

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Waterstaat  
Mevrouw drs. S. van Veldhoven-van der Meer  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 16 januari 2019  
**KENMERK** CGM/190116-01  
**ONDERWERP** Advies klinische studie met genetisch gemodificeerd *Salmonella* Typhi T21a (VXM01) bij patiënten met glioblastoma multiforme

Geachte mevrouw Van Veldhoven,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM-MV 18-004\_000 met de titel 'An open-label, Phase I/II multicenter clinical trial of VXM01 in combination with avelumab in patients with progressive glioblastoma and further clinical studies with VXM01 in patients with solid malignancies' van het Universitair Medisch Centrum Utrecht, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag voor een klinische studie bij patiënten met glioblastoma multiforme (hersentumor). In deze studie wordt gebruik gemaakt van een genetisch gemodificeerde *Salmonella* Typhi Ty21a stam (VXM01), die humaan vasculaire endotheliale groeifactor receptor 2 (VEGFR-2) tot expressie brengt. VXM01 zal als drinkoplossing worden toegediend aan de patiënten in combinatie met injectie in de bloedbaan van het antilichaam avelumab. Dit moet een immuunreactie opwekken bij de patiënt waardoor de vorming van bloedvaten in tumoren wordt geremd.

VXM01 is afgeleid van de laboratoriumstam *S. Typhi* Ty21a. Deze verzwakte vaccinstam kent een lange historie van veilig gebruik als vaccin tegen tyfus bij de mens. Net als *S. Typhi* Ty21a kan VXM01 niet lang overleven in het milieu.

Na toediening kan de patiënt VXM01 kortdurend via de ontlasting of door braken uitscheiden. Indien derden korte tijd na uitscheiding in aanraking komen met VXM01-besmette ontlasting of braaksel zou overdracht kunnen plaatsvinden en zouden zij hiervan nadelige effecten kunnen ondervinden.

Om deze reden acht de COGEM het wenselijk dat blootstelling van derden aan VXM01-besmette ontlasting en braaksel zoveel mogelijk wordt voorkomen. Teneinde blootstelling zoveel mogelijk te minimaliseren acht de COGEM het van belang dat er een aantal aanvullende voorschriften worden gehanteerd.

Op basis van bovenstaande gegevens en onder navolging van genoemde voorschriften is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met VXM01 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. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau ggo  
                  Mr. J.K.B.H. Kwisthout, Ministerie van IenW  
                  Dr. D.A. Bleijs, Loket Gentherapie

# Klinische studie met genetisch gemodificeerd *Salmonella* Typhi Ty21a (VXM01) bij patiënten met glioblastoma multiforme

## COGEM advies CGM/190116-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een vergunningaanvraag (IM-MV 18-004) met betrekking tot een klinische studie waarbij een genetisch gemodificeerde *Salmonella* Typhi Ty21a stam (VXM01) oraal wordt toegediend in combinatie met intraveneuze toediening van avelumab aan patiënten met glioblastoma multiforme (GBM). Het doel van de klinische studie is om de veiligheid en tolerantie van VXM01 te testen. VXM01 brengt een plasmide coderend voor de humane vasculaire endotheliale groeifactor receptor 2 (VEGFR-2) tot expressie. De genetisch gemodificeerde (gg-) *S. Typhi* Ty21a stam zal worden toegediend om een T-cel afhankelijke immuunreactie op te roepen tegen cellen in het vasculaire tumorweefsel die VEGFR-2 tot expressie brengen, hiermee wordt beoogd tumorangiogenese af te remmen.

#### 1.1 *Salmonella* Typhi

*Salmonella* Typhi (*S. Typhi*) behoort tot de soort *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi en is de verwekker van tyfus.<sup>1</sup> Naast vermoeidheid en stapsgewijze verhoging van de lichaamstemperatuur wordt deze ernstige ziekte gekenmerkt door hoesten, overgeven, hoofdpijn en een verhoogde hartslag.<sup>2</sup> Eén van de met tyfus geassocieerde complicaties betreft darmperforatie.<sup>3</sup> Volgens de laatste schattingen van de 'World Health Organization' (WHO) worden wereldwijd jaarlijks 11-21 miljoen mensen door deze ziekte getroffen en sterven 128.000-161.000 mensen aan de gevolgen.<sup>4</sup> Voor zover bekend is de mens de enige natuurlijke gastheer van *S. Typhi*.<sup>4,5,6</sup>

Ongeveer 90% van het genoom van *S. Typhi* bevat sequenties die ook in andere *Salmonella* serovars voorkomen. Dit deel van het genoom faciliteert vermoedelijk kolonisatie, infectie en transmissie. Het *S. Typhi* specifieke deel van het genoom bevat 300-400 genen en ligt vooral op zogenaamde '*Salmonella* pathogenicity islands' (SPIs). De coderende sequentie voor het voor *S. Typhi* specifieke Vi kapsel is gelegen op SPI-7.<sup>7</sup>

Een opmerkelijke eigenschap van het genoom van *S. Typhi* is de accumulatie van onderbroken of geïnactiveerde genen, zogenaamde pseudogenen. Het genoom van *S. Typhi* bevat ongeveer 200 pseudogenen. De aanwezigheid van deze pseudogenen wordt in verband gebracht met de aanpassing van *S. Typhi* aan zijn gastheer de mens.<sup>2</sup>

Besmetting met *S. Typhi* vindt hoofzakelijk plaats na consumptie van gecontamineerd voedsel of water. Aangezien de infectieuze dosis voor *S. Typhi* laag is (ongeveer  $10^4$  'colony forming units' (CFU)), is verspreiding van mens-op-mens relatief eenvoudig. Na inname dringen de bacteriën de darmmucosa binnen, verspreiden systemisch, en kunnen worden aangetroffen in bloed en beenmerg. Het pathogeen is invasief, maar veroorzaakt gewoonlijk geen snelle ontstekingsreactie of diarree. Dit wordt mede veroorzaakt door het *S. Typhi* specifieke Vi polysaccharide. Dit Vi kapsel heeft anti-

inflammatoire eigenschappen. Het beperkt onder andere de afzetting van complement op het oppervlak van de bacterie en vermindert de activatie van het immuunsysteem.<sup>2</sup> Gedurende subklinische en de vroege stadia van tyfus wordt *S. Typhi* met tussenpozen in de ontlasting uitgescheiden. Als een patiënt niet wordt behandeld, wordt de uitscheiding van *S. Typhi* meer persistent van aard. Zogenaamde ‘tyfus dragers’, die zelf geen symptomen van tyfus vertonen, kunnen hoge concentraties *S. Typhi* uitscheiden. In deze individuen is de galblaas door *S. Typhi* gekoloniseerd en komt de bacterie via de gal in de darm terecht. Chronische infectie van de galblaas door *S. Typhi* is in verband gebracht met het ontstaan van galblaascarcinoom.<sup>8</sup>

### 1.2 *S. Typhi Ty21a*

VXM01 is gebaseerd op de geattenueerde avirulente bacteriestam *Salmonella enterica* subsp. serovar Typhi Ty21a. Deze stam komt niet van nature voor, is voor het eerst beschreven in 1975 en is met behulp van chemische mutagenese vervaardigd uit de wildtype stam *S. Typhi Ty2*.<sup>9</sup>

Het genoom van *S. Typhi Ty21a* is bekend en bedraagt net als ouderstam *S. Typhi Ty2* 4,8 Megabaseparen (Mb).<sup>10,11,13</sup> In de stam zijn 679 ‘single nucleotide polymorphisms’ geïdentificeerd ten opzichte van de ouderstam.<sup>13</sup> Het fenotype en de mutaties die relevant zijn voor het geattenueerde fenotype zijn geïdentificeerd en (genetisch) stabiel.<sup>18</sup>

*S. Typhi Ty21a* is door de inactivatie van het *galE* gen deficiënt voor het enzym uridine difosfaat (UDP)-galactosidase-4-epimerase, dat betrokken is bij lipopolysaccharide (LPS) synthese. Verder bevat de stam verschillende mutaties die leiden tot een gewijzigd galactosemetabolisme, waardoor verminderde hoeveelheden van enzymen aangemaakt worden die betrokken zijn bij de synthese van UDP-galactose uit exogeen galactose. Tevens is de bacterie niet in staat om het Vi kapsel en de aminozuren isoleucine en valine te synthetiseren, kan het geen gebruik maken van H<sub>2</sub>S en bevat het een geïnactiveerd RNA-polymerase sigma factor (*rpoS*) gen. Deze mutaties hebben gezamenlijk geresulteerd in een bacteriestam die avirulent is en niet goed in het milieu kan overleven.<sup>9,12,13,14,15,16,17,18</sup> De stam is erg gevoelig voor verschillende soorten omgevingsstress waaronder hoge temperatuur, hoge osmolaliteit en zure of alkalische pH.<sup>15,19</sup> *S. Typhi Ty21a* kan slechts kort overleven in humaan weefsel, bloed en ontlasting.<sup>20,21,22</sup>

*S. Typhi Ty21a* is eind jaren tachtig van de vorige eeuw toegelaten op de Europese markt als vaccinstam, (Typhoral<sup>®</sup>/Vivotif<sup>®</sup>) en wordt sinds 2008 door de WHO aanbevolen ter toepassing van de bestrijding van endemische tyfus.<sup>4,23,24</sup> Inmiddels zijn er de afgelopen >25 jaar al meer dan 200 miljoen mensen gevaccineerd, hierbij is nooit reversie naar virulentie waargenomen.<sup>18,19</sup>

Verschillende klinische en post-marketing studies bij kinderen en volwassenen hebben aangetoond dat het vaccin geen of milde (buik)griepachtige verschijnselen van voorbijgaande aard teweeg brengt.<sup>25,26,27,28,29</sup> Na toediening overleeft de vaccinstam slechts voor korte tijd in de darmen van de patiënt. Klinische studies hebben aangetoond dat er niet of nauwelijks uitscheiding van *S. Typhi Ty21a* via de ontlasting plaatsvindt afhankelijk van de toegediende dosis van het vaccin.<sup>29,30,32,33,34</sup> Indien *S. Typhi Ty21a* via het maagdarmkanaal wordt uitgescheiden, is dit van voorbijgaande aard.<sup>31</sup> Bij een 10-voudige dosis (3-10 x10<sup>10</sup> CFU) van het vaccin werd slechts een lage mate van uitscheiding in de feces waargenomen, tot twee dagen na vaccinatie.<sup>32</sup> Op dag 3 werd slechts bij één van de 155

proefpersonen nog *S. Typhi* Ty21a gedetecteerd in de feces.<sup>32</sup> Na toediening blijven bloedkweken negatief.<sup>29,31,33</sup> Tevens is er geen overdracht van de vaccinstam van mens naar mens waargenomen.<sup>31,34</sup>

### **1.3 VXM01 (gg-*S. Typhi* Ty21a)**

De aanvrager is voornemens gebruik te maken van een gg-*S. Typhi* Ty21a stam genaamd VXM01. VXM01 is verkregen door *S. Typhi* Ty21a te transfecteren met het expressieplasmide pVAX10.VR2-1. Dit plasmide bevat de volgende elementen: de humane ‘cytomegalovirus immediate-early’ promoter (PCMV), het ‘bovine growth hormone’ polyadenyleringssignaal (bGH pA), het neomycine fosfotransferase II gen (*npt II*), een humane VEGFR-2 cDNA sequentie, een ‘origin of replication (pBR322 ori) en een ‘repressor of primer’ (rop(PMB1)) sequentie. Tussen de bovengenoemde elementen liggen enkele niet-functionele korte sequenties. Dit zijn overblijfselen als gevolg van de assemblage en bevatten geen coderende sequenties.

De aanvrager is voornemens VXM01 toe te passen als immuuntherapie bij patiënten met GBM. VXM01 brengt humaan VEGFR-2 tot expressie, deze receptor medieert vasculaire endotheliale groeifactor-A (VEGF-A) groei- en overlevingssignalen.<sup>35</sup> VEGFR-2 is betrokken bij de aanmaak en differentiatie van bloed- en lymfevaten. In het menselijk lichaam komt de receptor tot expressie op endotheelcellen, hematopoietische stamcellen en in het stroma van de navelstreng. VEGFR-2 is belangrijk bij tumorangiogenese en wordt verhoogd tot expressie gebracht op vermenigvuldigende endotheelcellen rondom bloedvaten die zich ontwikkelen in het tumorweefsel. Mogelijk brengen sommige tumorcellen zelf ook VEGFR-2 tot expressie.<sup>36,37,38,39</sup>

Expressie van VEGFR-2 in de gg-*S. Typhi* Ty21a stam moet zorgen voor een VEGFR-2-specifieke T-cel afhankelijke immuunreactie in de patiënt. Na orale toediening komt VXM01 via de M cellen in de Peyerse platen in de dunne darm van de patiënt terecht. Hier wordt de bacterie opgenomen door antigen-presenterende cellen (APC's) (macrofagen en dendritische cellen) die de bacterie lyseren. Het expressieplasmide komt hierdoor vrij in het cytosol en de celkern van de geïnfecteerde cel en wordt afgelezen. VXM01 antigenen, waaronder VEGFR-2 peptiden, worden vervolgens door de APC via de MHC klasse-I route aan naïeve T-cellen gepresenteerd. Uiteindelijk leidt dit tot de activatie van VEGFR-2-specifieke cytotoxische T-cellen, die vervolgens cellen in het vasculaire tumorweefsel die VEGFR-2 tot expressie brengen aanvallen, hiermee wordt beoogd angiogenese van de tumor af te remmen.<sup>38,40</sup>

### **1.4 Productie van VXM01**

De productie van VXM01 maakt geen deel uit van de onderhavige vergunningaanvraag. Voorafgaand aan de vrijgifte van elke VXM01 batch wordt deze getest op identiteit, hoeveelheid levende cellen, plasmide stabiliteit, activiteit, pH en microbiële verontreinigingen. De identiteit van het ggo moet voldoen aan de monografie van de ‘Europese Farmacopee voor het tyfusvaccin (Levend, oraal, stam Ty21a) <1055>’. De integriteit van het plasmide wordt getest door restrictie- en expressieanalyse.

## **2. Eerder COGEM advies**

In 2015 heeft de COGEM de vaccinstam *S. Typhi* Ty21a ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.<sup>41</sup> Eveneens heeft zij in dit advies geadviseerd over laboratoriumwerkzaamheden met de gg-*S. Typhi*

Ty21a stam uit onderhavige aanvraag (VXM01). Gezien de functie van het VEGFR-2 eiwit zag de COGEM geen reden om aan te nemen dat VXM01 een andere overleving en verspreiding in het milieu laat zien dan de vaccinstam *S. Typhi* Ty21a. COGEM adviseerde om werkzaamheden met het ggo VXM01 waarbij geen aerogene transmissie kan plaatsvinden, uit te voeren op inperkingsniveau ML-I. Werkzaamheden waarbij de kans bestond dat de medewerker blootgesteld wordt aan grote hoeveelheden van de VXM01 vaccinstam, adviseerde zij uit te voeren op inperkingsniveau ML-II in een VK-II kabinet.<sup>41</sup>

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

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

De aanvrager is voornemens VXM01 oraal toe te dienen aan patiënten met glioblastoma multiforme, in combinatie met intraveneuze toediening van het antilichaam avelumab. De verwachting is dat het anti-PD-L1 antilichaam avelumab, de VXM01-geïnduceerde T-cel afhankelijke immunoreactie gericht tegen cellen in het vasculaire tumorweefsel die VEGFR-2 tot expressie brengen, zal versterken. Aan deze studie zullen maximaal 300 patiënten deelnemen. Patiënten krijgen per toediening een VXM01 dosis van  $10^6$  of  $10^7$  CFU. Er zullen 4 doses gegeven worden op dag 1, 3, 5 en 7, gevolgd door een enkele dosis elke 4 weken tot maximaal 96 weken na de eerste behandeling.

De volgende groepen zijn uitgesloten van deelname aan de studie: patiënten met een verzwakt immuunsysteem, patiënten die immuunsuppressieve medicijnen ontvangen, patiënten met actieve infecties, patiënten die een chronische therapie met antibiotica ondergaan twee weken voorafgaand en tijdens de behandeling, patiënten met open wonden of met laesies in het maagdarmkanaal.

Voorafgaand aan de toediening wordt één ampul met VXM01 ontdooid in een laminaire flowkast. Via een gesloten connectiesysteem wordt 1 ml van het ggo overgebracht naar een beker met bufferoplossing. De aanvrager geeft aan dat personeel dat de reconstitutie uitvoert handschoenen, een laboratoriumjas, een veiligheidsbril en een mondkapje draagt. De beker wordt vervolgens met een afgesloten deksel in een gesloten plastic container naar de behandelkamer gebracht waar het ggo zal worden toegediend aan de patiënt. De behandelende arts draagt handschoenen tijdens de toediening. Tijdens en tot 1 uur na de behandeling is er geen bezoek toegestaan en wordt contact met derden geminimaliseerd. Na het verlaten van de behandelkamer worden handen gedesinfecteerd en gewassen.

Aan het begin van de studie krijgt de patiënt een training over hygiënische voorzorgsmaatregelen die in acht genomen moeten worden, na toediening wordt de patiënt hieraan herinnerd. Tot één week na de behandeling moet de patiënt de volgende hygiënische voorzorgsmaatregelen opvolgen: het meerdere keren per dag wassen en desinfecteren van handen, het regelmatig en na gebruik desinfecteren van het toilet en de badkamer, en het toevoegen van een desinfecteermiddel aan de ontlasting. Patiënten die na VXM01 toediening last krijgen van diarree moeten contact opnemen met de onderzoeker zodat besloten kan worden of de patiënt opgenomen moet worden in het ziekenhuis totdat de diarree over is. De patiënt wordt geadviseerd om contact met kwetsbare groepen (zwangere vrouwen en kinderen jonger dan 2 jaar) tot de eerste week na toediening te vermijden.

Op verschillende tijdstippen worden bloed- serum- en urinemonsters afgenomen, ook worden tumorbiopten afgenomen voor analyse.

## 4. Overweging

### 4.1 Eigenschappen van het ggo

VXM01 is gebaseerd op de laboratoriumstam *S. Typhi* Ty21a. *S. Typhi* Ty21a, komt niet van nature voor, bevat verschillende mutaties waardoor de stam avirulent is en kan niet goed overleven in het milieu.<sup>9,12,13,14,15,16,17,18</sup> Deze stam is al ongeveer 30 jaar toegelaten op de Europese markt als vaccin tegen tyfus (Typhoral<sup>®</sup>/Vivotif<sup>®</sup>), is (genetisch) stabiel en reversie naar virulentie is nog nooit waargenomen.<sup>4,18,19,23,24</sup>

*S. Typhi* Ty21a is in het verleden door de COGEM ingedeeld als apathogeen in pathogeniteitsklasse 1.<sup>41</sup> Ook zag de COGEM geen redenen om aan te nemen dat VXM01 gezien de functie van VEGFR-2 een andere verspreiding en overleving in het milieu heeft dan *S. Typhi* Ty21a.<sup>41</sup>

Met VXM01 zijn drie klinische Fase I studies afgerond bij verschillende patiëntengroepen (glioblastoma multiforme, darmkanker en alvleesklierkanker).<sup>42,43,44</sup> Gepubliceerde data van de klinische Fase I studie bij alvleesklierkankerpatiënten laten zien dat het vaccin effectief was bij deze patiëntengroep.<sup>45,46</sup> Er zijn geen ernstige schadelijke effecten gerapporteerd en eventuele ziekteverschijnselen waren mild (o.a. diarree) en van voorbijgaande aard.

De aanvrager heeft in het kader van de voorliggende vergunningaanvraag, de stabiliteit van VXM01 onder natuurlijke omstandigheden op een vaste ondergrond (mat glas en staal) en in aquatische vloeistoffen (drinkwater, oppervlaktewater en rioolwater) onderzocht. De vaste ondergronden werden gecoat met  $8 \cdot 10^7$  CFU VXM01. Drinkwater werd geïnoculeerd met  $4,3 \cdot 10^6$  CFU/ml en oppervlakte- en rioolwater met  $5,0 \cdot 10^5$  CFU/ml VXM01. Na drogen bij 37 °C en incubatie bij kamertemperatuur kon de bacterie na twee dagen niet meer op de vaste ondergronden worden gedetecteerd (detectielimiet 10 CFU/oppervlakte). In drink- en rioolwater kon de bacterie tot één dag en in oppervlaktewater tot twee dagen na inoculatie gedetecteerd worden (detectielimiet 10 CFU/ml). Deze ongepubliceerde data laten zien dat VXM01 slechts korte tijd kan overleven onder natuurlijke omstandigheden.

### 4.2 Moleculaire karakterisering

De aanvrager heeft het in VXM01 aanwezige expressieplasmide pVAX10.VR2-1 volledig gesequenced. De plasmidesequentie is 100% identiek bevonden aan de referentiesequentie. Om de identiteit van VXM01 te bevestigen heeft de aanvrager de regio's in het genoom van VXM01 die de attenerende mutaties bevatten met PCR geamplificeerd en gesequenced. De aanvrager heeft dezelfde mutaties in VXM01 geïdentificeerd als in de ouderstam *S. Typhi* Ty21a, waarvan de genoomsequentie bekend is.<sup>13</sup>

Op basis van bovenstaande gegevens is de COGEM van oordeel dat VXM01 voldoende moleculair gekarakteriseerd is.

### 4.3 Genoverdracht

Horizontale genoverdracht van het expressieplasmide naar andere bacteriën in het darmstelsel van de patiënt is in pre-klinische en klinische studies met VXM01 onderzocht en niet waargenomen. In het theoretische geval dat het expressieplasmide wordt overgedragen naar andere bacteriën kunnen deze,

gezien de aanwezigheid van het antibioticaresistentiegen *ntpII* op het plasmide, resistent worden voor aminoglycoside antibiotica zoals kanamycine en neomycine. Het antibioticaresistentiegen komt algemeen voor in de natuur en levert geen selectievoordeel op voor de ontvangende bacterie. Het transgen VEGFR-2 zal niet tot expressie kunnen komen in de ontvangende bacterie omdat deze onder controle staat van een eukaryotische promotor (humaan PCMV). De COGEM is van oordeel, dat indien er horizontale overdracht van het plasmide plaats zou vinden, dit geen risico vormt voor mens en milieu.

#### **4.4 Uitscheiding en verspreiding van het ggo**

Pre-klinische en klinische studies met VXM01 laten zien dat deze stam, net als de ouderstam *S. Typhi* Ty21a, via het maagdarmkanaal kan worden uitgescheiden in de feces. Zo werd in een pre-klinische studie met muizen op dag 1 en 7 na vaccinatie VXM01 aangetroffen in de ontlasting. Deze muizen kregen op dag 1, 3, 5 en 7 VXM01 oraal toegediend in een dosis van  $10^8$  CFU.

Gegevens van een klinische Fase I studie waaraan 30 patiënten met vergevorderde alvleesklierkanker deelnamen en VXM01 oraal werd toegediend ( $10^6$  tot  $10^{10}$  CFU), wijzen er op dat fecale uitscheiding kortdurend is en afhankelijk is van de toegediende dosis.<sup>45</sup> Direct na vaccinatie scheidde één patiënt die een dosis van  $10^9$  CFU en één patiënt die een dosis van  $10^{10}$  CFU toegediend kreeg, VXM01 in de ontlasting uit. De hierop volgende monsters waren negatief. VXM01 werd tijdens de duur van de studie bij geen van de proefpersonen gedetecteerd in bloed-, urine- en traanmonsters.<sup>45</sup>

In een hierop volgende klinische studie waaraan 18 patiënten deelnamen, werd uitscheiding in de ontlasting aangetroffen bij twee van de 12 patiënten die een VXM01 dosis van  $10^6$  CFU ontvingen, en bij vier van de zes patiënten die een dosis van  $10^7$  CFU kregen toegediend. De patiënten in de  $10^6$ -dosis groep die VXM01 uitscheidde, hadden een 'gastric bypass'. VXM01 werd tijdens de duur van de studie bij geen van de proefpersonen aangetroffen in andere onderzochte lichaamsvloeistoffen.<sup>46</sup>

De aanvrager beschrijft verder ongepubliceerde data van klinische studies bij GBM patiënten met en bij patiënten met darmkanker, die een VXM01 dosis van  $10^6$  of  $10^7$  CFU toegediend kregen. Bij één darmkankerpatiënt die  $10^6$  CFU toegediend had gekregen werd uitscheiding in de ontlasting gedetecteerd. Deze patiënt had een stoma op het horizontale deel van de dikke darm (transversostoma). In de GBM patiënten is bij één patiënt die een dosis van  $10^6$  en één patiënt die een dosis van  $10^7$  ontving uitscheiding in de ontlasting gerapporteerd. In alle gevallen was de uitscheiding van het ggo tijdelijk en binnen twee dagen na toediening niet meer detecteerbaar.

Op basis bovenstaande gegevens, is de verwachting van de COGEM dat er bij deelnemende patiënten aan de voorliggende studie, kortdurende zelflimiterende uitscheiding (tot twee dagen na toediening) van VXM01 in de feces van de patiënt kan plaatsvinden.

Een andere route waarop VXM01 bij deelnemende patiënten aan de voorliggende studie uitgescheiden zou kunnen worden, is als de patiënt korte tijd na de orale toediening van VXM01, moet overgeven. De aanvrager is voornemens VXM01 te combineren met intraveneuze toediening van het antilichaam avelumab. Eén van de regelmatig optredende bijwerkingen die optreedt na avelumab behandeling is braken (bij 16% van de behandelde patiënten), dit is tevens een mogelijke bijwerking van het Typhoral<sup>®</sup>/Vivotif<sup>®</sup> vaccin.<sup>31,47</sup> De aanwezigheid van VXM01 in braaksel is in de bovengenoemde



klinische studies niet onderzocht. De aanvrager geeft aan dat uit de literatuur bekend is dat de bacterie *S. Typhi* Ty21a erg gevoelig is voor verschillende soorten omgevingsstress waaronder hoge temperatuur, hoge osmolaliteit en zure of alkalische pH.<sup>15,19</sup> Wanneer *S. Typhi* Ty21a wordt blootgesteld aan zure omstandigheden (pH 2.5), vindt na een incubatietijd van 1 uur een sterke afname plaats in de hoeveelheid levende bacteriën. Afhankelijk van de exacte groeiomstandigheden voorafgaand aan de blootstelling is een reductie 2 tot 6 log waargenomen.<sup>19</sup>

Gezien het bovenstaande is de COGEM van oordeel VXM01 zeer korte tijd kan overleven in braaksel.

Secundaire transmissie van *S. Typhi* Ty21a naar derden is nog nooit waargenomen.<sup>31,34</sup> De dosis VXM01 die aan patiënten die deelnemen aan de voorliggende studie zal worden toegediend, is relatief laag ( $10^6$  of  $10^7$  CFU) in vergelijking tot de gangbare dosis van het tyfusvaccin ( $2 \cdot 10^{10}$  CFU).<sup>31</sup> Door de lage toegediende dosis zal de mate van VXM01 uitscheiding in ontlasting en braaksel beperkt zijn. Ook kan VXM01 niet lang overleven in het milieu (tot twee dagen). Hoewel de COGEM de kans, gezien het bovenstaande, op transmissie van het ggo naar derden zeer klein acht, kan dit niet volledig worden uitgesloten. VXM01 kan na toediening kortdurend worden uitgescheiden via de ontlasting of na het optreden van braken. Indien derden korte tijd na uitscheiding in aanraking komen met VXM01-besmette ontlasting of braaksel zou transmissie kunnen plaatsvinden. Hierdoor bestaat de theoretische kans dat bij derden een immunoreactie geïnduceerd wordt tegen cellen in het vasculair endotheel die VEGFR-2 tot expressie brengen.

Om bovenstaande reden acht de COGEM het wenselijk dat blootstelling van derden aan VXM01-besmette ontlasting en braaksel zoveel mogelijk wordt voorkomen.

Om de kans op blootstelling van derden via VXM01-besmet braaksel te minimaliseren – mede gezien het mogelijke optreden van braken tijdens de toediening – acht de COGEM het van belang dat de behandelend personeel tijdens de toediening naast de in het klinisch protocol voorgeschreven handschoenen, ook een laboratoriumjas, een veiligheidsbril en een mondkapje draagt. Verder acht de COGEM het van belang dat braaksel gedesinfecteerd wordt.

Om de kans op blootstelling van derden via VXM01-besmette ontlasting te minimaliseren acht de COGEM het van belang dat de patiënt, zoals voorgeschreven in het klinisch protocol, tot één week na de behandeling de volgende hygiënische voorzorgsmaatregelen in acht neemt: het meerdere keren per dag wassen en desinfecteren van handen, het regelmatig en na gebruik desinfecteren van het toilet en de badkamer, en het toevoegen van een desinfecteermiddel aan de ontlasting.

De aanvrager geeft aan dat het effect van VXM01 bij kinderen jonger dan 2 jaar en zwangere vrouwen niet is onderzocht. Bij deze groepen is de aanmaak van nieuwe bloedvaten essentieel. Gezien de anti-angiogenetische werking van VXM01, lopen deze groepen een verhoogd risico wanneer ze worden blootgesteld aan VXM01. De COGEM ondersteunt de aanbevelingen van de aanvrager, dat patiënten worden geadviseerd om contact met kwetsbare groepen gedurende de eerste week na toediening te vermijden.

De aanvrager geeft aan dat patiënten met een verzwakt immuunsysteem en patiënten die immuunsuppressieve medicijnen ontvangen uitgesloten zijn van deelname aan deze studie. Hoewel niet expliciet door de aanvrager benoemd gaat de COGEM er vanuit dat – gezien de immuunverzwakkende werking van de gangbare chemotherapie (temozolomide) waarmee GBM patiënten worden behandeld<sup>48</sup> – patiënten tijdens de duur van de studie geen chemotherapie zullen ondergaan.

Mensen kunnen asymptomatisch drager zijn van wildtype *Salmonella* serovars. Om mogelijke overdracht van het plasmide naar wildtype *Salmonella* serovars te voorkomen acht de COGEM het van belang dat, naast patiënten met actieve infecties ook mensen die (asymptomatisch) geïnfecteerd zijn met *Salmonella*, worden uitgesloten van deelname aan de studie.

### **5. Additionele opmerking**

In het kader dat VXM01 in de toekomst gecommmercialiseerd wordt en grootschalig zal worden toegepast, adviseert de COGEM de aanvrager om de ontlasting van patiënten die deelnemen aan de voorliggende studie met PCR analyses te testen op aanwezigheid van VXM01 en op de aanwezigheid van plasmidesequenties. Om zodoende met experimentele data de verwachting te bevestigen dat er in deze studieopzet, alleen kortdurende zelflimiterende uitscheiding (tot twee dagen na toediening) van VXM01 in de ontlasting plaatsvindt.

### **6. Advies**

De COGEM is van oordeel dat VXM01 afdoende moleculair gekarakteriseerd is. De COGEM acht de kans dat VXM01 zich kan verspreiden in het milieu verwaarloosbaar klein. Om de kans op blootstelling van derden ten gevolge van uitscheiding van het toegediende ggo te minimaliseren acht de COGEM het van belang dat er een aantal aanvullende voorschriften worden gehanteerd.

Met inachtneming van de in het klinisch protocol gestelde voorschriften en de door de COGEM geadviseerde aanvullende voorschriften, is de COGEM van oordeel dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie met VXM01 verwaarloosbaar klein zijn.

### **Referenties**

1. Porwollik S *et al.* (2004). Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. *J. Bac.* 186: 5883-5898
2. Dougan G & Baker S (2014). *Salmonella enterica* serovar Typhi and the pathogenesis of typhoid fever. *Annu. Rev. Microbiol.* 68: 317-36
3. Neil KP *et al.* (2012). A large outbreak of typhoid fever associated with a high rate of intestinal perforation in Kasese District, Uganda 2008-2009. *Clin. Infect. Dis.* 54: 1091-99

4. World Health Organization (WHO) (2018). Typhoid vaccines: WHO position paper – March 2018. Weekly epidemiological record 13(93): 153-172.  
<http://www.who.int/immunization/diseases/typhoid/en/> (bezocht: 14 december 2018)
5. Deng L *et al.* (2014). Host adaptation of a bacterial toxin from the human pathogen *Salmonella* Typhi. Cell 159: 1290–1299
6. World Health Organization (2011). The immunological basis for immunization series module 20: *Salmonella enterica* serovar Typhi (typhoid) vaccines.  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44752/9789241502610\\_eng.pdf;jsessionid=F59C3F2D628F368E0705D8B87A2077D5?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44752/9789241502610_eng.pdf;jsessionid=F59C3F2D628F368E0705D8B87A2077D5?sequence=1) (bezocht: 14 december 2018)
7. Pickard D *et al.* (2003). Composition, acquisition, and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding *Salmonella enterica* pathogenicity island SPI-7. J. Bacteriol. 185: 5055-5065
8. Scanu T *et al.* (2015). *Salmonella* manipulation of host signalling pathways provokes cellular transformation associated with gallbladder carcinoma. Cell Host Microbe 17: 763-774
9. Germanier R & Furer E (1975). Isolation and characterization of gal B mutant Ty21a of *Salmonella* typhi; a candidate strain for a live oral typhoid vaccine. J. Infect. Dis. 141: 553-558
10. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi str. Ty21a, complete genome.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/CP002099> (bezocht: 11 januari 2019)
11. Deng W *et al.* (2003). Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18. J. Bacteriol. 185(7): 2330-2337
12. Cryz SJ *et al.* (1988). Attenuated, live, oral typhoid vaccine. Drugs Today 24: 349-353
13. Xu DQ *et al.* (2013). Genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhi oral vaccine strain Ty21a. Genome Announcements 1(4) e00650-13
14. Germanier R & Furer E (1983). Characteristics of the attenuated oral vaccine strain *S. Typhi* Ty21a. Dev. Biol. Stand. 53: 3-7
15. Robbe-Saul V *et al.* (1995). The live oral typhoid vaccine Ty21a is a rpoS mutant and is susceptible to various environmental stresses. FEMS Microbiol. Lett. 126: 171-176
16. Coynault C *et al.* (1996). Virulence and vaccine potential of *Salmonella typhimurium* mutants deficient in the expression of the RpoS (sigma S) regulon. Mol. Microbiol. 22: 149-160
17. Robbe-Saul V & Norel F (1999). The *rpoS* mutant allele of *Salmonella typhi* Ty2 is identical to that of the live typhoid vaccine Ty21a. FEMS Microbiol. Lett. 170: 141-143
18. Kopecko DJ *et al.* (2009). Genetic stability of vaccine strain *Salmonella Typhi* Ty21a over 25 years. Int. J. Med. Microbiol. 299: 233-246
19. Dharmasena MN *et al.* (2016). Development of an Acid-Resistant *Salmonella Typhi* Ty21a Attenuated Vector For Improved Oral Vaccine Delivery. PLoS One 11
20. Somingos-Pereira S. *et al.* (2017). Preclinical efficacy and safety of the Ty21a vaccine strain for intravesical immunotherapy of non-muscle-invasive bladder cancer. Oncoimmunology. 6.
21. Brennenman KE *et al.* (2012). Use of RapidChek® SELECT™ *Salmonella* to detect shedding of live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi vaccine strains. J. Microbiol. Methods. 89: 137-147
22. Shi H *et al.* (2010). Live recombinant *Salmonella Typhi* vaccines constructed to investigate the role of rpoS in eliciting immunity to a heterologous antigen. PLoS One 5

23. European Medicines Agency (EMA) (2018). List of nationally authorised medicinal products. EMA/182704/2018. [https://www.ema.europa.eu/documents/psusa/typhoid-vaccine-live-attenuated-list-nationally-authorised-medicinal-products-psusa/00003067/201707\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/psusa/typhoid-vaccine-live-attenuated-list-nationally-authorised-medicinal-products-psusa/00003067/201707_en.pdf) (bezocht: 17 december 2018)
24. WHO (2008). Typhoid vaccines: WHO position paper. Weekly epidemiological record 6(83): 49-60
25. Levine MM *et al.* (1987). Large-scale field trial of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsule formulation. *Lancet* 1: 1049-1052
26. Begier EM *et al.* (2004). Postmarketing safety surveillance for typhoid fever vaccines from the Vaccine Adverse Event Reporting System, July 1990 through June 2002. *Clin. Infect. Dis.* 38: 771-779
27. Levine MM *et al.* (1999). Duration of efficacy of T21a, attenuated *Salmonella* Typhi live oral vaccine. *Vaccine* 17: S22-S27
28. Cryz JR *et al.* (1993). Safety and immunogenicity of *Salmonella* Typhi Ty21a vaccine in young Thai children. *Infect. Immun.* 61(3): 1149-1151
29. Levine MM *et al.* (2001). Host – *Salmonella* interaction: human trials. *Microbes Infect* 3: 1271-1279
30. Tacket CO *et al.* (1991). Lack of immune response to the Vi component of a Vi-positive variant of the *Salmonella* typhi live oral vaccine strain Ty21a in human studies. *J. Infect. Dis.* 163: 901-904
31. U.S. Food & Drug Administration. Approved Products. Vivotif Package Insert USA – Updated September 2013 – Increase of Upper Specification Limit. Vivotif®Typhoid Vaccine Live Oral Ty21a <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM142807.pdf> (bezocht: 3 januari 2019)
32. Gilman RH *et al.* (1977). Evaluation of a UDP-glucose-4-epimerase-less mutant of *Salmonella* typhi as a live oral vaccine. *J. Infect. Dis.* 136: 717-723
33. Black R *et al.* (1983). Immunogenicity of Ty21a attenuated *Salmonella typhi* given with sodium bicarbonate or in enteric-coated capsules. *Dev. Biol. Stand.* 53: 9-14
34. Wahdan MH *et al.* (1982). A controlled field trial of live *Salmonella typhi* strain Ty21a oral vaccine against typhoid: three year results. *J. Infect. Dis.* 145: 292-295
35. Shibuya M (2013). Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J. Biochem.* 153: 13-19
36. Niethammer AG *et al.* (2002). A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth. *Nature Medicine* 8: 1369-1375
37. Miyazawa M *et al.* (2009). Phase I clinical trial using peptide vaccine for human vascular endothelial growth factor receptor 2 in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Sci.* 101: 433-439
38. Reisfeld RA *et al.* (2004). DNA vaccines suppress tumor growth and metastases by the induction of anti-angiogenesis. *Immunol. Rev.* 199: 181-190
39. Schmitz-Winnenthal FH *et al.* (2015). A phase 1 trial extension to assess immunologic efficacy and safety of prime-boost vaccination with VXM01, an oral T cell vaccine against VEGFR2, in patients with advanced pancreatic cancer. *Oncoimmunology.* 7
40. Niethammer AG *et al.* (2012). Double-blind, placebo-controlled first in human study to investigate an oral vaccine aimed to elicit an immune reaction against the VEGF-Receptor 2 in patients with stage IV and locally advanced pancreatic cancer. *BMC Cancer.* 12: 361

41. COGEM (2015). Classificatie en inschaling van werkzaamheden met een op *Salmonella* Typhi gebaseerde vaccinstam. COGEM advies CGM/150716-01
42. U.S. National Library of Medicine. VXM01 Phase I Pilot Study in Patients With Operable Recurrence of a Glioblastoma. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02718443?term=VXM01&rank=2> (bezoekt: 3 januari 2019)
43. U.S. National Library of Medicine. VXM01 Phase I Study in Patients With Metastatic Colorectal Cancer With Liver Metastasis. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02718430?term=VXM01&rank=3> (bezoekt: 3 januari 2019)
44. U.S. National Library of Medicine. VXM01 Phase I Dose Escalation Study in Patients With Locally Advanced, Inoperable and Stage IV Pancreatic Cancer. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01486329?term=VXM01&rank=4> (bezoekt: 3 januari 2019)
45. Schmitz-Winnenthal FH *et al.* (2015). Anti-angiogenic activity of VXM01, an oral T-cell vaccine against VEGF receptor 2, in patients with advanced pancreatic cancer: A randomized, placebo-controlled, phase 1 trial. *Oncoimmunology*. 4: e1001217
46. Schmitz-Winnenthal FH *et al.* (2018). A phase 1 trial extension to assess immunologic efficacy and safety of prime-boost vaccination with VXM01, an oral T cell vaccine against VEGFR2, in patients with advanced pancreatic cancer. *Oncoimmunology*. 7: e1303584
47. European Medicines Agency (EMA). Bavencio: EPAR. Summary of product characteristics [https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/bavencio-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/documents/product-information/bavencio-epar-product-information_en.pdf) (bezoekt: 9 maart 2019)
48. Neyns B *et al.* (2010). Dose-dense temozolomide regimens: antitumor activity, toxicity, and immunomodulatory effects. *Cancer*. 116: 2868-2877