

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

**DATUM** 24 juni 2019  
**KENMERK** CGM/190624-01  
**ONDERWERP** Advies Klinische studie met gg-vaccin (HB-101) ter bescherming van  
niertransplantatiepatiënten tegen infectie met cytomegalovirus

Geachte mevrouw Van Nieuwenhuizen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 18-013\_000 getiteld: 'A Randomized, Placebo-Controlled, Phase 2 Study of HB-101, a Bivalent Cytomegalovirus (CMV) Vaccine, in CMV-seronegative Recipient (R-) Patients Awaiting Kidney Transplantation from Living CMV-seropositive Donors (D+)' van het Universitair Medisch Centrum Groningen, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de milieurisico's van een klinische studie waarbij patiënten gevaccineerd worden met een bivalent genetisch gemodificeerd (gg-) vaccin genaamd HB-101, voordat zij een niertransplantatie ondergaan. HB-101 bestaat uit twee recombinante *Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus* (rLCMV) vectoren die eiwitten van cytomegalovirus tot expressie brengen. De vaccinatie dient de patiënten te beschermen tegen een infectie met cytomegalovirus na de orgaantransplantatie.

De rLCMV vectoren kunnen niet repliceren omdat het gen coderend voor het glycoproteïne (GP) in de vectoren ontbreekt. De aanvrager voert testen uit om de aanwezigheid van replicatiecompetent virus (RCV) in de rLCMV vectorbatches uit te sluiten. De COGEM acht deze testen toereikend en acht de kans op de aanwezigheid van RCV in het medische eindproduct, mede gezien het gebruikte productiesysteem en de controle van de vectorbatches, verwaarloosbaar klein. De COGEM acht de kans dat HB-101 zich kan verspreiden in het milieu verwaarloosbaar klein. Tevens acht zij de kans op nadelige effecten bij blootstelling van derden aan HB-101 verwaarloosbaar klein.

Samengevat is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met HB-101 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, Bureau ggo  
                  Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW  
                  Dr. D. Horst, Loket genterapie

# Klinische studie met gg-vaccin (HB-101) ter bescherming van niertransplantatiepatiënten tegen infectie met cytomegalovirus

## COGEM advies CGM/190624-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd om te adviseren over een vergunningaanvraag (IM-MV 18-013) voor een klinische fase II studie waarbij human cytomegalovirus (HCMV)-seronegatieve (-) patiënten gevaccineerd worden met een bivalent genetisch gemodificeerd (gg-) vaccin genaamd HB-101, voordat zij een nier afkomstig van een HCMV-seropositieve (+) donor ontvangen. HB-101 bestaat uit twee recombinante *Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus* (rLCMV) vectoren die een verkorte versie het glycoproteïne B (gB) of ‘phosphoproteïn’ pp65 van HCMV tot expressie brengen. De vaccinatie moet bij de patiënten een immuunrespons opwekken tegen de gB en pp65 HCMV eiwitten, waardoor de patiënten beschermd zijn tegen een HCMV-infectie na niertransplantatie.

#### 1.1 Human betaherpesvirus 5 (HCMV) – donor transgenen

*Human betaherpesvirus 5* (HCMV, human cytomegalovirus) is een dubbelstrengs DNA virus behorende tot het genus *Cytomegalovirus* binnen de familie *Herpesviridae*.<sup>4</sup> De natuurlijke gastheer van HCMV is de mens. Mensen kunnen geïnfecteerd raken door (in)direct contact van slijmvliezen met besmette lichaamsvloeistoffen zoals speeksel, urine, sperma, cervixslijm, bloed en moedermelk.<sup>1,2</sup> Na een primo-infectie blijft het virus latent in het lichaam aanwezig, en kan er regelmatig re-activatie met hernieuwde virusexcretie optreden. Ook kan er re-infectie met een ander (geno)type van HCMV plaatsvinden. Vooral jonge kinderen scheiden HCMV langdurig (maanden tot jaren) uit in urine en speeksel.<sup>1,2</sup>

60-80% van de volwassen personen heeft antistoffen tegen HCMV.<sup>1</sup> Een HCMV infectie verloopt meestal asymptomatisch, maar kan soms een mononucleosis-achtig syndroom (monoculeosis syn. klierkoorts of ziekte van Pfeiffer) veroorzaken met symptomen als koorts, keelpijn, lymfkliervergroting, malaise, lymfocytose en leverfunctiestoornissen.<sup>1</sup>

HCMV vormt een risico voor immuungecompromitteerden waaronder HIV-geïnfecteerden, ontvangers van een ‘solide orgaantransplantatie’ (SOT) of hematopoietische stamceltransplantatie (HSCT). Bij transplantatiepatiënten kan een HCMV-infectie interstitiële (diffuse) pneumonie en hepatitis veroorzaken.<sup>1</sup> Een congenitale HCMV infectie (aangeboren infectie) komt in Nederland voor bij ~0,5% van de pasgeborenen en kan asymptomatisch verlopen, maar kan ook leiden tot ernstige neurologische complicaties.<sup>1</sup> Er is een relatie tussen het moment van infectie tijdens de zwangerschap en de ernst van cerebrale afwijkingen; hoe vroeger de infectie hoe groter de kans op ernstige ziektesymptomen.<sup>1,3</sup>

Bij risicogroepen zoals transplantatiepatiënten worden de antivirale middelen ganciclovir of valganciclovir preventief en curatief toegepast, maar dit is lang niet altijd effectief. Er is geen vaccin beschikbaar tegen HCMV. Er worden wel enkele kandidaat-vaccins getest in klinische studies.<sup>1,2</sup>

### ***1.2 Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus (LCMV) – vector***

*Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus* (LCMV) behoort tot het genus *Mammarenavirus* binnen de familie *Arenaviridae*.<sup>4</sup> Het genoom van het virus bestaat uit twee ambisense enkelstrengs RNA moleculen, een zogenaamd klein (S) en groot (L) RNA segment. Het Z gen codeert voor het matrixeiwit, bevindt zich op het L-segment, en wordt gecodeerd door het 5'-einde van het virale RNA in de sense oriëntatie. Het L gen codeert voor RNA polymerase, bevindt zich op het L-segment, en wordt gecodeerd in de antisense oriëntatie. Het glycoproteïne 'precursor' (GPC) gen, bevindt zich op het S-segment, en wordt gecodeerd door het 5'-einde van het virale RNA in de sense oriëntatie. Na posttranslationale klieving van GPC worden de GP1 en GP2 eiwitten gevormd. Het NP gen codeert voor het nucleoproteïne, bevindt zich op het S-segment, en wordt gecodeerd door het 3'-einde van het virale RNA in de antisense oriëntatie.<sup>5</sup>

De natuurlijke gastheer van LCMV is de muis.<sup>6</sup> LCMV kan daarnaast andere knaagdieren, kippen, honden, apen en mensen infecteren.<sup>7</sup> In muizenpopulaties wordt het virus verticaal van generatie op generatie via intra-uteriene infectie (in de baarmoeder) overgedragen.<sup>16</sup> Bij muizen kan LCMV een persistente infectie veroorzaken waarbij de muizen het virus gedurende hun leven uitscheiden in uitwerpselen en lichaamsvloeistoffen zonder dat zij zelf ziektesymptomen vertonen.<sup>8</sup> LCMV is enzoötisch in Europa, Afrika, de Verenigde Staten en mogelijk ook in andere continenten.<sup>6,9</sup>

Mensen kunnen geïnfecteerd raken met LCMV door direct contact met besmette knaagdieren, via beten of door blootstelling aan besmette urine, ontlasting, nestmateriaal, speeksel of aerosolen van geïnfecteerde knaagdieren.<sup>10</sup> De seroprevalentie van LCMV onder de humane bevolking ligt rond de 2-5%.<sup>11</sup> LCMV veroorzaakt geen chronische infectie bij de mens, na een acute fase van de ziekte wordt het virus geklaard uit het lichaam.<sup>11</sup> Een LCMV infectie veroorzaakt meestal geen of milde ziekteverschijnselen, maar kan ook hersenvliesontsteking veroorzaken. Een derde van de infecties verloopt subklinisch, een derde leidt tot milde griepachtige verschijnselen en een derde van de infecties veroorzaakt ernstigere ziekteverschijnselen zoals meningitis (hersenvliesontsteking) of meningo-encephalitis (hersenen- en hersenvliesontsteking).<sup>12,13</sup> Ook in ernstige gevallen treedt volledig herstel op na een LCMV infectie.<sup>14</sup> De mortaliteit bij gezonde mensen is minder dan 1%.<sup>6</sup>

Met uitzondering van verticale transmissie en orgaandonatie zijn er geen aanwijzingen dat LCMV van mens op mens kan worden overgedragen.<sup>7,15,16</sup> Een congenitale LCMV infectie kan optreden als een vrouw tijdens de zwangerschap een primaire LCMV infectie oploopt. Verticale transmissie naar het ongeboren kind kan leiden tot abortus, neonatale meningitis of ernstige geboorteafwijkingen. In ongeveer 35% van de gevallen is verticale transmissie van moeder op foetus fataal voor het ongeboren kind.<sup>7,17</sup> Er is geen vaccin of specifieke profylaxe voor LCMV beschikbaar.

### ***1.3 Recombinante LCMV vectoren HK1-HgB en HK1-Hpp65***

De aanvrager wil gebruik maken van een bivalent gg-vaccin HB-101, bestaande uit twee rLCMV vectoren genaamd HK1-HgB en HK1-Hpp65. Deze vectoren zijn afgeleid van een variant van de LCMV stam Armstrong, genaamd Armstrong Clone 13 (HK1). De LCMV laboratoriumstam Armstrong is in 1934 geïsoleerd door Charles Armstrong.<sup>18</sup>

In de rLCMV vector HK1-HgB is het ‘open reading frame’ (ORF) coderend voor het glycoproteïne (GP) van LCMV vervangen door de *UL55* sequentie van HCMV die codeert voor een verkorte versie van het glycoproteïne B (gB). In de rLCMV vector HK1-Hpp65 is het ORF coderend voor GP van LCMV vervangen door de *UL83* sequentie van HCMV die codeert voor het tegument (eiwitachtige substantie waarmee het capsid is omgeven) ‘phosphoproteïn’ pp65 (pp65). De aanvrager stelt dat de rLCMV vectoren replicatie-incompetent zijn doordat het ORF coderend voor het GP eiwit van LCMV ontbreekt. Door het ontbreken van de GP sequentie kunnen er geen nieuwe infectieuze vectordeeltjes gevormd worden.

#### **1.4 Productie van de rLCMV vectoren**

Voor de productie van de rLCMV vectoren wordt een vergelijkbaar cDNA productiesysteem zoals beschreven door Flatz *et al.* (2010) gebruikt.<sup>19</sup> In de rLCMV vectoren is het ORF coderend voor het GP eiwit van LCMV vervangen door het gen van interesse. De plasmiden leveren de ‘trans-acting factors’ NP, Z en L van LCMV aan. De plasmiden worden getransfecteerd in een HEK293 productiecellijn (HEK293-P5A3) die *in trans* het GP eiwit van LCMV complementeert.

Voor de productie van de HK1-HgB virusdeeltjes wordt gebruik gemaakt van de volgende 3 plasmiden:

- LCMV48: bevat de coderende sequentie voor het NP eiwit van LCMV Armstrong Clone 13, waarvan de expressie onder controle staat van een hybride HCMV-kippen beta-actine promotor.
- HK4-L(-): bevat de sequentie van het L-segment van LCMV Armstrong Clone 13 en brengt de L en Z eiwitten tot expressie. Transcriptie van het negatieve virale L-segment RNA staat onder controle van een humane polymerase I promotor, het positieve virale L-segment RNA staat onder controle van een HCMV promotor.
- HK5-HgB(dCt): bevat de sequentie van een gemodificeerd S-segment van LCMV Armstrong Clone 13, waarvan de expressie onder controle staat van een humane polymerase I promotor. Hierbij is de sequentie coderend voor het GP eiwit van LCMV (nucleotiden 639-4820) vervangen door de *UL55* sequentie coderend voor een codon-geoptimaliseerde verkorte versie van het gB eiwit (aminozuur 1-772+R) afkomstig van HCMV stam Merlin, waarbij het cytoplasmatische domein van het gB eiwit ontbreekt (gB[dCt]).

Voor de productie van de HK1-Hpp65 virusdeeltjes wordt gebruik gemaakt van de volgende 3 plasmiden:

- LCMV48, zie beschrijving hierboven.
- HK4-L(-), zie beschrijving hierboven.
- pHK5-Hpp65: bevat de sequentie van een gemodificeerd S-segment van LCMV Armstrong Clone 13, waarvan de expressie onder controle staat van een humane polymerase I promotor. Hierbij is de sequentie coderend voor het GP eiwit van LCMV (nucleotiden 639-4204) vervangen door de *UL83* sequentie coderend voor een codon-geoptimaliseerde versie van het pp65 eiwit afkomstig van HCMV stam AD169.

Voor de productie van de HK1-HgB en HK1-Hpp65 virusdeeltjes wordt een ‘Pre Master Virus Seed’ (PMVS) geproduceerd door de HEK293-P5A3 cellijn te transfecteren met de bovengenoemde plasmiden.

De HK1-HgB PMVS en HK1-Hpp65 PMVS worden doorgekweekt, opgezuiverd en gebruikt om het Master Virus Seed (MVS) van HK1-HgB en van HK1-Hpp65 te genereren. Vervolgens wordt de HEK293-P5A3 'master cell bank' geïnficeerd met de MVS van HK1-HgB of de MVS van HK1-Hpp65. Na de productie wordt de gg-vector geogst, behandeld met benzonase om gastheercel DNA af te breken, en wordt de ruwe fractie met behulp van verschillende technieken gezuiverd.

Per vectorbatch wordt de HK1-HgB of HK1-Hpp65 titer bepaald met behulp van een 'double-immunofluorescent focus forming unit assay' (DI-FFU assay). Een batch wordt geaccepteerd indien  $\geq 1 \times 10^7$  FFU/ml is aangetoond met een anti-NP antilichaam en  $\geq 1 \times 10^5$  FFU/ml is aangetoond met anti-gB of anti-pp65 antilichaam. Per vectorbatch HK1-HgB of HK1-Hpp65 wordt ook het aantal vectorgenoomkopieën bepaald met een RT-qPCR. Een batch wordt geaccepteerd indien  $\geq 1 \times 10^7$  vectorgenomen/ml aanwezig zijn. Het bivalente gg-vaccin HB-101 wordt geproduceerd in de Verenigde Staten. De productie maakt geen deel uit van de onderhavige vergunningaanvraag.

## **2. Eerder COGEM advies**

De COGEM heeft LCMV ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.<sup>20</sup> De COGEM heeft de LCMV laboratoriumstam Armstrong op basis van langdurig veilig gebruik, en omdat deze stam in tegenstelling tot het wildtype geen ziekte veroorzaakt in resusapen, ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.<sup>9</sup> HCMV is door de COGEM ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.<sup>21</sup>

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

### ***3.1 Opzet van de studie***

De klinische studie met HB-101 zal plaatsvinden in het Universitair Medisch Centrum Groningen (UMCG). In deze studie ontvangen maximaal 50 patiënten maximaal drie toedieningen van HB-101. De totale dosis per toediening is  $1,2 \times 10^8$  FFU. Het gg-vaccin (of de placebo) zal intramusculair als één injectie van 1 ml of als twee injecties van 0,5 ml worden toegediend aan de patiënten voordat zij een nier afkomstig van een HCMV immunoglobuline G (IgG) seropositieve (+) donor ontvangen. Als inclusiecriteria geldt dat deelnemende patiënten aan de studie HCMV IgG seronegatief (-) zijn.

Op dag 0 vindt de eerste toediening plaats. De tweede toediening vindt  $28 \pm 3$  dagen na dag 0 plaats, en de derde toediening vindt  $56 \pm 3$  dagen of  $84 \pm 3$  dagen na dag 0 plaats. De laatste toegediende dosis vindt minstens 7 dagen voorafgaand aan het moment dat de patiënt een nier van een HCMV + donor ontvangt plaats.

Het ggo zal in een bioveiligheidskabinet klasse II worden voorbereid. Hierbij wordt HB-101 van een ampul in een injectiespuit overgebracht. Tijdens de voorbereiding dragen de medewerkers beschermende kleding en handschoenen. Transport naar de kamer van de patiënt vindt plaats conform Bijlage 1.1 van de Regeling GGO. Ook tijdens de toediening van het ggo draagt het medisch personeel beschermende kleding en handschoenen. Vorming van aerosolen en morsen zal zoveel mogelijk worden voorkomen.

Na toediening wordt de injectieplaats voor 60 minuten geobserveerd waarna de injectieplaats mag worden afgedekt. Voorafgaand en na toediening van HB-101 zullen er bloedmonsters worden afgenomen bij de patiënten. Deze monsters worden onder andere getest op HCMV serologie.

Als exclusiecriteria hanteert de aanvrager dat zwangere vrouwen en vrouwen die borstvoeding geven, uitgesloten worden van deelname aan de studie.

#### **4. Overweging**

In de onderhavige aanvraag wordt een bivalent gg-vaccin HB-101 toegediend aan HCMV - patiënten, voordat zij een nier afkomstig van een HCMV + donor ontvangen. 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 de rLCMV vectoren**

De recombinante virale vectoren HK1-HgB en HK1-Hpp65 zijn gebaseerd op Armstrong Clone 13 (HK1), een variant van de LCMV laboratoriumstam Armstrong. Armstrong Clone 13 (HK1) is geïsoleerd uit de milt van muizen die persistent geïnfecteerd waren met LCMV.<sup>22</sup> Twee aminozuurveranderingen in Armstrong Clone 13 (F260L in het GP1 eiwit en K1076Q in het L polymerase eiwit) ten opzichte van de oorspronkelijke LCMV stam Armstrong zorgen er voor dat Clone 13 persistente infecties kan veroorzaken bij muizen.<sup>23</sup>

In de rLCMV vectoren ontbreekt de ORF sequentie die codeert voor het GP eiwit van LCMV. De aanvrager stelt dat de eiwitten (gB en pp65) waarvoor de HCMV sequenties in de rLCMV vectoren coderen geen van beide in staat zijn om de functies van het GP eiwit over te nemen. Experimentele data van Flatz *et al.* (2010) en Schleiss *et al.* (2017) tonen aan dat vergelijkbare rLCMV vectoren (rLCMV-GFP en rLCMV-gB(dCt)) replicatie-incompetent zijn. Wanneer HEK293 cellen die het LCMV GP niet *in trans* aanbieden geïnfecteerd worden met rLCMV vectordeeltjes kunnen er geen nieuwe infectieuze vectordeeltjes gevormd worden.<sup>19,24</sup>

Bovenstaande in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat de rLCMV vectoren replicatie-incompetent zijn.

De aanvrager geeft aan dat in toxiciteitstudies waarbij de HK3-Hpp65 intracraniaal werd toegediend aan immuungecompromitteerde RAG1 knock-out ( $7,65 \times 10^5$  FFU) of AG129 knock-out ( $7,65 \times 10^3$  of  $7,65 \times 10^5$  FFU) muizen er geen virale replicatie, persistentie of tekenen van ziekte, histologische ontsteking of letsel waargenomen werd. Bij muizen die het wildtype virus kregen toegediend werd omvangrijke virale replicatie en verspreiding naar hersenweefsel waargenomen. De rLCMV vectoren waren gebaseerd op de MP stam van LCMV (HK3) in plaats van de stam Armstrong Clone 13 (HK1).

In een andere toxiciteitstudie waarbij HK1-Hpp65 intraperitoneaal aan immuungecompromitteerde RAG1 knock-out muizen ( $1 \times 10^8$  FFU) werd toegediend, werd geen virale replicatie of ziekte waargenomen.

Ook in twee toxiciteitstudies bij ratten die intramusculair één keer per week (maximaal 4 toedieningen) een dosis van HK-Hpp65 ( $2,8 \times 10^7$  FFU) of HB-101 ( $1,4 \times 10^8$  FFU) kregen toegediend waren er geen aanwijzingen voor toxiciteit.

In een afgeronde klinische fase I studie met HB-101 ontvingen 54 gezonde proefpersonen intramusculair drie toedieningen van HB-101 in een dosering van  $2,6 \times 10^8$  FFU,  $2,6 \times 10^7$  FFU of  $2,6 \times 10^6$  FFU.<sup>25</sup> HB-101 werd goed getolereerd. De meest gerapporteerde bijwerkingen waren pijn bij de injectieplaats, malaise, moeheid, spierpijn en in enkele gevallen koorts.

Bovenstaande in overweging nemende concludeert de COGEM dat HB-101 goed wordt getolereerd.

#### **4.2 Moleculaire karakterisering**

De aanvrager heeft de LCMV genomesequenties in de gebruikte constructieplasmiden bepaald en meldt dat deze identiek zijn bevonden aan de sequenties van het gepubliceerde cDNA systeem zoals beschreven in Flatz *et al.* (2010).<sup>19</sup> Verder heeft de aanvrager de volledige coderende regio's van het PMVS van HK1-HgB en van HK1-Hpp65 gesequenced. Hierbij geeft de aanvrager aan dat de sequentie van de 5' en 3' UTR's en de 'untranslated intergenomic region' om technische redenen niet volledig bepaald kon worden.

Het PMVS van HK1-HgB bevat twee 'silent' mutaties op posities 423 en 1065, en drie mutaties in de regio coderend voor het L-polymerase die resulteren in de aminozuurveranderingen F258L, S287N en I1271M. De mutaties hebben volgens de aanvrager geen invloed op de groeikinetiek in de productieceld (bepaald met een FFU assay) of op de antigen expressie (bepaald met Western blot).

Het PMVS van HK1-Hpp65 bevat een valine naar isoleucine mutatie op positie 451 van het NP eiwit. Ook deze mutatie heeft volgens de aanvrager geen invloed op de groeikinetiek in de productieceld of op de antigen expressie (eveneens respectievelijk bepaald met een FFU assay en Western blot).

Op basis van bovenstaande gegevens is de COGEM van oordeel dat de aanvrager de moleculaire karakterisering van HK1-HgB en HK1-Hpp65 afdoende heeft uitgevoerd.

#### **4.3 Recombinatie en complementatie**

Een mogelijk risico tijdens de productie van de rLCMV vectoren of na toediening van HB-101 aan de patiënt is het ontstaan van 'replicatiecompetent' virus (RCV). Een ander risico is het ontstaan van recombinant/reassortant virus in de patiënt als gevolg van complementatie. Dit wordt hieronder nader toegelicht.

##### **4.3.1 Ontstaan van RCV tijdens de productie van de rLCMV vectoren**

De rLCMV vectoren HK1-HgB en HK1-Hpp65 zijn replicatie-incompetent omdat het ORF coderend voor het GP eiwit in de vectoren ontbreekt. Voor de productie van de rLCMV vectoren is er daarom een helpercellijn noodzakelijk. In de onderhavige aanvraag zullen de vectoren geproduceerd worden door drie verschillende plasmiden te co-transfecteren in een HEK293 afgeleide cellijn HEK293-P5A3 die *in trans* het GP eiwit van LCMV complementeert. Deze stabiele cellijn bevat de expressieplasmide pcDNA3.3-



TOPO LCMV GP. De aanvrager stelt dat het hoogst onwaarschijnlijk is dat er bij de productie homologe recombinitie tussen de HB-101 vectoren en HEK293-P5A3 kan plaatsvinden waarbij RCV gevormd kan worden, omdat er geen sequentieoverlap is tussen de HB-101 vectoren en de GP sequentie in de productiecellijn. De COGEM merkt op de aangeleverde informatie geen sequentiegegevens van de HB-101 vectoren en de GP sequentie in de productiecellijn bevat, hierdoor kan de COGEM de afwezigheid van sequentieoverlap niet controleren. In afwezigheid van sequentieoverlap tussen de virale vectoren en het GP gen in de cellijn acht de COGEM de kans op homologe recombinitie verwaarloosbaar klein.

De aanvrager stelt dat de MVS van HK1-HgB en HK1-Hpp65 met een op celkweek gebaseerde test worden getest op RCV door middel van een FFU assay. De detectielimiet is 0,4 FFU RCV per kweekfles. In de assay worden de te testen monsters met een maximale 'multiplicity of infection' (MOI) van 1 gebruikt om  $1 \times 10^6$  HEK293F cellen/ml te infecteren. Virusogsten worden geanalyseerd met een MOI van 1 in een totaal volume van 3,6 L, hiermee wordt volgens de aanvrager de afwezigheid van RCV in  $3,6 \times 10^9$  FFU bepaald. De RCV testen moeten negatief zijn voordat het MVS wordt vrijgegeven. De COGEM acht de gevoeligheid van de RCV test afdoende om RCV te detecteren.

De COGEM acht de RCV testen toereikend en acht de kans verwaarloosbaar klein dat de vectorbatches, waarmee het medische product wordt gevormd, RCV zal bevatten.

#### *4.3.2 Complementatie en recombinitie in de patiënt*

In theorie kunnen er in de patiënt opnieuw HK1-HgB en HK1-Hpp65 vectordeeltjes worden gevormd als gevolg van complementatie. Een vereiste hiervoor is een dubbelinfectie met een virus in dezelfde cel als de LCMV vector die in staat is om de functie van het ontbrekende LCMV GP eiwit te complementeren. Verder zou in theorie als gevolg van co-infectie met wildtype LCMV door recombinitie tussen de rLCMV vectoren en wildtype LCMV een recombinant/reassortant virus kunnen ontstaan.

De seroprevalentie van LCMV onder de humane bevolking is laag (~5%) en LCMV veroorzaakt geen persistente infecties bij mensen. De kans dat er in dezelfde cel zowel HK1-HgB of HK1-Hpp65 als wildtype LCMV of een ander virus dat in staat is om het ontbrekende GP eiwit te complementeren aanwezig is, acht de COGEM verwaarloosbaar klein. In het theoretische geval dat er een recombinant/reassortant virus ontstaat, zal het gevormde recombinante virus niet pathogener zijn dan wildtype LCMV.

Samengevat is de COGEM van oordeel dat de kans op recombinitie of complementatie in de patiënt en het daaraan gepaard gaande risico voor mens en milieu verwaarloosbaar klein is.

#### **4.4 Biodistributie en uitscheiding**

Met de rLCMV vectoren is alleen een 'single-round' infectie mogelijk. Dit betekent dat na vaccinatie met HB-101, de GP-gepseudotyperde gg-LCMV vectordeeltjes in staat zijn om een lichaamscel te infecteren, maar dat er daarna geen nieuwe infectieuze vectordeeltjes gevormd kunnen worden die naar andere cellen in het lichaam van de patiënt kunnen verspreiden.

De biodistributie en persistentie van HK1-Hpp65 is bestudeerd in C57BL/6 muizen. Deze muizen kregen intramusculair  $5 \times 10^6$  of  $4 \times 10^7$  FFU toegediend. HK1-Hpp65 verspreidde zich binnen 1 uur na injectie naar de longen, lever, hart, hersenen, nieren, milt, lymfeknopen en gonaden. Binnen 14 tot 28 dagen was HK1-Hpp65 niet meer te detecteren in de meeste organen. Na 28 dagen was rLCMV vectorgenoom enkel nog te detecteren in de lymfeknopen en de injectieplaats (detectielimiet qPCR ongeveer  $4,2 \log_{10}$  GC/ml). Na 56-90 dagen was er in geen van de organen meer rLCMV vectorgenoom te detecteren. De aanvrager verwacht dat de biodistributie van HK1-vectoren onafhankelijk is van het gecodeerde antigen, en acht de biodistributie van HK1-Hpp65 representatief voor beide vectoren in HB-101. De aanvrager geeft aan dat er geen shedding data van HB-101 beschikbaar is. De verwachting van de aanvrager is dat er slechts kortdurende shedding van kleine hoeveelheden van de gg-vectoren kan plaatsvinden via saliva, urine, feces en semen.

Op basis van de aangeleverde data kan de COGEM niet uitsluiten dat de rLCMV vectoren uitgescheiden worden. Gezien het feit dat de gg-vectoren replicatie-incompetent zijn, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu ten gevolge van eventuele uitscheiding verwaarloosbaar klein.

#### ***4.5 Exclusiecriteria voor selectie van proefpersonen***

Er zijn geen aanwijzingen dat LCMV van mens op mens kan worden overgedragen, met uitzondering van verticale transmissie en orgaandonatie. Als exclusie criterium hanteert de aanvrager dat zwangere vrouwen en vrouwen die borstvoeding uitgesloten worden van deelname aan de studie.

Naar aanleiding van een aanvullende vraag van de vergunningverlenende instantie, heeft de aanvrager aangegeven dat deelnemers aan de onderhavige studie niet uitgesloten worden van het doneren van bloed, organen, cellen en weefsels. De aanvrager geeft hiervoor als reden dat HB-101 niet kan repliceren in het menselijk lichaam en dat de verwachting is dat er slechts kortdurende shedding van kleine hoeveelheden HB-101 via saliva, urine, feces en semen kan plaatsvinden.

In de ontwerpbeschikking heeft de vergunningverlener met betrekking tot dit punt het volgende opgenomen: *“Hoewel de kans klein is dat het ggo zich vanuit de proefpersoon kan verspreiden en daarmee in derden mogelijk schadelijke effecten kan veroorzaken, kunnen schadelijke effecten in derden na transplantatie van organen niet volledig worden uitgesloten. Daarom is een additionele risicobeheersmaatregel nodig: De vergunninghouder dient ervoor zorg te dragen dat deelnemers aan de klinische studie worden uitgesloten van deelname als zij niet verklaren af te zien van het doneren van organen voor transplantatie.*

*Met inachtneming van deze risicobeheersmaatregel wordt het algehele risico van deze klinische studie met genetisch gemodificeerd LCMV verwaarloosbaar klein.”*

De COGEM is door Bureau GGO gevraagd of zij het vanuit het oogpunt van de milieurisicobeoordeling noodzakelijk acht dat de proefpersonen worden uitgesloten van het doneren van organen voor transplantatie, omdat de ontwerpbeschikking met betrekking tot dit punt afwijkt van de vergunningaanvraag.

De contra-indicaties die gelden voor orgaan- en weefseldonatie staan vermeld in het ‘Modelprotocol Postmortale orgaan- en weefseldonatie’ van de Nederlandse Transplantatie Stichting.<sup>26</sup> Hierin staat onder meer genoemd dat orgaantransplantatie in de voorgeschiedenis een algemene contra-indicatie is voor weefseldonatie. Door experts van de Nederlandse Transplantatie Stichting en Eurotransplant Orgaantransplantatie is aan de COGEM bevestigd dat orgaantransplantatie in de voorgeschiedenis geen algemene contra-indicatie is voor orgaandonatie. Het kan ook voorkomen dat een getransplanteerde nier opnieuw wordt aangeboden als transplantatie-orgaan.

Met betrekking tot de onderhavige studie betekent dit eveneens dat weefseltransplantatie wel en orgaantransplantatie niet uitgesloten kan worden.

Gezien de biodistributie data van HK1-Hpp65 in C57BL/6 muizen, kan de COGEM niet uitsluiten dat derden blootgesteld worden aan de gg-vectoren indien korte tijd na vaccinatie met HB-101 orgaandonatie aan derden plaatsvindt (een tweede transplantatie-ontvanger). De verwachting van de COGEM is dat de gevolgen van blootstelling aan de ggo's door transplantatie ten hoogste vergelijkbaar zullen zijn met die van de beoogde patiënt, en mogelijk zal leiden tot een immuunrespons tegen de gB en pp65 HCMV eiwitten, waardoor de tweede transplantatie-ontvanger beschermd is tegen HCMV-infectie. De COGEM acht het risico hiervan verwaarloosbaar klein. Gezien het feit dat de ggo's replicatie-incompetent zijn en zich niet verder kunnen verspreiden zullen de ggo's (net als wildtype LCMV) binnen enige tijd geklaard worden uit het lichaam van de tweede transplantatie-ontvanger. Alles in overweging nemende acht de COGEM het vanuit het oogpunt van milieurisicobeoordeling niet noodzakelijk dat de deelnemers aan de onderhavige studie worden uitgesloten van het doneren van organen voor transplantatie.

## 5. Conclusie

De COGEM is van oordeel dat HB-101 afdoende moleculair is gekarakteriseerd. Gezien het gebruikte productiesysteem en de controle van de vectorbatches acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de vectorbatches RCV bevatten. Ditzelfde geldt voor de kans op recombinatie of complementatie van HB-101 in de patiënt. De COGEM acht de kans dat HB-101 zich kan verspreiden in het milieu verwaarloosbaar klein. Tevens acht zij de kans op nadelige effecten bij blootstelling van derden aan HB-101 verwaarloosbaar klein. De COGEM is van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze voorgenomen klinische studie met HB-101 verwaarloosbaar klein zijn.

## Referenties

1. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). CMV-infectie <https://lci.rivm.nl/richtlijnen/cmv-infectie> (bezoekt: 20 mei 2019)
2. Mocarski ES *et al.* (2013). Chapter 62 Cytomegaloviruses. In: Fields virology, 6th edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
3. Enders G *et al.* (2011). Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. J. Clin. Virol. 52: 244-246
4. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (bezoekt: 20 mei 2019)

5. King AMQ *et al.* (2012). Family *Arenaviridae*. In *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed. King AMQ *et al.*, Elsevier Academic Press, Amsterdam
6. Buchmeier MJ *et al.* (2013). *Arenaviridae*. In: *Fields virology*, 6th edition. Ed. Knipe DM *et al.*, Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia
7. 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](http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/lymp-cho-eng.php) (bezoekt: 20 mei 2019)
8. 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
9. COGEM (2016). Inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerd (gg-) Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus. COGEM advies CGM/160513-01
10. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV). <https://www.rivm.nl/wilde-knaagdieren-en-zo-nosen/ziekteverwekkers/lymphocytic-choriomeningitis-virus-lcmv> (bezoekt: 20 mei 2019)
11. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Lymphocytic Choriomeningitis (LCM). <https://www.cdc.gov/vhf/lcm/pdf/factsheet.pdf> (bezoekt: 28 mei 2019)
12. Bonthius DJ (2012). Lymphocytic choriomeningitis virus: an underrecognized cause of neurologic disease in the fetus, child, and adult. *Semin. Pediatr. Neurol.* 19: 89-95
13. Barton LL & Mets MB (2001). Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection: decade of rediscovery. *Clin. Infect. Dis.* 33: 370-374
14. Verhaegh EM *et al.* (2014). Meningitis na muizenbeet. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 158: A7033
15. Fischer SA *et al.* (2006). Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation. *N. Engl. J. Med.* 354: 2235-2249
16. Bonthius DJ (2012). Lymphocytic choriomeningitis virus: an underrecognized cause of neurologic disease in the fetus, child, and adult. *Semin. Pediatr. Neurol.* 19: 89-95
17. Wright R *et al.* (1997). Congenital lymphocytic choriomeningitis virus syndrome: a disease that mimics congenital toxoplasmosis or Cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 100:E9
18. Armstrong C & Lillie RD (1934). Experimental Lymphocytic Choriomeningitis of Monkeys and Mice Produced by a Virus Encountered in Studies of the 1933 St. Louis Encephalitis Epidemic. *Public Health R.* 49: 1019-1027
19. Flatz L *et al.* (2010). Development of replication-defective lymphocytic choriomeningitis virus vectors for the induction of potent CD8+ T cell immunity. *Nat. Med.* 16: 339-345
20. COGEM (2011). Classificatie en inschaling van werkzaamheden met *Lymphocytic choriomeningitis virus* (LCMV). COGEM advies CGM/110921-03
21. COGEM (2017). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van een groot aantal humaan- en dierpathogene DNA en RNA virussen. COGEM advies CGM/170522-03
22. Ahmed R *et al.* (1984). Selection of genetic variants of lymphocytic choriomeningitis virus in spleens of persistently infected mice. Role in suppression of cytotoxic T lymphocyte response and viral persistence. *J. Exp. Med.* 160: 521-540

23. Sullivan BM *et al.* (2011). Point mutation in the glycoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus is necessary for receptor binding, dendritic cell infection, and long-term persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108: 2969-2974
24. Schleiss MR *et al.* (2017). Additive Protection against Congenital Cytomegalovirus Conferred by Combined Glycoprotein B/pp65 Vaccination Using a Lymphocytic Choriomeningitis Virus Vector. *Clin. Vaccine Immunol.* 24
25. NIH U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. Trial to Evaluate Safety and Immunogenicity of a Vaccine Against HCMV. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02798692> (bezoekt: 23 mei 2019)
26. Nederlandse Transplantatie Stichting (2019). Modelprotocol Postmortale orgaan- en weefseldonatie versie 1.2 – april 2019. [https://www.transplantatiestichting.nl/sites/default/files/modelprotocol\\_postmortale\\_orgaan-en\\_weefseldonatie.pdf](https://www.transplantatiestichting.nl/sites/default/files/modelprotocol_postmortale_orgaan-en_weefseldonatie.pdf) (bezoekt: 5 juni 2019)