

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W.J. Mansveld
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 11 december 2013
KENMERK CGM/131211-01
ONDERWERP Advies: aanvullende informatie karakterisering PROSTVAC-V/F

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

Eerder dit jaar heeft de COGEM twee adviezen uitgebracht over een vergunningaanvraag betreffende een klinische studie met het recombinante combinatievaccin PROSTVAC-V/F. In deze studie wil de aanvrager onderzoeken of het vaccin de levensverwachting van patiënten met prostaatkanker verlengt.

In haar laatste advies concludeerde de COGEM dat er nog relevante experimentele gegevens betreffende de moleculaire karakterisering van de vaccincomponenten ontbraken. Deze gegevens zijn noodzakelijk om te onderbouwen dat de risico's voor mens en milieu onder de voorgenoemde werkvoorschriften verwaarloosbaar klein zijn.

Naar aanleiding van het advies heeft de aanvrager nieuwe informatie betreffende de moleculaire karakterisering aangeleverd. Op basis van deze informatie acht de COGEM aangetoond dat het ouderorganisme van PROSTVAC-V, TBC-Wy, enige verwantschap vertoont met het veilig bevonden virus vaccin ACAM2000. Op basis van een virulentietest bij muizen acht zij aangetoond dat TBC-Wy niet virulenter is dan het veilig bevonden vaccin Dryvax. De COGEM is van mening dat de moleculaire karakterisering van PROSTVAC-V en PROSTVAC-F op adequate wijze is uitgevoerd.

Bovenstaande in overweging nemende, gecombineerd met het feit dat bij een eerder uitgevoerde klinische fase 2 studie met PROSTVAC-V/F geen schadelijke effecten zijn gemeld die toegeschreven kunnen worden aan de toediening van dit vaccin, en dat *Vaccina virus* al veelvuldig zonder serieuze consequenties in het milieu is geïntroduceerd, acht de COGEM onder naleving van de voorgenoemde en, in haar eerder opgestelde adviezen, aanvullende managementmaatregelen, de risico's voor mens en milieu bij voorgenoemde studie verwaarloosbaar klein.



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

Hoogachtend,

Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Vorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo
 Dr. I. van der Leij, Ministerie van IenM

Aanvullende informatie over de karakterisering van het op *Vaccinia virus* en *Fowlpox virus* gebaseerde vaccin PROSTVAC

COGEM advies CGM/131211-01

1. Inleiding

Dit advies betreft de beoordeling van nieuwe aangeleverde informatie inzake de karakterisering van het recombinante combinatievaccin PROSTVAC-V/F. Het vaccin heeft als doel de levensverwachting van patiënten met minimaal gemetastaseerde castratie-resistente prostaatkanker te verlengen. De vergunningaanvraag betreft een klinische fase 3 studie en is ingediend door het UMC St. Radboud te Nijmegen.

Eerder dit jaar heeft de COGEM twee adviezen over deze studie uitgebracht.^{1,2} In deze adviezen concludeerde de COGEM dat PROSTVAC-V beperkt pathogeen is, en dat er nog enkele verbeterpunten ten aanzien van de te nemen managementmaatregelen noodzakelijk waren om de kans op contacttransmissie met PROSTVAC-V te reduceren. Daarnaast achtte de COGEM de karakterisering van het vaccin niet volledig. Door het ontbreken van bepaalde onderbouwende gegevens kon niet nagegaan worden of de genetisch gemodificeerde organismen (ggo's) daadwerkelijk overeenkomen met de in de vergunningaanvraag genoemde ggo's. Ook de identiteit van het ouderorganisme van één van de twee vaccins was naar de mening van de COGEM onvoldoende vastgesteld. Aangezien de milieurisico-analyse deels berustte op de identiteit van het ouderorganisme, achtte de COGEM aanlevering van aanvullende informatie noodzakelijk voordat zij tot een definitief eindoordeel kon komen.

De COGEM is gevraagd de nieuwe aangeleverde informatie te beoordelen en opnieuw te adviseren over de eventuele milieurisico's van de voorgenomen klinische studie.

2. Belangrijke aspecten van PROSTVAC-V/F

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).

Vaccinstam TBC-Wy, ouderorganisme van PROSTVAC-V, 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 verschillende andere vaccins verkregen waaronder het vaccin Dryvax.³ In de Verenigde Staten is Dryvax bij grootschalige vaccinatieprogramma's tegen pokken toegepast. Het vaccin bestaat eveneens uit diverse *Vaccinia virus* subpopulaties, die in virulentie variëren.³ In de aangeleverde informatie beroept de aanvrager zich op de historie van veilig gebruik van Dryvax.

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 ter vervanging het vaccin ACAM2000 ontwikkeld.^{3,4} Dit is een gekloneerd plaque-isolaat van het Dryvax vaccin en wordt vermenigvuldigd in Verocellen. De werkzaamheid van dit veilig bevonden vaccin is eender aan Dryvax.

De vaccinstam TBC-FPV, ouderorganisme van PROSTVAC-F, is geïsoleerd uit het door de 'United States Department of Agriculture' (USDA) geregistreerde commercieel verkrijgbare kippenvaccin POXVAC-TC.

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).⁵ 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.⁶ De vier humane sequenties zijn in de vorm van vier afzonderlijke expressiecassettes door middel van polylinkers tot één cassette geassembleerd en met behulp van recombinatie in ouderorganismen TBC-Wy en TBC-FPV ingebracht.

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 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. Tevens wordt onderzocht of het adjuvans GM-CSF de immuunrespons nog verder kan stimuleren. Het vaccin zal om de twee weken poliklinisch toegediend worden. De totale studieduur bedraagt 6 maanden.

4. Eerder COGEM advies

4.1 Karakterisering ouderorganisme TBC-Wy

In haar tweede advies concludeerde de COGEM dat de herkomst van het ouderorganisme van PROSTVAC-V, TBC-Wy, niet duidelijk is.² Aangezien de milieurisico-analyse van PROSTVAC-V voor een belangrijk deel gebaseerd is op de veronderstelde veiligheid van Dryvax, en de aanvrager stelt dat TBC-Wy hiervan is afgeleid, acht de COGEM het van belang dat de verwantschap van TBC-Wy met Dryvax wordt aangetoond. Echter, met een door de aanvrager aangedragen vergelijkende genomische analyse in de vorm van een fylogenetische boom, waarin TBC-Wy wordt vergeleken met andere *Vaccinia virus* stammen, achtte de COGEM de verwantschap niet aangetoond.²

4.2 Moleculaire karakterisering PROSTVAC-V

In haar tweede advies over PROSTVAC-V/F concludeerde de COGEM dat op basis van de nieuwe aangeleverde informatie de beoogde modificatie in PROSTVAC-V nog niet afdoende moleculair was gekarakteriseerd.²

Ten eerste kon de COGEM op basis van de slechte kwaliteit van de aangeleverde figuren de uitspraken van de aanvrager over de restrictie-analyse en Southern blots moeilijk verifiëren.

Ten tweede werden er op basis van het vergelijken van sequenties verschillen waargenomen tussen de beoogde modificatie en de daadwerkelijk aangebrachte modificatie in PROSTVAC-V. Deze verschillen bestonden uit mutaties, deleties en inserties. De impact van deze verschillen op de biologische veiligheid van PROSTVAC-V werd niet door de aanvrager toegelicht.

Ten derde kon de COGEM niet vaststellen of er al dan niet herschikkingen rondom de recombinatiesite hebben plaatsgevonden, omdat voor de vergelijkende genomanalyse tussen ouderorganisme (TBC-Wy) en ggo (PROSTVAC-V) niet het genoom van TBC-Wy als referentiesequentie was gebruikt, maar het genoom van de uit Dryvax verkregen *Vaccinia virus* variant ACAM2000. Daardoor kon de COGEM ook niet uitsluiten of er elders in het genoom van PROSTVAC-V wijzigingen hebben plaatsgevonden.

Als laatste punt merkte de COGEM op dat, mede gezien het feit dat PROSTVAC-V in de mens kan repliceren, zij het van belang acht dat de overgangssequenties tussen het transgene insert en het flankerende acceptorgenoom gecontroleerd worden op de aanwezigheid van fusie-ORF's. Indien deze aanwezig zijn, dienen deze bioinformatisch te worden geanalyseerd en hun eventuele impact op de biologische veiligheid van het ggo door de aanvrager in de milieurisicobeoordeling te worden meegenomen.

4.3 Moleculaire karakterisering PROSTVAC-F

In haar tweede advies concludeerde de COGEM dat de beoogde modificatie in PROSTVAC-F nog niet afdoende moleculair was gekarakteriseerd.²

Ten eerste werden er op basis van sequentievergelijking verschillen waargenomen tussen de beoogde modificatie en de daadwerkelijk aangebrachte modificatie. Deze verschillen bestonden uit mutaties en deleties van enkele nucleotiden. De impact van deze verschillen op de biologische veiligheid van het ggo werd niet door de aanvrager toegelicht. Daarbij achtte de COGEM het tevens van belang dat de impact van de inactivatie van het FPV246 gen van ouderorganisme TBC-FPV in deze beoordeling werd meegenomen.

Ten tweede kon de COGEM niet vaststellen of er al dan niet herschikkingen rondom de recombinatiesite hadden plaatsgevonden, omdat in de vergelijkende genomanalyse tussen ouderorganisme (TBC-FPV) en ggo (PROSTVAC-F) de recombinatieregio's niet waren aangegeven.

Ten derde gaf de aanvrager aan dat op basis van sequentievergelijking het genoom van twee verschillende vaccinbatches van PROSTVAC-F 1% verschilt met een *in silico* gegenereerde sequentie van PROSTVAC-F. Omdat de mogelijke impact van dit verschil op de eigenschappen van PROSTVAC-F niet werd toegelicht, achtte de COGEM de karakterisering van onbedoelde wijzigingen in het ggo onvoldoende.

Als laatste punt merkte de COGEM op dat de aanvrager stelt dat de insertiecassettes in PROSTVAC-V en PROSTVAC-F identiek zijn. In werkelijkheid verschillen deze meer dan 50 nucleotiden in grootte. De COGEM achtte het voor de milieurisicobeoordeling van belang dat deze inconsistentie wordt toegelicht.

5. Overwegingen op basis van de nieuw aangeleverde informatie

De aanvrager heeft nieuwe gegevens aangeleverd over de herkomst en karakterisering van ouderorganisme TBC-Wy. Daarnaast heeft de aanvrager nieuwe gegevens aangeleverd over de moleculaire karakterisering van PROSTVAC-V en PROSTVAC-F.

5.1 Karakterisering ouderorganisme TBC-Wy

De aanvrager heeft nieuwe gegevens over de herkomst van ouderorganisme TBC-Wy aangeleverd. De aanvrager beschrijft dat TBC-Wy een plaque gezuiverd isolaat is van het Dryvax vaccin en dat het zuiveringsproces heeft plaatsgevonden door Dryvax een aantal malen te passeren in apencellen (fetal rhesus lung line FRhL-2). Dryvax zelf is verkregen door virus bevattende huidlaesies van met de NYCBH vaccin stam geïnfecteerde koeien meer dan 20 keer in koeien te passeren.

Daarnaast heeft de aanvrager een nieuwe genoomsequentie-analyse aangeleverd. Deze bestaat uit een fylogenetische boom waarin volgens de aanvrager de verwantschap van TBC-Wy met andere Dryvax *Vaccinia virus* varianten, waaronder de vaccinstam ACAM2000, en de *Vaccinia virus* WR stam wordt aangetoond.

Tevens laat de aanvrager de resultaten van 7 experimenten bij muizen zien. In de experimenten wordt de neurovirulentie van TBC-Wy en Dryvax met elkaar vergeleken. Op basis van de resultaten stelt de aanvrager dat de neurovirulentie van TBC-Wy bij benadering een factor 10-100 lager is dan die van Dryvax.

De COGEM is van mening dat in de nieuw aangeleverde informatie de herkomst van TBC-Wy eenduidig is beschreven.

Op basis van de nieuwe aangeleverde fylogenetische boom acht de COGEM het aangetoond dat TBC-Wy enige verwantschap vertoont met de *Vaccinia virus* variant ACAM2000. De COGEM wijst er echter op dat de boom door een afwijkende en foutieve schaalverdeling moeilijk te interpreteren is, waardoor de mate van verwantschap niet vast te stellen is.

Op basis van de neurovirulentie assay bij muizen kan de COGEM niet concluderen dat TBC-Wy een factor 10-100 minder virulent is dan Dryvax. Zij is van mening dat de experimenten er hooguit op duiden dat TBC-Wy minder virulent is, omdat in slechts 3 van de 7 experimenten het ouderorganisme rechtstreeks met Dryvax vergeleken kan worden. Daardoor is de statistische significantie onduidelijk.

Samengevat concludeert de COGEM dat ouderorganisme TBC-Wy op basis van de aangeleverde informatie beperkt gekarakteriseerd is, maar dat er geen aanwijzingen zijn dat de stam virulenter is dan Dryvax.

5.2 Moleculaire karakterisering PROSTVAC-V

De aanvrager heeft met betrekking tot de Southern blot analyse nieuwe figuren aangeleverd. Op basis van de aangeleverde figuren concludeert de aanvrager dat het insert daadwerkelijk is geïntegreerd in de beoogde locatie en dat er geen onbedoelde herschikkingen ter hoogte van de insertieplaats of elders in het genoom hebben plaatsgevonden.

Daarnaast heeft de aanvrager een nieuwe vergelijkende genoomanalyse uitgevoerd. Daarbij heeft hij *in silico* op basis van de genomsequentie van TBC-Wy en de transgene insertiecassette een sequentie van PROSTVAC-V gegenereerd, en deze vergeleken met de voor de klinische studie te gebruiken vaccinbatch van PROSTVAC-V. De vergelijkende analyse laat zien dat er in de recombinatieregio's geen herschikkingen, inserties of deleties hebben plaatsgevonden. In de recombinatieregio's die de insertiecassette flankeren, werden 13 mutaties waargenomen. Deze mutaties bestonden allen uit 'single nucleotide polymorphisms' (SNPs). De aanvrager verklaart deze SNPs doordat in de gebruikte constructievector recombinatiesequenties van de *Vaccinia virus* WR stam zijn gebruikt.

De aanvrager heeft de overgangssequenties van insert en flankerend genoom gecontroleerd op de aanwezigheid van fusie-ORF's. Daarbij werden twee potentiële ORF's geïdentificeerd die bioinformatisch zijn geanalyseerd. Deze analyse leverde geen gelijkenis op met eiwitsequenties aanwezig in de database van het 'National Center for Biotechnology Information'.

De COGEM heeft de door de aanvrager aangeleverde informatie beoordeeld en is van mening dat de moleculaire karakterisering van PROSTVAC-V op een adequate wijze is uitgevoerd.

5.3 Moleculaire karakterisering PROSTVAC-F

De aanvrager heeft een nieuwe vergelijkende genoomanalyse aangeleverd waarbij de sequenties van het ouderorganisme TBC-FPV en PROSTVAC-F met elkaar zijn vergeleken. Op basis van deze gegevens concludeert de aanvrager dat er ten gevolge van de integratie van het insert geen herschikkingen of wijzigingen hebben plaatsgevonden ter hoogte van de insertielocatie.

Daarnaast heeft de aanvrager de sequentie van de insertiecassette in PROSTVAC-F vergeleken met die van de insertiecassette in PROSTVAC-V. Hij geeft aan dat de sequenties van de insertiecassettes verschillen en dat al deze verschillen zich in de overgangssequenties tussen de individuele expressiecassettes bevinden. Deze overgangssequenties bevatten polylinkers en kloneringssites die gebruikt zijn om de vier afzonderlijke expressiecassettes tot één insertiecassette te assembleren, en zijn verschillend omdat ze aan de verschillende oudervirussen (*Fowlpox virus* en *Vaccinia virus*) zijn aangepast.

De aanvrager geeft aan dat de mogelijke functie van het door het FPV246 gen gecodeerde eiwit niet bekend is. Tevens stelt de aanvrager dat de groei-eigenschappen van PROSTVAC-F en TBC-FPV in kippen-embryocellen niet verschillen.

De COGEM heeft de door de aanvrager aangeleverde informatie beoordeeld en is van mening dat de moleculaire karakterisering van PROSTVAC-F op een adequate wijze is uitgevoerd. De

COGEM heeft geen redenen om aan te nemen dat de inactivatie van het FPV246 gen impact heeft op de milieuveiligheid van PROSTVAC-F.

6. Conclusie en advies

Aangezien de biologische veiligheid van PROSTVAC-V voor een belangrijk deel is gebaseerd op de veronderstelde veiligheid van ouderorganisme TBC-Wy, acht de COGEM de karakterisering van TBC-Wy van belang. Zij is van mening dat de oorsprong van TBC-Wy voldoende helder is beschreven. Daarnaast acht zij de verwantschap met de veilig bevonden vaccinstam Dryvax op beperkte wijze aangetoond. Op grond van de fenotypische karakterisering in de neurovirulentie assay bij muizen heeft zij geen aanwijzingen dat TBC-Wy virulenter is dan Dryvax.

Op basis van de nieuw aangeleverde informatie constateert de COGEM dat TBC-Wy fenotypisch en moleculair minimaal is gekarakteriseerd. Zij concludeert dat de moleculaire karakterisering van de ggo's PROSTVAC-V en PROSTVAC-F voldoet aan de eerder door haar gestelde eisen.^{7,8}

Omdat de voorgenomen studie uitgevoerd zal worden onder een klein aantal patiënten, er op basis van gegevens uit een eerdere kleine fase 2 studie met PROSTVAC-V/F geen melding is gemaakt van ernstige schadelijke effecten gerelateerd aan de toediening van PROSTVAC-V/F, en vaccinia virussen veelvuldig in het milieu zijn geïntroduceerd zonder serieuze consequenties, acht de COGEM onder naleving van de voorgenomen en eerder geadviseerde aanvullende managementmaatregelen de risico's voor mens en milieu bij de voorgenomen studie verwaarloosbaar klein.

Referenties

1. COGEM (2013). Fase 3 studie met een recombinant *Vaccinia virus*- en *Fowlpox virus*-vaccin bij patiënten met prostaatkanker. COGEM advies CGM/130617-01
2. COGEM (2013). Aanvullende informatie over klinische studie met een recombinant *Vaccinia virus*- en *Fowlpox virus*-vaccin bij patiënten met prostaatkanker. COGEM advies CGM/130926-01
3. 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
4. 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
5. Horoszewicz JS *et al.* (1983). LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Research* 43: 1809-1818
6. Garnet CT *et al.* (2006). TRICOM vector based cancer vaccines. *Curr Pharm Des* 12: 351-361.
7. COGEM (2013). Criteria voor moleculaire karakterisering van ggo's voor medische en veterinaire toepassing. COGEM advies CGM/130227-05
8. COGEM (2013). Criteria for the molecular characterisation of GMOs for medical and veterinary applications. COGEM advice CGM/130227-05