



Aan de minister van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke  
Ordening en Milieubeheer  
Mevrouw dr. J.M. Cramer  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 21 augustus 2008  
**KENMERK** CGM/080821-01  
**ONDERWERP** Advies fase 2a studie met *L. lactis* AG011 tegen matige ulceratieve colitis

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag met dossiernummer IM 08-004 over de vergunningaanvraag van het Leiden Universitair Medisch Centrum (LUMC) met als titel 'A phase 2a randomized, placebo-controlled, double-blind, multi-centre dose escalation study, to evaluate the safety, tolerability, pharmacodynamics and efficacy of AG011 in subjects with moderately active ulcerative colitis' deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een fase 2a klinische studie met de bacterie *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) AG011. Deze recombinante bacterie brengt het *humaan interleukine-10* (*hIL-10*) gen tot expressie. HIL-10 wordt getest als ontstekingsremmer bij patiënten met een matige vorm van ulceratieve colitis (UC). UC is een (chronische) ontsteking van de dikke darm en wordt gekenmerkt door buikpijn, diarree of juist constipatie en gewichtsverlies.

AG011 is de naam van een recombinante *L. lactis* stam in gevriesdroogde (poeder) vorm die geschikt is voor orale en/of rectale toediening. De ouderstam *L. lactis* is een niet-pathogene bacterie die ook wordt gebruikt in de zuivelindustrie. AG011 bevat het hIL-10 gen op de plaats van een gen coderend voor thymine productie. Deze stof is essentieel voor DNA replicatie en komt niet vrij in de natuur voor waardoor de stam afhankelijk is van toevoeging van thymine/thymidine om zich te vermenigvuldigen. Bovendien is de stam niet meer in staat te overleven in haar natuurlijke omgeving zonder specifieke toevoegingen. De bacteriestam is hierdoor sterk biologisch ingeperkt.

Patiënten die deelnemen aan de studie worden niet gehospitaliseerd maar dienen het middel zelf thuis toe. Na toediening zal de bacterie gedurende korte tijd met de feces worden uitgescheiden en in het milieu terecht komen. Elke week worden de patiënten in het ziekenhuis gecontroleerd en worden monsters genomen om uitscheiding van de bacterie te monitoren.

Gezien de niet-pathogene eigenschappen van *L. lactis* AG011 en de biologische inperking ervan, is de COGEM van mening dat de kans verwaarloosbaar klein is dat het organisme zich kan handhaven in het milieu. De COGEM is voor deze klinische studie daarom van mening dat risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

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

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman

Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs  
Dr. I. van der Leij

## **Fase 2a klinische studie met *L. lactis* stam AG011 tegen matige ulceratieve colitis**

### **COGEM advies CGM/080821-01**

#### **Inleiding**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een fase 2a klinische studie waarbij patiënten worden behandeld met een recombinante *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) stam die het humaan interleukine-10 (hIL-10) tot expressie brengt. Dit zou als ontstekingsremmer kunnen dienen tegen een matige vorm van ulceratieve colitis.

Ulcerative colitis (UC) is samen met de ziekte van Crohn (CD) de meest voorkomende vorm van Inflammatory bowel disease (IBD). UC is een ziekte van de dikke darm en wordt gekenmerkt door (open) zweren en ontstekingen. De meest voorkomende symptomen van patiënten met UC zijn buikpijn, diarree of juist constipatie en gewichtsverlies. UC kan worden behandeld door (een deel van) de darm te verwijderen en met behulp van verschillende medicijnen die erop gericht zijn ontstekingsreacties in de darm te beheersen en tegen te gaan.

#### **Achtergrond onderzoek**

De biologische functie van hIL-10 is voornamelijk het beperken en beëindigen van ontstekingsreacties en het reguleren van diverse immuuncellen. Recombinant hIL-10 is geproduceerd en getest in klinische trials voor diverse aandoeningen zoals reumatoïde arthritis, psoriasis, orgaantransplantaties en chronische hepatitis C.

Hoewel experimentele studies hebben aangetoond dat een plaatselijke behandeling met hIL-10 zeer effectief kan zijn, heeft dit middel bij toediening in de bloedbaan minder effect en kan bovendien bijwerkingen veroorzaken zoals bloedarmoede, tekort aan bloedplaatjes, hoofdpijn en koorts. Een alternatief voor het toedienen van hoge doses in de bloedbaan bij IBD patiënten is een lokale afgifte van medicijnen in het darmstelsel.

#### **Opzet van het onderzoek**

De voorliggende studie betreft een fase 2a klinische studie waarbij een levende niet-pathogene *L. lactis* AG011 stam wordt toegediend voor lokale afgifte van hIL-10 in het darmstelsel. De micro-organismen komen een aantal dagen na orale toediening in de darmen terecht en brengen daar hIL-10 tot expressie. De patiënten worden niet gehospitaliseerd en krijgen een voorraad van het middel mee voor maximaal één week. Thuis dienen zij het middel zelf toe (orale capsules 's morgens en 's avonds en een rectaal lavement in de avond). *L. lactis* zal na een wisseling van de darminhoud uit de darm verdwenen zijn (4). De aanvrager geeft aan dat dit gemiddeld drie dagen duurt. Zowel tijdens als enige tijd na de studie vindt monitoring plaats van uitscheiding van *L. lactis* AG011 om dit te bevestigen. Na

toediening zal de bacterie gedurende korte tijd met de feces worden uitgescheiden en in het riool terecht komen. De ontlasting wordt niet gedesinfecteerd.

De patiënten komen gedurende de studie, die 28 dagen duurt, wekelijks terug bij het LUMC voor controle en het nemen van monsters (bloed, urine, feces en darmbiopten). Tijdens deze bezoeken retourneren zij al het lege en ongebruikte materiaal van de voorgaande week en krijgen zij een nieuwe voorraad mee voor de volgende periode. In geval van onzekerheid of aanvullende vragen kunnen zij daarnaast 24 uur per dag contact opnemen met het studiecentrum. Vier weken later wordt nogmaals een onderzoek gedaan waarbij wederom ontlastingsmonsters verzameld worden. Ongeveer 40 weken na de laatste inname van de medicatie zal een telefonisch evaluatiegesprek plaatsvinden.

### **Eerdere COGEM adviezen**

De COGEM heeft in 2002 geadviseerd over een fase I studie met een recombinante *L. lactis* stam die *hIL-10* tot expressie brengt bij patiënten met de ziekte van Crohn (1). Gedurende de fase I studie werden de patiënten tijdens de behandeling gehospitaliseerd, om mogelijke bijwerkingen van het toegediende preparaat te controleren en uitscheiding te monitoren. In dit advies stelt de COGEM dat de gebruikte *L. lactis* stam voldoende biologisch is ingeperkt en geen risico vormt voor mens en milieu onder een aantal voorwaarden. Omdat mogelijk zwak pathogene eigenschappen van de stam niet konden worden uitgesloten achtte de COGEM het destijds raadzaam om feces van patiënten op te vangen en te desinfecteren. Daarnaast achtte de COGEM het wenselijk te monitoren op uitscheiding van *L. lactis* om te bevestigen dat uitscheiding van de bacterie van korte duur is.

Uit deze fase I studie is gebleken dat het preparaat veilig en effectief toegediend kan worden en dat uitscheiding van de bacterie tijdelijk is. De biologische inperking is effectief gebleken (6).

### **Kenmerken van *L. lactis* AG011**

Het uitgangsgenotype *L. lactis* komt voor in de darm, bijvoorbeeld na het consumeren van zuivelproducten die de bacterie bevatten. *L. lactis* heeft de GRAS (generally regarded as safe) status voor voedselproductie en wordt gebruikt bij de productie van zuivelproducten zoals karnemelk, yoghurt en kaas (2). Het organisme bezit geen pathogene eigenschappen en is niet in staat de darm te koloniseren.

Voor de productie van AG011 is een verzwakte stam van het uitgangsgenotype *L. lactis* gebruikt. Ouderstam *L. lactis* MG1363 is door het verwijderen van een deel van de genetische code niet meer in staat te overleven in haar natuurlijke omgeving zonder specifieke toevoegingen (3-7). Dit betekent dat de bacteriestam niet kan overleven buiten laboratoriumomstandigheden.

*L. lactis* AG011 is tot stand gekomen door in ouderstam *L. lactis* MG1363 (3) het gen voor thymine productie te vervangen door het *hIL-10* gen. Thymine is essentieel voor DNA replicatie en komt niet vrij in de natuur voor. Hierdoor is *L. lactis* AG011 afhankelijk van toevoeging van thymine/thymidine om zich te vermenigvuldigen. De afwezigheid van een

externe bron van thymine/thymidine resulteert niet alleen in een groeistilstand, maar initieert bovendien een versnelde dood van het organisme, ook wel bekend als *thymineless death* (8). Door de thymine/thymidine afhankelijkheid en het ontbreken van alle plasmiden is *L. lactis* AG011 sterk biologisch ingeperkt.

De recombinante *L. lactis* AG011 stam is in gevriesdroogde (poeder) vorm geschikt voor orale en/of rectale toediening. *L. lactis* AG011 zal volgens de aanvrager in poedervorm zeer snel degraderen in het milieu door gevoeligheid voor hoge temperaturen (boven 40 graden °C), lage pH, direct zonlicht, UV, zeep, bleek en hoge zoutconcentraties. In geval van morsen kan volstaan worden met normale hygiënische procedures om de bacteriën af te doden. Onder normale hygiënische omstandigheden wordt verstaan decontaminatie met standaard detergentia (zeep) of bleek.

### **Overweging en advies**

Bij de risicobeoordeling van genetisch gemodificeerde organismen (ggo's), zoals die door de COGEM wordt uitgevoerd, worden de effecten beoordeeld die het ggo kan hebben op mens en milieu. Hierbij wordt zowel gekeken naar mogelijke directe als indirecte schadelijke effecten van het ggo.

*L. lactis* AG011 is een recombinante bacteriestam die na orale en/of rectale toediening hIL-10 tot expressie brengt in het darmstelsel van patiënten. Het uitgangsgenorganisme *L. lactis* is niet-pathogeen en kan de darm niet koloniseren (4). De COGEM is, mede op basis van de resultaten van een fase I studie met dit organisme, van mening dat er geen redenen zijn om aan te nemen dat deze eigenschap in de *L. lactis* stam AG011 is veranderd. Uit deze fase I studie is gebleken dat het preparaat veilig en effectief toegediend kan worden en dat uitscheiding van de bacterie tijdelijk is. De biologische inperking is effectief gebleken (6).

Door het verwijderen van de plasmiden kan AG011 niet overleven in haar natuurlijke omgeving zonder specifieke toevoegingen. Daarnaast is de stam niet in staat zich te vermenigvuldigen door de vervanging van het thymine coderende gen voor het hIL-10 gen. *L. lactis* AG011 is hierdoor afhankelijk geworden van externe toevoeging van thymine/thymidine. Dit betekent dat zowel de ingenomen AG011 via capsules evenals de ingebrachte AG011 via een klysma een beperkte levensduur heeft en binnen enkele dagen afgebroken wordt.

De COGEM is van mening dat *L. lactis* AG011 voldoende biologisch is ingeperkt door het verwijderen van alle plasmiden en door de thymine/thymidine afhankelijkheid. De risico's voor mens en milieu bij het uitscheiden van het organisme tijdens de studie zijn volgens de COGEM verwaarloosbaar klein.

### *Monitoring*

Gedurende de studie die 28 dagen duurt, komen de patiënten wekelijks terug bij het LUMC voor controle en het nemen van monsters (bloed, urine, feces en darmbiopten). Om de uitscheiding van AG011 en de effectiviteit van de biologische inperking te monitoren wordt uit de feces de verhouding van levende en dode *Lactococci* bepaald. De aanwezigheid van het

hIL-10 DNA is specifiek voor *L. lactis* stam AG011. Daarom wordt ook getest op de aanwezigheid van hIL-10 DNA en RNA om de verhouding tussen levende en dode *L. lactis* AG011 te monitoren

Minimaal een week nadat de laatste dosis AG011 genomen is, worden patiënten nogmaals getest op aanwezigheid van AG011 in de ontlasting. Omdat AG011 de darm niet kan koloniseren en bovendien een beperkte levensduur heeft is het onwaarschijnlijk dat het organisme na deze periode nog wordt uitgescheiden. De fase 1 klinische studie heeft bevestigd dat uitscheiding van AG011 tijdelijk is. In het onwaarschijnlijke geval dat de patiënt na een week toch nog *L. lactis* AG011 uitscheidt via de ontlasting, ziet de COGEM hierin, gezien de biologische inperking van het organisme, geen risico's.

#### *Algemene hygiëne*

De COGEM acht de kans reëel dat er gemorst wordt tijdens de toediening van het preparaat via een klyisma. In het kader van de algemene hygiëne wijst de COGEM er daarom op dat het van belang is dat de patiënt een goede algemene toilethygiëne toepast (handen wassen) en het preparaat toedient op een niet absorberende ondergrond. Deze kan gemakkelijk gedecontamineerd worden. Een normale hygiënische procedure is voldoende om de gemorste bacteriën af te doden.

#### **Conclusie**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een fase 2a klinische studie waarbij patiënten worden behandeld met een recombinante *L. lactis* stam die het humaan interleukine-10 tot expressie brengt dat getest wordt als ontstekingsremmer tegen een matige vorm van ulceratieve colitis. Gezien de opzet van deze studie en de eigenschappen van het te gebruiken organisme is de COGEM van mening dat de kans dat *L. lactis* AG011 zich kan handhaven in het milieu verwaarloosbaar klein is.

Op grond van de overwegingen in dit advies acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat de voorgenomen fase 2a klinische studie met *L. lactis* AG011 risico's oplevert voor mens en milieu.

#### **Referenties**

- 1) COGEM (2002). Klinische toepassing van *Lactococcus lactis* met een recombinant humaan interleukine-10 (hIL-10) gen als ontstekingsremmer bij patiënten met een matige of ernstige vorm van de ziekte van Crohn. (CGM/020823-02)
- 2) Johansen E. (2003). Challenges when transferring technology from *Lactococcus* laboratory strains to industrial strains. Genet Mol Res 2003; 2(1):112-116
- 3) Gasson MJ. (1983). Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic *streptococci* after protoplast-induced curing. J Bacteriology 1983; 154 (1):1-9
- 4) Klijn N, Weerkamp AH, de Vos WM. (1995). Genetic marking of *lactococcus lactis* shows its survival in the human gastrointestinal tract. Appl Environ Microbiol 1995; 61(7):2771-2774

- 5) Droault S, Corthier G, Ehrlich SD *et al.* (1999). Survival, physiology, and lysis of *Lactococcus lactis* in the digestive tract. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(11) 4881-4886
- 6) Braat H, Rottiers P, Hommes DW *et al.* (2006). A Phase I trial with transgenic bacteria expressing Interleukin-10 in Crohns disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatolog* 2006; 4: 754-759
- 7) Gruzza M, Fons M, Ouriet MF *et al.* (1994). Study of gene transfer in vitro and in the digestive tract of gnotobiotic mice from *Lactococcus lactis* strains to various strains belonging to human intestinal flora. *Microb Releases* 1994; 2(4):193-189
- 8) Steidler L, Neiryk S, Huyghebaert N *et al.* (2003). Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat biotechnology* 2003; 21:785-789