

Aan de staatssecretaris van
Volkshuisvesting, Ruimtelijke
Ordening en Milieubeheer
De heer drs. P.L.B.A. van Geel
Postbus 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 12 oktober 2006
KENMERK CGM/061012-01
ONDERWERP Advies fase I klinische studie met een MVA-HIV-B vaccin (IM 06-009)

Geachte heer Van Geel,

Naar aanleiding van een adviesvraag met betrekking tot een fase I klinische studie met een genetisch gemodificeerd influenzavirus van het Academisch Medisch Centrum te Amsterdam, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de risico's voor mens en milieu van een fase I klinische studie met een genetisch gemodificeerd vaccin tegen *Human immunodeficiency virus-1* subtype B (HIV-B). Het vaccin is gebaseerd op de pokkenvirusstam, 'Modified Vaccinia Ankara' (MVA), waaraan HIV sequenties zijn toegevoegd (MVA-HIV-B). In de studie worden proefpersonen die besmet zijn met HIV-B twee maal gevaccineerd met MVA-HIV-B. Met het onderzoek wordt getracht te bepalen of het vaccin de specifieke afweer tegen HIV-1 dusdanig versterkt dat HIV-patiënten het langer zonder antivirale therapie kunnen stellen om bijwerkingen als gevolg van deze therapie uit te stellen of te voorkomen.

Om tot een risicoanalyse te komen, beoordeelt de COGEM de kansen dat het virus na vaccinatie vrijkomt in het milieu en anderen infecteert.

Tijdens toediening van het vaccin worden voorschriften gevolgd om verspreiding van het virus te voorkomen. De COGEM acht deze voorschriften adequaat maar adviseert om waterbestendige pleisters te gebruiken om de injectieplaats af te dekken en om de deelnemers hygiëne-instructies te geven over het zelf verwijderen van de pleister (na de tweede vaccinatie) om de kans op verspreiding van het virus verder te minimaliseren. Daarnaast blijkt uit studies dat het vaccinvirus zich niet systemisch in het lichaam van de proefpersoon verspreidt zodat de kans op uitscheiding via bijvoorbeeld urine uitermate klein is.

Verder is de COGEM van mening dat, zelfs al zou verspreiding in het milieu optreden, de kans dat het vaccinvirus niet-proefpersonen infecteert verwaarloosbaar klein is. De MVA vector is sterk verzwakt en apathogeen. De COGEM is van mening dat de toevoeging van HIV genen dit niet verandert. Verder verspreidt het vaccinvirus zich alleen via direct contact en is het niet in staat tot replicatie in humane cellen zodat een eventuele infectie zal uitdoven.

Gezien het bovenstaande is de COGEM van mening dat de risico's voor mens en milieu bij deze studie verwaarloosbaar klein zijn wanneer de aanvullende voorschriften in acht genomen worden.

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 on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman
Voorzitter COGEM

c.c. Dr. ir. B.P. Loos
Dr. I. van der Leij

Fase I klinische studie met een genetisch gemodificeerd MVA virus gericht tegen HIV-B

COGEM advies CGM/061012-01

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over de mogelijke risico's van een fase I klinische studie waarbij gebruik gemaakt wordt van een genetisch gemodificeerd virus dat wordt ingezet als vaccin gericht tegen *Human Immunodeficiency Virus* type 1 (HIV-1) subtype B. Het vaccin is gebaseerd op de sterk verzwakte pokkenvirusstam Modified Vaccinia virus Ankara (MVA) waaraan DNA is toegevoegd dat is afgeleid van enkele genen van HIV-1 subtype B (MVA-HIV-B).

HIV is een retrovirus dat de ziekte acquired immuno-deficiency syndrome, ofwel AIDS, veroorzaakt. Naar schatting van de World Health Organization waren er in Europa aan het eind van 2005 2.2 miljoen mensen met een HIV infectie (1). Subtype B is verantwoordelijk voor het merendeel van de HIV infecties in Europa (2).

Op dit moment is de meest gangbare medicatie de zogenaamde combinatietherapie, een antivirale therapie waarmee de replicatie van HIV geremd wordt. Deze therapie geeft echter ernstige bijwerkingen, zoals metabole complicaties en een verhoogd risico op hart- en vaatziekten. Wanneer de behandeling onderbroken wordt, zal HIV zich opnieuw gaan repliceren en tot ernstige ziekteverschijnselen kunnen leiden (14). Het doel van het onderzoek is om te bepalen of toediening van het vaccin de specifieke afweer van HIV-patiënten versterkt waardoor zij het langer zonder de combinatietherapie zouden kunnen stellen. Nadelen van de combinatietherapie worden zodoende uitgesteld of voorkomen.

Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft eerder geadviseerd over een fase I klinische studie met een MVA vaccin waaraan genen van HIV-1 subtype A waren toegevoegd (CGM/031211-02). Het betrof dezelfde genen als in de onderhavige studie. Destijds achtte de COGEM de kans op verspreiding van het vaccin na toediening verwaarloosbaar klein. Zij stelde hierbij als aanvullende voorwaarde dat zowel het beddengoed als de kleding van de proefpersonen werden ontsmet, aangezien beide besmet konden raken indien de injectieplaats niet goed was afgeplakt (15).

Milieurisicoanalyse

Onder risico wordt verstaan de combinatie van de gevolgen van een gevaar en daarnaast de kans dat deze gevolgen zich kunnen voordoen. Hierbij worden de mogelijke schadelijke effecten van (toepassing van) een ggo vergeleken met die van het ongemodificeerde organisme (de zogenaamde basislijn) waaruit het ggo is afgeleid.

Bij de risicobeoordeling voor introductie in het milieu van genetisch gemodificeerde organismen (ggo's), zoals die door de COGEM wordt uitgevoerd, worden de effecten beoordeeld die het ggo kan hebben op mens en milieu. Dit betekent dat gekeken wordt naar de mogelijke schadelijke effecten van het ggo, de kans op verspreiding in het milieu en de effecten die door de mogelijke verspreiding teweeg gebracht kunnen worden. Om deze aspecten te kunnen beoordelen worden de kenmerken van de vector, van het ingebrachte gen en van de vaccincellen in ogenschouw genomen.

De vector

MVA is een zeer verzwakte vorm van het *Vaccinia virus Ankara*, dat op zijn beurt vermoedelijk voortkomt uit het *Cowpoxvirus* (2). De virussen behoren tot de familie van de *Poxviridae* en het genoom bestaat uit één lineair dubbelstrengs DNA molecuul (13). Als één van de weinige DNA virussen repliceren pokkenvirussen alleen in het cytoplasma van de gastheercel, onafhankelijk van de kern van de geïnfecteerde cel (2).

Aan het einde van de 18^e eeuw, werd het *Cowpoxvirus* voor het eerst gebruikt als vaccin tegen het verwante *Variola virus* dat pokken veroorzaakt bij de mens. Hierna werd het 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 het *Vaccinia virus* (2).

Aanvankelijk werd gedacht dat het *Vaccinia virus* geen natuurlijke reservoir heeft, maar dit lijkt niet helemaal correct te zijn. Het virus wordt namelijk sporadisch geïsoleerd bij ziekte-uitbraken in vee, met name in India. Waarschijnlijk is het virus in de jaren zestig tijdens grootschalige vaccinatiecampagnes overgedragen aan deze dieren en heeft het zich kunnen handhaven in de kudde (18;19).

Overdracht van het *Vaccinia virus* vanuit de injectieplaats verloopt hoofdzakelijk door direct contact, hoewel in ziekenhuizen enkele gevallen beschreven zijn waarbij overdracht via onder andere handen plaatsvond (11;12).

In de strijd tegen pokken werd tot ongeveer 30 jaar geleden iedereen ingeënt met het *Vaccinia virus*. Dit kon leiden tot ernstige complicaties, zoals over het lichaam verspreidende wondjes en ontstekingen van het hersenweefsel, met fatale afloop (8;9).

Daarom werd in de jaren zeventig MVA ontwikkeld als veilig pokkenvaccin (Mayr). MVA is verkregen uit *Vaccinia* na 570 passages in kippenembryofibroblasten wat tot zes belangrijke deleties, met een totale grootte van 31.000 basenparen (ongeveer 9% van het genoom), in verschillende regio's van het genoom heeft geleid (3;4;5). Vanwege deze deleties is MVA niet meer in staat om zich te repliceren in de meeste zoogdiercellen waaronder humane cellen (5;6). Daarentegen is het virus nog wel in staat om de zogenaamde 'early' en 'late' genen, én tevens recombinante genen, tot expressie te brengen in humane cellen, zodat het een geschikte vector voor gentherapie vormt.

MVA is veelvuldig getest en gebruikt als vaccin en heeft zijn veiligheid bewezen in meer dan 120.0000 gevaccineerde personen en tevens in immunogecompromitteerde dieren (4;7). De COGEM heeft eerder geadviseerd dat MVA beschouwd kan worden als apathogeen, omdat het virus onschadelijk is gebleken bij toepassing in mens en dier (CGM/030519-06). Daarom heeft zij MVA ingedeeld in de laagste pathogeniteitsklasse (klasse 1) (16).

Het insert

HIV is een RNA virus dat behoort tot de *Retroviridae* (13). Het genoom bevat een aantal genen waarvan *gag*, *pol*, *env* en *nef* worden geplaatst in de MVA vector. De genen *gag*, *pol* en *nef* zijn afkomstig uit de laboratoriumstam HIV-1 clone IIIB en vormen na expressie een fusie-eiwit dat bestaat uit 1326 aminozuren. Het *env* gen komt uit het primaire HIV-1 isolaat BX08.

De genen die toegevoegd zijn aan de MVA vector vervullen in HIV verschillende functies. Het *gag* gen is betrokken bij een aantal stadia tijdens de virusassemblage. De aanvrager geeft aan dat het packagingsignaal dat deels met het *gag* gen overlapt, geïnactiveerd is. Het *pol* gen is slechts gedeeltelijk toegevoegd aan de vector. Het betreffende gedeelte codeert voor het enzym reverse transcriptase. Verder is het deel dat codeert voor *nef* aanwezig. *Nef* is een regulatorisch eiwit dat een rol speelt bij de infectie en bij de inhibitie van de expressie van bepaalde oppervlakte-eiwitten van het immuunsysteem van de gastheer. Als laatste codeert het *env* gen voor envelopeiwitten en is het betrokken bij het gastheertropisme (2).

De genen die niet in MVA geplaatst zijn, zijn verantwoordelijk voor de integratie van HIV genen in het DNA van de gastheer. Verder zijn meerdere regulatorische genen, die overigens afwezig zijn in de vector, noodzakelijk voor transcriptie en replicatie. Hieruit volgt dat de geïnserteerde genen niet tot replicatie van HIV en tot ziekte zullen leiden.

Naast de insertie van HIV genen is een additionele synthetische early/late promotor toegevoegd aan de vector om de expressie van de transgenen te reguleren.

Het ggo

Na constructie van het ggo MVA-HIV-B wordt het opgekweekt tot grote hoeveelheden in kippenembryofibroblasten, welke getest worden op afwezigheid van microbiële besmettingen. Daarnaast wordt het opgekweekte vaccinvirus getest op de mogelijkheid tot replicatie in humane cellen. Slechts virus dat niet repliceert, is geschikt als vaccin.

Aan de studie zullen maximaal 50 personen, die besmet zijn met HIV-1 subtype B, deelnemen. Deze personen ondergaan sinds minimaal een half jaar een succesvolle antivirale behandeling waardoor het immuunsysteem niet dusdanig verzwakt is geraakt dat het problemen zou kunnen geven bij toediening van het vaccin. De therapie wordt voortgezet gedurende de studie. Personen die een actieve infectie of een ernstige ziekte, zoals kanker en hepatitis, doormaakten gedurende de 30 dagen voorafgaand aan de aanvang van de studie zijn uitgesloten van deelname.

Op een speciale onderzoekseenheid (inperkingsniveau ML-I), welke voorzien is van een sluis, krijgen zij door middel van twee intramusculaire injecties het vaccin op dag 0 en op dag 28 toegediend. De vaccindosis bedraagt $1 \times 10^{7.5}$ plaque forming units (fpu). Na infectie van een gastheercel met MVA-HIV-B komen de HIV-genen tot expressie, waarna onderzocht wordt of de afweer tegen HIV toeneemt (17).

Binnen een tijdsbestek van 48 weken na de eerste vaccinatie wordt op een aantal momenten bloed afgenomen. Op de eerste dag na vaccinatie zal met behulp van PCR bepaald worden of het vaccin aantoonbaar is in het bloed en de keel. Indien blijkt dat MVA-HIV-B aanwezig is, dan worden de hierna af te nemen bloedmonsters ook hierop geanalyseerd.

Om verspreiding van het vaccin in het milieu na toediening te voorkomen, wordt de injectieplaats na vaccinatie gedesinfecteerd met alcohol. Tien minuten later wordt de injectieplaats afgeplakt met een pleister welke minimaal 24 uur dient te blijven zitten. De proefpersonen verblijven gedurende twee uur op de onderzoekseenheid.

De arts die het vaccin toedient, draagt ter bescherming een wegwerpjas, handschoenen, een chirurgisch mondmasker en een OK-muts, alsmede een beschermbril en oversloffen om de schoenen.

Tijdens de vaccinatie kan de deelnemer liggen of zitten. Het bed of de stoel worden afgedekt met een disposable laken. Daarnaast draagt de deelnemer een disposable jas, waarbij een gat wordt geknipt ter plaatste van de injectieplaats. Het is ook mogelijk om de huid rond de injectieplaats af te dekken met OK-doeken.

Bij het verlaten van de kamer volgt de medewerker een standaardprocedure. Dit betreft onder meer het desinfecteren van handen en onderarmen en daarnaast het deponeren van persoonlijke beschermingsmiddelen in een ton voor ggo-afval. Dit afval wordt net als het overige afval, zoals injectiespuit, naalden en bedlinnen, behandeld volgens de ggo-afvalprocedure van het Academisch Medisch Centrum. Tevens is opgesteld hoe te handelen bij prik- of snijaccidenten en in geval van morsen van ggo-materiaal.

Overwegingen en advies

Hieronder gaat de COGEM in op verschillende aspecten van de risicobeoordeling. Ten eerste wordt de pathogeniteit van het ggo behandeld. Vervolgens wordt ingegaan op het al dan niet optreden van recombinatie tussen het ggo en wildtype HIV-B waarmee de proefpersonen besmet zijn. Als laatste worden de kans dat shedding optreedt en de mogelijke gevolgen ervan behandeld.

Pathogeniteit ggo

Zoals reeds is gesteld, heeft de COGEM de MVA vector in een eerder advies ingedeeld in de laagste pathogeniteitsklasse, omdat MVA avirulent en onschadelijk is bij toepassing in mens en dier (16). Dit blijkt uit het feit dat 120.000 personen gevaccineerd zijn tegen pokken zonder dat daarbij incidenten zijn opgetreden. Daarnaast is het vaccin tevens in immuungecompromiteerde dieren niet-pathogeen gebleken (16;4;7).

Verder acht de COGEM de kans dat de insertie van HIV genen een verandering veroorzaakt in de pathogene eigenschappen van MVA verwaarloosbaar klein gezien de grote biologische verschillen tussen het vector- en het donovirus. HIV is een RNA virus dat repliceert in de kern van een cel. MVA behoort tot de DNA virussen en repliceert in het cytoplasma. Daarnaast is de COGEM van mening dat de additionele synthetische early/late promotor geen risico vormt. Deze promotor reguleert de expressie van de transgenen en de COGEM acht het zeer onwaarschijnlijk dat de promotor een effect heeft op de flankerende MVA genen.

Recombinatie

Na toediening van het vaccinvirus zou dit mogelijkterwijs dezelfde cellen kunnen infecteren als het wildtype HIV-B. Wanneer co-infectie van twee virussen plaatsvindt, zou recombinatie kunnen optreden. De COGEM acht de kans hierop echter verwaarloosbaar klein. De HIV genen van het vaccinvirus worden in het cytoplasma gesynthetiseerd, terwijl de genen van wildtype HIV in de kern tot expressie komen. Daarnaast ondergaan de proefpersonen een antivirale therapie, zodat de mate van replicatie van wildtype HIV zeer laag is. Bovendien is MVA een DNA virus en HIV een RNA virus. Dit alles verkleint de kans op recombinatie.

Verder zal recombinatie naar de mening van de COGEM niet leiden tot risico's, aangezien de sequentie van de HIV-genen in MVA gelijk is aan de sequentie van genen in wildtype HIV dat reeds aanwezig is in de deelnemende patiënten.

Personen die een actieve infectie doormaken, of een ernstige ziekte hebben 30 dagen voor aanvang van de studie, worden uitgesloten van deelname. Dit minimaliseert de kans op recombinatie met eventuele aanwezige nauwverwante virussen, zoals het *Cowpoxvirus*.

Shedding

Shedding van het vaccivirus zou kunnen optreden wanneer het virus uit de injectieplaats lekt of wanneer het via lichaamsvloeistoffen of afscheidingsproducten vrijkomt. Indien vervolgens een niet-proefpersoon in direct contact komt met het virus, zouden eventueel risico's kunnen ontstaan. De COGEM is van mening dat de maatregelen die verspreiding vanuit de injectieplaats moeten voorkomen adequaat zijn. Als aanvulling hierop, adviseert zij om gebruik te maken van waterbestendige pleisters.

Na de eerste vaccinatie wordt de injectieplaats afgedekt met een pleister. Deze wordt 24 uur later verwijderd in het ziekenhuis. Echter, na de tweede vaccinatie dienen de proefpersonen de pleister zelf te verwijderen. De COGEM adviseert om deelnemers hierover hygiëne-instructies te geven. Uit een onderzoek in 2004 blijkt dat wanneer het *Vaccinia virus* als vaccin wordt toegediend, dit soms detecteerbaar is op de pleister waarmee de injectieplaats wordt afgedekt. Daarnaast werd het virus in sommige gevallen aangetoond op de handen na het verwijderen van de pleister (11). De COGEM is daarom van mening dat er een kleine kans bestaat dat ook MVA op de pleisters of handen aanwezig zal zijn waardoor in theorie verspreiding zou kunnen optreden. Zij adviseert daarom dat proefpersonen de pleister na het verwijderen direct in een plastic zakje verpakken. Vervolgens dient 70% alcohol over de 'wondkant' van de pleister besprenkeld te worden waarna het zakje wordt afgesloten en gedeponerd bij het afval. De COGEM adviseert daarnaast om de injectieplaats te ontsmetten met 70% alcohol waarna de handen meteen gewassen moeten worden.

Op basis van literatuurgegevens en aangeleverde studies, is de COGEM van mening dat de kans klein is dat shedding via lichaamsvloeistoffen of afscheidingsproducten van de proefpersonen plaatsvindt, aangezien het vaccivirus zich niet systemisch verspreidt door het lichaam.

Uit een aangeleverde studie met MVA-HIV-B in ratten volgt dat 30 dagen na vaccinatie het virus lokaal of systemisch niet aantoonbaar was. Daarnaast blijkt uit de literatuur dat MVA, dat specifieke HIV-A sequenties tot expressie brengt, 55 dagen na

vaccinatie niet detecteerbaar is in weefsels (waaronder de geslachtsklier) van makaken besmet met het *Simian immunodeficiency virus* (10).

De genoemde studies hebben betrekking op de verspreiding van het virus na een relatief lange periode na vaccinatie. De aanvrager heeft ook een studie aangeleverd waarin de verspreiding van een genetisch gemodificeerd NYVAC virus in ratten bepaald is direct na toediening. De COGEM is van mening dat het NYVAC virus vergelijkbaar is met MVA, omdat het afkomstig is van het *Vaccinia virus* en tevens sterk verzwakt is. Hoewel er kleine verschillen zijn tussen beide virussen zijn deze niet van dien aard dat ze de uitkomsten van de hierop gebaseerde milieurisicoanalyse beïnvloeden. De COGEM heeft eerder geadviseerd dat NYVAC ingedeeld kan worden in de laagste pathogeniteitsklasse (16). Aan NYVAC waren sequenties coderend voor enkele genen van HIV subtype C toegevoegd. Wanneer NYVAC-HIV C werd toegediend als vaccin aan ratten, bleek dat direct na vaccinatie in 10 van de 15 huiduitstrijkjes van de injectieplaats virale deeltjes aanwezig waren. Zes uur later was de hoeveelheid gedetecteerde virusdeeltjes sterk verminderd (gemiddeld met een factor 100). Het virus was 24 uur, 3 en 10 dagen na injectie niet aantoonbaar in huiduitstrijkjes, bloed, speeksel, urine en feces. Overigens werden de ratten gevaccineerd met een relatief gezien hogere dosis dan gebruikt zal worden in de humane studie. Aangezien deze hoge dosis in ratten niet heeft geleid tot een systemische verspreiding van het virus, acht de COGEM de kans dat MVA zich zal verspreiden in het lichaam van de proefpersonen verwaarloosbaar klein.

Gezien het bovenstaande, acht de COGEM de kans op shedding verwaarloosbaar klein. Zij is van mening dat indien shedding onverhoopt toch op zou treden, de hoeveelheid zeer gering zal zijn. Bovendien is het virus sterk verzwakt en apathogeen. Het ggo is nog wel in staat om gastheercellen te infecteren, maar het kan zich niet repliceren in de cellen. Een infectie zal daarom uiteindelijk uitdoven.

Sero-conversie

Sero-conversie is de verandering van het resultaat van een specifieke serologische test (in dit geval de zogenaamde HIV-test waarmee de aanwezigheid van antilichamen wordt aangetoond) van negatief naar positief. Contact met het ggo kan in een HIV-negatief persoon een antilichaamrespons veroorzaken, zodat deze persoon positief zal reageren in de test. Sero-conversie vormt geen milieurisico maar dient vanuit maatschappelijke belangen voorkomen te worden, aangezien serologische testen gehanteerd worden voor bijvoorbeeld het afsluiten van een levensverzekering.

De COGEM signaleert dat de kans op sero-conversie bij niet-proefpersonen zeer onwaarschijnlijk is vanwege de gehanteerde beschermingsmaatregelen tijdens toediening

van het vaccin. Zij is verder van mening dat indien een prikaccident zou plaatsvinden, de kans op sero-conversie niet volledig uit te sluiten is. Echter, in een dergelijke situatie dient een grote hoeveelheid vaccin toegediend te worden vanwege de minimale dosis die nodig is om sero-conversie te bewerkstelligen.

Conclusie

De COGEM is van mening dat wanneer de voorschriften en instructies zoals beschreven in het dossier gehandhaafd worden, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn bij het gebruik van een MVA-HIV-B vaccin. Zij adviseert als aanvullend voorschrift om waterbestendige pleisters te gebruiken en om de deelnemers hygiëne-instructies te geven over het zelf verwijderen van de pleisters na de tweede vaccinatie.

Referenties

1. World Health Organization. HIV/AIDS in Europe: Overview (2005). Internet: <http://www.euro.who.int/Document/Mediacentre/fs1405e.pdf> (11/09/2006).
2. Field's virology Knipe, M. D. and Howley, P. M. (2001). Fields Virology. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
3. Antoine, G., Scheilinger, F., Dorner, F. en F.G. Falkner (1998). The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses. *Virology* 244: 365-396.
4. Mayr, A., Stickl, H., Müller, H.K., Danner, K. en H. Singer (1978). The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* 167: 375-390.
5. Sutter, G. en B. Moss (1992). Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10847-10851.
6. Drexler, I., Heller, K., Wahren, B., Erfle, V. en G. Sutter (1998). Highly attenuated modified vaccinia virus ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells. *J. Gen. Virol.* 79: 347-352.
7. Stittelaar, K.J., Kuiken, T., De Swart, R.L., Van Amerongen, G. *et al.* (2001). Safety of modified vaccinia virus ankara (MVA) in immune-suppressed macaques. *Vaccine* 19: 3700-3709.
8. Lane, J.M., Ruben, F.L., Neff, J.M. en J.D. Millar (1969). Complications of smallpox vaccination, 1968. *N. Engl. J. Med.* 281 (22): 1201-1208.

9. Landelijke coördinatiestructuur infectieziektebestrijding. Variola – pokken (2003). Internet: http://www.infectieziekten.info/bestanden/variola_B03_protocol_Gr_03_-pub.doc (11/09/2006).
10. Hanke, T., McMichael, A.J., Dennis, M.J. *et al* (2005). Biodistribution and persistence of an MVA-vectored candidate HIV vaccine in SIV-infected rhesus macaques and SCID mice. *Vaccine* 23: 1507-1514.
11. Talbot, T.R., Ziel, E., Doersam, J.K. *et al* (2004). Risk of Vaccinia transfer to the hands of vaccinated persons after smallpox immunization. *Clin Infect Dis* 35: 536-541.
12. Sepkowitz, K. (2003). How contagious is Vaccinia? *N Engl J Med* 348(5): 439-446.
13. Van Regenmortel, M. H. V. (2000). Seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego.
14. HIV Vereniging Nederland (2005). Kiezen voor de combinatietherapie? Internet: http://www.hivnet.org/HVN/Publicaties/pdf/combi_nl_2.pdf (11/09/2006).
15. COGEM (2003). MVA-HIV A vaccine klinische fase I studie (CGM/031211-02).
16. COGEM (2003). Classificatie geattenueerde pokkenvirus-stammen en aanvullende voorschriften (CGM/030519-06).
17. Gomez, C.E., Najera, J.L., Jimenez, E.P. *et al* (draft). Head-to-head comparison on the immunogenicity in mice of the attenuated poxvirus strains MVA and NYVAC co-expressing in a single locus the HIV-1BX08 gp120 and HIV-1IIIB gag-pol-nef proteins of clade B.
18. Buller, R.M.L. en G.J. Palumbo (1991). Poxvirus pathogenesis. *Microbiol Rev* Mar: 80-122.
19. Lewis-Jones, S. (2004). Zoonotic poxvirus infections in humans. *Curr opin inf dis* 17: 81-89.