Onder navolging van genoemde maatregelen verwacht de COGEM dat de risico's voor mens en milieu bij deze klinische studie met PROSTVAC-V/F vermoedelijk verwaarloosbaar klein zullen zijn. Door de beperkte moleculaire karakterisering van de ggo's is het dossier echter onvolledig. De COGEM acht aanlevering van deze aanvullende informatie noodzakelijk alvorens tot een eindoordeel te kunnen komen.

9. Aanvullende opmerking

De COGEM merkt op dat het onderhavige dossier zeer complex en onoverzichtelijk is. De informatie in het dossier is slecht gestructureerd en onvoldoende geordend. Het dossier kent veel bijlagen waarbij extra informatie in latere stadia is toegevoegd. Onduidelijk is vaak wanneer het gereviseerde informatie betreft of de nog oorspronkelijke onvolledige bijlagen. Er is geen scheiding aangebracht tussen voor de milieurisicoanalyse relevante en irrelevante informatie. Opvallend is dat de niet relevante informatie de bovenhand lijkt te voeren.

De slechte dossieropbouw heeft het uitvoeren van de milieurisicoanalyse gehinderd en nodeloos gecompliceerd, en veel extra tijd gekost. Daarbij wijst de COGEM er op dat het hier een vergunningaanvraag voor de introductie in het milieu van een ggo betreft. Met het oog op het winnen en het behouden van het vertrouwen van het publiek is transparantie en inzichtelijkheid van informatie van groot belang.

De COGEM adviseert om bij toekomstige vergelijkbare gevallen, de vergunningaanvrager te vragen een herzien dossier in te dienen, waarbij de informatie op overzichtelijke en eenduidige wijze gepresenteerd wordt.

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 & Fenner F (2001). Poxviruses. In: Fields Virology, volume 2, fourth edition. Eds Knipe DM *et al.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 2885-2921

3. Moss B (2001). Poxviridae: The viruses and their replication. In: Fields Virology, volume 2, fourth edition. Eds Knipe DM *et al.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 2849-84
4. Buller RML & Palumbo GJ (1991). Poxvirus pathogenesis. *Microbiol. Rev.* 80-122
5. Lewis-Jones S (2004). Zoonotic poxvirus infections in humans. *Curr. Opin. Inf. Dis.* 17: 81-9
6. Trindade *et al.* (2007). Brazilian Vaccinia viruses and their origins. *Emerging Infectious Diseases* 13(7): 965-972
7. Fulginiti VA *et al.* (2003). Smallpox vaccination: A review, Part I. Background, vaccination technique, normal vaccination and revaccination, and expected normal reactions. *Clinical Infectious Diseases* 37:241–50
8. Fulginiti VA *et al.* (2003). Smallpox vaccination: A review, Part II. Adverse events. *Clinical Infectious Diseases* 37: 251–71
9. Fenner F *et al.* (1988). Smallpox and its eradication. *History of International Public Health*, No. 6. World Health Organization 1988
10. Talbot TR *et al.* (2004). Risk of Vaccinia transfer to the hands of vaccinated persons after smallpox immunization. *Clin Infect Dis* 35: 536-41
11. Sepkowitz K (2003). How contagious is Vaccinia? *N Engl J Med* 348(5): 439-46
12. Nalca A & Zumbrun E (2010). ACAM 2000: The new smallpox vaccine for United States strategic national stockpile. *Drug Design, Development and Therapy* 4: 71-79
13. Qin L *et al.* (2011). Genomic analysis of the Vaccinia virus strain variants found in Dryvax vaccine. *J Virol* 85: 13049-13060
14. Neff J *et al.* (2008). Monitoring the safety of a Smallpox vaccination program in the United States: Report of the Joint Smallpox Vaccine Safety Working Group of the Advisory Committee on Immunization Practices and the Armed Forces Epidemiological Board. *Clinical Infectious Diseases* 46: S258–70
15. Morgan J *et al.* (2008). Myocarditis, pericarditis, and dilated cardiomyopathy after smallpox vaccination among civilians in the United States, January–October 2003. *Clinical Infectious Diseases* 46: S242–50
16. Young GE *et al.* (2011). Secondary and tertiary transmission of Vaccinia virus from US Military Service member. *Emerging Infectious Diseases* 17(4): 718-721
17. <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm180810.htm>
18. Weli SC & Tryland M (2011). Avipoxviruses: infection biology and their use as vaccine vectors. *Virology J.* 8: 49
19. Hess C *et al.* (2011). Outbreak of cutaneous form of poxvirus on a commercial turkey farm caused by the species fowlpox. *Avian. Dis.* 55(4): 714-718
20. Weli SC *et al.* (2004). Morphogenesis of fowlpox virus in a baby hamster kidney cell line. *Med Electron Microsc* 37: 225–235
21. Weli SC *et al.* (2005). Avipoxviru multiplication in a mammalian cell line. *Virus Research* 109: 39-49
22. Horoszewicz JS *et al.* (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Research* 43: 1809-1818
23. Terasawa H *et al.* (2002) Identification and characterization of a human agonist cytotoxic T-lymphocyte epitope of human prostate-specific antigen. *Clinical Cancer Research* 8: 41-53
24. Garnet CT *et al.* (2006). TRICOM vector based cancer vaccines. *Curr Pharm Des* 12: 351-361.

25. DeFillippes FM (1982). Restriction enzyme mapping of Vaccinia virus DNA. *J Virology* 43(1): 136-149
26. Goebel SJ *et al.* (1990). The complete DNA sequence of *Vaccinia virus*. *Virology* 179: 247-266
27. Jenkins S *et al.* (1991) Formation of Lentivirus particles by mammalian cells infected with recombinant Fowlpox virus. *AIDS Research and Human Retroviruses* 7(12): 991-998
28. Afonso CL *et al.* (2000). The genome of Fowlpox virus. *J Virology* 74(8): 3815–3831
29. COGEM (2003). Classificatie geattenueerde pokkenvirusstammen en aanvullende voorschriften. COGEM advies CGM/030519-06
30. COGEM (2003). Classificatie geattenueerde pokkenvirusstammen. COGEM advies CGM/030922-04
31. COGEM (2012). Classificaties van humaan- en dierpathogene virussen. COGEM advies CGM/120301-01
32. COGEM (2006). Fase I klinische studie met een genetisch gemodificeerd MVA virus gericht tegen HIV-B. COGEM advies CGM/061012-01
33. COGEM (2012). Klinische studie met genetisch gemodificeerd Modified vaccinia virus Ankara vaccin dat codeert voor het Hemagglutinine van Influenza A virus. COGEM advies CGM/120625-01
34. COGEM (2012). Aanvullende informatie klinische studie met gg-MVA-HA vaccin. COGEM advies CGM/120928-01
35. COGEM (2008). Fase II klinische studie met een genetisch gemodificeerd *Vaccinia virus* als vaccin tegen HIV-B. COGEM advies CGM/081106-01
36. Australian Government, Office of de Gene technology Regulator (2012). Limited and controlled release of genetically modified viral vaccines against prostate cancer.
[http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/dir116-3%5C\\$FILE%5Cdir116ramp.pdf](http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/dir116-3%5C$FILE%5Cdir116ramp.pdf)
37. Advisory Committee on releases to the environment (2012). Advice on an application for deliberate release of a GMO for research and development purposes. <http://www.defra.gov.uk/acre/files/ACRE-ADVICE-PROSTVAC.pdf>
38. Bioveiligheidsraad (2012). Advice of the Belgian Biosafety Advisory Council on the notification B/BE/11/BVW2 of the company BN ImmunoTherapeutics for deliberate release in the environment of genetically modified organisms other than higher plants for research and development. http://www.bio-council.be/docs/BAC_2012_0721_consolide.pdf
39. COGEM (2013). Criteria voor moleculaire karakterisering van ggo's voor medische en veterinaire toepassing. COGEM advies CGM/130227-05
40. Kretzschmar M *et al.* (2006). Frequency of adverse events after vaccination with different Vaccinia strains. *PLOS Medicin* 3(8): e272
41. Dipaola R *et al.* (2006). A phase I trial of pox PSA vaccines (PROSTVAC(r)-VF) with B7-1, ICAM-1 and LFA-3 co-stimulatory molecules in patients with prostate cancer. *J Transl Med* 4:1
42. Kaufman HKL *et al.* (2004). Phase II randomized study of vaccine treatment of advanced prostate cancer (E7897): a trial of the Eastern cooperative oncology group *J Clin Oncol* 22: 2122-2123
43. Arlen PM *et al.* (2007). Clinical safety of a viral vector based prostate cancer vaccine strategy. *J Urology* 178: 1515-1520