



**GENimmune N.V.**

Technologiepark 6 - 9052 Zwijnaarde – Belgium

## **GMO Deliberate Release Notification**

### **INFORMATIE VOOR HET PUBLIEK<sup>1</sup>**

**EEN MULTICENTRUM FASE I STUDIE VOOR DE EVALUATIE VAN VEILIGHEID EN  
VERDRAAGBAARHEID VAN EEN HETEROLOGE PRIME-BOOST VACCINATIE  
MET INX102-3697 HBV pDNA/INX102-0557 HBV MVA  
IN GEZONDE VRJWILLIGERS EN HBeAg+ CHRONISCHE HEPATITIS PATIENTEN**

**Europees notificatie nummer  
B/BE/07/BVW3**

---

<sup>1</sup> Dit document werd opgesteld volgens de "Guidelines To Compile The Public Dossier - Deliberate releases of genetically modified micro-organisms for experimental purposes (part B)" van de Adviesraad voor Bioveiligheid (versie van 26 februari 2003). Tekst die verplicht moet opgenomen worden, wordt schuin weergegeven.

## INHOUDSTAFEL:

1. REGULATORISCH KADER EN TOELATINGSPROCEDURE .....	3
2. BESCHRIJVING VAN HET GENETISCH GEWIJZIGD MICRO- ORGANISME (GGM) .....	3
3. AARD EN DOELSTELLING VAN DE GEPLANDE STUDIE .....	4
4. ONDERZOEKS- EN ONTWIKKELINGSKADER.....	5
5. MOGELIJKE VOORDELEN VAN DE GEPLANDE VRIJSTELLING .....	5
6. INSCHATTING VAN DE MOGELIJKE RISICO'S VOOR DE VOLKSGEZONDHEID EN HET MILIEU .....	6
7. VERANTWOORDELIJKHEDEN VAN DE AANVRAGER.....	8
8. INSPECTIE DOOR DE AUTORITEITEN .....	8
9. ACTIVITEITENVERSLAG.....	8
10. CONTACT.....	9

## 1. REGULATORISCH KADER EN TOELATINGSPROCEDURE

*De doelbewuste introductie van genetisch gewijzigde organismen (GGO's) in het leefmilieu is strikt gereguleerd op Europees niveau door de richtlijn 2001/18/EG van 12 maart 2001 ter vervanging van richtlijn 90/220/EEG en op het Belgisch niveau door het Koninklijk Besluit van 21 februari 2005 "tot reglementering van de doelbewuste introductie in het leefmilieu evenals van het in de handel brengen van genetisch gewijzigde organismen of van producten die er bevatten" ter vervanging van het Koninklijk Besluit van 18 december 1998.*

*Om het veilig gebruik van GGO's te waarborgen, stipuleren de wetteksten ondermeer dat de introductie van GGO's voor experimentele doeleinden verboden is zonder voorafgaande geschreven toelating van de bevoegde minister. Het al dan niet toelaten is gebaseerd op een grondige evaluatie van de bioveiligheid van de geplande vrijzetting, die uitgevoerd wordt door de Adviesraad voor Bioveiligheid, die is samengesteld uit verschillende wetenschappelijke comités die onafhankelijke experts van Belgische universiteiten en overheidsinstellingen groepeert.*

*Om de vereiste toelating van de bevoegde minister te verkrijgen heeft het bedrijf GENimmune NV een aanvraagdossier ingediend bij de bevoegde overheid. Op basis van het advies van de Adviesraad voor Bioveiligheid kan de bevoegde minister toestemming verlenen aan het bedrijf GENimmune NV om de proefnemingen met transgene modified vaccinia virus Ankara uit te voeren zoals beschreven in de aanvraag **B/BE/07/BVW3**.*

*De vrijzetting is voorzien in Vlaanderen / Wallonië / Brussel als gevolg van klinische studies uitgevoerd aan Centre Hospitalier Universitaire Brugmann, Brussels; Cliniques Universitaires Saint-Luc, Brussels; Drug Research Unit Ghent (D.R.U.G.) Gent; SGS Life Science Services - Research Unit Stuivenberg, Antwerpen; Universitair Ziekenhuis Antwerpen, Antwerpen; Universitair Ziekenhuis Brussel, Brussels; Universitair Ziekenhuis Gasthuisberg, Leuven, and Universitair Ziekenhuis Gent, Gent. Naar verwachting starten de proeven op 1 maart 2008 en worden ze afgerond voor 1 maart 2010.*

## 2. BESCHRIJVING VAN HET GENETISCH GEWIJZIGD MICRO-ORGANISME (GGM)

Het GGM is een therapeutisch polyepitooop vaccin ontwikkeld voor de behandeling van patiënten die chronisch met het hepatitis B virus (HBV) geïnfecteerd zijn.

Het gaat hierbij om een kunstmatig samengesteld gen, dat meerdere korte DNA fragmenten, verbonden door verbindingssequenties, bevat die coderen voor peptiden die een afweerreactie (immuun respons) tegen HBV kunnen opwekken. Dit zogenaamde "polyepitooop" gen wordt tot expressie gebracht, ofwel in een plasmide (INX102-3697 HBV pDNA), ofwel in een gemodificeerd vaccinia, Ankara virus (MVA) (INX102-0557 HBV MVA).

Vaccinia virus staat bekend als het vaccin dat gebruikt werd om de pokken uit te roeien. Het MVA virus is een sterk geattenuerde variant hiervan, afgeleid van een chorioallantois vaccinia virus stam die geïsoleerd werd in Ankara, vanwaar de naam afgeleid is. Tijdens een proces van verzwakking, waarbij dit virus talloze cycli van infectie en herisolatie in fibroblastcellen van kippenembryo's onderging, verloor MVA ongeveer 15% van zijn genetische informatie. Ondermeer die specifieke functies die verantwoordelijk zijn voor het bepalen van het soort gastheercellen dat kan geïnfecteerd worden en functies die verantwoordelijk zijn voor het ontsnappen aan de immuunrespons van de gastheer gingen verloren. Als gevolg hiervan is de mogelijkheid tot vermenigvuldiging van MVA in zoogdiercellen uiterst beperkt. Eén van de belangrijkste voordelen met betrekking tot de veiligheid van MVA is dat het virus zijn levenscyclus niet kan voltooien in zogenaamde niet-permissieve (menselijke) cellen, wat resulteert in de

accumulatie van niet-mature virusdeeltjes. Injectie van MVA bij de mens zal dan ook niet leiden tot productie van mature en besmettelijke viruspartikels.

Na injectie, zal de genetisch gewijzigde MVA stam het HBV polyepitooop slechts tijdelijk produceren. Dit genproduct werd zó ontworpen dat het een breed gamma van immunologische afweerreacties kan teweegbrengen bij een groot deel van de bevolking, maar het heeft zélf geen enzymatische activiteit. Het geproduceerd polyepitooop eiwit wordt door de cellen snel verwerkt en afgebroken en kan zich daardoor niet opstapelen.

Het recombinant plasmide bevat eveneens een gen voor resistentie tegen bepaalde aminoglycoside antibiotica (bv. kanamycine). Dit gen wordt in *Escherichia coli* tot uitdrukking gebracht en is nodig om de selectie van het plasmide mogelijk te maken.

### **3. AARD EN DOELSTELLING VAN DE GEPLANDE STUDIE**

De doelbewuste introductie kadert in een "open-label", niet-gerandomizeerde, niet-placebogecontroleerde, multicentrum, fase I studie waarbij de veiligheid, verdraagbaarheid en immunogeniciteit van een heterologe "prime-boost" vaccinatie met afwisselende toediening van intramusculaire (IM) injecties van INX102-3697 HBV pDNA en subcutane (SC) injecties van INX102-0557 HBV MVA zal geëvalueerd worden.

In de meeste gevallen is vaccinatie met een éénmalige dosis vaccin niet toereikend om een voldoende sterke of langdurige immuunreactie te bekomen. Herhaaldelijke toediening van hetzelfde vaccin kan deze immuunreactie verbeteren, een fenomeen dat bekend staat als "boosting" (van het Engels "versterken" of "opdrijven"). Bij een "prime-boost" aanpak wordt hetzelfde antigeen achtereenvolgens via verschillende dragers (vectoren) toegediend. Hierbij zal blootstelling aan dit antigeen via de eerste vector de immuunrespons op gang brengen ("prime"); een volgende blootstelling van het antigeen via de tweede vector zal de immuunrespons dan verder opdrijven ("boost"). Dergelijke aanpak wordt ook wel "heterologe boosting" genoemd; om het onderscheid te maken met de traditionele vaccinatiemethode ("homologe boosting"), waarbij achtereenvolgens twee of meer dosissen van hetzelfde vaccin gegeven worden. In deze studie zal de toediening van het HBV polyepitooop via het plasmide (INX102-3697 HBV pDNA) afgewisseld worden met toediening via het MVA (INX102-0557 HBV MVA).

De doelstelling van de proef is de veiligheid, verdraagbaarheid en werkzaamheid (immunogeniciteit) van het vaccin te beoordelen.

De studie zal bestaan uit een eerste gedeelte, waarbij 12 gezonde vrijwilligers zullen gevaccineerd worden. Wanneer hierbij de veiligheid en verdraagbaarheid van het vaccin bevestigd wordt, dan zal in een tweede gedeelte de behandeling van 12 patiënten met chronische hepatitis B gestart worden.

De proefpersonen zullen 5 maal een injectie toegediend krijgen van of het plasmide of de recombinante MVA stam. Deze toedieningen zullen met een tussenperiode van 3 weken gebeuren. Voor elk product wordt slechts één concentratie voorzien. De deelnemers aan de studie worden geïnformeerd over welk product ze toegediend krijgen ("open label" proef).

De patiënten worden geselecteerd volgens zeer strikte criteria. Om voldoende geschikte patiënten te vinden is het nodig meerdere klinische centra in te schakelen ("multicentrum studie").

Bij een vorige klinische fase I studie in één centrum werd reeds aangetoond dat het INX102-3697 HBV pDNA plasmide veilig is en goed verdragen wordt. INX102-0557 HBV MVA werd nog niet eerder in de kliniek getest. Er werden echter reeds verschillende testen uitgevoerd met recombinante MVA vectoren voor gelijkaardige toepassingen, zowel in Europese als in niet-

Europese landen. Alle resultaten bevestigen dat MVA een veelbelovende en veilige vector is voor medische toepassingen.

#### **4. ONDERZOEKS- EN ONTWIKKELINGSKADER**

Hepatitis B is een ontsteking van de lever die veroorzaakt wordt door het hepatitis B virus. Wereldwijd zijn meer dan 350 miljoen mensen geïnfecteerd, jaarlijks resulterend in ongeveer 1 miljoen overlijdens. HBV infectie vertoont een complex ziektepatroon dat ofwel spontaan kan verdwijnen of zich anderzijds kan manifesteren op verschillende manieren. Chronische dragers van HBV lopen het risico om langdurige complicaties te ontwikkelen, zoals cirrose, leverfalen en leverkanker. Tussen de 15 en 40% van de personen met HBV krijgen te maken met ernstige ziekteverschijnselen. Daarom vormt een doeltreffende antivirale behandeling een belangrijk aspect bij de klinische aanpak van HBV infectie en de daaruit voorkomende verwikkelingen.

Al kunnen de momenteel beschikbare geneesmiddelen voor de behandeling van hepatitis B zelden de infectie volledig uitschakelen, behandeling kan de vermenigvuldiging van het virus wel afgeremmen. De efficiëntie van deze geneesmiddelen verschilt echter van persoon tot persoon en bovendien kan ontwikkeling van virale resistentie optreden.

Therapeutische vaccins voor de behandeling van chronische (virale) infecties, zoals hepatitis B, zij er op gericht het virus uit te schakelen of tenminste gedurende lange tijd te onderdrukken. Hierbij is de inductie van een cytotoxische T-cell (CTL) respons vereist. CTLs zijn een type witte bloedcellen die in staat zijn om virusgeïnfecteerde cellen af te doden. Om deze CTLs te activeren zijn antigenen nodig met specifieke epitopen, zoals het HBV polyepitop in de huidige studie.

Gebaseerd op de steeds groeiende hoeveelheid gegevens, zowel uit gepubliceerde studies literatuur als uit GENimmune's eigen onderzoeksprogramma's, wordt verwacht dat een heterologe prime-boost vaccinatie een veelbelovende strategie kan zijn om sterke cellulaire antivirale immunoresponsen te induceren bij de mens.

Een eerste klinische studie (monocentrum fase I studie) met het INX102-3697 HBV pDNA plasmide dat het polyepitop tot uitdrukking brengt werd uitgevoerd in de Verenigde Staten. Bij deze proef werd de veiligheid en verdraagbaarheid geëvalueerd van 4 maandelijkse injecties van het vaccin, toegediend in twee concentraties in vergelijking met een placebo. Er werden geen klinisch relevante verschillen tussen placebo en de verschillende concentraties vaccin vastgesteld. Het geneesmiddel werd veilig en goed verdraagbaar bevonden bij beide concentraties.

De voorgestelde fase I klinische studie vormt de eerste evaluatie van het afwisselend toedienen van het polyepitop via een plasmide en via een MVA vector. De werking is enkel gebaseerd op tijdelijke expressie van het polyepitop en permanente transformatie van menselijke cellen wordt uitgesloten geacht.

#### **5. MOGELIJKE VOORDELEN VAN DE GEPLANDE VRIJSTELLING**

De geplande vrijstelling vormt een verdere stap in de ontwikkeling van een nieuwe strategie voor de behandeling van chronische hepatitis B.

Momenteel resulteert behandeling in een sterke daling van de virusconcentratie in het lichaam. Patiënten lopen echter nog steeds het risico op het ontstaan van verwikkelingen doordat de infectie aanwezig blijft. Verder kunnen potentiële risico's, zoals bijwerkingen of het ontstaan van

virale resistentie, naast een voldoende nauwkeurige opvolging van de behandeling door de patiënt en een voldoende gunstige reactie op de behandeling, een rol spelen.

De uiteindelijke bedoeling van de behandeling is om het virus volledig uit te schakelen alvorens leverschade optreedt. De voorgestelde prime-boost vaccinatie is hiertoe een veelbelovende aanpak.

## **6. INSCHATTING VAN DE MOGELIJKE RISICO'S VOOR DE VOLKSGEZONDHEID EN HET MILIEU**

Aangezien MVA een erg verzwakt, niet-replicerend type pokkenvirus is, met een beperkt aantal mogelijke gastheercellen, wordt het algemeen beschouwd als de vaccinia stam die de voorkeur geniet voor klinisch onderzoek en voor verdere ontwikkeling als vectorsysteem voor toepassing bij recombinante vaccins. Recombinante MVA vaccins werden reeds voor de mens veilig bevonden in klinische studies rond melanoma, HIV en orthopox infecties. In de EU werden verschillende klinische studies met genetisch gewijzigd MVA uitgevoerd. In alle gevallen werd bevestigd dat de MVA vectoren veilig kunnen gebruikt worden en geen aanleiding geven tot oncontroleerbare verspreiding. Deze bevindingen zijn hoogst relevant voor de hier voorgestelde doelbewuste introductie.

De MVA stam biedt verschillende voordelen met betrekking tot de veiligheid. MVA kan zich niet vermenigvuldigen in de meeste zoogdiercellen (kan enkel efficiënt vermenigvuldigen in primaire fibroblastcellen van kippenembryo's en in "baby hamster kidney cells", een nier-cel lijn oorspronkelijk geïsoleerd uit hamsters), hetgeen de kans op verspreiding beperkt. Het virus is niet pathogeen voor de mens omdat het belangrijke gedeeltes van zijn erfelijke informatie verloren heeft. Het kan niet interageren met het menselijk genoom omdat het in het cytoplasma blijft, buiten de kern, wat de mogelijkheid van permanente integratie beperkt. Het blijft in het cytoplasma tot het geëlimineerd wordt door de normale cellulaire processen. De duur van de expressie van het getransfereerd gen is bijgevolg beperkt in de tijd.

Doordat het zo verzwakt is wordt MVA algemeen geclassificeerd als een organisme behorend tot "biologisch risiconiveau 1". Deze classificatie blijft ongewijzigd na genetische modificatie.

Voor klinische proeven wordt het INX102-0557 HBV MVA onderzoeksproduct aangeleverd als een oplossing in een gesloten ampul. Het INX102-0557 pDNA onderzoeksproduct wordt aangeleverd als een oplossing in een flesje voor éénmalig gebruik, waaruit het rechtstreeks met een injectiespuit kan opgetrokken worden.

De oplossing wordt toegediend door getraind personeel in een kamer binnen het klinische testcentrum die voldoet aan de bioveiligheidsinperkingsniveau 1 voorwaarden. De injectieplaats wordt eerst ontsmet. Na de injectie wordt de injectieplaats afgedekt met een groot transparant wondverband om blootstelling tengevolge van mogelijke "lekkage" uit de injectieplaats te voorkomen. De proefpersoon blijft gedurende 4 uur na de injectie in het ziekenhuis voor medische opvolging. Alvorens het testcentrum te verlaten wordt het verband vervangen door een nieuw verband. Verder vrijstelling van het testproduct wordt niet verwacht. Tussen de behandelingen mogen de proefpersonen hun gewone activiteiten verderzetten. Er worden geen speciale, bioveiligheid-gerelateerde instructies meegegeven.

Naast de proefpersoon blijft mogelijke blootstelling aan het proefproduct beperkt tot het behandelend medisch personeel: contact met de oplossing uit een ampul, injectiespuit of verband, of accidenteel door een verwonding te wijten aan een gebroken flesje, geopende ampul of injectienaald. De kans op een dergelijke besmetting is uiterst beperkt aangezien het medisch personeel beschermde kledij zal dragen, zoals wegwerphandschoenen en labo's. Al het

gebruikte materiaal zal vernietigd worden als gevaarlijk medisch afval in overeenstemming met de geldende procedures ter plaatse. Ingeval van morsen zijn er efficiënte standaard ontsmettingsmethoden en sterilisatieprocedures. Het medisch personeel zal hiertoe de nodige instructies krijgen. Zelfs in geval blootstelling optreedt wordt geen significante reactie verwacht. Alhoewel het effect van het polyepitooop nog bewezen dient te worden zijn er momenteel geen negatieve indicaties verbonden aan een blootstelling. Blootstelling aan het MVA op zich zou kunnen leiden tot een immunreactie, die op zichzelf niet onwenselijk is. De dosis en de frequentie zullen hoogstwaarschijnlijk te laag zijn om enig gevolg te hebben. Verder is er een uitgebreide ervaring beschikbaar met betrekking tot mogelijk neveneffecten.

Blootstelling van andere personen, zelfs familieleden, is hoogst onwaarschijnlijk.

Vaccinia virus wordt traditioneel beschouwd als een laboratoriumvirus zonder natuurlijk reservoir. Aangezien MVA niet kan repliceren in menselijke cellen en in de meeste zoogdiercellen is het risico op verspreiding en overdracht beperkt. Een biodistributiestudie met INX102-0557 HBV MVA bij muizen heeft bevestigd dat MVA niet persistent aanwezig blijft. Plasmide DNA is onderhevig aan enzymatische afbraak in het bloed en wordt bijgevolg snel gemetaboliseerd en uit de circulatie verwijderd. Er werd aangetoond dat het plasmide niet geïntegreerd wordt in het genomisch DNA.

Er is geen actief verspreidingsmechanisme en verspreiding zou vooral beperkt blijven tot de behandelingskamer. Gentransfer naar andere organismen in het leefmilieu wordt niet verwacht. Het HBV polyepitooop werd in het MVA ingebracht via homologe recombinatie. Het is onwaarschijnlijk dat een dergelijk transfermechanisme in de natuur zou kunnen optreden vermits daar geen relevante vacciniastammen voorkomen.

Plasmiden op zich zijn niet in staat genetisch materiaal door te geven daar ze geïntegreerd dienen te zijn binnen bacteriële transfermechanismen alvorens ze kunnen uitgewisseld en doorgegeven worden. In laboratoriumcondities zijn belangrijke inspanningen nodig om bacteriën te transformeren met niet-conjugatieve en/of niet-mobiliseerbare plasmiden. Een toevallige opname van een plasmide door bacteriën binnen een persoon of in het leefmilieu is bijgevolg erg onwaarschijnlijk. Bovendien worden voorzorgsmaatregelen genomen om de blootstelling van plasmide DNA aan bacteriën ter hoogte van de injectieplaats te beperken: de injectieplaats wordt ontsmet vóór de injectie en het afval wordt verzameld en geïnactiveerd. In het onwaarschijnlijk geval van opname zouden de bacteriën tolerantie tegen kanamycine kunnen ontwikkelen als een bijkomend kenmerk. Dit zou de reeds wijd verspreide aanwezigheid van dit antibiotica resistentiegen in de natuur niet noemenswaardig verhogen. Het HBV polyepitooop gen is geen selecteerbaar kenmerk onder natuurlijke condities.

Het HBV polyepitooop is een uniek, synthetisch gen dat kan gedetecteerd worden via de "polymerase chain reaction" (PCR) techniek. Gezien de hoogst onwaarschijnlijke kans dat vrijstelling zou optreden, behalve in heel beperkte mate ter hoogte van de injectieplaats, wordt echter geen routinematige opsporing en opvolging van het GMO voorzien.

Deze notificatie betreft een doelbewuste vrijstelling van GGM voor experimentele doeleinden. Daarom is als algemene regel het gebruik van dit materiaal voor enig ander doel verboden.

## 7. VERANTWOORDELIJKHEDEN VAN DE AANVRAGER

*De toelating die de bevoegde minister kan geven aan de aanvrager bepaalt dat de aanvrager de volledige burgerlijke aansprakelijkheid op zich neemt voor wat betreft de schade die aangebracht zou worden aan de gezondheid van mens en dier of aan het leefmilieu als gevolg van de proefnemingen.*

## 8. INSPECTIE DOOR DE AUTORITEITEN

*Inspecteurs zijn belast met de controle van de proeven op de naleving van de voorwaarden gespecificeerd in de toelating en om eventuele inbreuken op de toelating vast te stellen. In het geval er een overtreding of bedrog wordt vastgesteld, zullen specifieke sancties worden opgelegd.*

## 9. ACTIVITEITENVERSLAG

*Op het einde van de proeven dient een door de kennisgever opgesteld activiteitenverslag overgemaakt te worden aan de bevoegde autoriteit. Dit activiteitenverslag omvat ten minste de volgende gegevens:*

- *de plaats en periode van de introductie,*
- *de precieze aard van de daadwerkelijk gebruikte GGOs,*
- *de doelstelling(en) van de proef,*
- *de maatregelen die werden genomen om een onbedoelde verspreiding van transgeen materiaal te voorkomen,*
- *indien van toepassing, de maatregelen die werden genomen om de patiënt (of het dier) te beschermen bij het toedienen van het experimenteel medisch product dat het GGO bevat,*
- *indien van toepassing, de maatregelen die werden genomen om de verwanten van de behandelde patiënten te beschermen,*
- *de maatregelen die werden genomen om de werknemers te beschermen die het GGO-bevattend materiaal moesten hanteren,*
- *de gebruikte methode ter vernietiging van ongebruikt of besmet materiaal,*
- *de bij de proef bekomen resultaten,*
- *een overzicht van de bewaking van het verspreiden van het GGO-therapeuticum buiten de patiënt of het dier,*
- *een overzicht van de bewaking van het GGO of het recombinant DNA in het leefmilieu.*



## **10. CONTACT**

*Indien u opmerkingen heeft over het publieke dossier of over onze activiteiten of wanneer u  
bijkomende informatie wenst over deze vrijzetting, kunt u ons contacteren op het volgende adres:*

### **Kennisgever:**

Naam van het bedrijf: GENimmune NV  
Adres: Technologiepark 6, 9052 Zwijnaarde, Belgium  
Telefoon: +32 (0)9 329 13 29  
Fax: +32 (0)9 329 17 68  
Email: info@genimmune.be  
Web site: www.genimmune.be

### **Contactpersoon:**

Naam van de  
contactpersoon: Hilde De Winter, MD  
Adres: Technologiepark 6, 9052 Zwijnaarde, Belgium  
Telefoon: +32 (0)9 329 17 38  
Fax: +32 (0)9 329 17 68  
Email: Hilde.de.Winter@genimmune.be

*U kunt ook de samenvatting van de kennisgeving (SNIF) raadplegen op de website van het Joint  
Research Centre van de Europese Commissie (<http://GGOinfo.jrc.it/>). Opmerkingen kunt u doen  
toekomen aan de Commissie via deze website.*