

Aan de minister van  
Infrastructuur en Waterstaat  
drs. C. van Nieuwenhuizen-Wijbenga  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 19 oktober 2020  
**KENMERK** CGM/201019-01  
**ONDERWERP** Advies klinische studie met MVA-MERS-S\_DF1 vaccin

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 20-010\_000 getiteld: 'MVA-MERS-S\_DF1: An MVA-vectored vaccine candidate against MERS coronavirus, encoding the MERS spike protein' van het Erasmus Medisch Centrum, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd om te adviseren over een klinische studie naar de veiligheid, verdraagbaarheid en immunogeniteit in gezonde proefpersonen van een levend verzwakt genetisch gemodificeerd (gg-) MVA-MERS-S\_DF1 vaccin gericht tegen het *Middle East respiratory syndrome-related coronavirus* (MERS-CoV). Dit vaccin is afgeleid van het verzwakte pokkenvirus Modified Vaccinia virus Ankara (MVA), en brengt het volledige Spike-eiwit van MERS-CoV tot expressie om hiertegen een immuunreactie op te wekken. MERS-CoV is een coronavirus dat voornamelijk in Saudi-Arabië voorkomt en overgedragen kan worden van dromedarissen naar mensen door contact met geïnfecteerde dieren. Infectie met MERS-CoV kan bij mensen asymptomatisch, mild, of zeer ernstig verlopen. MVA is een biologisch ingeperkt virus dat een historie van veilig gebruik kent als vaccin tegen het pokkenvirus.

De COGEM is van oordeel dat MVA-MERS-S\_DF1 geattenuëerd en biologisch ingeperkt is, en dat het transgen (MERS-S) geen verhogend effect heeft op de pathogeniteit en het verspreidingspotentieel van de vector. Daarnaast acht zij de kans verwaarloosbaar klein dat er recombinatie optreedt tussen MVA-MERS-S\_DF1 en zoönotische orthopoxvirussen of coronavirussen. Op basis van het bovenstaande is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu verbonden aan deze klinische studie met MVA-MERS-S\_DF1 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.
- Dr. J. Westra, Hoofd Bureau ggo
  - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en Milieurisico's  
DG Milieu en Internationaal
  - Dr. N. Smit, Loket Getherapie
  - Dr. .R.J. Vanmolkot, Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek
  - Mr. N. Gušić, Ministerie van VWS

*Met het oog op eventuele belangenverstrengeling zijn de COGEM leden Prof. dr. C.M.F. Dirven en Dr. S. Herfst niet betrokken geweest bij de besluitvorming over dit advies.*

# Klinische studie met gg-vaccin MVA-MERS-S\_DF1 ter bescherming tegen MERS-CoV

## COGEM advies CGM/201019-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd om te adviseren over een vergunningaanvraag (IM-MV 20-010) voor een klinische fase Ib studie om de veiligheid, verdraagbaarheid en immunogeniteit van het MVA-MERS-S\_DF1 vaccin gericht tegen het *Middle East respiratory syndrome-related coronavirus* (MERS-CoV) in gezonde vrijwilligers, te onderzoeken. Het MVA-MERS-S\_DF1 vaccin is afgeleid van het verzwakte pokkenvirus Modified Vaccinia virus Ankara (MVA), en brengt het volledige Spike (S)-eiwit van MERS-CoV tot expressie om hiertegen een immunoreactie op te wekken. Het vaccin is bestemd als profylaxe tegen MERS-CoV infectie.

#### 1.1 Middle East respiratory syndrome-related coronavirus

MERS-CoV behoort tot de orde *Nidovirales*, familie *Coronaviridae* (subfamilie *Orthocoronavirinae*), genus *Betacoronavirus* en subgenus *Merbecovirus*.<sup>1</sup> MERS-CoV is in de zomer van 2012 ontdekt bij een patiënt met acute longontsteking en nierfalen uit Saudi-Arabië,<sup>2</sup> en uit retrospectieve data is gebleken dat het virus al in april dat jaar in verschillende patiënten met ernstige luchtweginfecties in een ziekenhuis in Jordanië aanwezig was.<sup>3</sup> Het virus is verwant aan *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (SARS-CoV) en SARS-CoV-2 die eveneens in het genus *Betacoronavirus* ingedeeld zijn.<sup>4</sup> MERS-CoV wordt voornamelijk overgedragen van dromedarissen naar mensen door contact met geïnfecteerde dieren.<sup>5</sup> Infectie met MERS-CoV bij de mens kan asymptomatisch, mild, of zeer ernstig verlopen. De meest voorkomende klachten zijn koorts, hoesten en benauwdheid, en in sommige gevallen kan ook een longontsteking optreden. Ook gastro-intestinale klachten kunnen voorkomen. In ernstige gevallen kunnen acute luchtwegproblemen ontstaan waardoor kunstmatige beademing noodzakelijk is, en multi-orgaanfalen. De mortaliteit van MERS-CoV wordt 35% geacht, maar dit is mogelijk een overschatting omdat milde gevallen meestal niet gerapporteerd zijn.<sup>6</sup> Ouderen, (chronisch) zieke mensen of mensen met een niet goed functionerend immuunsysteem lijken meer risico te lopen op een ernstiger ziekteverloop na infectie met MERS-CoV.

Sinds 2012 hebben meer dan 80% van de ziektegevallen plaatsgevonden in Saudi-Arabië, de overige ziektegevallen waren verspreid over 27 landen.<sup>7</sup> Aangezien de clusters van infecties beperkt zijn gebleven tot individuen (medewerkers in ziekenhuizen en familieleden) die veelvuldig contact hadden met MERS-CoV geïnfecteerde patiënten, lijkt de transmissie van mens-op-mens niet efficiënt te verlopen.<sup>7,8,9,10</sup> Tot dusver zijn er nog geen vaccins of specifieke medicijnen beschikbaar tegen MERS. Sinds 2013 is MERS-CoV als meldingsplichtige ziekte aangemerkt.<sup>11</sup>

#### Genoomorganisatie MERS-CoV

MERS-CoV is een positief enkelstrengs RNA virus met een genoom van ca. 30 kb groot. De virusdeeltjes worden omhuld door een lipidemembraan. Het genoom bevat twee grote 'open reading frames' (ORFs 1a en 1b) die het grootste deel van het genoom omvatten en coderen voor polyproteïnen

die door virale proteases worden geknipt in 16 niet-structurele eiwitten (nsp1 t/m nsp16) welke het replicatie-transcriptie complex vormen.<sup>7</sup> Daarnaast zijn in het 3' uiteinde van het genoom meerdere kleinere ORFs aanwezig die coderen voor de structurele eiwitten (spike (S), het nucleocapside (N), het membraan (M), en het envelop (E) eiwit, en accessoire eiwitten. Het S-eiwit is bepalend voor het tropisme van het virus en kan door gastheerproteasen geknipt worden in 2 subunits (S1 en S2). Subunit 1 bevat een receptor-bindend domein, dat kan binden aan de dipeptidyl peptidase 4 (DPP4; CD26) receptor die onder meer op humane cellen voorkomt (voornamelijk op epitheelcellen van de lagere luchtwegen, maar ook op nierepitheelcellen, darmcellen, T-cellen en macrofagen). Subunit 2 is betrokken bij de fusie van het virale membraan met het membraan van de gastheer cel.<sup>7</sup> Aan de 5' en 3' uiteinden van het genoom van MERS-CoV bevinden zich niet-coderende sequenties, de zogenaamde 'non-translated regions' of NTRs die noodzakelijk zijn voor replicatie.

### **1.2 Modified Vaccinia virus Ankara (MVA)**

MVA is een verzwakte variant van het Chorioallantois vaccinia virus Ankara (CVA), een pokkenvirus uit de species *Vaccinia virus*, genus *Orthopoxvirus*, familie *Poxviridae*). MVA is ontwikkeld door CVA te cultiveren op kippenembryo-fibroblast (CEF) cellen. Na ongeveer 570 passages in CEF cellen zijn er verschillende mutaties ontstaan in het genoom die gepaard gaan met fenotypische veranderingen, zoals het onvermogen om cytopathische effecten of plaques te vormen in verschillende cellijnen, en de afwezigheid van huidlaesies na infectie van de huid. Deze aangepaste en zeer verzwakte vorm van CVA is in 1968 hernoemd als MVA.<sup>12</sup> MVA is niet pathogeen voor dieren, waaronder bestraalde muizen,<sup>13</sup> konijnen<sup>14</sup> en apen met een onderdrukt immuunsysteem.<sup>15</sup>

MVA is veelvuldig onderzocht, wordt sinds de jaren '70 bij mensen gebruikt als vaccin tegen pokken, en heeft zijn veiligheid bewezen in meer dan 120.000 gevaccineerde personen, waaronder kinderen, ouderen en personen met huidziekten, zonder ernstige bijwerkingen.<sup>16,17</sup> De veiligheid van MVA is tevens aangetoond in HIV-geïnfecteerde personen en kankerpatiënten.<sup>18,19,20,21</sup>

MVA virusdeeltjes bevatten een membraan, waarbij het virale lineaire dubbelstrengs (ds) DNA genoom van ongeveer 178 kbp,<sup>22,23</sup> is ingepakt in een zogenaamde virale 'core'. Bij de ontwikkeling van MVA hebben tijdens de passages in CEF cellen naast kleine deleties, inserties en puntmutaties ook zes grote deleties plaatsgevonden, en is ten opzichte van CVA ongeveer 15% van het genoom (circa 30 kbp) verloren gegaan.<sup>24,25,26</sup> Deze deleties zijn ontstaan in verschillende regio's van het genoom.<sup>24</sup> In vergelijking met ouderstam CVA bevat MVA 71 orthologe ORFs waarvan voorspeld is dat deze voor identieke eiwitten coderen, en 124 ORFs waarbij de genproducten aminozuurwijzigingen, inserties of deleties bevatten.<sup>27</sup>

Door de verschillende inserties, deleties en mutaties die zijn opgetreden bij de ontwikkeling van MVA, zijn onder andere genen betrokken bij de replicatie in verschillende zoogdiercellen, bij het ontduiken van het immuunsysteem van de gastheer, en bij de virulentie van het virus verstoord of verloren gegaan.<sup>12,24,28,29</sup>

Pokkenvirussen repliceren in het cytoplasma van de gastheer cel. Hiervoor is het virus afhankelijk van de eigen transcriptie-machinerie, die in de virale 'core', waarin ook het virale DNA zich bevindt,

ingepakt is. Voor de eiwittranslatie is het virus afhankelijk van de machinerie van de gastheer.<sup>30</sup> Door de deleties die aanwezig zijn in het genoom van MVA is dit virus niet meer in staat om productief te repliceren (ook wel ‘nonpermissive’ genoemd) in de meeste zoogdiercellen, waaronder humane cellen.<sup>26,31</sup> De blokkade in de replicatiecyclus in ‘nonpermissive’ cellijnen gebeurt in een laat stadium van de replicatiecyclus.<sup>32</sup> Het virus kan daardoor nog wel de zogenaamde ‘early’, ‘intermediate’ en ‘late’ genen, én eventueel aanwezige recombinante genen, tot expressie brengen in humane cellen, maar de uiteindelijke assemblage van het virusdeeltje in deze cellen is geblokkeerd.<sup>26, 33</sup>

Waar voor veel andere virussen vaak specifieke celreceptoren betrokken zijn bij het infecteren van cellen, zijn voor pokkenvirussen (nog) geen specifieke gastheerreceptoren geïdentificeerd. Tot dusver is bekend dat bij hechting en fusie met de gastheercel aanwezigheid van glycosaminoglycanen of extracellulaire matrixcomponenten nodig zijn, die op vrijwel alle cellen voorkomen. Pokkenvirussen kunnen daardoor waarschijnlijk een groot scala aan zoogdiercellen infecteren, maar de mogelijkheid tot productieve replicatie is afhankelijk van gastheercel-specifieke intracellulaire factoren.<sup>34</sup>

### **1.3 MVA-MERS-S\_DF1**

De aanvrager is voornemens het gg-vaccin MVA-MERS-S\_DF1, dat in het buitenland geproduceerd wordt, voor onderzoek aan gezonde vrijwilligers toe te dienen via een intramusculaire injectie in de bovenarm.

Voor de productie van MVA-MERS-S\_DF1 is gebruik gemaakt van MVA-F6-sfMR; een ‘stock’ virus van het MVA isolaat F6 dat geïsoleerd is na additionele passages van MVA op CEF cellen. Dit isolaat wordt volgens de aanvrager vaker gebruikt als vector voor de ontwikkeling van vaccins. Voor de constructie van het vaccin wordt gebruik gemaakt van de vector plasmide pIIIH5red\_MERS-S, waarin het gen coderend voor het S-eiwit van MERS-CoV gekloneerd is achter de *Vaccinia virus* early/late’ promotor PmH5,<sup>35</sup> en waarin zich tevens de fluorescente marker mCherry bevindt. De aanvrager stelt dat in het S-gen drie *Vaccinia virus* terminatiesignalen zijn uitgeschakeld door stille mutaties.<sup>36</sup> De expressiecassette wordt geflankeerd door MVA sequenties die recombinatie op het target locus (deletion site III) mogelijk maken.

CEF cellen die geïnfecteerd zijn met MVA-F6 worden vervolgens getransfecteerd met pIIIH5red\_MERS-S, waarbij door homologe recombinatie de PmH5-MERS-S-mCherry sequentie in deletion site III opgenomen wordt.<sup>36</sup> Vervolgens worden fluorescente plaques geïsoleerd, en is de integratie van de cassette in het genoom gecontroleerd door middel van PCR. Tijdens verdere plaque zuiveringen wordt geselecteerd op niet-fluorescente plaques afkomstig van het uiteindelijke vaccinconstruct MVA-MERS-S, waarbij het mCherry gen na een tweede homologe recombinatiestap uit het genoom is verwijderd. Het uiteindelijke kandidaatvaccin MVA-MERS-S\_DF1 wordt geproduceerd in DF-1 cellen, die zijn afgeleid van kippenembryo fibroblast cellijnen.

## **2. Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft MERS-CoV in 2013 ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.<sup>37</sup> De COGEM heeft MVA in 2003 als apathogeen in pathogeniteitsklasse 1 ingedeeld, omdat het virus onschadelijk is gebleken bij toepassing in mens en dier.<sup>38</sup> Een variant van MVA, MVA- Bavarian Nordic (BN), gecreëerd door

additionele passages in CEF cellen, is in 2013 toegelaten op de Europese markt onder de naam IMVANEX® en dient als vaccin tegen pokken.<sup>39</sup>

Daarnaast heeft de COGEM ook positief geadviseerd over verschillende klinische studies met gg-MVA vaccins die sequenties bevatten van een Hemagglutinine eiwit (HA) van Influenza A virus,<sup>40,41</sup> en sequenties afkomstig van HIV-A,<sup>42</sup> of HIV-B.<sup>43</sup> In 2019 heeft de COGEM in een vertrouwelijk advies positief geadviseerd over de markttoelating van een van MVA afgeleid vaccin tegen het Ebolavirus.

### **3. Informatie over de klinische studie**

Het kandidaatvaccin MVA-MERS-S\_DF1 wordt geproduceerd in Duitsland. De klinische studie met MVA-MERS-S\_DF1 zal plaatsvinden in het Erasmus Medisch Centrum in Rotterdam. Proefpersonen ontvangen binnen een jaar maximaal 5 keer het vaccin via intramusculaire toediening, met minimaal 1 week tussen de toedieningen. De dosering varieert tussen de  $2 \times 10^7$  of  $2 \times 10^8$  'plaque forming units' (PFU) en zal maximaal  $1 \times 10^9$  PFU bedragen per proefpersoon. Tijdens de vaccinatie draagt het medisch personeel handschoenen en een overjas die in de 'clinical trial unit' dient te blijven. De handschoenen van het personeel en eventuele oppervlakten waarop gemorst wordt, worden met 70% ethanol schoongemaakt. Direct na vaccinatie wordt ook de injectieplaats met 70% ethanol schoongemaakt en afgedekt met een waterbestendige pleister die minstens 24 uur moet blijven zitten. Bij het verwijderen van de pleister dienen de plaats van toediening, de pleister en de handen wederom schoongemaakt te worden met 70% ethanol. Na vaccinatie worden de proefpersonen 1 uur gemonitord, en als er geen klinisch relevante bevindingen optreden mogen zij daarna het ziekenhuis verlaten.

### **4. Overweging**

In de onderhavige aanvraag wordt een MVA-MERS-S\_DF1 vaccin toegediend aan proefpersonen om de veiligheid, verdraagbaarheid en immunogeniteit te onderzoeken. Mogelijke risico's die hierbij kunnen optreden, hebben betrekking op de pathogeniteit van de genetisch gemodificeerde organismen (ggo's), de mogelijke verspreiding van de ggo's in het milieu en de eventuele vorming van nieuwe recombinante virussen. Door de verspreiding zouden andere personen dan de deelnemende patiënten geïnfecteerd kunnen raken met de ggo's of met een recombinant virus.

#### **4.1 Eigenschappen van MVA-MERS-S\_DF1**

MVA is door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1 als apathogeen organisme. Replicatie van het MVA-(vector)genoom vindt plaats in het cytoplasma van de cel en integratie van het vectorgenoom in het gastheergenoom is nooit beschreven.<sup>24,44</sup> Het potentieel schadelijke effect van de MVA-MERS-S\_DF1 hangt daarom samen met de geïnsereerde S-sequentie en de functie van het S-eiwit.

Het MERS-CoV S-eiwit is betrokken bij de hechting van MERS-CoV aan gastheercellen. De aanvrager acht het zeer onwaarschijnlijk dat het S-eiwit in het membraan van het MVA-MERS-S\_DF1 deeltje geïncorporeerd wordt. Bij MERS-CoV vindt de assemblage van virusdeeltjes plaats tussen het endoplasmatisch reticulum en Golgi systeem, waar de structurele eiwitten (waaronder het S-eiwit) naartoe getransporteerd worden.<sup>45</sup> Bij de natuurlijke replicatiecyclus van MVA bestaan twee infectieuze vormen van het virus, het intracellulaire 'intracellular mature virion' (IMV) en het extracellulaire 'extracellular enveloped virion' (EEV). Bij het IMV wordt het virale DNA in de gastheercel ingepakt

en komen de deeltjes vrij wanneer de cel lyseert ten gevolge van infectie. Een deel van de IMVs kunnen worden ingepakt in een dubbel membraan afkomstig van het trans-Golgi systeem.<sup>46,47</sup> Deze virusdeeltjes kunnen door fusie van het buitenste membraan met het gastheercelmembraan de cel verlaten en worden vervolgens EEV genoemd. Bij de ontwikkeling van EEVs kan bij de productie van MVA-MERS-S\_DF1 de mogelijkheid bestaan dat het S-eiwit in het virale membraan terecht komt. De aanvrager geeft echter aan dat bij de voorbereidingen van het vaccin (behandeling met lysis buffer en zuivering met ‘tangential flow filtration’) het buitenste membraan snel beschadigd raakt en verloren gaat. Ook zijn bij de aanvrager geen mechanismen bekend waardoor het S-eiwit op een andere manier in het MVA-MERS-S\_DF1 virusdeeltje geïncorporeerd kan worden. Indien MVA-MERS-S\_DF1 gepseudotyperd zou zijn met het S-eiwit zal dit volgens de aanvrager overigens geen verbreding van het tropisme opleveren, aangezien het gastheerbereik van MVA al zeer breed is.<sup>34</sup>

De aanvrager stelt dat toevoeging van de S-sequentie en aanwezigheid van het S-eiwit na infectie geen invloed heeft op de morfogenese van MVA, en dat daarmee de mogelijkheid tot productieve replicatie van MVA-MERS-S\_DF1 onveranderd is ten opzichte van MVA. Dit is onderzocht in CEF cellen en niet-permissieve HeLa en HaCat cellen, en hieruit blijkt dat de mogelijkheid tot productieve replicatie van MVA-MERS-S\_DF1 gelijk is aan die van wildtype MVA en productieve replicatie in menselijke cellen niet mogelijk is. Deze test in permissieve en niet-permissieve cellijnen is ook uitgevoerd met het Master Seed Virus van deze studie.

Er zijn enkele preklinische studies met het MVA-MERS-S vaccin geproduceerd in CEF cellen (MVA-MERS-S\_CEF), uitgevoerd met muizen en dromedarissen, waarbij geen ziekteverschijnselen zijn waargenomen.<sup>36,48</sup> Uit (pre)klinische studies met verschillende MVA-vectoren (o.a. als vaccin tegen influenza en HIV) is gebleken dat deze vectoren in het algemeen goed getolereerd worden.<sup>49,50,51</sup> Hoewel MVA wel kan repliceren in kippen, zijn er geen schadelijke effecten gerapporteerd in kippen na infectie met een MVA-H5 vector (een recombinant MVA met het hemagglutinine gen van influenzavirus (H5N1) A/vietnam/1194/04).<sup>52</sup>

De COGEM kan zich vinden in bovenstaande beweringen van de aanvrager. Zij acht het onwaarschijnlijk, maar niet geheel uitgesloten dat het S-eiwit in het MVA-MERS-S\_DF1 membraan opgenomen wordt. Wanneer in het theoretische geval toch pseudotypering optreedt, acht zij dit niet van invloed op de pathogeniteit en het gastheerbereik van de vector en de mogelijkheid tot productieve replicatie.

Al het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de virale vector MVA-MERS-S\_DF1 geattenuëerd en biologisch ingeperkt is bij toediening aan proefpersonen. De COGEM is van oordeel dat het transgen (MERS-S) geen verhogend effect heeft op de pathogeniteit en het verspreidingspotentieel van de vector.

#### **4.2 Moleculaire karakterisering**

Bij het vergelijken van het genoom van het ‘Master Seed Virus’ (MVA-F6) met de MVA-F6 consensus-sequentie met behulp van ‘next-generation sequencing’ (NGS), zijn twee ‘single nucleotide polymorphisms’ (SNPs) ontdekt in het ‘Master Seed Virus’. De eerste is geïdentificeerd als stille

mutatie, en de tweede vormt een stop-codon in een ORF dat codeert voor een niet-functioneel deel van de type I interferon receptor. Omdat dit eiwit al niet functioneel is in MVA, is de aanvrager van mening dat deze SNP geen invloed heeft op de werking van het vaccin.

MVA-MERS-S\_DF1 is 5 keer gepasseerd op DF-1 cellen, waarna het genoom van het vaccin na iedere passage is gesequenced met NGS en vergeleken met de referentiesequentie (een *in silico* constructie van de MVA-F6 backbone met de sequentie van het MERS S-eiwit en de PmH5 promotor). De aanvrager geeft aan dat daarbij enkel SNPs en geen recombinatie of deleties zijn waargenomen. Alleen stille mutaties of niet-coderende repetitieve sequenties worden geaccepteerd tijdens het productieproces (onderdeel van de acceptatiecriteria). De aanvrager stelt dat MVA-MERS-S genetisch stabiel is in DF-1 cellen.

Op basis van bovenstaande gegevens is de COGEM van oordeel dat de aanvrager de moleculaire karakterisering van MVA-MERS-S\_DF1 afdoende heeft uitgevoerd.

### **4.3 Recombinatie en reversie**

Een potentieel risico bij deze klinische studies met gg-virussen is het ontstaan van recombinant virus in de patiënt als gevolg van recombinatie met verwante wildtype virussen, of reversie naar een virulenter fenotype.

#### **4.3.1 Recombinatie**

Recombinatie kan optreden wanneer verwante virussen gelijktijdig dezelfde cel infecteren, waardoor de verloren functies in de MVA-vector opnieuw verkregen zouden kunnen worden, of waarbij de transgene sequentie in een wildtype (pokken)virus terecht zou kunnen komen. Een vereiste hiervoor is dat een verwant pokkenvirus ook mensen kan infecteren. Het meest bekende pokkenvirus uit het genus *Orthopoxvirus* dat infecties bij de mens veroorzaakt en ook alleen de mens als gastheer heeft, is het *Variola virus*. Dit virus is echter sinds 1980 wereldwijd uitgeroeid, waardoor co-infectie met dit virus uitgesloten is. Daarnaast bestaan er verschillende orthopoxvirussen met zoönotisch potentieel, zoals het *Monkeypox virus* en *Camelpox virus*. Ook van het *Vaccinia virus*, waarvan geen natuurlijke gastheer bekend is, zijn varianten aangetoond in vee en buffels in Brazilië en India, waarbij ook infectie bij mensen gemeld is.<sup>53,54</sup> In Europa is infectie van de mens met orthopoxvirussen zeer zeldzaam.<sup>53,55</sup> Tot dusver zijn er in Europa enkele gerapporteerde gevallen bekend; in september 2018 en december 2019 zijn drie infecties met het *Monkeypox virus* gerapporteerd in Engeland, die waarschijnlijk zijn opgelopen in Nigeria.<sup>56,57</sup> Infectie met het *Cowpox virus* is in Europa zeer zeldzaam en wordt sporadisch gerapporteerd, voornamelijk bij mensen die direct contact hebben gehad met een geïnfecteerd dier.<sup>58</sup>

Van het *Vaccinia virus* is het fenomeen van ‘superinfection exclusion’ beschreven, waarbij een opvolgende secundaire infectie van dezelfde gastheercel wordt voorkomen door expressie van bepaalde ‘early’ eiwitten.<sup>59,60</sup> Het is nog wel mogelijk dat meerdere virusdeeltjes een cel tegelijkertijd kunnen infecteren, maar wanneer specifieke ‘early’ eiwitten tot expressie komen, wordt een daaropvolgende infectie van buitenaf voorkomen.<sup>60</sup> Ook de vorming van de ‘virus factories’ waarin de replicatie van het DNA plaatsvindt, kan belemmerend werken voor recombinatie.<sup>61</sup> Echter, *in vitro* is aangetoond dat



recombinatie tussen een recombinante MVA-vector en een *Cowpox virus* variant kan plaatsvinden bij zowel co-infectie als superinfectie (2 tot 6 uur na primaire infectie) in ‘semi-permissieve’ cellijnen.<sup>55,62,63</sup>

Hoewel recombinatie tussen verwante orthopoxvirussen theoretisch mogelijk is, en *in vitro* ook aangetoond is met *Cowpox virus*<sup>63,64</sup> acht de COGEM de kans op een co-infectie van een gevaccineerde met MVA-MERS-S\_DF1 en een verwant Orthopoxvirus zeer onwaarschijnlijk, omdat de aanwezigheid van de replicatie-deficiënte MVA-MERS-S\_DF1 vector in de gevaccineerde met de tijd afneemt en infectie met andere orthopoxvirussen in Nederland zeer zeldzaam is.

Op basis van bovenstaande gegevens concludeert de COGEM dat de kans op recombinatie tussen MVA-MERS-S\_DF1 en zoönotische orthopoxvirussen verwaarloosbaar klein is, aangezien deze virussen niet circuleren in Europa. Daarnaast zijn er, voor zover bekend bij de COGEM, geen aanwijzingen dat er recombinatie is opgetreden tussen MVA(-vectoren) en andere pokkenvirussen in de periode na vaccinatie met MVA, of bij gebruik van deze vector in klinische studies. De kans op recombinatie tussen MVA-MERS-S\_DF1 (dsDNA vaccivirus) en coronavirussen (positief enkelstrengs RNA virus) acht zij verwaarloosbaar klein.

Naast het genus *Orthopoxvirus* zijn er ook andere genera binnen de familie *Poxviridae* waarin virusspecies voorkomen die mensen kunnen infecteren.<sup>65</sup> De kans op recombinatie tussen MVA-MERS-S\_DF1 en pokkenvirussen uit een ander genus dan *Orthopoxvirus* acht de COGEM echter verwaarloosbaar klein, onder meer omdat hier in het verleden nooit melding van is geweest gedurende of na de grootschalige vaccinaties met *Vaccinia virus* varianten ter preventie van infectie met het *Variola virus*.

#### 4.3.2 Reversie naar wildtype

MVA-vectoren zijn biologisch ingeperkt. Ten opzichte van ouderstam CVA ontbreekt 15% van het genoom door verschillende grote en kleinere deleties en andere mutaties.<sup>44</sup> De mogelijkheid om een productieve replicatie te handhaven wordt waarschijnlijk door meerdere ontbrekende of slecht functionerende genproducten veroorzaakt. Hierdoor acht de COGEM de kans op spontane volledige reversie van het genoom naar een volledig replicatiecompetent fenotype verwaarloosbaar klein.

#### 4.4 Biodistributie en uitscheiding

Verspreiding is mogelijk door morsen, prikincidenten, lekkage op de plaats van injectie, of blootstelling aan besmet afval. Het risico op infectie van derden acht de aanvrager minimaal, onder andere omdat infectie zelflimiterend is en omdat in studies met vergelijkbare MVA-vectoren geen uitscheiding van intacte (replicatiecompetente) MVA-vectordeeltjes in niet-humane primaten en mensen gedetecteerd is.<sup>66,67</sup>

In een dierstudie met MVA-MERS-S\_CEF is zeer beperkte biodistributie in enkele muizen aangetoond en is geen MVA-DNA gedetecteerd in nieren, rectum, ontlasting, blaas en urine.<sup>68</sup> De aanvrager stelt dat op basis van deze bevindingen en het feit dat er geen hematogene verspreiding is, er geen ggo uitgescheiden zal worden in urine en respiratoire druppels.

Om verspreiding via lekkage en accidentele blootstelling aan vaccinemateriaal te voorkomen is de aanvrager voornemens hygiënemaatregelen te hanteren. Zo wordt bij de patiënt de injectieplaats na de vaccinatie met 70% alcohol schoongemaakt en afgedekt met een waterbestendige pleister die minstens 24 uur moet blijven zitten. Bij het verwijderen van de pleister dienen de plaats van toediening, de pleister en de handen schoongemaakt te worden met 70% ethanol.

Indien MVA-MERS-S\_DF1 in het milieu wordt uitgescheiden, is deze vector biologisch ingeperkt en zal zich niet verder verspreiden. Daarnaast is de COGEM van oordeel dat het ingebrachte transgen geen verhoging van de pathogeniteit ten opzichte van MVA met zich meebrengt. De COGEM acht de milieurisico's ten gevolge van uitscheiding van MVA-MERS-S\_DF1 daarom verwaarloosbaar klein.

## 5. Conclusie

De COGEM is van oordeel dat MVA-MERS-S\_DF1 afdoende moleculair is gekarakteriseerd. De COGEM acht het risico op recombinatie of reversie in de proefpersoon verwaarloosbaar klein. De kans op verspreiding en op nadelige effecten bij eventuele blootstelling van derden aan MVA-MERS-S\_DF1 acht zij eveneens verwaarloosbaar klein. Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze voorgenomen klinische studie met MVA-MERS-S\_DF1 verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. International Committee on Taxonomy of Viruses( ICTV). Virus Taxonomy: 2019 Release <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 24 September 2020)
2. Zaki AM *et al.* (2012). Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med.* 367:1814-20
3. De Wit E *et al.* (2016). SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 14: 523-534
4. Petrosillo N *et al.* (2020). COVID-19, SARS and MERS: are they closely related? *Clin. Microbiol. Infect.* 26: 729-734
5. World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) [https://www.who.int/westernpacific/news/q-a-detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-\(mers-cov\)](https://www.who.int/westernpacific/news/q-a-detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-(mers-cov))
6. World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-\(mers-cov\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-(mers-cov))
7. Al-Omari A *et al.* (2019). MERS coronavirus outbreak: Implications for emerging viral infections. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 93: 265-285
8. Memish ZA *et al.* (2013). Family Cluster of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infections. *N Engl J Med.* 2013 May 29. [Epub ahead of print]

9. Health Protection Agency (HPA) UK Novel Coronavirus Investigation team. 2013. Evidence of person-to-person transmission within a family cluster of novel coronavirus infections, United Kingdom, February 2013. *Euro Surveill.* 18:20427
10. Yin Y & Wunderink RG (2018). MERS, SARS, and other coronaviruses as causes of pneumonia. *Respirology* 23: 130-137
11. Landelijke Coördinatie Infectieziektebestrijding (LCI). Richtlijnen & Draaiboeken: MERS-CoV. <https://lci.rivm.nl/richtlijnen/merscov> (bezoekt: 24 september 2020)
12. Volz A & Sutter G (2017). Modified Vaccinia Virus Ankara: History, Value in Basic Research, and Current Perspectives for Vaccine Development. *Adv. Virus Res.* 97: 187-243
13. Mayr A *et al.* (1978). The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defense mechanism. *Zentralbl. Bakteriol.* 167: 375–390
14. Werner GT *et al.* (1980). Studies on poxvirus infections in irradiated animals. *Arch. Virol.* 64: 247-256
15. Stittelaar KJ *et al.* (2001). Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques. *Vaccine.* 19: 3700-3709
16. Mayr A *et al.* (1978). Vaccination against pox diseases under immunosuppressive conditions. *Dev Biol Stand* 41: 225-34
17. McCurdy LH *et al.* (2004). Modified Vaccinia virus Ankara: Potential as an alternative smallpox vaccine. *Clinical Infectious Diseases* 38: 1749-1753
18. Greenough TC *et al.* (2008). Safety and immunogenicity of recombinant poxvirus HIV-1 vaccines in young adults on highly active antiretroviral therapy. *Vaccine* 26:6883-93
19. Cosma A *et al.* (2007). Evaluation of modified vaccine virus Ankara as an alternative vaccine against smallpox in chronically HIV type 1-infected individuals undergoing HAART. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23:782-93
20. Harrop R *et al.* (2010). Cross-trial analysis of immunologic and clinical data resulting from phase I and II trials of MVA-5T4 (TroVax) in colorectal, renal, and prostate cancer patients. *J Immunother* 33:999-1005
21. Oudard S *et al.* (2011). A phase II study of the cancer vaccine TG4010 alone and in combination with cytokines in patients with metastatic renal clear-cell carcinoma: clinical and immunological findings. *Cancer Immunol Immunother* 60:261-71
22. Skinner MA *et al.* (2012). The Double Stranded DNA Viruses, family *Poxviridae*. In: *Virus Taxonomy, Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Edited by King AMQ *et al.* Elsevier Academic Press, Amsterdam 291-309
23. Antoine G *et al.* (1998). The Complete Genomic Sequence of the Modified Vaccinia Ankara Strain: Comparison with Other Orthopoxviruses. *Virology* 244: 365–396
24. Verheust C *et al.* (2012). Biosafety aspects of Modified Vaccinia virus Ankara (MVA)-based vectors used for gene therapy or vaccination. *Vaccine.* 30: 2623-2632
25. Meyer H *et al.* (1991). Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J. Gen. Virol.* 72: 1031-1038
26. Sutter G & Moss B (1992). Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10847-10851
27. Meisinger-Henschel C *et al.* (2007). Genomic sequence of chorioallantois vaccinia virus Ankara, the ancestor of modified vaccinia virus Ankara. *J. Gen. Virol.* 88: 3249-3259

28. Peng C & Moss B (2020). Repair of a previously uncharacterized second hostrange gene contributes to full replication of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in human cells. *PNAS* 117: 3759-3767
29. Blanchard TJ *et al.* (1998). Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J. Gen. Virol.* 79: 1159-1167
30. Liem J & Liu J (2016). Stress beyond translation: Poxviruses and more. *Viruses*, 8: 169
31. Drexler I *et al.* (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: 347-52
32. Carroll MW & Moss B (1997). Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. *Virology* 238: 198-211
33. Sancho MC *et al.* (2002). The block in assembly of modified Vaccinia virus Ankara in HeLa cells reveals new insights into Vaccinia virus morphogenesis. *J. Virol.* 76: 8318-8334
34. McFadden G (2005). Poxvirus tropism. *Nature Reviews, Microbiology.* 3: 201-213
35. Wang Z *et al.* (2010). Modified H5 promoter improves stability of insert genes while maintaining immunogenicity during extended passage of genetically engineered MVA vaccines. *Vaccine* 28: 1547-1557
36. Song F *et al.* (2013). Middle East respiratory syndrome coronavirus spike protein delivered by Modified Vaccinia virus Ankara efficiently induces virus-neutralizing antibodies. *J. Virol.* 87: 11950-11954
37. COGEM (2013). Classificatie en werkzaamheden met *Middle East Respiratory Syndrome coronavirus* (MERS-CoV). COGEM advies CGM/130822-01
38. COGEM (2003). Classificatie geattenuerde pokkenvirus-stammen en aanvullende voorschriften (CGM/030519-06)
39. European Medicines Agency. IMVANEX  
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/imvanex> (bezoekt: 20 april 2020)
40. COGEM (2012). Klinische studie met genetisch gemodificeerd Modified vaccinia virus Ankara vaccin dat codeert voor het Hemagglutinine van Influenza A virus. COGEM advies CGM/120625-01
41. COGEM (2012). Aanvullende informatie klinische studie met gg-MVA-HA vaccin. COGEM advies CGM/120928-01
42. COGEM (2003). MVA-HIV A vaccin klinische fase I studie (CGM/031211-02)
43. COGEM (2006). Fase I klinische studie met een genetisch gemodificeerd MVA virus gericht tegen HIV-B. (CGM/061012-01)
44. Goossens M *et al.* (2013). Environmental risk assessment of clinical trials involving modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vectors. *Current Gene Therapy*, 13: 413-420
45. Ujike M & Taguchi F (2015). Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions. *Viruses* 7: 1700-1725
46. Liu L *et al.* (2014). From crescent to mature virion: Vaccinia virus assembly and maturation. *Viruses*, 6: 3787-3808
47. Condit RC *et al.* (2006). In a nutshell Structure and assembly of the vaccinia virion. *Adv. Virus Res.* 66: 31-124
48. Haagmans BL *et al.* (2016). An Orthopoxvirus-based vaccine reduces virus excretion after MERS-CoV infection in dromedary camels. *Science* 351: 77-81

49. Altenburg AF *et al.* (2014). Modified Vaccinia virus Ankara (MVA) as production platform for vaccines against influenza and other viral respiratory diseases. *Viruses* 6: 2735-2761
50. Rimmelzwaan GF & Sutter G (2009). Candidate influenza vaccines based on recombinant modified vaccinia virus Ankara. *Expert. Rev. Vaccines* 8: 447-454
51. Guo ZS *et al.* (2019). Vaccinia virus-mediated cancer immunotherapy: cancer vaccines and oncolytics. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 7:6
52. Veits J *et al.* (2008). Protective efficacy of several vaccines against highly pathogenic H5N1 avian influenza virus under experimental conditions. *Vaccine* 26: 1688-1696
53. Lewis-Jones S (2004). Zoonotic poxvirus infections in humans. *Current Opinion in Infectious Diseases* 17: 81-89
54. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Smallpox & other Orthopox-associated infections. <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/smallpox-and-other-orthopoxvirus-associated-infections> (bezoekt: 3 augustus 2020)
55. Okeke MI *et al.* (2006). Modified vaccinia virus Ankara multiplies in rat IEC-6 cells and limited production of mature virions occurs in other mammalian cell lines. *J. Gen. Virol.* 87: 21-27
56. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Rapid risk assessment, Monkeypox cases in the UK imported by travelers returning from Nigeria, 2018. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/rapid-risk-assessment-monkeypox-cases-uk-imported-travellers-returning-nigeria> (visited: 28th of May 2020)
57. Public Health England. Monkeypox case confirmed in England. <https://www.gov.uk/government/news/monkeypox-case-confirmed-in-england> (visited: 28th of May 2020)
58. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Cowpox <https://www.ecdc.europa.eu/en/cowpox/about-disease-cowpox> (visited: 28th of May 2020)
59. Doceul V *et al.* (2010). Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science*. 327: 873-876
60. Laliberte JP & Moss B (2014). A novel mode of poxvirus superinfection exclusion that prevents fusion of the lipid bilayers of viral and cellular membranes. *J. Virol.* 88: 9751-9768
61. Paszkowski P *et al.* (2016). Live-cell imaging of Vaccinia virus recombination. *PLoS Pathogens* DOI:10.1371/journal.ppat.1005824
62. Okeke MI *et al.* (2017). Hazard characterization of Modified Vaccinia virus Ankara vector: What are the knowledge gaps? *Viruses*, 9: 318
63. Okeke MI *et al.* (2009). In vitro host range, multiplication and virion forms of recombinant viruses obtained from co-infection in vitro with a vaccinia-vectored influenza vaccine and a naturally occurring Cowpox virus isolate. *Virol. J.* 6: 55
64. Hansen H *et al.* (2004). Recombinant viruses obtained from co-infection in vitro with a live vaccinia-vectored influenza vaccine and a naturally occurring Cowpox virus display different plaque phenotypes and loss of the transgene. *Vaccine* 23: 499-506
65. Damon IK (2013). Chapter 67: Poxviruses. In: *Fields Virology*, Volume 2, sixth edition. Edited by. Knipe DM *et al.* Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia. 2161-2184

66. Stittelaar KJ *et al.* (2001). Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques. *Vaccine* 19: 3700-3709
67. Rochlitz C *et al.* (2003). Phase I immunotherapy with a modified vaccinia virus (MVA) expressing human MUC1 as antigen-specific immunotherapy in patients with MUC1-positive advanced cancer. *J. Gene Med.* 5: 690-699
68. Langenmayer MC *et al.* (2018). Distribution and absence of generalized lesions in mice following single dose intramuscular inoculation of the vaccine candidate MVA-MERS-S. *Biologicals* 54: 58-62