

Aan de staatsecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
drs. V.L.W.A. Heijnen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 21 maart 2022
KENMERK CGM/220321-01
ONDERWERP Advies over klinische studies met TheraT vectoren

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende dossier IM-MV 21-025 met de titel 'A phase I/II study of TheraT® vector(s) expressing Human papillomavirus 16 positive (HPV16+) specific antigens in patients with HPV 16+ confirmed cancers' ingediend door Het Nederlands Kanker Instituut, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

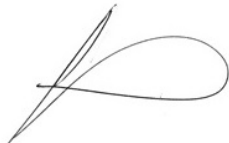
De COGEM is gevraagd te adviseren over klinische studies met genetisch gemodificeerde (gg-)virussen, als behandeling tegen tumoren. De gg-virussen brengen een E7E6 fusie-eiwit van het humaan papillomavirus tot expressie, dat bij toediening aan de patiënt een immuunreactie opwekt tegen de tumoren.

Er zullen twee typen gg-virussen worden getest: gg-Lymphocytic choriomeningitis virus (HB-201) en gg-Pichinde virus (HB-202). De gg-virusdeeltjes worden geproduceerd met het zogeheten TheraT-vectorsysteem. In deze gg-virussen is de samenstelling van het genoom aangepast: naast de aanwezigheid van het transgen (E7E6), is één van de twee genoomsegmenten opgesplitst waardoor ze drie genoomsegmenten bevatten, in plaats van twee. HB-201 en HB-202 kunnen zich nog steeds vermeerderen, maar studies in cellen, muizen en cavia's tonen aan dat de gg-virussen verzwakt zijn. De nucleotidesequenties van HB-201 en HB-202 zijn gecontroleerd, en mogelijke recombinitie met andere virussen zal niet leiden tot virussen die schadelijker zijn dan de oorspronkelijke virussen. Uitscheiding van gg-virus bij toediening aan de patiënten kan niet uitgesloten worden. Bij het uitvoeren van de klinische studies met HB-201 en HB-202 zijn maatregelen opgesteld om verspreiding en blootstelling aan derden te voorkomen.

Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met HB-201 en HB-202 verwaarloosbaar klein zijn.

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

Hoogachtend,



Prof. dr. ing. Sybe Schaap
Voorzitter COGEM

- c.c.
- Drs. Y. de Keulenaar, Hoofd Bureau ggo
 - Ministerie van IenW, Directie Omgevingsveiligheid en milieurisico's, DG Milieu en Internationaal
 - Dr. ir. M.M.C. Gielkens, Loket Gentherapie
 - Dr. R.J. Vanmolkot, Centrale Commissie Mensgebonden Onderzoek
 - Drs. K.E. Kok, Ministerie van VWS

Advies over klinische studies met TheraT-vectoren afgeleid van Lymphocytic choriomeningitis virus en Pichinde virus

COGEM advies CGM/220321-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over klinische studies met genetisch gemodificeerd (gg-) Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) en *Cali mammarenavirus* (Pichinde virus; PICHV) in proefpersonen (IM-MV 21-025). De aanvraag voor de klinische studies is afkomstig van de stichting Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek ziekenhuis in Amsterdam. De gg-virussen brengen een gemodificeerd E7E6 fusie-eiwit van het *Human papillomavirus* type 16 (HPV-16) tot expressie. Door toediening van de gg-virussen wordt naar verwachting een immuunreactie opgewekt tegen HPV-16 positieve tumoren. De gg-virussen zijn verzwakt, maar wel in staat om te repliceren, waardoor er langdurig een sterke immuunreactie kan worden opgewekt.

2. Achtergrondinformatie over LCMV en PICHV

LCMV behoort tot de species *Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus* en PICHV behoort tot de species *Cali mammarenavirus*.¹ Beide zijn mammarenavirussen (genus *Mammarenavirus*, familie *Arenaviridae*).¹

2.1 Eigenschappen van LCMV

De natuurlijke gastheer van LCMV is de muis (*Mus musculus*).² LCMV kan daarnaast andere knaagdieren, kippen, honden, apen en mensen infecteren.³ Bij muizen komt LCMV in de natuur meestal voor als persistente infectie waarbij de muizen het virus gedurende hun leven uitscheiden in uitwerpselen en lichaamsvloeistoffen, zonder dat zij zelf ziektesymptomen hebben.⁴ LCMV is enzoötisch in Europa, Afrika, de Verenigde Staten en mogelijk ook op andere continenten.²

Mensen kunnen geïnfecteerd worden met LCMV door contact met besmette dieren, via beten of door contact met urine, ontlasting, nestmateriaal, speeksel of aerosolen.^{5,6} Infectie van dier op mens komt regelmatig voor, maar de incidentie is moeilijk in te schatten omdat de symptomen niet altijd opgemerkt worden. Een derde van alle infecties verloopt subklinisch, een derde met milde griepachtige verschijnselen en een derde van de infecties ontwikkelt zich met meer ernstige ziekteverschijnselen zoals meningitis (hersenvliesontsteking) of meningo-encephalitis (hersenen hersenvliesontsteking).^{7,8} In de meeste gevallen herstellen gezonde immuuncompetente mensen volledig na een LCMV-infectie; de mortaliteit bij deze groep is minder dan 1%.^{9,2,10} Bij immuungecompromitteerde mensen kan een LCMV-infectie ernstige en soms fatale gevolgen hebben. Dit komt bijvoorbeeld voor bij patiënten die een met LCMV besmet donororgaan ontvangen.¹¹ Daarnaast kan verticale transmissie optreden bij zwangere vrouwen waarbij de kans bestaat op spontane abortus, neonatale meningitis of ernstige geboortefwijkingen. Verticale transmissie van moeder op foetus is in 35% van de gevallen fataal voor het ongeboren kind.³ Voor zover bekend, met uitzondering van orgaantransplantatie en verticale transmissie, kan LCMV zich niet van mens op mens verspreiden.

In de wetenschappelijke literatuur zijn verschillende infecties van laboratoriummedewerkers met wildtype LCMV beschreven.^{12,13,14} Sinds de jaren 80 is er veel onderzoek gedaan met de LCMV-stammen Armstrong, Docile en WE. Na intraveneuze toediening van wild-type LCMV in resusapen kregen de dieren hemorragische koorts, terwijl toediening van het virus via het maagdarmkanaal geen ziekteverschijnselen veroorzaakte.¹⁵ Ongeacht de route van toediening van LCMV-stam WE kregen resusapen een leverziekte. Infectie van resusapen met de Armstrong-stam veroorzaakte geen ziekteverschijnselen.¹⁶ Er zijn voor zover bekend geen onderzoeken uitgevoerd met resusapen die geïnfecteerd zijn met LCMV-stam Docile. Tot op heden is er in de wetenschappelijke literatuur geen melding gemaakt van laboratoriumbesmettingen van mensen met de LCMV-stammen Armstrong, Docile en WE.

2.2 Eigenschappen van PICHV

De primaire gastheer van PICHV is de bergrijst (*Oryzomys albigularis*, Tome's rice rat).^{17,18} Dit knaagdier komt voor in Noord-, Midden- en Zuid-Amerika. Ook bij andere in Noord-Amerika voorkomende knaagdieren, behorende tot het geslacht *Neotoma*, zijn antistoffen tegen het virus aangetoond.¹⁹ *In vivo* studies bij uit inteelt voortgekomen cavia's hebben aangetoond dat het virus milde tot ernstige ziekteverschijnselen bij deze dieren kan veroorzaken.¹⁷

Bij mensen zijn antistoffen tegen het virus aangetroffen, maar nooit ziekteverschijnselen beschreven.^{17,20} In een gebied waar PICHV enzoëtisch was, werden bij twee van de 82 personen die waren onderzocht, antistoffen tegen PICHV aangetoond.¹⁷ Onderzoek bij mensen die beroepshalve met grote hoeveelheden virus in aanraking zijn gekomen, toonde eveneens antilichamen tegen het virus in 6 van 13 medewerkers aan, zonder dat deze medewerkers duidelijke ziekteverschijnselen vertoonden.²¹ Eén van de medewerkers ontwikkelde aan een hand een blaasjesachtige wond, wat wijst op de mogelijke 'porte d'entrée' van het virus. Er zijn geen aanwijzingen dat er overdracht van PICHV tussen mensen onderling plaatsvindt.

Virusstam PICHV P18 is verkregen door PICHV stam An4763 18 keer serieel te passeren in de milt van ingeteelde cavia's.^{17,22,23,24} Het P18 virus is aan deze dieren geadapteerd en veroorzaakt bij cavia's een aan Lassakoorts gelijkend ziektebeeld met een fatale afloop.^{23,24} Het ziektebeeld kenmerkt zich door koorts en gaat gepaard met bloedingen (virale hemorragische koorts). Virus afgeleid van stam An4763 dat twee seriële miltpassages in cavia's heeft ondergaan (P2), is mild pathogeen voor cavia's.^{22,23}

2.3 Genoomorganisatie van LCMV en PICHV

LCMV en PICHV hebben beide een lipidenmembraan (virale envelop) en een negatief enkelstrengs RNA-genoom. Het genoom bestaat uit twee ambisense enkelstrengs RNA-segmenten: het kleinere (small) S-segment en het grotere (large) L-segment. Op het S-segment bevinden zich de genen die coderen voor de glycoproteïnen (GP) en nucleoproteïnen (NP). Op het L-segment bevinden zich de genen die coderen voor het RNA-afhankelijke RNA-polymerase en voor het RING Z-eiwit. De genen zijn onderling van elkaar gescheiden door 'intergenic regions' (IGR's). Elk genoomsegment is geflankeerd door de 5' en 3' 'untranslated regions' (UTR's).

3. Informatie over de klinische studies

De klinische studies worden uitgevoerd met gg-varianten van LCMV en PICHV in patiënten met HPV-16 positieve tumoren.

3.1 De medische producten HB-201 (LCMV) en HB-202 (PICHV)

Het medisch product bestaat uit geattenueerde replicerende gg-virussen die zijn afgeleid van LCMV (virusstam Armstrong clone 13, met het GP-eiwit van virusstam WE) en van PICHV (virusstam P18), die een transgen voor de productie van gemodificeerd E7E6-eiwit tot expressie brengen.^{25,26} Het gg-virale vectorsysteem waarmee de gg-virusdeeltjes worden geproduceerd wordt door de aanvrager het TheraT-vectorsysteem genoemd. Het medisch product bestaat uit twee componenten, die HB-201 (afgeleid van LCMV-C113/WE-GP) en HB-202 (afgeleid van PICHV-P18) worden genoemd.

3.1.1 Het TheraT-vectorsysteem

HB-201 (afgeleid van LCMV-C113/WE-GP) en HB-202 (afgeleid van PICHV-P18) zijn op dezelfde manier opgebouwd. De attenuatie van de gg-virussen is gebaseerd op de samenstelling van het genoom: bestaande uit drie segmenten, in plaats van twee.^{27,25,26} De gg-virale vectoren produceren één L-genoomsegment, en twee S-genoomsegmenten die elk een gen bevatten dat codeert voor het GP- of voor het NP-eiwit (maar niet voor beide). Beide GP- en NP-genen op beide segmenten staan onder controle van het 5'UTR. In het geval van HB-201, afgeleid van LCMV-C113/WE-GP, is het GP-eiwit afkomstig van de LCMV-stam WE. In de NP- of GP-bevattende segmenten is ook het E7E6-transgen ingebracht, dat in beide segmenten onder controle staat van de 3'UTR. De plasmiden voor het TheraT vectorsysteem zijn *de novo* chemisch gesynthetiseerd, vermeerderd in bacteriën, geïsoleerd en vervolgens geïdentificeerd met behulp van Sanger-sequencing.

3.1.2 Het transgen E7E6

E6 en E7 zijn oncogenen in het HPV-16 genoom. In een menselijke gastheer interfereren de E6- en E7-eiwitten onder andere met tumorsuppressoreiwitten, waardoor maligne tumoren ontstaan en behouden blijven.²⁸ HB-201 en HB-202 bevatten beide een transgen dat codeert voor een gemodificeerd E7E6 fusie-eiwit.²⁹ Het transgen is ook *de novo* chemisch gesynthetiseerd en bevat mutaties op vijf posities. Door deze mutaties kunnen de twee eiwitten niet meer binden aan retinoblastoma eiwit pRB en tumorsuppressoreiwit p53, wat de oncogeniciteit van de E7- en E6-eiwitten opheft.²⁹

3.1.3 De productie van HB-201 en HB-202

HB-201 en HB-202 worden geproduceerd door co-transfectie van de betreffende TheraT-vectoren in een GP-complementerende humane cellijn. Deze cellijn produceert het GP-eiwit van de LCMV virusstam WE. In latere productiestappen wordt een niet-complementerende humane cellijn gebruikt voor de verdere vermeerdering van de TheraT-vectoren.

3.2 Opzet van de fase 1 en fase 2 klinische studies

De klinische studies met HB-201 en HB-202 bestaan uit een fase 1, waarbij de veilige dosis wordt bepaald, en een fase 2 die als doel heeft om de antitumor-activiteit vast te stellen. In totaal zullen

maximaal 200 patiënten deelnemen aan de studie: ongeveer 100 personen in fase 1 en ongeveer 60 tot 100 personen in fase 2. De patiënten zullen of alleen HB-201, of HB-201 in combinatie met HB-202 ontvangen. Een combinatie van HB-201 en HB-202 wordt onderzocht naar aanleiding van studies in muizen, die aantonen dat immunisatie met heterologe vectoren (LCMV en PICHV) een positiever effect heeft op de immuunrespons die wordt opgewekt, dan immunisatie met homologe vectoren (meermaals LCMV).²⁶ In de klinische studies worden de medische producten intraveneus (IV) aan de patiënten toegediend. HB-201 (gg-LCMV) wordt ook in de tumor toegediend (intratumoraal (IT)); met HB-202 wordt dit niet gedaan.

De dosis die patiënten ontvangen is uitgedrukt in RCV FFU: ‘replication-competent virus forming units’. Per toediening zal de patiënt maximaal 5×10^7 RCV FFU HB-201 en 1×10^8 HB-202 ontvangen. Afhankelijk van het doseringsschema kan een patiënt bij behandeling HB-201 en HB-202 gecombineerd, een cumulatieve dosis van maximaal 5×10^8 RCV FFU van HB-201 en 1×10^9 RCV FFU van HB-202 ontvangen.

3.3 Informatie over virusuitscheiding en methoden voor verder onderzoek

De aanvrager heeft gegevens over de uitscheiding van gg-virusdeeltjes in muizen. In de studie ontvingen muizen intraveneus HB-201 of HB-202; met behulp van RT-qPCR zijn urine en uitwerpselen onderzocht en is er geen uitscheiding van virale vectoren waargenomen. De eerste klinische studie met HB-201 en/of HB202 bij patiënten met HPV-16-positieve kanker worden op dit moment uitgevoerd in de Verenigde Staten (HB-200-001). Op basis van deze lopende studie kunnen nog geen conclusies worden getrokken over de transmissie en uitscheiding van HB-201 en/of HB-202 bij patiënten. Op dit moment kan daarom niet worden uitgesloten dat uitscheiding van virusdeeltjes plaatsvindt.

Om meer informatie te verzamelen over de uitscheiding van gg-virus door patiënten, zal in de klinische studies bloed, speeksel, urine en uitwerpselen van de patiënten worden verzameld. In deze monsters zal de hoeveelheid NP-RNA gekwantificeerd worden met behulp van RT-qPCR. Deze analyse wordt mogelijk uitgebreid met een ‘infectivity assay’ in celweek, om de hoeveelheid uitgescheiden infectieuze virusdeeltjes vast te stellen. Wanneer er uitscheiding is vastgesteld, wordt de patiënt getest tot de resultaten van de uitscheidings-analyses negatief zijn of onder de detectielimiet vallen. De detectielimiet en controles in deze assays zijn niet gespecificeerd in de aanvraag.

3.4 Maatregelen om verspreiding en blootstelling aan derden te voorkomen

Vrouwen die zwanger zijn, of zwanger willen worden tijdens deelname aan de studie, worden uitgesloten van deelname, vanwege de mogelijke transmissie van de gg-virale vectoren naar het ongeboren kind. Daarnaast zijn exclusiecriteria en maatregelen opgesteld om blootstelling van gg-virusdeeltjes aan derden te voorkomen. Zo zijn ook vrouwen die borstvoeding geven uitgesloten van deelname aan de klinische studies. Mannelijke deelnemers dienen vanaf het begin van de klinische studie tot vijf maanden na de laatste dosis gebruik te maken van een barrièremethode als contraceptie; vrouwelijke deelnemers dienen een ‘zeer effectieve contraceptiemethode’ te gebruiken. De vijf maanden heeft de aanvrager gebaseerd op eerdere studies in muizen en preliminaire data uit de klinische studies in de Verenigde Staten. Deelnemende patiënten dienen zich te onthouden van sperma- en eiceldonatie gedurende de studie en tot vijf maanden na de laatste toegediende dosis. Er wordt niet verwacht dat

patiënten met vergevorderde kanker een orgaan zullen doneren, maar zij dienen zich ook hiervan te onthouden. Tevens wordt onderzoekers en personeel geadviseerd om niet in contact te komen met het medisch product (direct of indirect via de patiënt) indien zij zwanger zijn, borstvoeding geven of een verzwakt immuunsysteem hebben.

Naast deze restricties, zijn er aanbevelingen voor de deelnemers opgesteld om verspreiding te voorkomen. De patiënten worden geïnformeerd over de mogelijke aanwezigheid van de gg-virale vectoren op de injectieplek en in lichaamsvloeistoffen, zoals urine, bloed en speeksel. De patiënten wordt aanbevolen (gedurende de studie en tot vijf maanden na de laatst toegediende dosis) de uitwisseling van lichaamsvloeistoffen met kwetsbare personen te vermijden. Onder kwetsbare personen wordt verstaan: zwangere vrouwen, vrouwen die borstvoeding geven, kinderen en mensen met een verzwakt immuunsysteem. De uitwisseling van speeksel via het gebruik van elkaars glazen, bestek en dergelijke, moet voorkomen worden. Direct contact tussen kwetsbare personen met de plek van injectie moet vermeden worden. De monsters die zijn genomen van de patiënten, en mogelijk gg-virus bevatten, worden als ziekenhuisafval afgevoerd.

4. Eerder COGEM advies

De COGEM heeft LCMV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.³⁰ De LCMV-stam Armstrong is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2, gezien het langdurig veilige gebruik van de stam en omdat deze in tegenstelling tot het wildtype LCMV geen ziekte veroorzaakt in rhesusapen.³¹ In dit advies is ook de LCMV-stam WE beoordeeld; voor deze stam is geadviseerd de indeling in pathogeniteitsklasse 3 te handhaven. De COGEM heeft in 2019 PICHV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.³²

5. Overweging

Bij het uitvoeren van klinische studies worden ggo's in het milieu geïntroduceerd. Voor de milieurisicoanalyse zijn verschillende aspecten van belang, zoals de pathogeniteit, moleculaire karakterisering, mogelijkheden tot recombinatie en verspreiding in het milieu. De onderhavige aanvraag betreft een klinische studie met replicerende gg-virale vectoren die een gemodificeerd E7E6 fusie-eiwit van HPV-16 tot expressie brengen. De hierbij van belang zijnde milieurisicoaspecten worden hieronder puntsgewijs overwogen.

5.1 Attenuatie van HB-201 en HB-202

De modificatie van LCMV, waarbij een tri-gesegmenteerd genoom is gecreëerd in plaats van een bi-gesegmenteerd genoom, leidt tot een geattenuerd gg-virus, omdat het inpakken van drie genoomsegmenten minder efficiënt verloopt.²⁷ De pathogeniteit van HB-201, het tri-gesegmenteerde gg-LCMV met het E7E6-insert, is onderzocht in celkweek en met infectieproeven in muizen. Analyse van het aantal virusdeeltjes in het bloed van geïnfecteerde muizen toont aan dat de replicatie van HB-201 geattenuerd is in vergelijking met replicatie van de LCMV-stam waarvan HB-201 is afgeleid (virusstam Armstrong clone 13, met het GP-eiwit van virusstam WE).²⁵ De neurovirulentie van HB-201 is zeer verzwakt: een minimale dosis van 10 of minder RCV FFU van het wildtype LCMV veroorzaakt lethale choriomeningitis in muizen, terwijl er meer dan 1000 RCV FFU van HB-201 nodig is voor hetzelfde ziektebeeld.²⁵

PICHV veroorzaakt lethale ziekte bij cavia's, wat gepaard gaat met grote hoeveelheden virusdeeltjes. HB-202, het tri-gesegmenteerde gg-PICHV met het E7E6-transgen, leidde tot verminderde replicatie in cavia's, en geen van de geïnfecteerde dieren ontwikkelde een lethale ziekte.²⁶ De aanvrager heeft gegevens overlegd waaruit eveneens blijkt dat HB-202 geattenuëerd is ten opzichte van het wildtype PICHV.

Tevens heeft de aanvrager gegevens overlegd over de biodistributie van HB-201 en HB-202 in muizen, waaruit blijkt dat de hoeveelheid gg-virussen afneemt binnen 16 weken, en dat er geen sprake lijkt te zijn van uitscheiding in urine of feces.

In HB-201 en HB-202 is de genomorganisatie aangepast, maar zijn geen modificaties aangebracht in de oorspronkelijke eiwitten van de virussen. Een uitzondering hierop is het GP-eiwit in het LCMV-afgeleide product HB-201; het GP-eiwit is afkomstig van virusstam WE, in plaats van het originele GP-eiwit van virusstam Armstrong clone 13. Het is niet te verwachten dat het tropisme of gastheerbereik van de gg-virussen is veranderd ten opzichte van de wildtype virussen. Er is geen reden om aan te nemen dat de modificaties in genoomsamenstelling leiden tot een voordeel voor de gg-virussen, ten opzichte van de wildtype virussen.

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de infectieproeven in diermodellen^{25,26} en gegevens over de biodistributie van HB-201 en HB-202 in muizen, afdoende aantonen dat HB-201 en HB-202 geattenuëerd zijn ten opzichte van de virussen waar zij van zijn afgeleid.

5.2 Moleculaire karakterisering van HB-201 en HB-202

De LCMV en PICHV genoomsegmenten en het HPV-16 E7E6-transgen zijn *de novo* chemisch gesynthetiseerd. Onderzoek toont aan dat de TheraT virale vectoren stabiel blijven *in vivo* en bij meerdere passages *in vitro*.^{27,26,25} Met behulp van Western blotting is aangetoond dat het E7E6-transgen in gg-LCMV tot expressie komt.²⁵ In de aanvraag is beschreven dat de integriteit van de nucleotidesequenties van HB-201 en HB-202 is aangetoond door de gg-virussen na meerdere passages in celweek te amplificeren met RT-PCR en te controleren met Sanger-sequencing. In de derde passage van HB-201 is een 'silent mutation' gedetecteerd in het E7E6-insert op het S-segment met het GP-gen. Voor HB-202 zijn geen verschillen met de uitgangssequentie gerapporteerd. Na 10 keer passeren van HB-201 en HB-202 zijn nogmaals de nucleotidesequenties gecontroleerd; deze resultaten waren hetzelfde en bevestigen de stabiliteit van het systeem.

Het 'pre-master virus seed' (PMVS) voor de productie van HB-201 en HB-202 wordt gecontroleerd en gemonitord door middel van Sanger-sequencing. HB-201 en HB-202 worden volgens GMP richtlijnen geproduceerd, er zijn geen additionele acceptatiecriteria opgesteld voor het vrijgeven van het medisch product. Op basis van de gegevens uit wetenschappelijke publicaties^{26,27} en onderzoeksresultaten van de aanvrager, wordt gesteld dat de vectoren stabiel zijn en dat de genomintegriteit behouden blijft.

Het bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de medische producten HB-201 en HB-202 afdoende moleculair gekarakteriseerd zijn.

5.3 Mogelijke recombinitie van HB-201 en HB-202

Recombinatie komt zelden voor bij negatief enkelstrengse RNA-virussen, zoals LCMV en PICHV.^{33,34} Het ontwerp van de gemodificeerde genoomsegmenten van HB-201 en HB-202 zorgt er voor dat eventuele recombinitie niet kan resulteren in verlies van het transgen.²⁷ In het TheraT-vectorsysteem zijn de NP- en GP-genen verdeeld over twee S-segmenten, waarbij het NP-gen zijn natuurlijke positie heeft behouden en de oriëntatie van het GP-gen is omgedraaid. De NP- en GP-genen worden gereguleerd door het 3' UTR. Het transgen staat onder controle van het 5' UTR. Door de verplaatsing van het GP-gen wordt voorkomen dat eventuele recombinitie leidt tot verlies van het transgen.²⁷ Bovendien is door de opdeling van het NP- en GP-gen over twee afzonderlijke S-segmenten, en het verplaatsen van het GP-gen, een volledige herschikking van het S-segment nodig voor reversie naar virusstam waarvan de gg-virale vectoren zijn afgeleid.

Theoretisch kan er ook recombinitie plaatsvinden tussen de gg-virussen en de wildtype virussen LCMV en PICHV. Hierbij zal uitwisseling van het transgen geen invloed hebben op de pathogeniteit van het virus, en zal hypothetische recombinitie niet leiden tot een virulenter virus dan de oorspronkelijke virusstam.

Het transgen in HB-201 en HB-202 is een gemodificeerd E7E6 gen, afgeleid van de E6 en E7-genen uit HPV-16. De wildtype E6- en E7-genen kunnen zich tevens bevinden in het chromosomale DNA van tumorcellen, omdat HPV-16 zich in het chromosoom kan integreren. In theorie zouden HB-201 en HB-202 kunnen recombineren met de wildtype E6- en E7-genen van HPV-16. Een dergelijke uitwisseling van sequenties van het transgen is niet van invloed op de verspreidende eigenschappen van het gg-virus. De kans op recombinitie tussen de negatieve enkelstrengs RNA-genoomsegmenten van gg-LCMV of gg-PICHV, en de wildtype E6- en E7 -genen, is verwaarloosbaar klein omdat de genen zich bevinden op het dubbelstrengs DNA-genoom van HPV-16 óf geïntegreerd zijn in chromosomaal DNA.

Tevens wordt er de eerste stappen van het vectorproductieproces wordt een complementerende cellijn gebruikt, die het GP-eiwit van LCMV-stam WE tot expressie brengt. De hypothetische recombinitie tussen de cellijn en de sequenties van HB-201 en HB-202 zal niet leiden tot het herstellen van een wildtype fenotype, aangezien het genoom van de gg-vectoren is opgedeeld in drie segmenten en hierdoor geattenuëerd is.

Recombinatie komt zelden voor bij negatief enkelstrengse RNA-virussen.^{35,36} De COGEM is van oordeel dat in het theoretische geval van een recombinitie event, dit niet zal leiden tot een virus met een hogere pathogeniteit dan het wildtype virus.

5.4 Verspreiding van HB-201 en HB-202 in het milieu en blootstelling aan derden

In studies met muizen is er geen uitscheiding van HB-201 of HB-202 waargenomen in urine en uitwerpselen. Over de uitscheiding van virusdeeltjes bij mensen is slechts preliminaire data beschikbaar, afkomstig uit een lopende klinische studie in de Verenigde Staten. In de klinische studie van de onderhavige aanvraag zal uitscheiding verder worden onderzocht met behulp van RT-qPCR en mogelijk een 'infectivity assay'.

Indien uitscheiding van HB-201 en/of HB-202 plaatsvindt, zal dit mogelijk een risico kunnen vormen voor kwetsbare personen in de directe omgeving van de patiënt, zoals immuungecompromitteerden of

zwangere vrouwen. Om te voorkomen dat kwetsbare personen worden blootgesteld aan de gg-virale vectoren, zijn er door de aanvrager diverse maatregelen opgesteld waaraan de patiënt, betrokken onderzoekers en personeel, zich dienen te houden. Deze maatregelen hebben als algemeen doel om direct contact met lichaamsvloeistoffen, zoals urine of speeksel, of organen die mogelijk gg-virus kunnen bevatten, te vermijden. Overigens kunnen, voor zover bekend, wildtype LCMV en wildtype PICHV niet van mens op mens verspreiden. De verminderde replicatie van de tri-gesegmenteerde gg-virussen zal mogelijk de kans op verspreiding verder beperken.

Indien er uitscheiding van HB-201 en/of HB-202 plaatsvindt, zou er gg-virus overgedragen kunnen worden naar vatbare huisdieren, zoals cavia's en muizen. Er zijn geen maatregelen benoemd om blootstelling van gg-virus naar huisdieren, te voorkomen.

De COGEM is van oordeel dat de gebruikte methode (RT-qPCR), bij gebruik van de juiste controles afdoende is om eventuele uitscheiding van HB-201 en/of HB-202 vast te stellen. Tevens is de COGEM van oordeel dat de getroffen maatregelen afdoende zijn om blootstelling van HB-201 en/of HB-202 aan derden te voorkomen. De COGEM merkt op dat, indien er uitscheiding van HB-201 en/of HB-202 plaatsvindt, contact tussen de deelnemer en huisdieren, in het bijzonder knaagdieren (cavia's, ratten, hamsters, muizen, etc.) zoveel mogelijk vermeden moet worden.

6. Advies

Alles in ogenschouw nemende, is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met HB-201 (gg-LCMV) en HB-202 (gg-PICHV) met het HPV-16 E7E6-transgen, verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. International Committee on Virus Taxonomy. Genus *Mammarenavirus* https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/w/arenaviridae/1117/genus-mammarenavirus (bezocht op 05-03-2022)
2. Buchmeier MJ *et al.* (2013). Arenaviridae. In: Fields virology, 6th edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
3. Public Health Agency Canada (2011). Lymphocytic choriomeningitis virus. Pathogen Safety Data Sheet – Infectious Substances. www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/lymp-cho-eng.php (bezocht: 08/03/2022)
4. Salvato MS *et al.* (2012). Family *Arenaviridae*. In Virus taxonomy, ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Inc., Amsterdam
5. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV). <https://www.rivm.nl/wilde-knaagdieren-en-zo-nosen/ziekteverwekkers> (bezocht op 08/03/2022)
6. Centers for Disease Control and Prevention (2014). Lymphocytic Choriomeningitis (LCM) Transmission <https://www.cdc.gov/vhf/lcm/transmission/index.html> (bezocht op 18-03-2022)
7. Bonthuis DJ (2012). Lymphocytic choriomeningitis virus: an underrecognized cause of neurologic disease in the fetus, child, and adult. *Semin. Pediatr. Neurol.* 19: 89-95

8. Barton LL & Mets MB (2001). Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection: decade of rediscovery. *Clin. Infect. Dis.* 33: 370-374
9. Verhaegh EM et al. (2014). Meningitis na muizenbeet. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 158: A7033
10. Centers for Disease Control and Prevention (2014). Lymphocytic Choriomeningitis (LCM) Signs and Symptoms. <https://www.cdc.gov/vhf/lcm/symptoms/index.html> (bezoekt op 08/03/2022)
11. Fischer SA et al. (2006). Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation. *N. Engl. J. Med.* 354: 2235-2249
12. Hotchin J et al. (1974). Lymphocytic choriomeningitis in a hamster colony causes infection of hospital personnel. *Science* 185: 1173-1174
13. Baum SG et al. (1966). Epidemic nonmeningitic lymphocytic-choriomeningitis-virus infection. An outbreak in a population of laboratory personnel. *N. Engl. J. Med.* 274: 934-936
14. Dykewicz CA et al. (1992). Lymphocytic choriomeningitis outbreak associated with nude mice in a research institute. *JAMA* 267: 1349-1353
15. Lukashevich IS et al (2002). Hemorrhagic fever occurs after intravenous, but not after intragastric, inoculation of rhesus macaques with lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Med. Virol.* 67: 171-186
16. Lukashevich IS et al. (2004). LCMV-mediated hepatitis in rhesus macaques: WE but not ARM strain activates hepatocytes and induces liver regeneration. *Arch. Virol.* 149: 2319-2336
17. Trapido H & Sanmartin C (1971). Pichinde virus, a new virus of the Tacaribe group from Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 20: 631-641
18. Jahrling PB et al. (1981). Pathogenesis of a Pichinde virus strain adapted to produce lethal infections in guinea pigs. *Infect. Immun.* 32: 872-880
19. Kosoy MY et al. (1996). Prevalence of antibodies to Arenaviruses in rodents from the Southern and Western United States: Evidence for an Arenavirus associated with the genus *Neotoma*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 54: 570-576
20. Johnson KM et al. (1973). Biology of Tacaribe complex viruses. In: Lymphocytic choriomeningitis virus and other arena viruses. Ed. F. Lehman-Grube. Springer-Verlag, Berlin
21. Buchmeier M et al. (1974). Serological evidence of infection by Pichinde virus among laboratory workers. *Infect. Immun.* 9: 821-823
22. Lan S et al. (2008). Genome comparison of virulent and avirulent strains of the arenavirus Pichinde. *Arch. Virol.* 153: 1241-1250
23. Kumar N et al. (2012). Characterization of virulence-associated determinants in the envelope glycoprotein of Pichinde virus. *Virol.* 433: 97-103
24. McLay L et al. (2013). Identification of virulence determinants within the L genomic segment of the Pichindé arenavirus. *J. Virol.* 87: 6635-6643
25. Schmidt S et al. (2020). Live-attenuated lymphocytic choriomeningitis virus-based vaccines for active immunotherapy of HPV16-positive cancer. *Oncoimmunology* 9: 1809960
26. Bonilla WVN et al. (2021). Heterologous arenavirus vector prime-boost overrules self-tolerance for efficient tumor-specific CD8 T cell attack. *Cell. Rep. Med.* 2: 100209
27. Kallert SM et al. (2017). Replicating viral vector platform exploits alarmin signals for potent CD8+ T cell-mediated tumour immunotherapy. *Nat. Commun.* 8: 15327
28. Pal A and Kundu R (2020). Human Papillomavirus E6 and E7: The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy. *Front. Microbiol.* 10: 31166
29. Cassetti MC et al. (2004). Antitumor efficacy of Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles encoding mutated HPV16 E6 and E7 genes. *Vaccine* 22: 520-527
30. COGEM (2011). Classificatie en inschaling van werkzaamheden met Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV). COGEM advies CGM/110921-03

31. COGEM (2016). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-)Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus. COGEM advies CGM/160513-01
32. COGEM (2019). Classificatie Cali mammarenavirus (PICHV) en inschaling werkzaamheden met genetisch gemodificeerd replicatiecompetent en replicatie-incompetent PICHV. COGEM advies CGM/190703-03
33. Simon-Loriere E & Holmes EC (2011). Why do RNA viruses recombine? *Nat. Rev. Microbiol.* 9: 617–626
34. Han GZ & Worobey M (2011). Homologous recombination in negative sense RNA viruses. *Viruses* 3: 1358–1373
35. Simon-Loriere E & Holmes EC (2011). Why do RNA viruses recombine? *Nat. Rev. Microbiol.* 9: 617–626
36. Han GZ & Worobey M (2011). Homologous recombination in negative sense RNA viruses. *Viruses* 3: 1358–1373