

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

**DATUM** 24 maart 2021  
**KENMERK** CGM/210324-01  
**ONDERWERP** Advies generieke milieurisicobeoordeling klinische studies met MVA-vectoren

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,


De COGEM heeft, naar aanleiding van een adviesvraag over een brede vergunningaanvraag voor vaccinstudies met MVA-vectoren, een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische toepassingen met MVA-vectoren opgesteld ten einde de vergunningverleningsprocedure voor deze studies te stroomlijnen.

**Samenvatting:**

Het Modified Vaccinia virus Ankara (MVA) is een biologisch ingeperkt virus dat een historie van veilig gebruik kent als vaccin tegen het pokkenvirus. Vectoren afgeleid van MVA worden gebruikt voor verschillende klinische toepassingen (zoals vaccinatie), met name vanwege de grote 'packaging' capaciteit, de hoge immunogeniciteit, en omdat het vectorgenoom niet integreert in het DNA van de gastheercel.

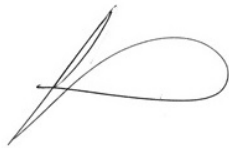
De COGEM heeft verscheidene keren geadviseerd over klinische studies waarbij MVA-vectoren ingezet worden. Mede naar aanleiding van een brede vergunningaanvraag om MVA-vectoren te gebruiken voor klinische vaccinstudies, heeft de COGEM een generieke milieurisicobeoordeling voor klinische toepassingen met MVA-vectoren opgesteld.

MVA-vectoren zijn dusdanig ingeperkt dat zij apathogeen zijn en zich niet kunnen vermenigvuldigen in mensen, waardoor verdere verspreiding in het milieu niet mogelijk is. De COGEM is van oordeel dat, gezien de eigenschappen van de MVA-vectoren, de risico's voor mens en milieu bij klinische studies met deze vectoren verwaarloosbaar klein zijn, mits aan een aantal randvoorwaarden voldaan wordt. Deze generieke milieurisicobeoordeling kan het vergunningverleningsproces vereenvoudigen en stroomlijnen, omdat het als basis kan dienen voor het instellen van een vergunning onder vaste voorwaarden (VoV) voor deze toepassingen.



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. ir. M.M.C. Gielkens, Loket Gentherapie

# Generieke milieuristicobeoordeling van klinische studies met MVA-vectoren

## COGEM advies CGM/210324-01

### 1. Inleiding

Het Modified Vaccinia virus Ankara (MVA) is een verzwakt virus dat een historie van veilig gebruik kent als vaccin tegen het pokkenvirus (*Variola virus*). Vanwege de eigenschappen van dit verzwakte virus, is de afgelopen jaren veel onderzoek gaande naar de ontwikkeling van vectoren die afgeleid zijn van MVA en ingezet kunnen worden als klinische toepassing, bijvoorbeeld als vaccin tegen verschillende infectieziekten.

#### 1.1 Generieke milieuristicobeoordeling

MVA-vectoren worden om verschillende redenen als goede kandidaten beschouwd voor gebruik als vectorsysteem voor klinische toepassingen (bijvoorbeeld vaccinatie), met name vanwege de grote 'packaging' capaciteit, de hoge immunogeniciteit als vaccin en het feit dat deze vectoren relatief makkelijk geproduceerd kunnen worden. Daarnaast vindt de replicatie van het MVA-(vector)genoom plaats in het cytoplasma van de cel en is integratie van het vectorgenoom in het gastheergenoom nooit gerapporteerd.<sup>1,2,3</sup>

De COGEM heeft verscheidene keren geadviseerd over klinische studies waarbij MVA-vectoren ingezet worden. Een brede vergunningaanvraag voor het gebruik van MVA-vectoren in klinische vaccinatiestudies (al dan niet in combinatie met replicatie-deficiënte adenovirale vectoren afgeleid van humaan adenovirus 26), vormt de aanleiding voor het opstellen van de onderhavige generieke milieuristicobeoordeling die de basis kan vormen om een vereenvoudigde vergunningprocedure (vergunning onder vaste voorwaarden, VoV) voor klinische studies met MVA-afgeleide vectoren op te stellen. De voor de milieuristicobeoordeling relevante aspecten en informatie worden hieronder verder besproken.

### 2. Pokkenvirussen

De familie *Poxviridae* is onderverdeeld in 2 subfamilies, de *Chordopoxvirinae* en de *Entomopoxvirinae*. De subfamilie *Entomopoxvirinae* bevat vier genera, terwijl de *Chordopoxvirinae* 18 genera bevat. Modified Vaccinia virus Ankara (MVA) is een verzwakte variant van het Chorioallantois Vaccinia virus Ankara (CVA), een pokkenvirus uit de species *Vaccinia virus*. Het *Vaccinia virus* is de typesoort uit het genus *Orthopoxvirus* (subfamilie *Chordopoxvirinae*), dat nog 11 andere pokkenvirussoorten kent, zoals het apenpokkenvirus (*Monkeypox virus*) en het koepokkenvirus (*Cowpox virus*).<sup>4</sup> Een andere bekende soort uit dit genus is het (inmiddels uitgeroeide) *Variola virus*, het virus dat bij mensen de besmettelijke ziekte 'pokken' veroorzaakt, waarbij de patiënt last krijgt van griepachtige symptomen en koorts, gevolgd door blaasjes en pustels op de huid. Infectie met het *Variola virus* kende in 30% van de gevallen een dodelijke afloop en heeft met name in de 18<sup>e</sup> eeuw in Europa jaarlijks voor veel slachtoffers gezorgd.

Sommige pokkenvirussen zijn onder natuurlijke omstandigheden zeer gastheerspecifiek. Zo had het *Variola virus* alleen de mens als gastheer en is het kamelenpokkenvirus (*Camelpox virus*) alleen besmettelijk voor kamelen, maar er zijn ook pokkenvirussen die een breder tropisme hebben en verschillende gastheren (verschillende diersoorten en mensen) kunnen infecteren. Zo omvat het genus *Orthopoxvirus* meerdere pokkenvirussoorten die een dierlijke gastheer hebben, maar waarbij ook infectie

bij mensen gerapporteerd is, namelijk *Cowpox virus*, *Monkeypox virus*, *Akhmeta virus*<sup>5,6</sup> en *Abatino macacapox virus*<sup>7</sup>.

De voornaamste manier om geïnfecteerd te raken met een zoönotisch pokkenvirus is door direct contact met de beschadigde huid, door een beet van een dier of via besmette gebruiksvoorwerpen ('fomites').<sup>8</sup> De voornaamste manier van verspreiding van het *Vaccinia virus* buiten het lichaam is via direct contact.<sup>9</sup> Het *Variola virus* kon daarnaast ook via respiratoire druppels verspreid worden.<sup>10</sup>

Pokkenvirussen zijn zeer stabiel buiten het lichaam: ze kunnen lange tijd (meerdere maanden) infectieus blijven en zijn zeer resistent tegen uitdroging in materiaal waarin het virus zich bevindt en uitgescheiden wordt (zoals in korsten, serum, bloedresten of andere excreties).<sup>1,11</sup> De virussen zijn wel gevoelig voor veelgebruikte desinfectiemiddelen.<sup>11</sup>

### **2.1 Geschiedenis van Modified Vaccinia virus Ankara (MVA)**

Aan het einde van de 18<sup>e</sup> eeuw heeft de Engelse arts Edward Jenner aangetoond dat materiaal verkregen uit pokken van zieke koeien (verondersteld wordt dat het *Cowpox virus* of mogelijk een reeds uitgestorven Horsepox virus betrof)<sup>12</sup> gebruikt kon worden om mensen te beschermen tegen pokken veroorzaakt door het *Variola virus*. Later is in de 19<sup>e</sup> eeuw een overstap gemaakt naar het *Vaccinia virus* als vaccivirus tijdens de bestrijding van het *Variola virus*,<sup>13</sup> maar het is onbekend wat de herkomst of achtergrond van het *Vaccinia virus* is geweest. Van dit virus zijn geen natuurlijke gastheren bekend.<sup>14</sup> De Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) is in 1966 gestart met een vaccinatiecampagne om het *Variola virus* wereldwijd uit te roeien, waarbij gebruik gemaakt is van verschillende *Vaccinia virus* stammen als vaccin.<sup>15</sup> In 1980 is het *Variola virus* officieel uitgeroeid verklaard. Vaccinatie met *Vaccinia virus* kon in zeldzame gevallen ernstige complicaties geven, zoals progressieve vaccinia (met vaak dodelijke afloop), gegeneraliseerde vaccinia (dat een vergelijkbaar ziektebeeld geeft als infectie met het *Variola virus* maar vaak zelflimiterend is), neurologische complicaties of myocarditis. Ook was vaccinatie met *Vaccinia virus* gecontra-indiceerd voor personen met huidaandoeningen zoals eczeem, omdat bij deze personen een ernstige infectie kon ontstaan die zich over het hele lichaam kon verspreiden.<sup>16</sup>

MVA is afgeleid van het Chorioallantois Vaccinia virus Ankara (CVA), dat is ontwikkeld door de *Vaccinia virus* stam Ankara te cultiveren op het chorioallantoismembraan van bevruchte kippeneieren. CVA is in het verleden ook toegepast als vaccin tegen pokken, maar gaf secundaire laesies als bijwerking na vaccinatie. Er is veel onderzoek gedaan naar de eigenschappen van CVA, onder andere naar de evolutie en stabiliteit door het virus herhaaldelijk te passeren in 'chicken embryo fibroblast' (CEF) cellen.<sup>17,18</sup> Na ongeveer 570 passages in CEF cellen zijn er verschillende mutaties ontstaan in het genoom die gepaard gingen 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>18</sup> MVA is niet pathogeen in dieren, waaronder bestraalde muizen,<sup>19</sup> konijnen<sup>20</sup> en immuun-gecompromitteerde apen.<sup>21</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>22,23</sup> De veiligheid van MVA is tevens aangetoond in HIV-geïnfecteerde personen en kankerpatiënten.<sup>24,25,26,27</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>28,29</sup> De MVA Bavarian Nordic (BN) stam, gecreëerd door additionele passages in CEF cellen, is in 2013 toegelaten op de Europese markt onder de naam IMVANEX® en dient als vaccin tegen ‘smallpox’ (pokken veroorzaakt door het *Variola virus*).<sup>30</sup> MVA-BN is ook veilig gebleken in individuen met een contra-indicatie voor het reguliere pokkenvaccin (*Vaccinia virus*).<sup>31,32,33</sup>

## **2.2 Genoomorganisatie van MVA**

MVA virusdeeltjes bezitten een of twee membranen, en het virale lineaire dubbelstrengs DNA genoom van ongeveer 178 kbp<sup>34,35</sup> is ingepakt in een zogenaamde virale ‘core’. Na meer dan 500 passages van ouderstam CVA in CEF cellen, hebben in het MVA genoom naast kleine deleties, inserties en puntmutaties ook zes grote deleties plaatsgevonden. Hierdoor is ten opzichte van CVA ongeveer 15% van het genoom (circa 30 kbp) verloren gegaan.<sup>1,36,37</sup> Deze deleties zijn ontstaan in verschillende regio’s van het genoom.<sup>36</sup> In vergelijking met ouderstam CVA bevat MVA 71 orthologe open leesramen (‘ORFs’) die voor identieke eiwitsequenties coderen, en 124 ORFs waarbij de genproducten aminozuurwijzigingen, inserties of deleties bevatten.<sup>17</sup>

Door de verschillende inserties, deleties en mutaties die zijn opgetreden bij de ontwikkeling van MVA, zijn onder andere genen verstoord of verloren gegaan die betrokken zijn bij de replicatie in verschillende zoogdiercellen, bij het ontduiken van het immuunsysteem van de gastheer, en bij de virulentie van het virus.<sup>1,18,38,39</sup>

## **2.3 Infectie, DNA replicatie en levenscyclus van pokkenvirussen**

Van pokkenvirussen is bekend dat bij hechting en fusie met de gastheercel de 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 (d.w.z. de mogelijkheid om na infectie nieuwe virusdeeltjes te vormen) is afhankelijk van gastheercel-specifieke intracellulaire factoren.<sup>40</sup>

Pokkenvirussen (*Poxviridae*) repliceren in het cytoplasma van de gastheercel. Hiervoor is het virus afhankelijk van de eigen ‘transcriptie-machinerie’, die ingepakt is in de virale ‘core’, waarin ook het virale DNA zich bevindt. Voor translatie is het virus afhankelijk van de cel-eigen eiwitsynthese.<sup>41</sup> Om de gastheercel te infecteren, hecht het virus zich aan het oppervlak van de gastheercel en vervolgens fuseert het virale membraan met het gastheermembraan, gemedieerd door een ‘viral entry/fusion complex’ bestaande uit minstens 12 virale eiwitten, en komt de ‘core’ in het cytoplasma terecht.<sup>42,43</sup> Na enige tijd vindt de ‘core uncoating’ plaats, waarbij het genoom vrijkomt. Er wordt verondersteld dat de ‘core uncoating’ gebeurt in de nabijheid van het endoplasmatisch reticulum (ER). Hierdoor wordt een replicatiecomplex gevormd dat omringt is door het membraan van het ruwe ER, een zogenaamde ‘virus factory’.<sup>44</sup>

De levenscyclus van pokkenvirussen verloopt in drie fasen; de ‘early’, ‘intermediate’ en ‘late’ fase. De ‘early’ transcriptie vindt plaats in de ‘core’ van het virion door het DNA-afhankelijke RNA polymerase, Hierbij wordt viraal mRNA geproduceerd dat codeert voor eiwitten die betrokken zijn bij DNA replicatie, de expressie van ‘intermediate’ genen, en bij het moduleren van de antivirale respons van de gastheer. Omdat de complete transcriptie-machinerie in de virale ‘core’ aanwezig is, kan transcriptie van het virale genoom zeer snel na infectie plaatsvinden. Na de expressie van de ‘early’ genen valt de ‘core’ uit elkaar, en kan DNA-replicatie plaatsvinden, en worden daarna ook de ‘intermediate’ en ‘late’ genen getranscribeerd.<sup>45</sup> Replicatie van het DNA kan binnen 2 uur na infectie gedetecteerd worden. Gedurende de 2<sup>de</sup>, ofwel ‘intermediate’ fase worden met name eiwitten geproduceerd die nodig zijn voor de expressie van de ‘late’ genen. In de 3<sup>de</sup> of ‘late’ fase komen de structurele eiwitten van het virus tot expressie, en worden daarnaast ook de eiwitten geproduceerd die nodig zijn voor het tot expressie komen van de ‘early’ genen (zoals de DNA-afhankelijke RNA-polymerase, het ‘capping’ enzym en polyA polymerase), die ingepakt worden in de ‘core’ van het nieuwe virusdeeltje om een volgende infectiecyclus te faciliteren.<sup>46</sup> Van het *Vaccinia virus* is bekend dat er meer dan 100 eiwitten in het virusdeeltje ingepakt zijn.<sup>44</sup>

Het uiteindelijke virusdeeltje kent twee infectieuze vormen, het ‘intracellulaire mature virion’ (IMV) en het ‘extracellulaire enveloped mature virion’ (EEV). Eerst wordt het virale DNA in de gastheercel ingepakt in zogenaamde intracellulaire ‘immature virions’ (IV), die daar matureren in infectieuze IMV. De IMV komen vrij wanneer de cel lyseert ten gevolge van de infectie. Een deel van de IMVs kan worden ingepakt in een dubbel membraan afkomstig van het *trans*-Golgi systeem; deze worden intracellulaire ‘enveloped’ of ‘wrapped’ virions (IEV of WV) genoemd. De IEV worden via microtubuli getransporteerd naar het celmembraan, en daar kan het buitenste virale membraan fuseren met het plasmamembraan van de gastheercel; deze vorm wordt ‘cel-geassocieerd enveloped virion’ (CEV) genoemd. Deze CEV kunnen direct losgekoppeld worden van het celmembraan of indirect door inductie van actinepolymeren, waarbij het vrijgekomen virus bekend is als EEV.<sup>40,47,48,49</sup>

Het IMV en EEV verschillen in het aantal omringende membranen en hebben daarbij ook verschillende antigenen/glycoproteïnen op het membraanoppervlak. Bij infectie met IMV fuseert het enkele membraan en kan de virale ‘core’ direct in het cytoplasma van de cel terechtkomen. Bij EEV wordt eerst het buitenste membraan verstoord door eiwitten aanwezig op het cel- en virusmembraan op de plaats van hechting aan de gastheercel, waardoor het binnenmembraan kan fuseren met de gastheercel.<sup>16</sup>

#### **2.4 Replicatie van MVA in verschillende gastheercellen**

Productieve replicatie van MVA is mogelijk in een beperkt aantal cellijnen, met als voornaamste cellijn de CEF cellen. Replicatie is ook mogelijk in andere cellijnen van embryonale aviaire oorsprong, zoals van kippen, eenden of kwartels. Door de deleties die aanwezig zijn in het genoom van MVA is het virus echter niet meer in staat om productief te repliceren (ook wel ‘nonpermissive’ genoemd) in de meeste zoogdiercellen, waaronder humane cellen.<sup>37,50</sup> Zo worden in HeLa cellen, afkomstig van de mens, enkel IV-deeltjes gedetecteerd, en geen IMVs.<sup>37,51</sup> In enkele specifieke zoogdiercellijnen, zoals de ‘baby hamster kidney’ (BHK-21) cellen en IEC-6 cellen afkomstig van de rat, is MVA wel in staat tot replicatie (‘permissive’ cellijnen).<sup>1,50,52,53</sup> Ook zijn er enkele cellijnen waarin in beperkte mate productieve replicatie kan plaatsvinden (‘semi-permissive’ cellijnen), zoals MA104, BS-C-1 en CV-1 cellen (afkomstig van de

groene meerkat), en MDCK cellen (afkomstig van de hond).<sup>52</sup> Hierbij dient opgemerkt te worden dat de mogelijkheid tot productieve infectie *in vitro* anders kan zijn, en vaak breder is, dan *in vivo*.<sup>40</sup>

De blokkade in de replicatiecyclus in ‘nonpermissive’ cellijnen vindt plaats in een laat stadium van de replicatiecyclus.<sup>52</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 is in deze cellen geblokkeerd.<sup>37,51</sup>

### ***Host-range genen***

Al bijna 30 jaar wordt er onderzoek gedaan naar de ‘host range’ (gastheerbereik) genen die verantwoordelijk zijn voor de verminderde replicatiecapaciteit van MVA. Inmiddels is duidelijk dat regulatie van het gastheerbereik multifactorieel is en zijn er verschillende genen geïdentificeerd die hierbij een rol kunnen spelen. Vaak leidt herstel van een ‘host-range’ gen en expressie van het bijbehorende eiwitproduct voor een gedeeltelijk herstel van de replicatiecapaciteit, of is replicatie alleen productief wanneer specifieke cellijnen gebruikt worden. Recent is een nieuw ‘host-range’ gen in het genoom van het *Vaccinia virus* geïdentificeerd, C16L/B22R, dat betrokken lijkt te zijn bij de replicatie in verschillende humane gastheercellen.<sup>38,54</sup> Dit gen (aanwezig in twee kopieën, links en rechts, in het genoom van de meeste orthopoxvirussen) is geïnactiveerd in MVA door meerdere deleties. Wanneer dit gen hersteld wordt, of tot expressie gebracht wordt in een humane cellijn, is MVA in staat in bepaalde humane cellijnen productief te repliceren. Wanneer daarnaast ook een tweede in MVA ontbrekend host-range gen (C12L) hersteld wordt, waarvan al eerder verondersteld werd dat deze een rol speelt als ‘host-range’ gen, kan de replicatiecapaciteit in meer humane cellijnen hersteld worden.<sup>38</sup>

Niet alle MVA stammen hebben dezelfde fenotypische eigenschappen. Zo bestaan er enkele MVA stammen (MVA-572 en MVA-1721) die in staat zijn productief te repliceren in cellen van menselijke oorsprong en in immuun-gecompromitteerde muizen.<sup>55</sup> Er wordt verondersteld dat MVA-572 en MVA-1721 heterogene mixen zijn van MVA varianten waarvan enkele varianten een ander genotype en andere fenotypische eigenschappen hebben, maar aanwezig zijn onder de detectielimiet van een PCR.<sup>55</sup> Op basis van sequentie-analyse van de coderende regio’s bleken deze stammen 100% identiek aan het MVA-referentiegenoom.<sup>35</sup> Bij nadere analyse, door gebruik te maken van CVA-primers in plaats van MVA-primers, is aangetoond dat in enkele varianten binnen de MVA-1721 stam deletiesites ontbreken. Voor MVA-572 zijn na isolatie van twee varianten uit immuun-gecompromitteerde muizen, in deze varianten mutaties aangetroffen in genen met onbekende functie. In dit onderzoek naar (fenotypische) heterogeniteit van deze stammen en MVA-BN is beschreven dat MVA-BN niet kan repliceren in humane cellijnen en een homogene en stabiele MVA stam is.<sup>1,55</sup>

### ***2.5. MVA als expressievector***

Hoewel MVA niet productief kan repliceren in de meeste zoogdiercellen, kan het virus deze cellen wel infecteren en vindt er ook expressie plaats van virale genen en eventueel aanwezige recombinante genen.<sup>37</sup> De mate van eiwitproductie van MVA in HeLa cellen (‘nonpermissive’ voor MVA) is vergelijkbaar met die van de wildtype *Vaccinia virus* Ankara stam in dezelfde cellen.<sup>37</sup> Vanwege de efficiënte genexpressie van MVA, en het onvermogen om infectieuze virusdeeltjes te produceren na infectie, wordt veel onderzoek

gedaan naar MVA als kandidaat voor de ontwikkeling van recombinante vectoren voor klinische toepassingen. Hierbij wordt ook onderzoek gedaan naar de mogelijkheid om de recombinante genexpressie in MVA-vectoren te verbeteren, bijvoorbeeld door gebruik van verschillende pokkenvirus-promotoren.<sup>56</sup> Promotoren van verwante pokkenvirussen kunnen onderling uitgewisseld worden, maar kunnen verschillen opleveren in de mate van genexpressie. Onderzoek wijst uit dat gebruik van een ‘early’ promotor, waarbij transgenen tijdens de vroege fase tot expressie gebracht worden, een verbeterde cellulaire immunreactie kan geven.<sup>56</sup>

### 2.5.1 Productiesysteem MVA-vectoren

De meest gebruikte techniek om recombinante MVA-vectoren te ontwikkelen, is door homologe recombinatie in met MVA geïnfecteerde cellen. Hiervoor wordt een transferplasmide gebruikt met het transgen en een virus-specifieke promotor, geflankeerd door homologe MVA sequenties die nodig zijn voor integratie op een specifieke plek in het MVA genoom. De transgene expressiecassette kan geïnsereerd worden in regio's waarin de grote deleties hebben plaatsgevonden of in niet-overlappende regio's tussen essentiële genen, de zogenaamde intergenic regions (IGRs).<sup>18,57,58</sup> Inertie in IGRs kan de stabiliteit van de recombinante MVA-vectoren bevorderen.<sup>58,59</sup> Het is ook mogelijk om meerdere inserties plaats te laten vinden in hetzelfde MVA genoom. Soms bevatten de transferplasmiden selectiemarkers om getransformeerde MVA-vectoren te kunnen selecteren; deze merkgenen kunnen na de initiële selectie ook weer verwijderd worden door een tweede recombinatie-event.<sup>61</sup> Een alternatieve methode om recombinant MVA te verkrijgen, is door kloneren van het MVA genoom als bacterieel artificieel chromosoom (BAC), dat in *Escherichia coli* gemodificeerd kan worden door homologe recombinatie.<sup>18</sup>

### **3. MVA-vectoren in klinische studies**

Vectoren afgeleid van MVA worden om verschillende redenen als goede kandidaten beschouwd voor therapeutische doeleinden. Pokkenvirusvectoren hebben een grote ‘packaging’ capaciteit (minstens 25kb), waarbij grote transgene fragmenten in het genoom opgenomen kunnen worden.<sup>47,60</sup> Daarnaast vindt de replicatie van het genoom plaats in het cytoplasma en is integratie in het genoom tot op heden nooit waargenomen. Tot slot is de immunogeniciteit als vaccin hoog (mogelijk door verlies of verstoring van immunomodulerende genen)<sup>53</sup> en kunnen deze vectoren relatief makkelijk geproduceerd worden.

Sinds de jaren '90 zijn veel verschillende (pre)klinische studies uitgevoerd met MVA-vectoren als profylaxe of vaccin tegen verschillende virale, bacteriële of parasitaire infectieziekten, waaronder HIV, influenza, malaria, pokken en tuberculose, of als behandeling voor kanker.<sup>15,18,47,61,62,63</sup> Voor vaccinstudies worden MVA-vectoren ook wel ingezet als ‘boosting agent’, waarbij de MVA-vector vaak enige tijd na de primaire vaccinatie, vaak met een DNA vaccin of adenovirale vectoren, plaatsvindt. Dit wordt ook wel een heterologe ‘prime-boost’ vaccinstrategie genoemd, en dient om de immunreactie en daarmee de ontwikkeling van de immuniteit te versterken.

MVA-vectoren die onderzocht worden voor hun potentie als immunotherapie tegen kanker, bevatten vaak tumor-geassocieerde antigenen die zijn ontwikkeld om een immunreactie tegen de tumor(antigenen) uit te lokken of te versterken. De resultaten van preklinische studies zijn overwegend positief en ook in klinische studies wordt de MVA-vector in het algemeen goed getolereerd.<sup>47,64</sup>



#### 4. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft in het verleden geadviseerd MVA als apathogeen aan te merken, omdat het virus onschadelijk is gebleken bij toepassing in mens en dier.<sup>28,29</sup> Ook heeft zij verscheidene keren geadviseerd over klinische studies met MVA-vectoren. Zo heeft de COGEM in 2003 geadviseerd over een fase I klinische studie met een op MVA gebaseerd vaccin waaraan een aantal genen van HIV-1 subtype A waren toegevoegd.<sup>65</sup> De MVA-vector werd intramusculair, subcutaan of intradermaal toegediend. De COGEM achtte de risico's van deze studie voor mens en milieu verwaarloosbaar klein. Zij stelde daarbij als aanvullende voorwaarde dat naast het beddengoed ook kleding ontsmet werd, aangezien beide besmet kunnen raken als de injectieplaats niet goed is afgeplakt.

In 2006 heeft de COGEM wederom geadviseerd over een fase I klinische studie met een gg-MVA dat sequenties van het HIV-1 subtype B bevatte als vaccin gericht tegen HIV.<sup>66</sup> Het vaccin werd via twee opeenvolgende intramusculaire injecties toegediend. De COGEM was van oordeel dat de toevoeging van de HIV genen het apathogene karakter van MVA niet veranderde en achtte de risico's voor mens en milieu van deze studie verwaarloosbaar klein. Ter aanvulling op de voorschriften adviseerde de COGEM om waterbestendige pleisters te gebruiken om de injectieplaats af te dekken en om de deelnemers hygiëne-instructies te geven over het verwijderen van de pleister, om verspreiding van het gg-virus te minimaliseren. Dit naar aanleiding van een onderzoek waaruit bleek dat na injectie van het *Vaccinia virus* als vaccin, het virus soms detecteerbaar is op de pleister waarmee de injectieplaats wordt afgedekt, of op de handen na het verwijderen van de pleister.<sup>67</sup> De COGEM tekende daarbij aan dat zelfs als verspreiding optreedt, zij de kans dat het vaccivirus niet-proefpersonen infecteert verwaarloosbaar klein acht en dat een eventuele infectie zal uitdoven aangezien het virus niet in humane cellen kan repliceren.

In 2012 is geadviseerd over een fase I klinische studie met gg-MVA waarin de sequentie van het hemagglutinine (HA) gen van het *Influenza A virus* is opgenomen.<sup>68</sup> Hiervoor zijn 16 verschillende gg-MVA-HA vectoren ontwikkeld voor 16 *Influenza A virus* subtypen. De vaccins werden onderling niet gecombineerd, en werden in drie opeenvolgende intramusculaire injecties toegediend. Ondanks dat de COGEM verwachtte dat de risico's van de klinische studie, onder navolging van voorgestelde werkvoorschriften, verwaarloosbaar klein zouden zijn, kon zij geen eindoordeel geven door het ontbreken van informatie over de moleculaire karakterisering. De aanvrager heeft vervolgens experimentele gegevens aangeleverd ter onderbouwing van de moleculaire karakterisering van één van de MVA-HA-vectoren. Voor deze variant achtte de COGEM de moleculaire karakterisering voldoende, en zij achtte dezelfde analyse noodzakelijk voor de overige 15 varianten om tot eenzelfde oordeel te komen.<sup>69</sup>

In 2020 heeft de COGEM geadviseerd over een klinische studie met een gg-MVA waaraan het Spike-eiwit van het *Middle East respiratory syndrome-related coronavirus* (MERS-CoV) is toegevoegd. Het vaccin werd via intramusculaire injectie toegediend, waarbij tijdens en na de vaccinatie hygiënemaatregelen gehanteerd worden. De COGEM was van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met MVA-MERS-S\_DF1 verwaarloosbaar klein zijn.<sup>70</sup>

Eind mei 2020 heeft de European Medicines Agency (EMA) onder een versnelde beoordelingsprocedure het op MVA gebaseerde Ebola vaccin MVA-BN-Filo tot de Europese markt toegelaten.<sup>71</sup> De COGEM heeft

over deze markttoelating in 2019 een (vertrouwelijk)<sup>a</sup> positief advies uitgebracht.<sup>72</sup> Dit multivalente vaccin is gebaseerd op MVA-BN, waarin transgenen zijn aangebracht om de glycoproteïnen van verschillende ebolavirussen en het Marburgvirus tot expressie te laten komen.

## 5. Overwegingen bij de milieurisicobeoordeling

Bij de milieurisicobeoordeling van klinische studies staat de vraag centraal of mensen of dieren die niet aan de studie deelnemen ('derden') met de MVA-vector of daarvan afgeleide sequenties geïnfecteerd kunnen worden en daar nadelige gevolgen van kunnen ondervinden. De eventuele milieurisico's zijn gerelateerd aan de pathogeniteit van de vector, de verspreiding van de vector in het milieu, en de mogelijke vorming van nieuwe recombinante virussen door eventuele recombinitie in de patiënt. Ten behoeve van de onderbouwing van het advies worden de genoemde aspecten hieronder verder uitgewerkt.

### 5.1 Pathogeniteit van een MVA-vector

De COGEM heeft MVA geclassificeerd als niet-ziekteverwekkend virus, en ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.<sup>28,29</sup>

#### 5.1.1 Mogelijke schadelijke effecten

In het algemeen worden recombinante MVA-vectoren goed getolereerd in klinische studies, en wordt de meerderheid van de gerapporteerde bijwerkingen ('adverse events') gecategoriseerd als mild, kortdurend, of voorspelbaar. De manier van toediening kan invloed hebben op de bijwerkingen die gerapporteerd worden. Zo zijn lokale bijwerkingen (jeuk, zwelling, warmte en roodkleuring) significant minder bij intramusculaire toediening, in vergelijking met intradermale toediening.<sup>73</sup> In klinische studies waarbij hoge doseringen (meer dan 10<sup>8</sup> plaquevormende eenheden) van MVA-vectoren toegediend werden, zijn wel vaker ernstige bijwerkingen ('severe adverse events') gerapporteerd, maar deze effecten (malaise, misselijkheid of overgeven, en rillingen) worden niet als levensbedreigend beschouwd.<sup>73,74</sup>

Naast de eigenschappen van de vector zelf, dient bij de risicobeoordeling van recombinante MVA-vectoren rekening gehouden te worden met de eventuele schadelijke effecten van het geïnsereerde gen(product), bijvoorbeeld bij transgenen geassocieerd met virulentie, toxines of cytokines, of herstel van verloren functies.

De COGEM merkt hierbij op dat eventuele schadelijke effecten van MVA-vectoren in eerste instantie een risico voor de ontvanger vormen. Of deze effecten ook kunnen optreden bij derden is immers afhankelijk van de mate van verspreiding en blootstelling van derden aan de MVA-vectoren (zie paragraaf 5.2).

#### 5.1.2 Integratie van vector genoom in gastheergenoom

Replicatie van het MVA-(vector)genoom vindt plaats in het cytoplasma van de cel. Ook beschikt MVA niet over sequenties die integratie in het gastheergenoom mogelijk maken.<sup>75</sup> Er is tot op heden geen bewijs gevonden dat het MVA-vectorgenoom kan integreren in het gastheergenoom.<sup>1,2</sup>

---

<sup>a</sup> Het betreft hier een advies over een vergunningaanvraag voor markttoelating van een medische toepassing in de EU. Dergelijke dossiers en vergunningaanvragen worden in zijn geheel als vertrouwelijk verklaard door de European Medicines Agency (EMA). Conform de EMA richtlijnen mogen COGEM adviezen niet gepubliceerd of op een andere wijze openbaar gemaakt worden.

## 5.2 Replicatie, uitscheiding en verspreiding

### 5.2.1 Replicatie

Bij gebruik voor toepassingen in mensen is MVA replicatie-incompetent.<sup>b</sup> Productieve replicatie waarbij nieuwe virusdeeltjes gevormd kunnen worden is beperkt tot specifieke cellijnen, voornamelijk van aviaire oorsprong. Bij toediening in menselijk weefsel is een MVA-vector biologisch ingeperkt.

### 5.2.2 Verspreiding binnen de gastheer (biodistributie)

Verspreiding van pokkenvirussen, met name *Vaccinia virus*, binnen de gastheer kan op verschillende manieren plaatsvinden: door directe verspreiding van cel naar cel door gebruik te maken van ‘actin tails’ (door het virus geïnduceerde microvilli waarin zich actine bevindt),<sup>76</sup> als vrije virusdeeltjes, door infectie van leukocyten, of door virus-geïnduceerde beweging van cellen.<sup>16,47</sup>

Uit onderzoek bij muizen is gebleken dat een MVA-vector met een bioluminescent transgen (luciferase) zich na initiële inoculatie via het peritoneum verder kan verspreiden in het abdomen. Bij intramusculaire toediening was het luciferase-sigitaal voornamelijk beperkt tot de plaats van toediening.<sup>77</sup> De MVA-vector blijft beperkte tijd aanwezig, en was na 2 dagen niet meer aantoonbaar in muizen waarbij intraperitoneale toediening plaatsvond, en ook bij intramusculaire toediening neemt de hoeveelheid vector snel af en was het 72-96 uur na toediening nog zeer beperkt aanwezig.<sup>77,47</sup> In een andere studie met een MVA-MERS-S vector in muizen is in enkele muizen zeer beperkte biodistributie aangetoond en is geen MVA-DNA gedetecteerd in nieren, rectum, ontlasting, blaas en urine.<sup>78</sup> Ook bij makaken is onderzoek gedaan naar de verspreiding bij verschillende toedieningsroutes (intradermaal, intranasaal en intramusculair). Hierbij kon geen MVA geïsoleerd worden uit verschillende afgenomen monsters (bloed, keelslijmvlies, lymfeklieren, en andere organen), ook niet bij immuun-gecompromitteerde dieren. Wel kon MVA-DNA na enkele dagen met PCR aangetoond worden.<sup>21</sup> Bij een studie waarbij toediening via aerosolen is toegepast, werd de vector voornamelijk aangetroffen in het slijmvlies van de longen, en andere delen van het ademhalingsstelsel van makaken. De vector was niet aantoonbaar in hersenen of ogen.<sup>47</sup>

### 5.2.3 Verspreiding buiten de gastheer (uitscheiding)

Er is nog weinig informatie beschikbaar over uitscheiding van MVA-vectoren bij gebruik in klinische studies. In één fase I studie waarbij een recombinante MVA-vector gebruikt is die het humane eiwit MUC1 tot expressie brengt als therapie voor kankerpatiënten, zijn plasma- en urinemonsters die 1 tot 4 uur, of 8 dagen na inoculatie afgenomen zijn, onderzocht en zijn hierin geen vectorsequenties of virusdeeltjes gedetecteerd.<sup>79</sup> Er wordt verondersteld dat eventuele uitscheiding beperkt zal zijn, omdat de vector niet productief kan repliceren.<sup>53</sup>

Bij toediening van het *Vaccinia virus* vaccin ontstaan vaak huidlaesies waarin zich vectordeeltjes kunnen bevinden. Van MVA (en IMVANEX<sup>®</sup>) is bekend dat zij geen huidlaesie veroorzaken na intramusculaire

---

<sup>b</sup> Enkele specifieke stammen zijn *in vitro* in staat tot productieve replicatie in humane cellen, zoals beschreven onder paragraaf 2.4, het is echter niet bekend of deze stammen ook *in vivo* productief kunnen repliceren en of daarbij ook sprake zou zijn van pathologie.

toediening.<sup>18,80</sup> Wel kunnen bij subcutane toediening direct na de injectie nog virusdeeltjes aanwezig zijn op de huid.<sup>1</sup> Een andere manier waarop verspreiding buiten de beoogde patiënt plaats kan vinden, is door morsen of lekken van besmet materiaal, of aerosolen die hierbij ontstaan.

MVA-vectoren die in het milieu worden uitgescheiden, zijn biologisch ingeperkt en zullen zich niet verder verspreiden. Wanneer het (product van het) transgen niet bijdraagt aan herstel van geattenueerde eigenschappen of de replicatie-incompetente eigenschap van de vector complementeert, acht de COGEM de kans op verdere verspreiding van MVA-vectoren onder mens of dier ten gevolge van eventuele uitscheiding verwaarloosbaar klein. Daarnaast wijst de COGEM erop dat bij het hanteren van standaard hygiënemaatregelen binnen en buiten het ziekenhuis, - of aanvullende maatregelen bij toedieningswijzen waarbij de kans op uitscheiding aanwezig is -, de kans op blootstelling van derden aan het ggo verder beperkt wordt.

### 5.3 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 (zie paragraaf 2), zoals *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 infectie bij mensen ook gemeld is.<sup>8,81</sup> In Europa is infectie van de mens met orthopoxvirussen zeer zeldzaam.<sup>8,53</sup> Tot dusver zijn er in Europa sporadische gevallen bekend. In september 2018 en december 2019 zijn drie gerapporteerde gevallen van infectie met het *Monkeypox virus*, waarschijnlijk opgelopen in Nigeria.<sup>82,83</sup> Infectie met het *Cowpox virus* is zeer zeldzaam en is voornamelijk gerapporteerd bij mensen die direct contact hebben gehad met een geïnfecteerd dier.<sup>84</sup>

Van het *Vaccinia virus* is het fenomeen van ‘superinfection exclusion’ beschreven, waarbij een secundaire infectie van dezelfde gastheercel wordt voorkomen door expressie van bepaalde ‘early’ eiwitten.<sup>85,86</sup> Ook de vorming van de ‘virus factories’ (zie paragraaf 2.3), waarin de replicatie van het DNA plaatsvindt, kan belemmerend werken voor recombinatie.<sup>87</sup> Het is nog wel mogelijk dat virussen een cel tegelijkertijd kunnen infecteren.<sup>86</sup> Recombinatie tussen MVA-vectoren en verwante orthopoxvirussen is *in vitro* aangetoond door co-infectie van een MVA-vector en het *Cowpox virus*.<sup>88,89</sup> De hybride virussen die hierbij ontstaan verliezen na enkele passages (mede afhankelijk van de gebruikte cellijn) de transgenen. De plaque fenotypes in de hybride virussen waren in sommige gevallen vergelijkbaar met de oudervirussen, maar konden ook afwijken van beide oudervirussen.<sup>88,89</sup> Naast *in vitro* recombinatie tussen een recombinante MVA-vector en een *Cowpox virus* variant bij co-infectie, is ook recombinatie na superinfectie in Verocellen (‘semi-permissive’) beschreven (2 tot 6 uur na primaire infectie met een ‘multiplicity of infection’ van 5), waarbij 0,4% tot 7,1% van de plaques recombinante virussen met het transgen betrof). Ook hier

werden voor zowel hybride virussen met als zonder het transgen verschillende plaque fenotypes beschreven.<sup>74</sup>

Recombinatie tussen een MVA-vector en circulerende orthopoxvirussen is mogelijk. De COGEM acht de kans op een co-infectie van een patiënt met een toegediende MVA-vector en een verwant Orthopoxvirus echter zeer onwaarschijnlijk, omdat zoönotische orthopoxvirussen niet circuleren in Europa en infectie met deze orthopoxvirussen daarom zeer zeldzaam is. Daarnaast kunnen MVA-geïnfecteerde cellen zich maar een korte periode handhaven voordat ze door het immuunsysteem worden opgeruimd, omdat na toediening slechts een eenmalige infectieronde plaats kan vinden en daarbij geen nieuwe infectieuze virusdeeltjes gevormd worden die andere cellen kunnen infecteren.

Naast het genus *Orthopoxvirus* zijn er ook andere genera binnen de familie *Poxviridae* waarin virusspecies voorkomen die mensen kunnen infecteren, bijvoorbeeld *Molluscum contagiosum virus* uit het genus *Molluscipoxvirus*, dat uitsluitend mensen infecteert.<sup>40</sup> *Bovine popular stomatitis virus*, *Orf virus*, *Pseudocowpox virus* en *Grey sealpox virus* uit het genus *Parapoxvirus*, en *Tanapox virus* en *Yaba monkey tumor virus* uit het genus *Tatapoxvirus*,<sup>14</sup> hebben allen zoönotisch potentieel en kunnen ook mensen infecteren. Tatapoxvirussen worden alleen in Afrika aangetroffen. De kans op recombinatie tussen MVA-vectoren en pokkenvirussen uit een ander genus dan *Orthopoxvirus* acht de COGEM verwaarloosbaar klein, 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*.

Al het bovenstaande in overweging nemende, concludeert de COGEM dat het risico van recombinatie verwaarloosbaar klein is. Daarnaast zijn er, voor zover bekend bij de COGEM, geen aanwijzingen dat er recombinatie is opgetreden tussen MVA(-vectoren) en andere pokkenvirussen ten tijde van vaccinatie met MVA, of bij gebruik van deze vector in klinische studies.

### 5.3.1 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>2</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 waarbij een volledig replicatiecompetent fenotype ontstaat, verwaarloosbaar klein.

## **5.4 Deelconclusies**

De COGEM concludeert op grond van bovenstaande overwegingen dat:

- Incidentele waargenomen ‘adverse effects’ na toediening van MVA-vectoren met name betrekking hebben op de ontvanger. Of deze effecten ook kunnen optreden bij derden is afhankelijk van de mate van verspreiding en blootstelling van derden aan deze vectoren;
- MVA-vectoren geattenuerd en biologisch ingeperkt zijn, en vanwege hun onvermogen om productief te repliceren in mensen, zich niet in het milieu kunnen verspreiden;

- Van MVA-vectoren niet duidelijk is of ze uitgescheiden kunnen worden, maar dat ze na toediening wel op de huid aanwezig kunnen zijn. Vanwege hun biologische inperking is verdere verspreiding niet mogelijk;
- Infectie met een wildtype pokkenvirus zeer zeldzaam is. Co-infectie of recombinatie met een wildtype pokkenvirus na vaccinatie is niet eerder beschreven, ondanks een lange historie van gebruik als vaccin en toepassing in klinische studies.

## 6. Andere elementen van belang bij de milieuristicobeoordeling

### 6.1 Moleculaire karakterisering

In 2013 heeft de COGEM een generiek advies uitgebracht over de genetische karakterisering van ggo's voor klinische toepassingen.<sup>90</sup> De COGEM wijst erop dat er naast MVA-BN ook MVA-stammen zijn die heterogene mixen zijn van MVA varianten en die kunnen repliceren in humane cellijnen. Voor gebruik van MVA-vectoren als klinische toepassing acht de COGEM het daarom noodzakelijk dat aangetoond is dat er met een zuivere MVA kloon gewerkt wordt die niet in staat is tot productieve replicatie in humane cellen en de meeste zoogdiercellen. Daarnaast acht de COGEM een volledige sequentie- en bioinformatische analyse van de MVA-vector met insert noodzakelijk. Dit alles om uit te sluiten dat er een heterogene mix gebruikt wordt en ter bevestiging dat de sequentie van de MVA-vector overeenkomt met de beoogde sequentie. Indien aan deze voorwaarden wordt voldaan, is de COGEM van oordeel dat een MVA-vector afdoende moleculair is gekarakteriseerd.

## 7. Advies

Op grond van het hierboven staande, concludeert de COGEM dat het mogelijk is een generieke milieuristicobeoordeling op te stellen voor klinische toepassingen met MVA-vectoren. Vanwege het apathogene karakter van deze vectoren, en het feit dat replicatie van deze vectoren in cellen van mensen niet mogelijk is, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu bij klinische studies met MVA-vectoren verwaarloosbaar klein zijn, mits aan een aantal randvoorwaarden wordt voldaan. Zij adviseert bij deze studies de volgende randvoorwaarden in acht te nemen:

- De MVA-vector is afgeleid van een zuivere MVA kloon die niet in staat is tot productieve replicatie in humane cellen en de meeste zoogdiercellen;
- De MVA-vector is volledig gesequenced en geanalyseerd ter bevestiging dat de sequentie van de vector overeenkomt met de beoogde sequentie;
- Het gebruikte transgen codeert niet voor een genproduct dat bijdraagt aan herstel van geattenueerde eigenschappen of de replicatie-incompetente eigenschap van de vector complementeert.

## Referenties

1. 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

2. Goossens M *et al.* (2013). Environmental risk assessment of clinical trials involving modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vectors. *Curr. Gene Ther.* 13: 413-420
3. Cottingham MG & Carroll MW (2013). Recombinant MVA vaccines: Dispelling the myths. *Vaccine* 31: 4247-4251
4. International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezocht: 15 februari 2021)
5. Vora NM *et al.* (2015). Human infection with a zoonotic *Orthopoxvirus* in the country of Georgia. *N. Engl. J. Med.* 372: 1223-1230
6. Doty JB *et al.* (2019). Isolation and characterization of *Akhmeta virus* from wild-caught rodents (*Apodemus* spp.) in Georgia. *J. Virol.* 93: e00966-19
7. Gruber CEM *et al.* (2018). Whole genome characterization of Orthopoxvirus (OPV) Abatino, a zoonotic virus representing a putative novel clade of old world orthopoxviruses. *Viruses* 10: 546
8. Lewis-Jones S (2004). Zoonotic poxvirus infections in humans. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17: 81-89
9. Stark JH *et al.* (2006). Lack of Transmission of Vaccinia Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 698-700
10. Ammon A *et al.* (2007). Early disease management strategies in case of smallpox outbreak. In: *Poxviruses*. Editors: Mercer AA *et al.* Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel; 397–405.
11. Van Rheinbaben F *et al.* (2007). Environmental resistance, disinfection and sterilization of poxviruses. In: *Poxviruses*. Editors: Mercer AA, Schmidt A, Weber O. Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel; 397–405.
12. Esparza J *et al.* (2017). Equination (inoculation of horsepox): An early alternative to vaccination (inoculation of cowpox) and the potential role of horsepox virus in the origin of the smallpox vaccine. *Vaccine* 35: 7222-7230
13. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). History of Smallpox. <https://www.cdc.gov/smallpox/history/history.html> (bezocht: 15 februari 2021)
14. 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
15. Sánchez-Sampedro L *et al.* (2015). The evolution of poxvirus vaccines. *Viruses* 7: 1726-1803
16. Smith GL (2007). Genus *Orthopoxvirus: Vaccinia virus*. In: *Poxviruses*. Editors: Mercer AA *et al.*. Switzerland: Birkhäuser Verlag Basel
17. 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
18. 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
19. 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
20. Werner GT *et al.* (1980). Studies on poxvirus infections in irradiated animals. *Arch. Virol.* 64: 247-256
21. Stittelaar KJ *et al.* (2001). Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques. *Vaccine.* 19: 3700-3709
22. Mayr A *et al.* (1978). Vaccination against pox diseases under immunosuppressive conditions. *Dev. Biol. Stand.* 41: 225-34
23. McCurdy LH *et al.* (2004). Modified vaccinia virus Ankara: Potential as an alternative smallpox vaccine. *Clin. Infect. Dis.* 38: 1749-1753

24. 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
25. 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
26. 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
27. 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
28. COGEM (2003). Classificatie geattenueerde pokkenvirus-stammen en aanvullende voorschriften. COGEM advies CGM/030519-06
29. COGEM (2003). Classificatie van geattenueerde pokkenvirusstammen. COGEM advies CGM/030922-04
30. European Medicines Agency. IMVANEX <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/imvanex> (bezoekt: 15 februari 2021)
31. Von Sonnenburg F *et al.* (2014). Safety and Immunogenicity of Modified Vaccinia Ankara as a Smallpox Vaccine in People With Atopic Dermatitis. *Vaccine* 32: 5696-5702
32. Vollmar J *et al.* (2006). Safety and immunogenicity of IMVAMUNE, a promising candidate as a third generation smallpox vaccine. *Vaccine* 24: 2065-2070
33. Darsow U *et al.* (2016). Long-term safety of replication-defective smallpox vaccine (MVA-BN) in atopic eczema and allergic rhinitis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 30: 1971-1977
34. 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
35. Antoine G *et al.* (1998). The complete genomic sequence of the Modified Vaccinia Ankara strain: Comparison with other orthopoxviruses. *Virology* 244: 365–396
36. 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
37. Sutter G & Moss B (1992). Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10847-10851
38. 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117: 3759-3767
39. 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
40. McFadden G (2005). Poxvirus tropism. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 201-213
41. Liem J & Liu J (2016). Stress beyond translation: Poxviruses and more. *Viruses* 8: 169
42. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Family: *Poxviridae*. ICTV Ninth Report; 2009 Taxonomy Release. [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna\\_viruses/74/poxviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/74/poxviridae) (bezoekt: 15 februari 2021)
43. Moss B (2012). Poxvirus cell entry: how many proteins does it take? *Viruses* 4: 688-707



44. Novoa RR *et al.* (2005). Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol. Cell* 97: 147-172
45. Broyles SS (2003). Vaccinia virus transcription. *J. Gen. Virol.* 84: 2293-2303
46. Rubins KH *et al.* (2008). Comparative analysis of viral gene expression programs during poxvirus infection: a transcriptional map of the vaccinia and monkeypox genomes. *PLoS One.* 3: e2628
47. Gómez CE *et al.* (2008). The poxvirus vectors MVA and NYVAC a gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr. Gene Ther.* 8: 97-120
48. Liu L *et al.* (2014). From crescent to mature virion: Vaccinia virus assembly and maturation. *Viruses*, 6: 3787-3808
49. Condit RC *et al.* (2006). In a nutshell Structure and assembly of the vaccinia virion. *Adv. Virus Res.* 66: 31-124
50. 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
51. 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
52. 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
53. 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
54. Sutter G (2020). A vital gene for modified vaccinia virus Ankara replication in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117: 6289-6291
55. Suter M *et al.* (2009). Modified vaccinia Ankara strains with identical coding sequences actually represent complex mixtures of viruses that determine the biological properties of each strain. *Vaccine* 27: 7442-7450
56. Alharbi NK *et al.* (2019). Poxviral promoters for improving the immunogenicity of MVA delivered vaccines. *Hum. Vaccin Immunother.* 15: 203-209
57. Drexler I *et al.* (2004). Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential? *Curr. Opin. Biotechnol.* 15: 506-512
58. Wyatt *et al.* (2009). Elucidating and minimizing the loss by recombinant vaccinia virus of human immunodeficiency virus gene expression resulting from spontaneous mutations and positive selection. *J. Virol.* 83: 7176-7184
59. Timm A *et al.* (2006). Genetic stability of recombinant MVA-BN. *Vaccine* 24: 4618-4621
60. Smith GL & Moss B (1983). Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25000 base pairs of foreign DNA. *Gene.* 25: 21-28
61. Im EJ & Hanke T (2014). MVA as a vector for vaccines against HIV-1. *Expert Rev. Vaccines.* 3: 589-597
62. 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
63. Rimmelzwaan GF & Sutter G (2009). Candidate influenza vaccines based on recombinant modified vaccinia virus Ankara. *Expert. Rev. Vaccines* 8: 447-454
64. Guo ZS *et al.* (2019). Vaccinia virus-mediated cancer immunotherapy: cancer vaccines and oncolytics. *J. Immunother. Cancer* 7: 6

65. COGEM (2003). MVA-HIV A vaccin klinische fase I studie (CGM/031211-02)
66. COGEM (2006). Fase I klinische studie met een genetisch gemodificeerd MVA virus gericht tegen HIV-B. (CGM/061012-01)
67. Talbot TR *et al.* (2004). Risk of Vaccinia transfer to the hands of vaccinated persons after smallpox immunization. *Clin. Infect. Dis.* 35: 536-541
68. 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
69. COGEM (2012). Aanvullende informatie klinische studie met gg-MVA-HA vaccin. COGEM advies CGM/120928-01
70. COGEM (2020). Klinische studie met gg-vaccin MVA-MERS-S\_DF1 ter bescherming tegen MERS-CoV. COGEM advies CGM/201019-01
71. European Medicines Agency (EMA). Mvabea  
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/summaries-opinion/mvabea> (bezocht: 15 februari 2021)
72. COGEM (2019). Application for the market authorisation of MVA-BN-Filo a recombinant, replication incompetent Ebola vaccine. COGEM advies CGM/191212-01 [VERTROUWELIJK]
73. Gilbert SC (2013). Clinical development of Modified Vaccinia virus Ankara vaccines. *Vaccine* 31: 4241-4246
74. Okeke MI *et al.* (2017). Hazard characterization of Modified Vaccinia virus Ankara vector: What are the knowledge gaps? *Viruses* 9: 318
75. European Medicines Agency (EMA, 2007). Guideline on non-clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors. EMEA/273974/2005
76. Cudmore S *et al.* (1995). Actin-based motility of vaccinia virus. *Nature* 378: 636-638
77. Gómez CE *et al.* (2007). Virus distribution of the attenuated MVA and NYVAC poxvirus strains in mice. *J. Gen. Virol.* 88: 2473-2478
78. 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
79. 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
80. Kennedy JS & Greenberg RN (2009). IMVAMUNE: modified vaccinia Ankara strain as an attenuated smallpox vaccine. *Expert. Rev. Vaccines* 8: 13-24
81. 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> (bezocht: 15 februari 2021)
82. 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> (bezocht: 15 februari 2021)
83. Public Health England. Monkeypox case confirmed in England.  
<https://www.gov.uk/government/news/monkeypox-case-confirmed-in-england> (bezocht: 15 februari 2021)
84. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Cowpox  
<https://www.ecdc.europa.eu/en/cowpox/about-disease-cowpox> (bezocht: 15 februari 2021)

85. Doceul V *et al.* (2010). Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science*. 327: 873-876
86. 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
87. Paszkowski P *et al.* (2016). Live-cell imaging of Vaccinia virus recombination. *PLoS Pathog.* 12: e1005824
88. 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. *Virology*. 6: 55
89. 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
90. COGEM (2013). Criteria voor moleculaire karakterisering van ggo's voor medische en veterinaire toepassing. COGEM advies CGM/130227-05