

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

DATUM 26 september 2013
KENMERK CGM/130926-01
ONDERWERP Advies: aanvullende informatie over klinische studie met PROSTVAC-V/F vaccin

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een aanvullend adviesvraag over de vergunningaanvraag IM-MV 12-008 getiteld 'A randomized double-blind, phase 3 efficacy trial of PROSTVAC-V/F ± 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:

Recent heeft de COGEM advies uitgebracht over een vergunningaanvraag betreffende een klinische studie met de recombinante virusvaccins PROSTVAC-V en PROSTVAC-F. In deze studie wil de aanvrager onderzoeken of het vaccin de levensverwachting van patiënten met prostaatkanker verlengt.

In het advies concludeerde de COGEM dat bepaalde gegevens ontbraken, in het bijzonder relevante experimentele gegevens betreffende de moleculaire karakterisering. Deze gegevens zijn noodzakelijk om de veronderstelling, dat de risico's voor mens en milieu onder de voorgenoemde werkvoorschriften verwaarloosbaar klein zijn, te onderbouwen. Daarnaast adviseerde de COGEM aanvullende managementmaatregelen in acht te nemen ten einde de risico's als gevolg van contacttransmissie te reduceren.

Naar aanleiding van het advies heeft de aanvrager aanvullende managementmaatregelen in zijn instructiedocumenten opgenomen. Daarnaast heeft hij nieuwe informatie betreffende de moleculaire karakterisering aangeleverd.

Ten aanzien van de instructiedocumenten over de te nemen managementmaatregelen acht de COGEM nog verbetering van enkele punten noodzakelijk. De moleculaire karakterisering van beide recombinante vaccins acht zij niet volledig. Ook de identiteit van ouderorganisme TBC-Wy is naar de mening van de COGEM onvoldoende vastgesteld.

Om bij de introductie in het milieu de milieurisico's van een genetisch gemodificeerde organisme (ggo) te kunnen beoordelen, is een gedegen moleculaire karakterisering van het ggo noodzakelijk. Daarom acht de COGEM aanlevering van aanvullende informatie essentieel 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,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop followed by a horizontal line and a small dash.

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

Aanvullende informatie over klinische studie met een recombinant *Vaccinia virus*- en *Fowlpox virus*-vaccin bij patiënten met prostaatkanker

COGEM advies CGM/130926-01

1. Inleiding

Recent heeft de COGEM advies uitgebracht over een vergunningaanvraag betreffende een fase 3 klinische studie met het recombinante vaccin PROSTVAC-V/F.¹ In deze studie wil de aanvrager onderzoeken of het vaccin PROSTVAC-V/F de levensverwachting van patiënten met minimaal gemetastaseerde, castratie-resistente prostaatkanker verlengt. De vergunningaanvraag is ingediend door het UMC St. Radboud te Nijmegen.

In haar advies merkte de COGEM op dat de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen klinische studie vermoedelijk verwaarloosbaar klein zijn als aanvullende managementmaatregelen worden gehanteerd. Echter, door het ontbreken van bepaalde onderbouwende gegevens betreffende de moleculaire karakterisering van het genetisch gemodificeerde (gg) vaccin, kon niet nagegaan worden of het genetisch gemodificeerde organisme (ggo) daadwerkelijk overeenkomt met het in de vergunningaanvraag geschetste ggo. Alvorens zij tot een definitief eindoordeel kon komen, achtte de COGEM aanlevering van aanvullende informatie over de moleculaire karakterisering daarom noodzakelijk.

Naar aanleiding van dit advies heeft de aanvrager aanvullende informatie aangeleverd. De COGEM is gevraagd deze informatie te beoordelen en opnieuw te adviseren over de eventuele milieurisico's van de voorgenomen klinische studie.

2. Belangrijke aspecten van het vaccin

Tijdens de studie wordt gebruik gemaakt van twee levende 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).

Vaccinstam TBC-FPV is geïsoleerd uit het door de 'United States Department of Agriculture' (USDA) geregistreerde commercieel verkrijgbare kippenvaccin POXVAC-TC. Vaccinstam TBC-Wy is afgeleid van het New York City Board of Health (NYCBH) vaccin. Het NYCBH vaccin bestaat uit diverse *Vaccinia virus* subpopulaties. Vanuit dit vaccin zijn diverse andere vaccins verkregen waaronder het vaccin Dryvax.² Dryvax is in de Verenigde Staten bij grootschalige vaccinatieprogramma's tegen bij de mens voorkomende pokken toegepast en bestaat eveneens uit verschillende *Vaccinia virus* subpopulaties. Deze subpopulaties variëren in virulentie.² In de informatie aangeleverd bij de vorige adviesvraag beroept de aanvrager zich op de historie van veilig gebruik van Dryvax en claimt hij dat, op basis van een neurovirulentie test bij muizen, de virulentie van TBC-Wy 10-100 keer lager is dan die van Dryvax.¹

De gg-virusstammen PROSTVAC-V en PROSTVAC-F brengen dezelfde vier humane cDNA-sequenties tot expressie. Eén gen codeert voor een antigeen dat specifiek is voor humane prostaatcellen (PSA).³ De andere drie genen coderen voor eiwitten die een stimulerende werking hebben op het T-cel gebaseerde immuunsysteem van de mens. Het betreft het lymfocytfunctie-geassocieerd antigeen-3 (LFA-3), het intercellulair adhesiemolecuul-1 (ICAM-1) en B7.1. Deze eiwitten staan samen bekend onder de naam TRICOM.⁴ 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.

3. De voorgenomen werkzaamheden

In Nederland zullen maximaal 40 proefpersonen aan de studie deelnemen van wie ongeveer 9 in het UMC St. Radboud in Nijmegen. De proefpersonen worden eerst gevaccineerd 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 de immuunrespons te versterken met behulp van zes opeenvolgende vaccinaties met PROSTVAC-F (1×10^9 pfu per dosis). Tevens wordt onderzocht of het adjuvans GM-CSF de immuunrespons nog verder kan stimuleren. De injectie van PROSTVAC-V of F, al dan niet in combinatie met GM-CSF zullen subcutaan toegediend worden in de bovenarm of het bovenbeen. De toediening is poliklinisch en vindt om de twee weken plaats. De totale studieduur bedraagt 6 maanden.

4. Eerdere COGEM adviezen

In het voorgaande advies over de klinische studie met PROSTVAC-V/F heeft de COGEM aangegeven dat zij PROSTVAC-V als beperkt pathogeen beschouwt.¹ Door het geringe aantal deelnemers, de gestelde inclusie- en exclusiecriteria en de voorgenomen managementmaatregelen, achtte zij het zeer onwaarschijnlijk dat transmissie naar derden op zal treden. Zij kon dit echter niet uitsluiten. Om de risico's als gevolg van contacttransmissie te reduceren, heeft zij daarom aanvullende managementmaatregelen geadviseerd.

Daarnaast achtte de COGEM de moleculaire karakterisering van PROSTVAC-V/F onvoldoende. De experimentele data van Southern blot en PCR analyses die waren uitgevoerd om PROSTVAC-V en PROSTVAC-F in kaart te brengen, waren niet aangeleverd. Tevens bleken de aangeleverde genomsequenties van beide gg-virusstammen op verschillende punten af te wijken van de *in silico* vervaardigde beoogde sequenties. Ook kwamen de sequenties van het, door de aanvrager gestelde, 'identieke' insert van beide gg-virusstammen, niet overeen. De aanvrager ging niet in op deze verschillen en op de mogelijke impact die deze mutaties zouden kunnen hebben op de eigenschappen van beide ggo's.

Om de milieurisico's van een ggo te kunnen beoordelen, is een gedegen moleculaire karakterisering van het ggo noodzakelijk. Aan het begin van dit jaar heeft de COGEM in een advies uiteengezet aan welke voorwaarden de moleculaire karakterisering van een ggo dat als gevolg van een klinische of veterinaire studie in het milieu wordt geïntroduceerd, moet voldoen.⁵ In het advies zijn de voorwaarden in drie onderdelen opgesplitst. Ten eerste dient de identiteit van het uitgangsgo te worden vastgesteld.

vastgesteld te worden. Daarnaast is het van belang om te weten welke genetische elementen aan het ggo zijn toegevoegd of zijn onttrokken, en wat de functie van deze elementen is. Als laatste dienen ook eventueel opgetreden onbedoelde wijzigingen in kaart gebracht te worden. Dit betreft de analyse van mogelijk opgetreden herschikkingen, deleties of puntmutaties in het genoom van het ggo. Bovendien dient in kaart gebracht te worden of er onbedoeld andere stukken DNA, die bij de constructie van het ggo aanwezig zijn, in het genoom van het ggo zijn geïntroduceerd. De voorwaarden voor de moleculaire karakterisering van op virus gebaseerde ggo's zijn door de COGEM in haar advies als volgt gespecificeerd:

Identificatie van het uitgangsgenoom

- De identiteit van het uitgangsgenoom dient vastgesteld te zijn. Dit kan op basis van enkele specifieke kenmerken in de sequentievolgorde van het genoom van betreffend uitgangsgenoom.

Karakterisering van beoogde modificatie

- Indien sequenties aan een micro-organisme worden toegevoegd, moet bekend zijn welke elementen in het ggo zijn geïntroduceerd, evenals het aantal aanwezige kopieën van de insertiecassette, de exacte locatie en de functie van deze elementen.
- Indien een of meerdere genen uit het genoom van het micro-organisme worden verwijderd of het ORF van deze genen wordt onderbroken, moet bekend zijn welke elementen niet meer tot expressie komen, wat de exacte locatie van de wijzigingen zijn en wat de functie van deze elementen is.
- Indien de wijziging een of meerdere puntmutaties betreft moet exact bekend zijn welke mutaties aangebracht worden en moeten zowel de oorspronkelijke als nieuwe eigenschappen van betreffend gen aangegeven worden.
- Bovengenoemde wijzigingen moeten volledig gekarakteriseerd zijn door middel van sequentiebepaling. Deze sequentiebepaling omvat de regio van de beoogde wijziging inclusief eventueel gebruikte recombinatiesequenties en moet zich uitstrekken tot in de flankerende sequenties van het genoom van het uitgangsgenoom.
- Indien de betreffende ggo's biologisch niet-ingeperkt zijn, moeten, als extra veiligheid, de fusie-ORFs in kaart worden gebracht en, waar mogelijk, hun eventuele functie worden beschreven.

Karakterisering van onbedoelde wijzigingen in genoom van ggo

- Het ggo moet geanalyseerd worden op de eventuele aanwezigheid van onbedoelde heterologe sequenties. Dit kan op basis van een controle van het restrictiepatroon, een uitgebreide Southernblot analyse of een sequentieanalyse van het volledige genoom van het ggo.
- Het genoom van gg-virussen dient gecontroleerd te worden op deleties en/of herschikkingen en de impact van onverwachte wijzigingen moet worden toegelicht. De genomische organisatie kan afdoende in kaart worden gebracht met een aantal Southernblot analyses of een

vergelijking van de in theorie verwachte en de in de praktijk verkregen nucleotidevolgorde van het ggo.

5. Overwegingen op basis van de nieuw aangeleverde aanvullende informatie

5.1 Aanvullende managementmaatregelen

De aanvrager geeft aan dat alle door de COGEM geadviseerde managementmaatregelen in de voor het behandelend personeel en proefpersonen bestemde instructiedocumenten zijn opgenomen. De COGEM merkt op dat zij heeft geadviseerd dat alle in de behandelkamer aanwezige personen een veiligheidsbril dienen te dragen ten einde ooginfecties te voorkomen. De COGEM wijst er op dat het dragen van deze bril niet alleen het (ziekenhuis)personeel betreft maar ook de proefpersoon. Dit laatste is volgens de COGEM nog niet correct in het instructieprotocol verwerkt. De COGEM adviseert dit punt alsnog in het protocol op te nemen.

Bij toediening van het vaccin en/of verschoning van de pleister, zal het personeel handschoenen dragen. Na deze handelingen zullen de handschoenen worden afgevoerd in een afgesloten plastic zak en de handen worden gewassen met water en zeep. De COGEM benadrukt dat, voorafgaand aan het wassen met water en zeep, de handen gedesinfecteerd moeten worden. Desinfectie dient plaats te vinden met handalcohol, zoals voorgeschreven in de standaardrichtlijn 'Handhygiëne medewerkers in ziekenhuizen'.⁶ De COGEM acht het van belang dat deze standaardrichtlijn wordt gevolgd.

5.2 Moleculaire karakterisering

Om de milieurisico's van een ggo te kunnen beoordelen, is een gedegen moleculaire karakterisering van het ggo noodzakelijk. De COGEM heeft de nieuwe door de aanvrager aangeleverde gegevens betreffende de moleculaire karakterisering van PROSTVAC-V/F getoetst aan de in sectie 4 weergegeven criteria.⁵ Deze toetsing wordt puntsgewijs besproken in secties 5.2.1 (PROSTVAC-V) en 5.2.2 (PROSTVAC-F).

5.2.1 Moleculaire karakterisering PROSTVAC-V

5.2.1.1 Identificatie uitgangsgenoom TBC-Wy

PROSTVAC-V is gebaseerd op uitgangsgenoom TBC-Wy. Ter identificatie van TBC-Wy heeft de aanvrager het genoom van de stam geanalyseerd met behulp van restrictiepatroon-analyse en Southern blots. Tevens is de sequentie van het genoom van TBC-Wy bepaald en vergeleken met het genoom van andere *Vaccinia* virussen. Aan de hand van een fylogenetische boom wordt de onderlinge verwantschap met deze andere *Vaccinia* virussen geïllustreerd.

Door de wijze waarop de restrictieanalyse en Southern blots zijn uitgevoerd en door de slechte kwaliteit van de aangeleverde figuren, is de COGEM van mening dat op basis van de Southern blot analyses geen conclusie getrokken kan worden over de identiteit van uitgangsgenoom TBC-Wy.

De COGEM wijst er op dat de herkomst van uitgangsgenoom TBC-Wy niet eenduidig beschreven wordt. Enerzijds geeft de aanvrager aan dat TBC-Wy een plaque gezuiverd isolaat is, rechtstreeks

afkomstig van het NYCBH *Vaccinia virus* vaccin. Anderzijds geeft de aanvrager aan dat TBC-Wy een plaque gezuiverd isolaat is, verkregen uit het Dryvax vaccin, en op deze wijze indirect verkregen is van het NYCBH *Vaccinia virus* vaccin.

De COGEM acht de vergelijking van de sequentiedata met die van verwante virusstammen een goede manier om de identiteit van het uitgangsgenoom vast te stellen. De aanvrager heeft door middel van een vergelijkende genoomsequentie-analyse onder andere gekeken naar de algemene organisatie van de 'open reading frames' (ORF's). Tevens zijn enkele fenotypische kenmerken gecontroleerd. Op basis van de aangeleverde weergave van de fylogenetische boom concludeert de COGEM dat TBC-Wy een *Vaccinia virus* is. De analyse verschaft echter geen duidelijkheid over eventuele verwantschap van TBC-Wy met *Vaccinia virus* varianten aanwezig in het Dryvax vaccin. Hieruit concludeert de COGEM dat het uit de bijgevoegde sequentievergelijking niet mogelijk is om vast te stellen of TBC-Wy al dan niet uit Dryvax verkregen is.

Echter, de door de aanvrager aangeleverde milieurisicobeoordeling is gebaseerd op het feit dat PROSTVAC-V van Dryvax is afgeleid. De COGEM acht het van belang dat eerst helderheid verkregen wordt over de herkomst van TBC-Wy, voordat de veronderstelde veiligheid van Dryvax ook naar ouderorganisme TBC-Wy geëxtrapoleerd kan worden.

Samengevat concludeert de COGEM dat de identiteit van ouderorganisme TBC-Wy niet afdoende is vastgesteld.

De COGEM merkt op dat voor het vaststellen van de identiteit van TBC-Wy aan de hand van een vergelijkende genoomanalyse de publicatie van Qin *et al.* (2011) gebruikt kan worden.⁷ In deze analyse zijn genoomsequenties van verscheidene Dryvax *Vaccinia virus* varianten met elkaar vergeleken.

5.2.1.2 Karakterisering van de beoogde modificatie

De aanvrager heeft de beoogde modificatie geanalyseerd met behulp van restrictiepatroon-analyse en Southern blots. Daarnaast heeft de aanvrager van de 'master virus stock' de nucleotidevolgorde van de insertiecassette, en 850 bp 'upstream' en 'downstream' van de insertieplaats in het genoom van TBC-Wy door middel van sequentiebepaling bepaald.

De Southern blots zijn gehybridiseerd met probes specifiek voor de insertiecassettes PSA, LFA-3, ICAM-1 en B7.1, en een probe specifiek voor de *HindIII* F-regio van het *Vaccinia virus*. Door de wijze waarop de restrictieanalyse en Southern blots zijn uitgevoerd, en door de relatief slechte kwaliteit van enkele figuren, kan de COGEM de uitspraken van de aanvrager moeilijk verifiëren. Zij acht daarom de moleculaire karakterisering van de beoogde modificatie op basis van de Southern blot analyses onvolledig en niet bruikbaar voor de milieurisicoanalyse.

De sequentie van het insert en flankerende regio's werd vergeleken met de nucleotidevolgorde van het insert aanwezig in de - voor de constructie van PROSTVAC-V gebruikte - plasmidevector. Daarbij

werden 10 verschillen waargenomen. Deze verschillen betroffen zowel mutaties, inserties als deleties, en varieerden in grootte van 1 tot circa 60 nucleotiden. De aanvrager geeft geen uitleg waarom de nucleotidevolgorde van het insert in het beoogde ggo anders is dan de insertiesequentie in de gebruikte constructievector. De aanvrager concludeert dat deze mutaties zich buiten de coderende sequenties van de geïnsereerde transgenen bevinden en daarom geen impact hebben.

De COGEM wijst er op dat ook wijzigingen in niet-coderende sequenties van invloed kunnen zijn op de fenotypische eigenschappen en biologische veiligheid van een organisme. Zij acht het daarom voor de milieurisicobeoordeling van belang dat de impact van de waargenomen verschillen op de eigenschappen van het ggo op wetenschappelijk onderbouwde wijze wordt toegelicht.

De nucleotidevolgorde van het volledige genoom van twee verschillende batches van PROSTVAC-V is bepaald. Deze batches betreffen vaccin toegediend tijdens een eerder uitgevoerde klinische fase 1/2 studie met PROSTVAC-V, en vaccin dat tijdens de op handen zijnde fase 3 studie gebruikt zal gaan worden. De twee sequenties zijn met elkaar vergeleken, en vergeleken met een sequentie van PROSTVAC-V die de aanvrager *in silico* gegenereerd heeft. Deze *in silico* gegenereerde sequentie is samengesteld uit de genoomsequentie van *Vaccinia virus* variant ACAM2000 en een sequentie van het transgene insert. De herkomst van deze insertsequentie is niet aangeleverd. De aanvrager concludeert op basis van de analyse dat de twee vaccin-batches van PROSTVAC-V genetisch stabiel zijn.

De COGEM merkt op dat het niet duidelijk is hoe de sequentie van het transgene insert uit de twee vaccin-batches zich verhoudt ten opzichte van de transgene insertiesequentie uit de master virus stock. Zoals eerder aangegeven, werden er 10 verschillen waargenomen tussen het beoogde insert in de mastervirus stock en het insert in de gebruikte constructievector. De COGEM acht het noodzakelijk dat verduidelijkt wordt hoe de insertsequenties in de twee vaccin batches, de master virus stock en de gebruikte constructievector zich tot elkaar verhouden. Op deze wijze kan de identiteit van het transgene insert in het toe te passen ggo eenduidig vastgesteld worden.

De COGEM wijst er verder op dat de *in silico* gegenereerde genoomsequentie gebaseerd is op *Vaccinia virus* variant ACAM2000, en niet op de genoomsequentie van het ouderorganisme TBC-Wy. Zij kan daarom niet vaststellen of er in PROSTVAC-V al dan niet herschikkingen rondom de recombinatiesite hebben plaatsgevonden.

Mede gezien het feit dat het op *Vaccinia virus* gebaseerde PROSTVAC-V in de mens kan repliceren, acht de COGEM het van belang dat de overgangssequenties tussen insert en flankerend acceptorgenoom gecontroleerd worden op de aanwezigheid van fusie-ORF's. Indien deze aanwezig zijn, dienen deze bioinformatisch te worden geanalyseerd en hun eventuele impact door de aanvrager in de milieurisicobeoordeling te worden meegenomen.

Samengevat concludeert de COGEM dat op grond van bovenstaande overwegingen de beoogde genetische modificatie in PROSTVAC-V niet afdoende is gekarakteriseerd.

5.2.1.3 Karakterisering van onbedoelde wijzigingen in het genoom van PROSTVAC-V

Zoals beschreven in 5.2.1.2 is de nucleotidevolgorde van het volledige genoom van twee verschillende vaccinbatches van PROSTVAC-V bepaald en vergeleken met een sequentie van PROSTVAC-V die de aanvrager *in silico* heeft gegenereerd.

Met behulp van een vergelijkende genomanalyse van het ouderorganisme en het beoogde ggo kunnen onbedoelde wijzigingen in het genoom van een ggo in kaart worden gebracht. De COGEM wijst er op dat voor de *in silico* gegenereerde sequentie geen gebruik is gemaakt van de genomsequentie van het ouderorganisme TBC-Wy, maar van de genomsequentie van een andere *Vaccinia virus* variant, namelijk ACAM2000 uit Dryvax. Door deze wijze van vergelijken, kan de COGEM geen uitsluitel geven of er al dan niet onbedoelde wijzigingen in het genoom van PROSTVAC-V hebben plaatsgevonden. Daarom acht zij de moleculaire karakterisering van PROSTVAC-V op dit punt onvolledig. De COGEM wijst er hierbij op dat, indien er bij een nieuwe vergelijkende genomsequentie-analyse onbedoelde wijzigingen aan het licht komen, de eventuele impact op de eigenschappen van het ggo door de aanvrager in de milieurisicobeoordeling meegenomen dient te worden.

5.2.2 Moleculaire karakterisering PROSTVAC-F

5.2.2.1 Identificatie uitgangorganisme TBC-FPV

PROSTVAC-F is gebaseerd op uitgangsstam TBC-FPV. Ter identificatie heeft de aanvrager het genoom van de stam geanalyseerd met behulp van restrictiepatroon-analyse en Southern blots. Tevens is de sequentie van het genoom van TBC-FPV bepaald en vergeleken met het genoom van andere virussen binnen de genera *Avipoxvirus* en *Orthopoxvirus*.

Wederom moet opgemerkt worden dat door de slechte kwaliteit van de figuren en de wijze waarop de restrictieanalyse uitgevoerd is, het voor de COGEM niet mogelijk is om conclusies te trekken over de identiteit van uitgangorganisme TBC-FPV.

Zoals eerder aangegeven, acht de COGEM een vergelijking van de genomsequentie met die van verwante virussen een goede manier om de identiteit van het uitgangorganisme vast te stellen. De aanvrager heeft bij deze vergelijking onder andere gekeken naar de algemene organisatie van de ORF's en tevens zijn enkele fenotypische kenmerken gecontroleerd. Op basis van bovenstaande overweging is de COGEM van mening dat de identiteit van uitgangorganisme TBC-FPV afdoende is vastgesteld.

5.2.2.2 Karakterisering van de beoogde modificatie

In de informatie behorende bij het voorgaande COGEM advies over PROSTVAC-V/F, heeft de aanvrager aangegeven dat de recombinatiesite van de insertiecassette in PROSTVAC-F gelegen is in de *BamHI* J-regio van ouderorganisme TBC-FPV. Door de recombinatie is het in deze regio gelegen FPV246 gen geïnactiveerd.¹ De aanvrager heeft de beoogde modificatie geanalyseerd met behulp van restrictiepatroon-analyse en Southern blotanalyses. Daarnaast heeft de aanvrager van de master virus stock de nucleotidevolgorde van het gehele insert, en 1000 bp upstream en downstream van de insertiesite bepaald.

De Southern blots zijn gehybridiseerd met probes specifiek voor de insertiecassettes PSA, LFA-3, ICAM-1 en B7.1, en een probe specifiek voor de *Bam*HI J-regio van het *Fowlpox virus*. De COGEM acht op basis van deze analyses aangetoond dat van elk van de elementen één kopie in het genoom van ouderorganisme TBC-FPV is geïnsereerd.

De sequentie van het insert en flankerende regio's werd vergeleken met de nucleotidevolgorde van het insert aanwezig in de, voor de constructie van PROSTVAC-F gebruikte, plasmidvector. Daarbij werden 11 verschillen waargenomen. Deze verschillen betroffen zowel mutaties als deleties van enkele nucleotiden. De aanvrager concludeert dat een deel van de te verwachte sequenties onjuist was voorspeld en gaat verder niet in op de impact van deze mutaties.

De COGEM is van mening dat de waargenomen mutaties van invloed kunnen zijn op de fenotypische eigenschappen en biologische veiligheid van het ggo. Zij acht het daarom voor de milieुरisicobeoordeling van belang dat de impact van deze verschillen op de eigenschappen van het ggo op wetenschappelijk onderbouwde wijze wordt toegelicht. Zij acht het tevens van belang dat de aanvrager de impact van de inactivatie van het FPV246 gen van ouderorganisme TBC-FPV in deze beoordeling meeneemt.

De nucleotidevolgorde van het volledige genoom van twee verschillende batches van PROSTVAC-F is bepaald. Deze batches betreffen vaccin toegediend tijdens een eerder uitgevoerde klinische fase 1/2 studie met PROSTVAC-F, en vaccin dat tijdens de op handen zijnde fase 3 studie gebruikt zal gaan worden. Deze twee sequenties zijn met elkaar vergeleken, en vergeleken met een sequentie van PROSTVAC-F die de aanvrager *in silico* gegenereerd heeft. Deze *in silico* gegenereerde sequentie is samengesteld uit de genoomsequentie van TBC-FPV en de sequentie van het insert aanwezig in de master virus stock. In de alignment is de geïnsereerde gencassette in een ander lettertype weergegeven.

De COGEM wijst er op dat de recombinatiesites niet in de alignment zijn aangegeven. Om te kunnen beoordelen of er tijdens de recombinatie herschikkingen hebben plaatsgevonden, acht de COGEM het van belang dat deze recombinatiesites in de alignment zichtbaar worden gemaakt.

Aangezien het een biologisch ingeperkt ggo betreft, wijst de COGEM er op dat het voor PROSTVAC-F niet nodig is de aanwezigheid van fusie-ORF's in de overgangssequenties tussen insert en flankerend acceptorgenoom in kaart te brengen en de eventuele functie daarvan te beschrijven.

Samengevat concludeert de COGEM dat op grond van bovenstaande overwegingen de beoogde genetische modificatie in PROSTVAC-F niet afdoende is gekarakteriseerd.

5.2.2.3 Karakterisering van onbedoelde wijzigingen in het genoom van PROSTVAC-F

Zoals beschreven in 5.2.2.2 is de nucleotidevolgorde van het volledige genoom van twee verschillende vaccin batches van PROSTVAC-F bepaald en vergeleken met een sequentie van PROSTVAC-F die de aanvrager *in silico* heeft gegenereerd. Uit deze analyse blijkt dat het complete genoom van de twee batches PROSTVAC-F 1% verschilt van de *in silico* gegenereerde sequentie. De aanvrager gaat niet in op de aard van aangetroffen afwijkingen en de mogelijke implicaties.

De COGEM is van mening dat met de uitgevoerde alignment eventueel aanwezige onbedoelde wijzigingen in kaart kunnen worden gebracht. Vanuit het oogpunt van de milieuristicobeoordeling wijst zij er op dat het bepalen van de mogelijke impact van onbedoelde wijzigingen in het genoom op de eigenschappen van het betreffende ggo essentieel is. De COGEM is van mening dat dit aspect in de vergunningaanvraag onderbelicht is en acht de karakterisering van onbedoelde wijzigingen in PROSTVAC-F daarom onvoldoende.

Aanvullend merkt de COGEM op dat de aanvrager aangeeft dat de PSA en TRICOM bevattende insertiecassette voor beide ggo's PROSTVAC-V en PROSTVAC-F identiek zijn. De COGEM wijst er op dat op basis van de aangeleverde genoomsequenties de insertiecassette in PROSTVAC-V 5034 nucleotiden en in PROSTVAC-F 4978 nucleotiden bedraagt. De COGEM acht het voor de milieuristicobeoordeling van belang dat de aanvrager deze inconsistentie toelicht.

6. Conclusie en advies

Onder de voorwaarde dat de aanvrager aan de instructiedocumenten toevoegt dat álle in de behandelkamer aanwezige personen een veiligheidsbril dragen, en dat de handen, na toediening van het vaccin en/of verschoning van de pleister en na het uittrekken van handschoenen gedesinfecteerd worden met alcohol, alvorens deze te wassen met water en zeep, acht de COGEM de voorgenomen managementmaatregelen afdoende.

Op basis van de nieuw aangeleverde informatie betreffende de moleculaire karakterisering concludeert de COGEM dat de herkomst van ouderorganisme TBC-Wy onduidelijk is en dat zijn identiteit onvoldoende is vastgesteld. Daarnaast acht de COGEM de beoogde modificaties van zowel PROSTVAC-V als PROSTVAC-F onvoldoende moleculair gekarakteriseerd. Tevens acht de COGEM het van belang dat de aanvrager de impact van onderlinge verschillen, die waargenomen zijn tussen de geïnsereerde gencassettes enerzijds, en de genetische achtergrond van oudervirussen en gg-virusstammen anderzijds, meeneemt in de milieuristicobeoordeling. De COGEM merkt op dat de benodigde gegevens als volgt te verkrijgen zijn:

- Identificatie van ouderorganisme TBC-Wy kan verkregen worden door zijn genoomsequentie te vergelijken met genoomsequenties van *Vaccinia virus* varianten aanwezig in het Dryvax vaccin. Verwantschap kan aan de hand van een fylogenetische analyse geïllustreerd worden.
- De identiteit van het insert in PROSTVAC-V dient eenduidig vastgesteld te worden.
- De genetische achtergrond van PROSTVAC-V dient vergeleken te worden met de genetische achtergrond van het ouderorganisme TBC-Wy.
- Van PROSTVAC-V dienen overgangssequenties van insert en flankerend acceptorgenoom gecontroleerd te worden op de aanwezigheid van fusie-ORF's. Indien aanwezig, dienen deze bioinformatisch geanalyseerd en dient hun eventuele impact in de milieuristicobeoordeling meegenomen te worden.

- Van PROSTVAC-F dient de impact van de inactivatie van het FPV246 gen op de eigenschappen en biologische veiligheid van het ggo in de milieurisicobeoordeling meegenomen te worden.
- Bij de vergelijking van de genomsequenties van PROSTVAC-V en PROSTVAC-F met de genomsequenties van ouderorganismen TBC-Wy en TBC-FPV, dienen de recombinatiesites aangegeven te worden ten einde vast te kunnen stellen of ter plekke van de recombinatie herschikkingen in het genoom hebben plaatsgevonden.
- Indien bij een vergelijkende sequentie-analyse verschillen worden waargenomen tussen de te beoordelen sequentie en de referentie-sequenties waarmee vergeleken wordt, dient in de milieurisicobeoordeling de impact van de waargenomen verschillen op de eigenschappen en biologische veiligheid van het te beoordelen organisme meegenomen te worden.
- De impact van de onderlinge sequentieverschillen tussen het insert in PROSTVAC-V en het insert van PROSTVAC-F dient eveneens in de milieurisicobeoordeling meegenomen te worden.

Samenvattend verwacht de COGEM dat onder navolging van bovengenoemde aanvullende managementmaatregelen 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 aanvullende informatie noodzakelijk alvorens tot een eindoordeel te kunnen komen.

7. Referenties

1. COGEM (2013). Fase 3 studie met een recombinant *Vaccinia virus*- en *Fowlpox virus*-vaccin bij patiënten met prostaatcancer. COGEM advies CGM/130617-01
2. Osborne JD *et al.* (2007). Genomic differences of *Vaccinia virus* clones from Dryvax smallpox vaccine: The Dryvax-like ACAM2000 and the mouse neurovirulent Clone-3. *Vaccine* 25: 8807-8832
3. Horoszewicz JS *et al.* (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Research* 43: 1809-1818
4. Garnet CT *et al.* (2006). TRICOM vector based cancer vaccines. *Curr Pharm Des* 12: 351-361.
5. COGEM (2013). Criteria voor moleculaire karakterisering van ggo's voor medische en veterinaire toepassing. COGEM advies CGM/130227-05
6. Werkgroep Infectiepreventie (2007). § 4.2 Handdesinfectie. In 'Ziekenhuizen, Algemene voorzorgsmaatregelen, Handhygiëne medewerkers'.
http://www.wip.nl/free_content/Richtlijnen/120913%20handhygiene%20def.pdf. Websitebezoek 12/09/2013
7. Qin L *et al.* (2011). Genomic analysis of the *Vaccinia virus* strain variants found in Dryvax vaccine. *J of Virology* 85(24): 13049-13060