



ActoGeniX N.V.

Technologiepark 4 - 9052 Zwijnaarde – Belgium

GMO Deliberate Release Notification

INFORMATION POUR LE PUBLIC¹

**ETUDES CLINIQUES DE PHASE 1B ET 2A
AVEC UN *LACTOCOCCUS LACTIS* (*L. LACTIS*) EXPRIMANT L'hIL-10**

**Numéro Européen de la Notification
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-FR-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.

TABLE DES MATIERES:

1	CADRE RÉGLEMENTAIRE ET PROCÉDURE D'AUTORISATION:.....	3
2	DESCRIPTION DU MICRO-ORGANISME GENETIQUEMENT MODIFIE (MOGM).	3
3.	TYPE ET OBJECTIFS DES ESSAIS CLINIQUES PROPOSES/ENVISAGES:.....	4
4.	CADRE DE RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT	4
5.	BENEFICES POTENTIELS DE LA LIBERATION PLANIFIÉE :.....	6
6.	EVALUATION DES RISQUES POTENTIELS POUR LA SANTE HUMAINE ET L'ENVIRONNEMENT:.....	6
7.	RESPONSABILITÉS DU NOTIFIANT:.....	7
8.	INSPECTION PAR LES AUTORITÉS PUBLICS:.....	8
9.	RAPPORT D'ACTIVITÉS:	8
10.	CONTACT:.....	8

1 CADRE RÉGLEMENTAIRE ET PROCÉDURE D'AUTORISATION:

La dissémination volontaire d'organismes génétiquement modifiés (OGMs) dans l'environnement est strictement réglementée au niveau européen par la directive 2001/18/CE du 12 mars 2001 abrogeant la directive 90/220/CEE et au niveau belge par l'Arrêté Royal du 21 février 2005 réglementant la dissémination volontaire dans l'environnement ainsi que la mise sur le marché d'organismes génétiquement modifiés ou de produits en contenant abrogeant l'Arrêté Royal du 18 décembre 1998.

Pour garantir l'utilisation sans risque d'OGMs, la loi stipule entre autres que la dissémination volontaire d'OGMs à titre expérimental est interdite sans l'autorisation préalable écrite du ministre compétent. L'octroi d'un accord dépend d'une évaluation minutieuse de la biosécurité de la dissémination projetée à faire par le Conseil de Biosécurité, qui est composé des différents Comités Scientifiques, entre eux des experts indépendants des universités belges et des instituts gouvernementaux.

Afin d'obtenir l'autorisation nécessaire du ministre compétent, la société ActoGeniX NV a introduit un dossier de demande d'autorisation auprès de l'autorité compétente. Après l'avis du Conseil de Biosécurité le ministre compétent pourrait décider d'accorder ou non l'autorisation à la société ActoGeniX NV de faire des expérimentations de *Lactococcus lactis* transgénique, comme décrites dans la demande **B/BE/07/BVW1**.

La dissémination est prévue en Flandre / en Wallonie / à Bruxelles en conséquence des essais cliniques conduites à UZ Gasthuisberg, Leuven et Imelda vzw, Bonheiden. Les essais se dérouleront du mois de juillet 2008 au mois de juillet 2011.

2 DESCRIPTION DU MICRO-ORGANISME GENETIQUEMENT MODIFIE (MOGM)

La souche du micro-organisme *Lactococcus lactis* MG1363 a été génétiquement modifiée pour produire la protéine humaine thérapeutique interleukine-10 (hIL-10). Cette protéine a le potentiel de réduire les symptômes (tels que la douleur et les diarrhées contenant du sang) chez les patients qui souffrent d'affections inflammatoires de l'intestin.

Le *L. lactis* est un des micro-organismes les plus importants dans l'industrie laitière. Il est essentiel pour la fabrication de produits tels que le babeurre, le yaourt et le fromage. Le *L. lactis* fut premièrement isolé de l'un des seuls milieux dans lesquels il peut subsister : le lait cru. Le *L. lactis* peut aussi être présent chez l'homme et les animaux, le sol, les cours d'eau et les plantes. Cependant, ces milieux ne permettent pas d'assurer sa croissance. Le *L. lactis* n'est pas pathogène et ne développe pas de structures qui lui permettraient de survivre (telle la sporulation). L'insertion du gène de l'hIL-10 n'affecte pas cette caractéristique.

La souche du micro-organisme *L. lactis* MG1363 ne peut plus se multiplier dans le lait ou dans d'autres habitats naturels. En effet, les gènes codant pour les enzymes nécessaires à l'utilisation des constituants du lait ont été supprimés. Par conséquent, la souche MG1363 ne survit, ni croît que dans des milieux de culture artificiels contenant les nutriments essentiels à son développement.

La souche du micro-organisme génétiquement modifié MG1363 est encore plus confinée : le gène codant pour l'hIL-10, inséré de manière stable dans le chromosome, remplace le gène codant pour une enzyme nécessaire à la production de thymidine (un constituant élémentaire de l'acide désoxyribonucléique (ADN)). Cet échange rend la souche recombinante dépendante de l'adjonction de thymidine dans le milieu de culture. Sans ce supplément de thymidine, la bactérie ne peut survivre.

L'insert génétique contient aussi un signal permettant l'expression de la protéine d'hIL-10 hors de la bactérie. Chez le patient, quand la bactérie est active, elle produit de l'hIL-10 qui sera excrétée dans l'intestin du patient pour son bénéfice.

Dans les quelques jours qui suivent leur ingestion, les micro-organismes seront rejetés dans les fèces. Peu d'entre eux survivent à ce passage dans le corps. Les micro-organismes qui auront survécu seront dégradés très rapidement.

3. TYPE ET OBJECTIFS DES ESSAIS CLINIQUES PROPOSES/ENVISAGES:

Deux types d'essais sont envisagés.

- Le premier essai est une étude multicentrique de Phase 1b menée en double aveugle, randomisée, contrôlée versus placebo pour évaluer la sécurité, la tolérance et l'efficacité du produit AG011 chez des patients souffrant de rectocolite hémorragique modérément active.
- Le second essai est une étude multicentrique de Phase 2a menée en double aveugle, randomisée, contrôlée versus placebo pour évaluer la sécurité, la tolérance, la pharmacodynamie et l'efficacité de différentes concentrations d'AG011 chez des patients souffrant de rectocolite hémorragique modérément active.

Le code AG011 désigne la formulation lyophilisée de la souche du micro-organisme *L. lactis* MG1363 génétiquement modifié pour produire la protéine humaine thérapeutique interleukine-10 (hIL-10). Deux voies d'administration sont envisagées : des gélules pour la voie orale et un lavement pour l'application rectale.

Dans l'étude de Phase 1b, une seule dose ou un placebo sera administré par voie rectale tous les jours pendant quatre semaines. Dans la seconde étude (de Phase 2a), l'administration sera à la fois orale et rectale tous les jours pendant huit semaines. Les patients recevront une des trois doses ou un placebo.

Les deux études ont pour but d'évaluer la sécurité, la tolérance et l'efficacité du médicament. Dans tous les cas, 20 patients seront recrutés par groupe de traitement. De ce fait, les deux essais cliniques rassembleront un total de 120 patients.

La sélection des patients se fera selon des critères très contraignants. De ce fait, une approche multicentrique répartie dans plusieurs pays est nécessaire. Ces deux études se caractérisent par une thérapeutique ambulatoire. C'est à dire que le patient n'est pas confiné dans le centre d'essai clinique (CEC) pendant la durée de l'étude. Le sujet reçoit un conditionnement (« pack ») contenant les doses de produit et tout le matériel d'accompagnement nécessaire pour une certaine durée de traitement décrit par le protocole de l'étude clinique, ainsi que les instructions appropriées pour le bon usage du produit de l'étude reçues au CEC. Le sujet revient au CEC à des intervalles réguliers pour une évaluation.

Une étude précédente montre que le produit est sûr et que les micro-organismes ne survivent pas hors du corps humain.

4. CADRE DE RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT

La maladie de Crohn (MdC) et la rectocolite hémorragique (RH) sont les formes majeures des affections inflammatoires du tractus gastro-intestinal dont les causes exactes restent inconnues.

La MdC peut affecter toute partie du tractus gastro-intestinal depuis la sphère buccale jusqu'à l'anus. Les principaux symptômes gastro-intestinaux de la MdC sont des douleurs abdominales, des diarrhées (qui peuvent contenir du sang) ou de la constipation et une perte de poids.

La RH est une maladie du gros intestin ou du colon qui se caractérise par des ulcères caractéristiques du colon. La RH active se caractérise principalement par l'apparition progressive de diarrhées et de rectorragies (c'est-à-dire l'émission de sang par l'anus).

La RH peut être traitée par le retrait de tout le colon au cours d'une opération chirurgicale. Il n'existe pas de traitement (qu'il soit médical ou chirurgical) connu pour la MdC. Par conséquent, la plupart des traitements médicaux disponibles ont pour objectif d'induire et de maintenir la rémission de la pathologie (la rémission est un état ou une période pendant laquelle les symptômes d'une maladie sont réduits au point de donner une impression de guérison).

L'administration d'IL-10 humaine (hIL-10) serait un traitement éventuel. Les fonctions biologiques principales de l'hIL-10 sont la limitation et l'arrêt de réponses inflammatoires et la régulation de la croissance de plusieurs types de cellules immunitaires. On a attribué un rôle prépondérant à l'hIL-10 dans la suppression de la réponse immunitaire. L'hIL-10 recombinante a déjà été produite et testée dans

des essais cliniques. Les principales indications ont été l'arthrite rhumatoïde, les affections inflammatoires de l'intestin, le psoriasis, la transplantation d'organes ou l'hépatite C chronique.

L'injection de doses élevées d'hIL-10 a produit des effets indésirables. Ces effets sont principalement la réduction du nombre de globules rouges (anémies) et/ou du nombre de plaquettes sanguines (thrombocytopénie) et/ou l'apparition de maux de tête et/ou de fièvre.

ActoGeniX propose désormais, un système d'administration baptisé TopAct™, qui est basé sur l'administration produits à visée thérapeutique par une souche d'un micro-organisme vivant non-pathogène, le *L. lactis*, directement au niveau intestinal. Le système d'administration TopAct™ évite l'administration de doses élevées en délivrant localement les agents thérapeutiques au niveau du tractus gastro-intestinal. Après l'administration orale, le micro-organisme suit le trajet intestinal endéans quelques jours. Dans le cadre des études citées auparavant, la souche recombinante de *L. lactis* sécrète de l'hIL-10.

De plus, le micro-organisme contient le gène pour l'hIL-10, intégré de manière stable dans le patrimoine génétique (chromosome) où il remplace gène codant pour une enzyme nécessaire à la production de thymidine (un constituant élémentaire de l'acide désoxyribonucléique (ADN)). Cet échange rend la souche recombinante dépendante à l'adjonction de thymidine dans le milieu de culture. Sans ce supplément de thymidine, la bactérie ne peut survivre.

Il a été précédemment démontré dans deux modèles de souris souffrant de maladies intestinales que des doses thérapeutiques d'IL-10 peuvent être réduites par administration locale à l'aide d'une bactérie génétiquement modifiée pour sécréter ladite protéine. L'administration dans l'intestin de *L. lactis* sécrétant de l'IL-10 a réduit de manière significative les rectocolites induites chez la souris. De plus, l'administration d'IL-10 produite par *L. lactis* a été comparée avec celle de méthodes anti-inflammatoires standards (cinq injections quotidiennes) qui entre-autres étaient de l'hIL-10 recombinante. Cette comparaison a démontré que l'administration d'hIL-10 produite par *L. lactis* requerrait des doses bien plus basses.

Une précédente étude clinique de Phase 1 avec TopAct™ délivrant de l'hIL-10 chez des patients souffrant de maladie de Crohn conduite aux Pays-Bas (Référence Officielle GMO Ref. BGGO: 02/01; Ref. COGEM: CGM020823-02) a montré une bonne tolérance et une bonne sécurité. De plus, cette étude a fourni des indications d'efficacité clinique. Cette nouvelle stratégie d'administration évite les effets indésirables et est biologiquement confinée. Par conséquent, cette approche thérapeutique est un bon candidat pour les traitements d'entretien des maladies intestinales chroniques.

Les études cliniques de Phase 1b et Phase 2a dans la RH sont des poursuites de ce développement. Au vu des résultats de l'étude clinique de Phase 1, cette proposition d'études introduit une souche de *L. lactis* qui a une capacité accrue de sécrétion d'hIL-10 par rapport à la souche utilisée lors de la première étude, ainsi que deux méthodes d'administration (gélules par voie orale et lavement par voie rectale).

Grâce à sa technologie de libération locale et topique de produits thérapeutiques au niveau intestinal (TopAct®), ActoGenix développe une nouvelle classe de produits biopharmaceutiques caractérisés par une efficacité accrue et des effets indésirables diminués. TopAct™ peut couvrir un spectre étendu de maladies. Au cours des dernières années, l'équipe de recherche fondatrice d'ActoGeniX a déjà validé le concept de produits utilisant TopAct™ dans un panel de modèles animaux pour différentes pathologies. Des données positives d'efficacité ont été obtenues dans des modèles d'affections inflammatoires intestinales, dans les mucosites buccales et intestinales et les allergies alimentaires.

5. BENEFCES POTENTIELS DE LA LIBERATION PLANIFIÉE :

La libération planifiée est une étape supplémentaire dans le développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique pour soulager des affections inflammatoires de l'intestin. Les médicaments actuellement disponibles pour contrôler la maladie ont souvent de sérieux effets indésirables lors d'une administration chronique.

Ceci est aussi le cas pour l'hIL-10 injectée. Le système d'administration TopAct™ proposé permet de réduire ces effets indésirables. De plus, le médicament est libéré et agit uniquement localement. Par conséquent, les doses administrées peuvent être plus basses tout en étant actives.

6. EVALUATION DES RISQUES POTENTIELS POUR LA SANTE HUMAINE ET L'ENVIRONNEMENT:

Le micro-organisme *L. lactis* est communément trouvé et ajouté dans les produits alimentaires. Le *L. lactis* est un des plus important micro-organismes présent dans l'industrie laitière. La majorité des bactéries de la famille des *Lactococci* produits industriellement, ne survit pas hors de l'environnement de la production laitière. Cette bactérie n'est pas considérée comme dangereuse. Elle ne produit pas de spores pour assurer sa survie et sa reproduction.

Le micro-organisme *L. lactis* peut être trouvé dans un grand nombre d'endroits, mais ils ne sont nullement des niches écologiques. Ce micro-organisme a été identifié comme étant ni invasif, ni perturbateur pour l'environnement et ce, bien qu'il soit très largement utilisé et massivement libéré dans l'environnement. Sa croissance ne peut être assurée que dans un nombre limité de milieux nutritionnels favorables (tels que le lait). Le micro-organisme *L. lactis* ne se multiplie ni ne colonise l'être humain ou les animaux.

La souche MG1363 de *L. lactis* ne peut croître que dans des milieux de culture artificiellement additionnés de nutriments dans une juste composition qualitative et quantitative, et que dans des conditions appropriées. En effet, les gènes qui lui permettraient d'utiliser les nutriments présents dans le lait ont été enlevés. La souche MG1363 ne produit pas d'antibiotiques et est sensible à un large spectre d'entre eux.

De plus, la souche capable de produire l'hIL-10 ne peut synthétiser la thymidine. Sans cette dernière, le micro-organisme meurt. Il est hautement improbable le micro-organisme génétiquement modifié puisse ré-acquérir la capacité de produire la thymidine. D'autre part il n'est pas possible de transférer le transgène (codant pour l'IL-10) vers d'autres micro-organismes.

Dans le cadre de l'essai clinique, le micro-organisme génétiquement modifié (MOGM) sera utilisé sous forme de poudre lyophilisée, soit en gélules enrobées gastro-résistantes dans des plaquettes thermoformées, pour la voie orale, soit sous forme liquide dans un applicateur spécial, pour la voie rectale. En cas d'altération du conditionnement, le principe actif dans la poudre lyophilisée se dégraderait rapidement sous l'effet de l'humidité et de la chaleur. Le MOGM est très sensible à des températures supérieures à 40°C, au pH acide, à l'air sec, à l'exposition directe au soleil, aux rayons ultra-violet, au savons, aux agents de blanchiment (tels que la Javel), aux antibiotiques et aux milieux fortement salins. La quantité d'éclaboussures sera limitée (une seule dose). Les zones souillées peuvent être décontaminées avec des détergents standards (savon) ou de l'Eau de Javel.

Au moment de la prise des gélules (ingestion), il n'y a pas de contact avec la poudre contenant la bactérie. Dans le cas du lavement, un bref contact avec la solution pourrait se produire au moment de la reconstitution juste avant l'administration et lors de celle-ci. Excepté lors de la reconstitution du lavement, il n'y a pas besoin de manipulations supplémentaires étant donné que chaque patient reçoit toutes les doses nécessaires pour le traitement dans un emballage adéquat. Le patient ne reçoit que le nombre d'unités de traitement et le matériel annexe nécessaire pour une semaine de traitement. A cette occasion, le patient reçoit les instructions et les explications nécessaires pour le bon suivi du traitement. Bien que les patients souffrant de RH soient habitués aux lavements, le personnel médical du centre

d'essais cliniques (CEC) prodiguera des recommandations supplémentaires pour que le lavement soit gardé au moins deux heures suite à l'application.

Dans une étude en ambulatoire (voir définition plus haut), l'administration du produit se fait hors de l'hôpital (par exemple au domicile du patient). Une fois administrée, le micro-organisme suit le transit intestinal. L'administration du produit ainsi son excrétion par mode fécal n'est pas confinée au domicile du patient. Par conséquent, le territoire national est considéré comme étant potentiellement exposé au produit. On estime que le micro-organisme vivant est encore détectable dans les fluides intestinaux (excréments) du patient pendant quelques jours après la dernière prise du traitement. Les contraintes imposées par le design des études conduit à recommander au patient de ne pas quitter le pays pendant la durée de participation aux études cliniques. Du fait de l'absence d'impact pertinent sur l'environnement et du confinement biologique, il n'y a pas de traitement spécifique des fluides intestinaux prévu. De plus, le grand public n'a pas accès au système d'égouts. Si nécessaire, un traitement antibiotique standard suffirait pour inactiver la bactérie.

Chaque semaine, le patient retournera à l'hôpital afin de subir les examens prescrits par le protocole d'étude, mais aussi afin de rendre tout matériel contenu dans l'emballage (vide ou partiellement vide) de la période de traitement en cours et de recevoir un nouveau « pack » de traitement pour la période suivante (une semaine). Au CEC, les précautions qui sont en place sont standard. Il suffira à l'équipe clinique de respecter les conditions normales d'hygiène lors de la manipulation des fluides du patient (en particulier, les selles). Des gants à usage unique et des lingettes jetables doivent être utilisés lors de la manipulation du matériel pour les analyses et les biopsies. Tout déchet devra être considéré comme matériel dangereux et être traité comme tel.

Il est évident que le patient sera directement exposé au micro-organisme. Les membres de la famille du patient pourraient eux aussi être exposés au micro-organisme lors de la manipulation des récipients vides (bien que ceux-ci seront collectés et stockés dans des récipients adéquats), du matériel souillés ou des fluides contenant le micro-organisme. Pour limiter ou éviter des taux d'exposition élevés, on s'assurera que les règles d'hygiène élémentaires sont respectées.

On ne peut exclure que des biotopes d'intérêt (champs de culture), des zones protégées ou les systèmes de fourniture d'eau potable soient exposés au MOGM. Cependant, il est à noter que cette exposition au *L. lactis* existe déjà. La souche modifiée du micro-organisme n'a pas de caractéristiques supplémentaires qui augmenteraient les chances d'exposition. Au contraire, vu qu'il est totalement dépendant de la présence de thymidine pour sa survie, toute exposition précédemment décrite serait encore plus limitée dans le temps. Alors que la dispersion dans l'environnement peut être considérée comme similaire à celle de *L. lactis*, les modifications qui caractérisent le MOGM sont telles que cette souche a encore moins de chances de survie dans ces biotopes.

L'expression d'hIL-10 déclenche des effets sur les cellules humaines qui ont le récepteur approprié. Ces récepteurs sont hautement spécifiques et pour les mammifères sensibles à l'hIL-10 qui ont des récepteurs spécifiques, il y a très peu voire aucune réaction croisée avec l'hIL-10. Les seules espèces pour lesquelles une réaction croisée existe sont les singes et les souris.

Le gène de l'hIL-10 dans le MOGM est unique, artificiel et peut être distingué du gène natif de l'hIL-10. La méthode de détection utilisée est l'amplification en chaîne par polymérisation (ou PCR).

Cette notification se réfère à une dissémination volontaire d'un micro-organisme génétiquement modifié à des fins expérimentales. Par conséquent, l'utilisation de ce matériel à toutes autres fins est strictement interdite.

7. RESPONSABILITÉS DU NOTIFIANT:

L'autorisation qui pourrait être accordée au notifiant par le ministre compétent, stipule que le notifiant assure la pleine responsabilité civile pour tout dommage à la santé humaine ou animale, et à l'environnement, qui résulterait de l'expérimentation projetée.

8. INSPECTION PAR LES AUTORITÉS PUBLICS:

Des inspecteurs sont chargés du contrôle des essais du respect des conditions d'autorisation incombant au notifiant et de l'investigation des infractions éventuelles à l'autorisation. Dans le cas où une infraction ou une fraude est constatée, des sanctions spécifiques seront imposées.

9. RAPPORT D'ACTIVITÉS:

A l'issue de l'essai, un rapport d'activités rédigé par le notifiant sera remis à l'autorité compétent. Ce rapport d'activités comprendra au minimum les données suivantes:

- *Le lieu et la période de la dissémination,*
- *la nature précise des OGMs effectivement disséminés,*
- *l'objectif ou les objectifs des expérimentations,*
- *les mesures étant prises pour éviter la dissémination involontaire du matériel transgénique,*
- *si applicable, les mesures étant prises pour la protection du sujet (patient/animal) pendant l'administration du produit médical expérimental contenant l'OGM,*
- *si applicable, les mesures étant prises pour la protection des parents des patients traités,*
- *les mesures étant prises pour la protection des travailleurs qui ont dû manipuler le matériel contenant l'OGM,*
- *la méthode utilisée pour la destruction du matériel non utilisé ou contaminé,*
- *les résultats obtenus lors des essais,*
- *un résumé de la surveillance de la dissémination du produit OGM hors du patient/animal,*
- *un résumé de la surveillance de l'OGM ou ADN recombinant dans l'environnement.*

10. CONTACT:

Si vous avez des commentaires sur cette fiche d'information ou sur nos activités ou si vous voudriez obtenir des renseignements complémentaires relatifs aux essais, n'hésitez pas à nous contacter à l'adresse suivante:

Notifiant:

Nom de la compagnie: ActoGeniX NV
Adresse: Technologiepark 4, 9052 Zwijnaarde, Belgium
Téléphone: +32 (0)9 261 06 00
Fax: +32 (0)9 261 06 19
Email: info@actogenix.com
Web site: <http://www.actogenix.com>

Contact

Nom: Dr Bernard Coulie
Adresse: Technologiepark 4, 9052 Zwijnaarde, Belgium
Téléphone: +32 (0)9 261 06 00
Fax: +32 (0)9 261 06 19
Email: bernard.coulie@actogenix.com

Vous pouvez aussi avoir accès au compte-rendu (SNIF) sur le site du "Joint Research Centre of the European Commission" (<http://gmoinfo.jrc.it/>). Par ce site, vous pouvez faire parvenir vos commentaires à la Commission.