



ActoGeniX N.V.

Technologiepark 4 - 9052 Zwijnaarde – Belgium

GMO Deliberate Release Notification

INFORMATIE VOOR HET PUBLIEK¹

**Fase 1b en 2a klinische studies met een hIL-10-producerende
Lactococcus lactis (L. LACTIS).**

**Europees notificatie nummer
B/BE/07/BVW1**

Edition No.:	01
Issue (Release)/Report Date:	2007-10-19
Replaces Previous Edition No. (Date):	N/A
Document No.:	AG011-GMO-BE-IP-NL-00001-200710
Prepared by:	Dr. Decebal Bora Director Regulatory Affairs ActoGenix N.V.

¹ *This document is in line with the “Guidelines To Compile The Public Dossier - Deliberate releases of genetically modified micro-organisms for experimental purposes (part B)” of the Biosafety Advisory Council (version of 26 februari 2003). Mandatory text is presented in italics*

INHOUDSTABEL:

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

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 Bioveiligheidsraad, die is samengesteld uit verschillende wetenschappelijke comités die onafhankelijke experts van Belgische universiteiten en overheidsinstellingen groepeeren.

Om de vereiste toelating van de bevoegde minister te verkrijgen heeft het bedrijf ActoGeniX NV een aanvraagdossier ingediend bij de bevoegde overheid. Op basis van het advies van de Bioveiligheidsraad kan de bevoegde minister toestemming verlenen aan het bedrijf ActoGeniX NV om de proefnemingen met transgene *Lactococcus lactis* uit te voeren zoals beschreven in de aanvraag **B/BE/07/BVW1**.

De vrijzetting is voorzien in Vlaanderen / Wallonië / Brussel als gevolg van klinische studies uitgevoerd aan UZ Gasthuisberg, Leuven and Imelda vzw, Bonheiden. Naar verwachting starten de proeven in juli 2008 en worden ze afgerond tegen juli 2011.

2. Beschrijving van het genetisch gewijzigd organisme (GGO).

De bacteriële stam *Lactococcus lactis* MG1363 werd genetisch gewijzigd om het therapeutisch eiwit humaan Interleukine-10 (hIL-10) vrij te stellen. Dit eiwit verlicht de symptomen (pijn, bloederige diarree) van inflammatoire (= ontstekingsachtige) darmziekten bij patiënten.

Lactococcus lactis (*L. lactis*) is een van de belangrijkste micro-organismen in de zuivelindustrie. De bacterie is van cruciaal belang in de productie van karnemelk, yoghurt en kaas. *L. lactis* werd voor het eerst geïsoleerd uit verse melk, meteen ook een van de weinige niches (plaatsen in het ecosysteem) die *L. lactis* bacteriën kunnen onderhouden. De bacterie kan ook voorkomen in of op mensen, dieren en planten, in bodemstalen en in afvoerwater, maar kan in deze omgevingen niet vermenigvuldigen. *L. lactis* is niet ziekteverwekkend en maakt ook geen overlevingsstructuren aan zoals sporen. Inbouw van het *hIL-10* gen heeft hier geen effect op.

De *L. lactis* MG1363 stam kan niet langer groeien of overleven in melk of enige andere natuurlijke niche. Hiertoe werden de genen verwijderd die nodig zijn om essentiële voedingsstoffen uit melk te gebruiken, waardoor MG1363 enkel nog kan aangroeien in kunstmatig aangerijkte voedingsbodems.

De genetisch gewijzigde stam MG1363 is zelfs nog meer gelimiteerd: de stam bevat het *hIL-10* gen, stabiel geïntegreerd in het chromosoom, waar het een gen vervangt dat essentieel is in de productie van thymidine (een bouwsteen van DNA). Zonder dit gen is het genetisch gewijzigde organisme (GGO) volledig afhankelijk van thymidine-toevoeging aan het groeimedium. Bovendien is de aanwezigheid van thymidine essentieel voor het overleven van de bacterie.

De ingebouwde genetische structuur bevat ook een sequentie die de bacterie in staat stelt om (inwendig) aangemaakt hIL-10 eiwit naar buiten toe vrij te stellen. Bijgevolg zullen de bacteriën hIL-10 produceren en vrijstellen in de ingewanden van de patiënt, wat een duidelijk gunstige uitwerking heeft.

De bacteriën verlaten binnen een aantal dagen opnieuw het lichaam via de ontlasting. Het aantal bacteriën dat de doortocht door het lichaam overleeft is zeer beperkt en ook deze sterven kort daarna af.

3. Aard en doelstelling van de geplande studie:

Er zijn twee verschillende studies gepland:

- De eerste geplande studie is een zogenaamde "Fase 1b gerandomiseerde, dubbel blinde studie in patiënten met matig actieve ulceratieve colitis, verspreid over verschillende studiecentra, om de veiligheid, de tolereerbaarheid en het therapeutisch effect van AG011 te bepalen tegenover een placebo controlegroep.
- De tweede geplande studie is een zogenaamde "Fase 2a gerandomiseerde, dubbel blinde studie in patiënten met matig actieve ulceratieve colitis, verspreid over verschillende studiecentra, om de veiligheid, de tolereerbaarheid en het farmacologisch en therapeutisch effect van AG011 te bepalen tegenover een placebo controlegroep".

AG011 is de naam van het geneesmiddel. Er zijn twee verschillende toedieningswijzen voorzien; capsules voor orale inname en een lavement (darmspoeling) voor toediening via de anus.

In de Fase 1b studie wordt dagelijks een vaste dosis of placebo via de anus toegediend gedurende vier weken. In de tweede studie wordt dagelijks zowel orale toediening als toediening via de anus voorzien, gedurende acht weken. Patiënten zullen één van de drie vooropgestelde dosissen toegediend krijgen, of placebo.

Beide studies zijn erop gericht de veiligheid, de tolereerbaarheid en het therapeutisch effect van het geneesmiddel te bepalen. Er worden steeds 20 patiënten gerekruteerd per behandelingsgroep. Dit betekent dat er in totaal, over de twee studies gespreid, 120 patiënten zullen deelnemen.

De patiënten worden geselecteerd op basis van uiterst strikte eisen. Dit is meteen ook de reden waarom verspreiding over meerdere studiecentra, uit verschillende landen, een noodzaak is. Beide studies zijn zogenaamde poliklinische/ambulante studies, wat betekent dat patiënten gedurende de studie niet in het klinisch studiecentrum (KSC) verblijven. De patiënten ontvangen een behandelingspakket met het geneesmiddel en alle benodigdheden en instructies, waarmee ze een door het studieprotocol bepaalde periode toekomen. Op regelmatige tijdstippen moet de patiënt teruggaan naar het KSC voor een consultatie.

Een vorige studie toonde reeds aan dat het geneesmiddel veilig is en niet overleeft buiten het menselijk lichaam.

4. Onderzoeks- en ontwikkelingskader.

De ziekte van Crohn (Crohn's disease, CD) en ulceratieve colitis (UC) zijn de meest voorkomende vormen van inflammatoire darmziekten, waarvan de oorzaak niet gekend is.

CD kan elk deel van het maagdarm kanaal aantasten, van mond tot anus. De belangrijkste maagdarm klachten bij CD zijn pijn, diarree (die bloederig kan zijn) of constipatie, en gewichtsverlies.

UC is een aandoening van de dikke darm, voornamelijk gekenmerkt door zweren in het colon (dikke darm). Het belangrijkste symptoom van actieve UC is het geleidelijk opkomen van bloederige diarree.

UC kan genezen worden door chirurgische verwijdering van het volledige colon. Er bestaat geen medicamenteuze of chirurgische geneeswijze voor CD. Er bestaan een aantal medicamenteuze behandelingen die gericht zijn op het verkrijgen en behouden van klinische remissie (tijdelijke vermindering of verdwijning van ziekteverschijnselen, waardoor de patiënt tijdelijk genezen is).

Toediening van hIL-10 is één van die behandelingen. De belangrijkste biologische functie van IL-10 is het beperken en beëindigen van ontstekingsreacties en het controleren van de uitgroei van verschillende immuuncellen. Men vermoedt dat IL-10 een sleutelrol speelt in het controleren van immuniteitsreacties. Recombinant hIL-10 is reeds ontwikkeld en getest in klinische studies gericht op verschillende indicaties, waaronder reumatoïde artritis, inflammatoire darmziekten, psoriasis, orgaantransplantatie en chronische hepatitis C.

Men heeft vastgesteld dat injectie van hoge dosissen hIL-10 neveneffecten veroorzaakt. Deze betreffen voornamelijk daling van het aantal rode bloedcellen (anemie), vermindering van het aantal bloedplaatjes (thrombocytopenie), hoofdpijn en/of koorts.

ActoGeniX ontwikkelt momenteel het TopAct™ toedieningssysteem, gebaseerd op een levende, niet-ziekteverwekkende *L. lactis* stam voor de lokale vrijstelling van geneesmiddelen in de ingewanden. Het TopAct™ toedieningssysteem vermindert de behoefte aan hoge dosissen door plaatselijke toediening in het maagdarm kanaal. Enkele dagen na orale inname verlaten de

micro-organismen de ingewanden. De studies die hier beschreven staan gebruiken een genetisch gewijzigde *L. lactis* stam die recombinant hIL-10 vrijstelt.

Verder bevatten de bacteriën het gen voor hIL-10, stabiel geïntegreerd in het chromosoom, waar het een gen vervangt dat essentieel is in de productie van thymidine. Hierdoor werd de gewijzigde stam afhankelijk van thymidine-toevoeging aan de cultuur. Zonder thymidine, sterft de bacterie.

In verschillende muismodellen voor colitis werd reeds aangetoond dat de therapeutische dosis van IL-10 verminderd kan worden via plaatselijke vrijstelling door bacteriën die genetisch gewijzigd werden om het eiwit vrij te stellen. Vrijstelling van IL-10 in de ingewanden door IL-10-producerende *L. lactis* verminderde duidelijk colitis in muizen. Bovendien werd de IL-10-vrijstelling door *L. lactis* ook vergeleken met bestaande ontstekingsremmende behandelingen: vergelijking met vijf dagelijkse injecties van onder andere recombinant IL-10 toonde duidelijk aan dat vrijstelling van IL-10 door *L. lactis* veel lagere dosissen inhield.

Een eerdere Fase 1 klinische studie met hIL-10-producerende *L. lactis* in CD patiënten in Nederland (Officiële GGO Ref. BGG0: 02/01; Ref. COGEM: CGM020823-02) toonde reeds goede tolereerbaarheid en veiligheid aan. Bovendien werden in de studie ook aanwijzingen voor een therapeutisch effect gevonden. Deze nieuwe strategie vermijdt neveneffecten en is bovendien biologisch ingeperkt. Daarom is het een uitstekende kandidaat voor langdurige behandeling van aanhoudende darmaandoeningen.

De geplande Fase 1b en 2a klinische studies in UC zijn een voortzetting van het ontwikkelingsplan. Gebaseerd op de resultaten van de voorafgaande Fase 1 klinische studie, omvat de opzet deze maal een *L. lactis* stam die meer hIL-10 produceert dan de stam uit de eerste studie, en een combinatie van twee verschillende toedieningswijzen (capsules en lavement).

Gebaseerd op het TopAct™ toedieningssysteem voor lokale vrijstelling van geneesmiddelen in de ingewanden, ontwikkelt ActoGeniX op dit moment een nieuw soort biologische geneesmiddelen met verhoogd therapeutisch effect en minder neveneffecten. TopAct™ kan toegepast worden in een brede waaier van ziektes. In de voorbije jaren heeft het oorspronkelijke onderzoeksteam van ActoGeniX bewijs aangeleverd voor de mogelijke toepasbaarheid van verschillende TopAct™-gebaseerde producten. Positieve resultaten voor een therapeutische werking werden aangetoond in diermodellen voor inflammatoire darmziektes, slijmvliesontsteking in de mond of darm (mucositis) en voedselallergie.

5. Mogelijke voordelen van de geplande vrijstelling

De geplande vrijstelling is een verdere stap in de ontwikkeling van een nieuwe strategie voor de behandeling van inflammatoire darmaandoeningen. De huidige geneesmiddelen die gebruikt worden om de ziekte te controleren vertonen vaak ernstige neveneffecten bij langdurig gebruik.

Dit is ook zo voor hIL-10 wanneer het toegediend wordt via injecties. Het vooropgestelde TopAct™ toedieningssysteem vermindert deze neveneffecten. Bovendien wordt het geneesmiddel enkel lokaal vrijgesteld en heeft het slechts een plaatselijke uitwerking, precies daar waar het nodig is. Hierdoor zijn de therapeutische dosissen veel lager.

6. Inschatting van de mogelijke risico's voor de volksgezondheid en het milieu

L. lactis komt algemeen voor in voedingsmiddelen en wordt er ook vaak aan toegevoegd. *L. lactis* is een van meest cruciale micro-organismen in de zuivelindustrie. Het merendeel van de industrieel benutte bacteriën kan niet overleven buiten de zuivelomgeving. Ze worden niet beschouwd als een gevaarlijk organisme. Ze produceren geen overlevingsstructuren zoals sporen.

L. lactis kan in een brede waaier aan omgevingen gevonden worden, maar deze worden niet beschouwd als ecologische niches. Ondanks wijd verspreid gebruik en vrijstelling in de omgeving, wordt *L. lactis* niet beschouwd als een indringende of versturende soort. Groei kan enkel plaatsvinden in een beperkt aantal omgevingen met gunstige voedingsvoorwaarden, waaronder melk. *L. lactis* vermenigvuldigt niet in mensen en dieren en is niet koloniserend.

L. lactis stam MG1363 groeit enkel in kunstmatig verrijkte culturen, aangezien de genen die betrokken zijn bij het gebruiken van essentiële voedingsstoffen verwijderd zijn. MG1363 produceert geen antibiotica maar is wel gevoelig aan een brede waaier hiervan.

De hIL-10-producerende stam kan ook niet langer zelf thymidine aanmaken en sterft indien geen thymidine voorradig is. Het is hoogst onwaarschijnlijk dat de genetische modificatie kan doorgegeven worden aan andere micro-organismen.

Het geneesmiddel (dat de bacterie bevat) is beschikbaar in poedervorm tijdens de klinische studies en wordt ofwel aangeboden als capsules in een blister (strip) ofwel, in geval van het lavement, opgelost in een vloeistof. Indien de verpakking beschadigd zou raken, wordt het poeder snel afgebroken na contact met vocht en warmte. Het micro-organisme is gevoelig aan temperaturen hoger dan 40 °C, lage pH (zuurtegraad), contact met lucht, blootstelling aan zonlicht of UV (ultraviolet) licht, zeep, bleekwater (javel), antibiotica en hooggeconcentreerde zoutoplossingen. De vrijgestelde hoeveelheid bij morsen is steeds gelimiteerd (één dosis). Het

betreffende gebied kan ontsmet worden met een standaard detergent (zeep) of bleekwater (javel).

Bij inname is er geen direct contact met het geneesmiddel in geval van de capsules. Bij het lavement is er kortstondig contact mogelijk met het poeder en de oplossing bij samenstelling van het lavement en bij opening van de verpakking voor onmiddellijke toediening. Behalve het samenstellen van het lavement, zijn er geen bijkomende handelingen vereist, aangezien het pakket dat elke patiënt zal ontvangen dosissen bevat die reeds klaargemaakt zijn voor toediening door de patiënt zelf. De patiënt ontvangt enkel het nodige materiaal voor een behandelingsperiode van één week. Tezelfdertijd zullen instructies voorzien en uitgelegd worden om te verzekeren dat het protocol nageleefd wordt. Hoewel UC patiënten vertrouwd zijn met toediening van een lavement, worden hen toch bijkomende instructies gegeven om het lavement minstens twee uur op te houden.

In een ambulante studie gebeurt de toediening van het onderzochte product buiten het ziekenhuis (hoogst waarschijnlijk thuis). Eenmaal toegediend, volgen de bacteriën de weg van de ontlasting. Toediening en ontlasting zijn niet noodzakelijk gelimiteerd tot het huis van de patiënt. Bijgevolg wordt het hele nationale grondgebied beschouwd als mogelijke plaats van vrijstelling. Er wordt verwacht dat het vrijstellen van levende bacteriën enkele dagen na de laatste behandeling stopt. Patiënten zullen aangeraden worden het land niet te verlaten tijdens de klinische studies omwille van de beperkingen die het ontwerp van de klinische studies oplegt. Er is geen specifieke behandeling voorzien van de omgeving waarbinnen vrijstelling gebeurt, wat gerechtvaardigd wordt door de strikte biologische inperking en het ontbreken van enig belangwekkend effect op het leefmilieu. Bovendien heeft het grote publiek normaalgezien geen toegang tot de rioleringen. Indien nodig volstaat een standaard behandeling met antibiotica om de bacterie uit te schakelen.

Eenmaal per week komen de patiënten naar het ziekenhuis, niet alleen voor onderzoek maar ook om alle gebruikte materialen terug te geven (leeg of ongebruikt) en om een nieuw behandelingspakket te krijgen. In het KSC worden de gebruikelijke voorzorgen genomen. Standaard hygiënische maatregelen voor ziekenhuispersoneel dat in contact komt met lichaamsvloeistoffen (en stoelgang in het bijzonder) volstaan. Wegwerphandschoenen en –doekjes moeten gebruikt worden bij het hanteren van apparaten voor analyses en biopsieën (staalnames). Afvalmateriaal moet behandeld worden als risicohoudend medisch afval.

Het is evident dat de patiënt in direct contact zal komen met de bacteriën. Andere familieleden zouden kunnen blootgesteld worden bij het hanteren van lege verpakkingen (hoewel deze verzameld en opgeborgen worden in daartoe voorziene containers) en eventueel materiaal met vrijgestelde bacteriën. Standaard hygiënische maatregelen volstaan om beduidend contact te verminderen of te vermijden.

Het kan niet helemaal uitgesloten worden dat waardevolle biotopen, beschermde gebieden of drinkwatervoorraden blootgesteld worden. Daarentegen, blootstelling aan *L. lactis* vindt ook vandaag de dag reeds plaats. De gewijzigde stam heeft geen bijkomende eigenschappen die blootstelling meer waarschijnlijk maken. In tegendeel, aangezien deze afhankelijk is van de

aanwezigheid van thymidine om te overleven, zal blootstelling nog verder beperkt zijn in tijd. Hoewel kan besloten worden dat de vrijstellingsomgeving vergelijkbaar is met diegene die normaal wordt ingeschat voor *L. lactis*, zorgen de wijzigingen eigen aan de GGO ervoor dat de stam niet meer kan overleven in deze habitat.

hIL-10 productie veroorzaakt enkel een effect op menselijke cellen die de aangepaste receptoren bevatten. Deze receptoren zijn uiterst specifiek voor de mens. De meeste andere IL-10-gerichte receptoren bij zoogdieren vertonen weinig tot geen reactie met het hIL-10, behalve enkele receptoren bij apen en muizen.

Het hIL-10 gen in de GGO is een uniek, kunstmatig gen dat onderscheiden kan worden van het natuurlijke hIL-10 gen. Het kan gedetecteerd worden met behulp van een techniek genaamd polymerase-kettingreactie.

Deze aanmelding betreft de bewuste vrijstelling van een GGO voor experimentele doeleinden. Bijgevolg is elk 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: ActoGeniX NV
Adres: Technologiepark 4, 9052 Zwijnaarde, België
Telefoon: +32 (0)9 261 06 00
Fax: +32 (0)9 261 06 19
Email: info@actogenix.com
Web site: <http://www.actogenix.com>

Contactpersoon:

Naam van de contactpersoon: dr; Bernard Coulie
Adres: Technologiepark 4, 9052 Zwijnaarde, België
Telefoon: +32 (0)9 261 06 00
Fax: +32 (0)9 261 06 19
Email: Bernard.Coulie@ActoGeniX.com

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.