

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Waterstaat  
Mevrouw drs. S. van Veldhoven-van der Meer  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 11 januari 2018  
**KENMERK** CGM/180111-01  
**ONDERWERP** Advies klinische studie met genetisch gemodificeerd *M. bovis* in patiënten met blaaskanker

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 17-004 met de titel 'Phase I/II Open Label Clinical Trial Assessing Safety and Efficacy of Intravesical Instillation of the Recombinant BCG VPM1002BC in Patients with Recurrent Non-Muscle Invasive Bladder Cancer after Standard BCG Therapy' van het Nederlands Kanker Instituut, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een klinische studie in patiënten met blaaskanker. In deze studie wordt een genetisch gemodificeerde (gg-) *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (gg-BCG) bacteriestam in de blaas van patiënten toegediend, om een afweerreactie tegen de blaastumor op te wekken. De verwachting is dat gg-BCG een verbeterde antitumor-activiteit in patiënten zal hebben in vergelijking met de standaard BCG therapie. Na toediening in de blaas wordt gg-BCG korte tijd uitgescheiden via de urine van de behandelde patiënt.

De gg-BCG stam is gebaseerd op een in het laboratorium gegenereerde laag pathogene ouderstam. Deze ouderstam komt niet van nature voor en verspreiding in het milieu hiervan is nog nooit waargenomen. De gg-BCG stam brengt het *listeriolysine* gen tot expressie waardoor het zich minder lang kan handhaven in het lichaam dan de uitgangsstam. De COGEM beschouwt de gg-BCG stam als verzwakt ten opzichte van de BCG ouderstam en is van oordeel dat de gg-stam apathogeen is voor mens en dier.

Op basis van bovenstaande gegevens en onder navolging van genoemde voorschriften is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met gg-BCG verwaarloosbaar klein zijn.



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

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap  
Voorzitter COGEM

c.c.           Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo  
                  Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW

# **Klinische studie met genetisch gemodificeerd *Mycobacterium bovis* BCG in patiënten met blaaskanker**

## **COGEM advies CGM/180111-01**

### **1. Inleiding**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag (IM-MV 17-004) met betrekking tot een klinische Fase II studie waarbij VPM1002BC aan blaaskankerpatiënten wordt toegediend. VPM1002BC is een genetisch gemodificeerde (gg-) *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) bacteriestam die het listeriolysine O (LLO) eiwit van *Listeria monocytogenes* tot expressie brengt. De gg-BCG stam zal intravesicaal worden toegediend aan patiënten om een afweerreactie tegen de blaastumor op te wekken. Het doel van deze studie is om de veiligheid en effectiviteit van toediening van VPM1002BC in de blaas van blaaskankerpatiënten te bepalen, nadat de patiënten behandeld zijn met standaard BCG therapie, om zodoende een verbeterde therapie tegen blaastumoren te ontwikkelen.

#### **1.1 *Mycobacterium bovis***

De ziekte tuberculose (TB) wordt veroorzaakt door bacteriesoorten behorende tot het *Mycobacterium tuberculosis* complex, waaronder *Mycobacterium bovis*. *M. bovis* is een langzaam groeiende bacterie met een verdubbelingstijd van 16-24 uur en is de hoofdveroorzaker van TB in dieren waaronder gedomesticeerde koeien. De bacterie heeft een breed gastheerbereik en kan vele zoogdieren infecteren, inclusief de mens.<sup>3</sup> Natuurlijke reservoirs van *M. bovis* zijn onder andere Nieuw-Zeelandse possums (*Trichosurus vulpecula*), Europese dassen (*Meles meles*), kafferbuffel (*Syncerus caffer*), wilde zwijnen (*Sus scrofa*) en herten in Noord-Amerika (*Odocoileus virginianus*).<sup>1</sup> Een *M. bovis* infectie kan zich onder gedomesticeerde koeien verspreiden door het inhaleren van geïnfecteerde aërosolen van een hoestend of niezend dier met open tuberculose, of via besmette stofdeeltjes.<sup>2</sup> In koeien vindt voornamelijk horizontale overdracht van *M. bovis* plaats.<sup>2</sup> Humane tuberculose veroorzaakt door *M. bovis* komt vooral voor in ontwikkelingslanden door consumptie van ongepasteuriseerde melkproducten.<sup>3</sup> De symptomen van humane tuberculose veroorzaakt door *M. bovis* zijn koorts, zwakte, nachtelijk zweten en gewichtsverlies.<sup>3</sup>

#### **1.2 *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG)**

*Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG) is een laboratoriumstam die ontstaan is door continue seriële *in vitro* passage van *M. bovis* gedurende een periode van 13 jaar.<sup>4</sup> BCG is bijna een eeuw geleden ontwikkeld als een geattenuëerd levend vaccin tegen tuberculose.<sup>4,5</sup> Het heeft in tegenstelling tot *M. bovis* geen natuurlijke niches. BCG mist de genomische sequentie 'Region of Difference 1' (RD1), waardoor deze stam sterk geattenuëerd is. Deze sequentie is aanwezig in virulente stammen van *M. tuberculosis* en *M. bovis* en codeert voor belangrijke virulentiefactoren.<sup>4,5</sup> Na het ontstaan van de originele *M. bovis* BCG stam in 1921 zijn er door sub-kweken meerdere BCG sub-stammen ontstaan die verschillen in mate van virulentie.<sup>4</sup>

Sinds 1976 wordt BCG ook toegepast als immuuntherapie tegen blaaskanker (*non-muscle invasive bladder cancer* (NMIBC)).<sup>6</sup> De eerste stap in de behandeling van blaaskanker bestaat uit het verwijderen van de tumor door middel van transurethrale resectie. Als vervolgbehandeling wordt voor patiënten die een middelmatig tot hoog risico hebben op terugkeer van de tumor en mogelijke ziekteprogressie, intravesicale therapie aangeraden bestaande uit immuuntherapie of chemotherapie.<sup>7</sup> Van deze opties is immuuntherapie met BCG het meest effectief.<sup>8,9</sup> Helaas reageert ~30-50% van de patiënten niet op intravesicale BCG therapie en bestaat er na behandeling met BCG een geringe kans dat de tumor terugkeert of dat er ziekteprogressie optreedt.<sup>8,9,19</sup>

De exacte immunologische mechanismes van BCG therapie zijn niet bekend. Wel is duidelijk dat er onderscheid gemaakt kan worden in drie categorieën van reacties: infectie van urotheliale cellen of blaaskankercellen, inductie van immuunreacties en inductie van antitumor effecten.<sup>10</sup> Bij het antitumor effect van BCG staat de T-cel gemedieerde immuunreactie centraal.<sup>11</sup> De stimulatie van CD8 T-cellen door BCG is echter suboptimaal.<sup>12</sup>

Met de onderhavige klinische studie (SAKK 06/14) wil de aanvrager een gg-BCG stam intravesicaal toedienen aan NMIBC patiënten, om een verbeterde immuuntherapie te ontwikkelen. De verwachting is dat de aangebrachte modificatie in de gg-BCG stam zal leiden tot een sterkere T-cel gemedieerde immuunreactie als gevolg van een betere CD8 cytotoxische T-cel stimulatie, en dat dit hierdoor een verbeterde antitumor-activiteit zal hebben dan de standaard BCG therapie. Een Fase I klinische studie (SAKK 06/14) met de gg-BCG stam is afgerond, de onderhavige aanvraag heeft betrekking op een Fase II studie met dezelfde stam.<sup>13</sup>

### **1.3 VPM1002BC (*rBCGΔureC::Hly*<sup>+</sup>)**

De aanvrager wil gebruik maken van een gg-BCG stam genaamd VPM1002BC (*rBCGΔureC::Hly*<sup>+</sup>) welke gebaseerd is op *M. bovis* BCG substam Praag. In de gg-BCG stam is het *urease C* (*ureC*) gen gedeeltelijk vervangen door het *listeriolysine* (*hly*) gen afkomstig van *Listeria monocytogenes* EGD. De coderende sequentie voor listeriolysine is gefuseerd met het gen coderend voor antigen 85B (Ag85B), resulterend in een signaalsequentie die zorgt voor secretie van het listeriolysine O (LLO) eiwit.<sup>14</sup> LLO is een porievormend eiwit dat actief is in het fagosomale compartiment van macrofagen die geïnfecteerd zijn met *L. monocytogenes*. De activiteit van LLO in het fagosoom medieert de translocatie van de bacterie naar het cytosol. Dit eiwit is actief in een beperkte pH 'range' 5,5-6 (zoals in het fagosoom) en is hierdoor inactief bij de fysiologische pH (cytosol en bloed).<sup>15,16</sup>

*M. bovis* BCG is normaal gesproken intracellulair aanwezig in de fagosomen van macrofagen en stimuleert hierdoor voornamelijk CD4 T-cellen door antigen presentatie via de 'major histocompatibility complex' (MHC) klasse-II-moleculen.<sup>17</sup> Expressie van LLO in VPM1002BC moet er voor zorgen dat er een sterkere CD8 T-cel cytotoxische stimulatie plaatsvindt.<sup>18,33</sup> Door insertie van het *hly* gen is het *ureC* gen niet meer actief in VPM1002BC, waardoor de pH toeneemt in de fagosomen van VPM1002BC-geïnfecteerde cellen. Hierdoor kan LLO optimaal functioneren en zorgt daarbij voor perforatie van het fagosomale membraan, waardoor de inhoud van het fagosoom (VPM1002BC antigenen en fagosomale enzymen) vrijkomt in het cytosol. Vervolgens kan er cross-presentatie van VPM1002BC antigenen plaatsvinden en kunnen er via de MHC klasse-I route ook

CD8 cytotoxische T-cellen gestimuleerd worden. Dit moet uiteindelijk leiden tot een, in vergelijking met *M. bovis* BCG, versterkte T-cel gemedieerde immuunreactie.<sup>18,19,33</sup>

#### **1.4 Constructie VPM1002BC (rBCGΔureC::Hly<sup>+</sup>)**

Voor de vervaardiging van VPM1002BC is gebruik gemaakt van een 'shuttle' vector genaamd pVEP2003. pVEP2003 bevat onder andere een 'origin of replication' (ori) afkomstig van *E. coli*, een hygromycine expressiecassette geflankeerd door  $\gamma\delta$  resolvase herkenningsplaatsen en een *Ag85B-hly* cassette. De *Ag85B-hly* cassette bevat de sequentie voor het *hly* gen en staat onder controle van de 'heat shock protein' (*hsp*) 60 promotor van *M. bovis* BCG. Verder bevat de cassette twee *E. coli* hemolysine A genfragmenten, een zogenaamd 'linker' tyrosine en de signaalsequentie van *Ag85B*. Om VPM1002BC te genereren is een twee-stappen-plan uitgevoerd. In de eerste stap is door middel van homologe recombinatie een gedeelte van de *ureC* sequentie vervangen door de expressiecassettes van listeriolysine en hygromycine. Hierbij is de hygromycine-resistente stam VPM1002 (rBCGΔureC::Hly<sup>+</sup>::Hyg<sup>+</sup>) ontstaan. In de tweede stap is een pWM19 vector, welke het resolvase eiwit tot expressie brengt, tijdelijk ingebracht in VPM1002. Door middel van  $\gamma\delta$  resolvase-gemedieerde excisie is vervolgens de hygromycine-coderende sequentie uit het genoom van *M. bovis* BCG verwijderd. pWM19 heeft een temperatuur-afhankelijke ori en bevat een *sacB* element. De expressie van *sacB* is toxisch voor mycobacteriële cellen onder hoge sucroseconcentraties.<sup>20</sup> Door de toegepaste groeicondities (hoge temperatuur en sucroseconcentratie) heeft er zelfeliminatie van pWM19 plaatsgevonden, waardoor het uiteindelijk niet in VPM1002BC aanwezig is. Het uiteindelijke insert in VPM1002BC codeert voor 619 aminozuren (aa). Het recombinante eiwit dat tot expressie komt bestaat uit de volgende onderdelen: het listeriolysine peptide (504 aa), de *Ag85B* signaalsequentie (67 aa), twee flankerende *E. coli* hemolysine A fragmenten (5': 18 aa; 3': 14 aa), een 'linker' tyrosine en een niet-functioneel fragment (14 aa).

## **2. Voorgenomen werkzaamheden**

Voorafgaand aan de vrijgifte van elke VPM1002BC batch wordt met PCR testen de afwezigheid van het hygromycine resistentiegen en de aanwezigheid van het listeriolysine-coderende gen in de correcte oriëntatie gecontroleerd. Ook wordt voor elke batch de sequentie van het insert bepaald. Een batch wordt afgekeurd als het niet voldoet aan de vooraf gestelde criteria. Ook wordt er voorafgaand aan vrijgifte getest op contaminatie met bacteriën en schimmels en virulente mycobacteria.

De aanvrager is voornemens VPM1002BC intravesicaal toe te dienen aan maximaal 39 patiënten met een maximale dosis van  $19,2 \times 10^8$  CFU/50 ml per instillatie. Patiënten krijgen maximaal 15 doses VPM1002BC toegediend via een katheter door middel van blaasinstillatie. De eerste 6 toedieningen ('inductiefase') vinden plaats met een wekelijks interval. Vervolgens is er een 'onderhoudsbehandelfase', die bestaat uit 3 perioden met elk 3 toedieningen, met een wekelijks interval. Minimaal één uur na elke behandeling zal de patiënt urineren in een fles met daarin twee Javel-Tabletten ten behoeve van desinfectie van de urine. Na 15 minuten incubatietijd zal de urine worden doorgespoeld door het toilet. Voorafgaand aan elke instillatie met VPM1002BC zullen er bloed- en urinemonsters worden genomen. Daarnaast worden er op verschillende tijdstippen blaasbiopten en blaasspoelingmonsters genomen.

Bij immuungecompromitteerde patiënten bestaat de kans op het optreden van BCG-gerelateerde infecties na behandeling met BCG.<sup>21,22,23</sup> De COGEM wijst op het belang dat deze patiënten worden uitgesloten van deelname aan de onderhavige studie zoals door de aanvrager wordt voorgeschreven.

### 3. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft in het verleden geadviseerd over werkzaamheden met een gg-BCG stam met dezelfde genetische achtergrond (rBCG $\Delta$ ureC::Hly<sup>+</sup>) als het ggo uit de onderhavige aanvraag.<sup>24</sup> Dit betrof de inschaling van vaccinatiewerkzaamheden in makaken met twee recombinante *M. bovis* BCG stammen. In het advies oordeelde de COGEM dat, gezien het langdurige en wereldwijde gebruik van wildtype *M. bovis* BCG als vaccinstam, de veiligheid van BCG voldoende is aangetoond. De COGEM beschouwde beide gg-BCG stammen als geattenuerd ten opzichte van de BCG ouderstam. Op basis van het geringe pathogene karakter en de beperkte mate van overdracht van de gg-BCG stammen, was de COGEM van oordeel dat de voorgenomen werkzaamheden op ML-I/DM-I niveau uitgevoerd konden worden zonder risico voor mens en milieu.

### 4. Overweging

#### 4.1 Pathogeniteit van het ggo

De ouderstam *M. bovis* BCG waarop VPM1002BC is gebaseerd, is een geattenuerde avirulente laboratoriumstam met een lange historie van veilig gebruik.<sup>4,5</sup> BCG heeft geen natuurlijke niches en verspreiding van deze vaccinstam in het milieu is nog nooit waargenomen.

Verscheidene BCG sub-stammen zijn op de markt toegelaten als medicinale producten (zoals *M. bovis* BCG Tice, Onco TICE<sup>25</sup>; *M. bovis* BCG Connaught, ImmuCyst<sup>26</sup>; *M. bovis* BCG RIVM, BCG-medac<sup>27</sup>). Met VPM1002BC is al een klinische Fase I studie afgerond.<sup>13</sup> Ook zijn er klinische Fase I en IIa studies afgerond met de vaccinstam VPM1002.<sup>28,29,30,31,32</sup> VPM1002 is een voorloper van VPM1002BC, waarin het hygromycine resistentiegen nog wel aanwezig is. Introductie van het *listeriolysine* gen in VPM1002 (en VPM1002BC) induceert autofagie in en apoptose van macrofagen en zorgt hierdoor voor verminderde persistentie in deze cellen in vergelijking met de BCG ouderstam.<sup>18,33,34</sup> Deletie van *ureC* heeft geen noemenswaardig effect op de persistentie van *M. bovis* BCG.<sup>35</sup>

Een preklinische studie met immuungecompromitteerde muizen (muizen met 'severe combined immunodeficiency' (SCID)) die subcutaan BCG of VPM1002 toegediend kregen, laat zien dat de overlevingsduur van muizen behandeld met VPM1002 significant langer is in vergelijking met BCG behandelde muizen.<sup>18</sup> Tevens is in preklinische studies aangetoond dat VPM1002BC na herhaalde inoculatie in ratten geen mortaliteit of morbiditeit veroorzaakt (ongepubliceerde data aanvrager).

Alles in overweging nemende beschouwt de COGEM VPM1002BC als minder persistent, minder invasief en geattenuerd ten opzichte van de BCG ouderstam. Op basis van bovenstaande gegevens is de COGEM van oordeel dat VPM1002BC apathogeen is voor mens en dier.

#### 4.2 Moleculaire karakterisering

De COGEM heeft in 2013 criteria voor de moleculaire karakterisering van ggo's voor medische toepassingen vastgesteld. In de criteria staat vermeld dat het insert in het ggo volledig gesequenced dient te worden. De sequentieanalyse dient het insert met eventueel gebruikte recombinatiesequenties te omvatten en dient aan weerszijden van het insert enkele tientallen nucleotiden door te lopen in het genoom van het acceptororganisme.<sup>36</sup>

De aanvrager heeft het genoom van VPM1002BC volledig gesequenced en vergeleken met een referentiesequentie van *M. bovis* BCG. De analyses bevestigen dat het insert als één kopie op de verwachte positie in het genoom van *M. bovis* BCG aanwezig is en laten zien dat de cassette zich in de 'antisense' oriëntatie ten opzichte van het *ureC* gen bevindt.

De COGEM is van oordeel dat de aanvrager in voldoende mate heeft aangetoond dat alleen de volgende delen van de vector pVEP2003 aanwezig zijn in het genoom van VPM1002BC: *ureC* homologe regio's, *hsp60* promotor, de *Ag85B-hly* cassette sequentie met flankerende *E. coli* hemolysine A fragmenten, een 'linker' tyrosine en de sequentie van één  $\gamma\delta$  resolvase herkenningsplaats. Er zijn geen coderende vectorsequenties, zoals promotors, regulatoire sequenties of antibiotica-resistentie coderende sequenties in het genoom van het ggo aanwezig.

Uit de sequentieanalyse komt naar voren dat het 3' hemolysine A fragment in VPM1002BC een frameshift bevat ten opzichte van de vectorsequentie pVEP2003, waardoor 14 extra aminozuren tot expressie komen in VPM1002BC. Deze zijn volgens de aanvrager niet functioneel. Ook bevindt zich in het resterende niet-functionele 3' deel van het *ureC* gen een 'silent' mutatie in VPM1002BC ten opzichte van de *M. bovis* BCG referentiesequentie. De COGEM is van oordeel dat de bovengenoemde frameshift en puntmutatie niet van invloed zijn op de uitkomst van de milieurisicobeoordeling.

Op basis van bovenstaande gegevens is de COGEM van oordeel dat de moleculaire karakterisering van VPM1002BC volledig is.

#### 4.3 Genoverdracht

Horizontale genoverdracht tussen BCG, *M. bovis* en *M. tuberculosis* is volgens de aanvrager nog nooit onder experimentele condities waargenomen. In het theoretische geval dat er genetische uitwisseling zou plaatsvinden tussen het ggo en BCG zal dit, aangezien VPM1002BC een deletiemutant is, in het ergste geval kunnen leiden tot onderlinge uitwisseling en het ontstaan van het uitgangsgenorganisme. Omdat het uitgangsgenorganisme BCG een laboratoriumstam is, geen natuurlijke gastheren of niches heeft waarin het kan overleven en zich niet kan verspreiden in het milieu, acht de COGEM de risico's van mogelijke reversie verwaarloosbaar klein. Ook in het theoretische geval dat er genetische uitwisseling zou plaatsvinden tussen het ggo en andere mycobacterium stammen, is de COGEM van oordeel dat dit niet tot nadelige effecten zal kunnen leiden.

#### 4.4 Uitscheiding en verspreiding van het ggo

Volgens de aanvrager laten ongepubliceerde data afkomstig van een Fase I studie zien dat VPM1002BC niet aangetroffen wordt in sputum- of bloedmonsters van behandelde patiënten (voorafgaand en tot 24 uur na behandeling). Ook in klinische studies met de BCG ouderstam werd

slechts in uitzonderlijke gevallen, BCG na intravesicale toediening in sputum- en bloedmonsters aangetroffen.<sup>37,38</sup> Er is geen systemische verspreiding van VPM1002BC waargenomen tijdens de Fase I studie en ook niet in preklinische studies met VPM1002BC na intravesicale toediening in ratten (ongepubliceerde data aanvrager). VPM1002BC wordt uitgescheiden in urine van behandelde patiënten, maar wordt snel geklaard en is na 24 uur niet meer te detecteren (ongepubliceerde data aanvrager). Dit is aanzienlijk sneller dan de klaringstijd van *M. bovis* BCG, die na een week nog in 27% van de urinemonsters gedetecteerd wordt.<sup>38</sup> Om verspreiding van VPM1002BC in het milieu via urine te voorkomen, schrijft de aanvrager voor dat patiënten minimaal één uur na elke behandeling urineren in een fles waarna de opgevangen urine wordt gedesinfecteerd. Omdat VPM1002BC na toediening korte tijd in urine aanwezig is, acht de COGEM het van belang dat dit voorschrift wordt opgevolgd.

Verspreiding van *M. bovis* BCG naar derden via bloed of andere lichaamsvloeistoffen is nooit waargenomen en de aanvrager acht dit ook onwaarschijnlijk voor VPM1002BC. Ook seksuele transmissie van *M. bovis* BCG na intravesicale instillatie is volgens de aanvrager nog nooit waargenomen. De aanvrager kan echter niet geheel uitsluiten dat VPM1002BC via semen naar derden kan verspreiden of door contact met de genitale lichaamszone. Hoewel VPM1002BC slechts korte tijd wordt uitgescheiden (tot 24 uur na toediening in urine), schrijft de aanvrager voor dat patiënten gedurende de studie en tot 6 maanden na de laatste behandeling een condoom moeten gebruiken tijdens geslachtsgemeenschap. De duur van deze maatregel is door de aanvrager gekozen als onderdeel van de voorgeschreven anticonceptie (en is niet gebaseerd op de duur van uitscheiding van het ggo). De COGEM stemt in met dit aanvullende voorschrift van de aanvrager.

Concluderend acht de COGEM het risico voor mens en milieu bij eventuele uitscheiding van VPM1002BC verwaarloosbaar klein, aangezien VPM1002BC geattenuëerd is en de ouderstam geen natuurlijke gastheer heeft waarin het kan overleven.

## 5. Advies

De COGEM is van oordeel dat VPM1002BC afdoende moleculair gekarakteriseerd is en als apathogeen aangemerkt kan worden. De COGEM acht de kans dat VPM1002BC zich kan verspreiden in het milieu verwaarloosbaar klein. Tevens acht zij de kans op nadelige effecten bij blootstelling van derden aan VPM1002BC verwaarloosbaar klein.

Met inachtneming van de in het klinisch protocol gestelde aanvullende voorwaarden is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met VPM1002BC verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. Palmer MV (2013). *Mycobacterium bovis*: characteristics of wildlife reservoir hosts. *Transbound Emerg. Dis.* doi: 10.1111/tbed.12115.



2. Cousins DV (2001). *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. Rev. Sci. Tech. 20:71-85
3. Esteban J & Muñoz-Egea MC (2016). *Mycobacterium bovis* and Other Uncommon Members of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. Microbiol. Spectr. doi: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0021-2016
4. Liu J *et al.* (2009). BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. Hum. Vaccin. 5: 70-78
5. Mahairas GG *et al.* (1996). Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. J. Bacteriol. 178: 1274-1282
6. Morales A *et al.* (1976). Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. J. Urol. 116: 180-183
7. Botteman MF *et al.* (2003). The health economics of bladder cancer: a comprehensive review of the published literature. Pharmacoeconomics. 21: 1315-1330
8. Sanli O *et al.* (2017). Bladder cancer. Nat. Rev. Dis. Primers. 3: :17022. doi: 10.1038/nrdp.2017.22.
9. Douglass L & Schoenberg M (2016). The Future of Intravesical Drug Delivery for Non-Muscle Invasive Bladder Cancer. Bladder Cancer. 2: 285-292
10. Kawai K *et al.* (2013). Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer: current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine. Cancer Sci. 104: 22-27
11. Maruf M *et al.* (2016). Nonmuscle invasive bladder cancer: a primer on immunotherapy. Cancer Biol. Med. 13: 194-205
12. Schaible UE *et al.* (2003). Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. Nat. Med. 9: 1039-1046
13. U.S. National Library of Medicine. VPM1002BC in Recurrent Non-muscle Invasive Bladder Cancer. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02371447?term=SAKK+06%2F14&rank=1> (bezocht: 21 december 2017)
14. Horwitz MA *et al.* (2000). Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97: 13853-13858
15. Beaugard KE *et al.* (1997). pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. J. Exp. Med. 186: 1159-1163
16. Portnoy DA *et al.* (1988). Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. J. Exp. Med. 167: 1459-1471
17. Kaufmann SHE & Hess J (1999). Impact of intracellular location of and antigen display by intracellular bacteria: implications for vaccine development. Immunol. Lett. 65: 81-84
18. Grode L *et al.* (2005). Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. J. Clin. Invest. 115: 2472-2479
19. Nieuwenhuizen NE *et al.* (2017). The Recombinant Bacille Calmette-Guérin Vaccine VPM1002: Ready for Clinical Efficacy Testing. Front Immunol. 8: 1147
20. Malaga W *et al.* (2003). Production of unmarked mutations in mycobacteria using site-specific recombination. FEMSS Microbiol. Lett. 219: 261-268

21. Talbot EA *et al.* (1997). Disseminated bacille Calmette-Guerin disease after vaccination: case report and review. *Clin. Infect. Dis.* 24: 1139-1146
22. Yossepowitch O *et al.* (2006). Safety and efficacy of intravesical bacillus Calmette-Guerin instillations in steroid treated and immunocompromised patients. *J. Urol.* 176: 482-485
23. Hesselning AC *et al.* (2009). Disseminated bacille Calmette-Guérin disease in HIV-infected South African infants. 87: 505-511
24. COGEM (2007). Inschaling van vaccinatie van makaken met de genetische gemodificeerde *Mycobacterium bovis* stam Calmette-Guérin. COGEM advies CGM/070402-05
25. College ter Beoordeling van Geneesmiddelen. Geneesmiddeleninformatiebank. OncoTICE. [https://db.cbg-meb.nl/ords/f?p=111:3:0:ATC:NO::P0\\_DOMAIN,P0\\_LANG,P3\\_RVG1:H,NL,17509](https://db.cbg-meb.nl/ords/f?p=111:3:0:ATC:NO::P0_DOMAIN,P0_LANG,P3_RVG1:H,NL,17509) (bezoekt: 13 december 2017)
26. Electronic Medicines Compendium (eMC). ImmuCyst. <https://www.medicines.org.uk/emc/medicine/7779> (bezoekt: 13 december 2017).
27. College ter Beoordeling van Geneesmiddelen. Geneesmiddeleninformatiebank. BCG-medac [https://db.cbg-meb.nl/ords/f?p=111:3:0:ATC:NO::P0\\_DOMAIN,P0\\_LANG,P3\\_RVG1:H,NL,26876](https://db.cbg-meb.nl/ords/f?p=111:3:0:ATC:NO::P0_DOMAIN,P0_LANG,P3_RVG1:H,NL,26876) (bezoekt: 13 december 2017)
28. U.S. National Library of Medicine. Study to Evaluate Safety and Immunogenicity of VPM1002 in Comparison With BCG in Newborn Infants in South Africa. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01479972> (bezoekt: 19 december 2017)
29. U.S. National Library of Medicine. Dose-Escalation Study on Safety and Immunogenicity of VPM1002 in Comparison to BCG in Healthy Volunteers in South Africa. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01113281> (bezoekt: 19 december 2017)
30. U.S. National Library of Medicine. Dose-Escalation Study on Safety and Immunogenicity of VPM1002 in Comparison With BCG in Healthy Male Volunteers. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00749034> (bezoekt: 19 december 2017)
31. Grode L *et al.* (2013). Safety and immunogenicity of the recombinant BCG vaccine VPM1002 in a phase 1 open-label randomized clinical trial. *Vaccine* 31: 1340-1348
32. Kaufmann SH *et al.* (2014). The BCG replacement vaccine VPM1002: from drawing board to clinical trial. 13: 619-630
33. Hess J *et al.* (1998). *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin strains secreting listeriolysin of *Listeria monocytogenes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 5299-5304
34. Meyer-Morse N *et al.* (2010). Listeriolysin O is necessary and sufficient to induce autophagy during *Listeria monocytogenes* infection. *PLoS One.* 5: e38610
35. Reyrat JM *et al.* (1996). Urease activity does not contribute dramatically to persistence of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Infect. Immun.* 64: 3934-3936
36. COGEM (2013). Criteria voor moleculaire karakterisering van ggo's voor medische en veterinaire toepassing. COGEM advies CGM/130227-05
37. Siatelis A *et al.* (2011). Detection of bacillus Calmette-Guérin (*Mycobacterium bovis* BCG) DNA in urine and blood specimens after intravesical immunotherapy for bladder carcinoma. *J. Clin. Microbiol.* 49: 1206-1208

38. Durek C *et al.* (2001). The fate of bacillus Calmette-Guerin after intravesical instillation. *J. Urol.* 165: 1765-1768