

Chondroïtinesulfaat

Chondroitin sulphate

Beoordeling van de veiligheid voor de consument, volgens de Europese verordening 258/97 betreffende nieuwe voedingsmiddelen en nieuwe voedsel ingrediënten

Assessment of safety for the consumer, in accordance with European Regulation 258/97 concerning novel foods and novel food ingredients

aan/to:

de Minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport
the Minister of Health, Welfare and Sport

Nr. 2017-03 BNV, Utrecht, 23 mei 2017
No. 2017-03 BNV, Utrecht, May 23, 2017

Inhoudsopgave

Samenvatting en conclusies	4
1 Inleiding	5
2 Volledigheid en juistheid van het dossier	6
2.1 Administratieve gegevens	6
2.2 Algemene beschrijving van het voedingsmiddel	6
2.3 Classificatie van het voedingsmiddel voor beoordeling	6
2.4 Informatievergaring over het voedingsmiddel	6
2.5 Beknopt overzicht door de aanvrager	7
2.6 Overige beoordelingen	7
2.7 Etiketteringsvoorstel van de aanvrager	7
3 Interpretatie en evaluatie van de voorgelegde gegevens	8
3.1 I Specificatie van het nieuwe voedingsmiddel	8
3.2 II Effecten van het gevolgde productieprocedé op het voedingsmiddel	10
3.3 III Achtergrondinformatie over het als bron voor het voedingsmiddel gebruikte organisme	11
3.4 IX Verwachte opname en gebruiksfrequentie van het voedingsmiddel	11
3.5 X Informatie op basis van eerdere blootstelling van de mens aan het voedingsmiddel of zijn bron	12
3.6 XI Informatie over de voedingswaarde van het voedingsmiddel	12
3.7 XII Microbiologische informatie over het voedingsmiddel	12
3.8 XIII Toxicologische informatie over het voedingsmiddel	13
BIJLAGEN	
Product specificatie	27
Literatuur	28
De commissie	30
Samenvatting van het dossier	32

Contents (English translation)

Executive summary	16
1 Introduction	17
2 Completeness and accuracy of the dossier	18
2.1 Administrative data	18
2.2 General description of the food	18
2.3 Classification of the food for assessment	18
2.4 Information on the food	18
2.5 Brief summary by the applicant	19
2.6 Other assessments	19
2.7 Applicant's labelling proposal	19
3 Interpretation and evaluation of data submitted	20
3.1 I Specification of the novel food	20
3.2 II Effects of the production process applied to the food	22
3.3 III History of the organism used as the source of the food	23
3.4 IX Anticipated intake and extent of use of the food	23
3.5 X Information from previous human exposure to the food or its source	23
3.6 XI Nutritional information on the food	24
3.7 XII Microbiological information on the food	24
3.8 XIII Toxicological information on the food	24

APPENDICES

Product specification	27
Literature	28
The Committee	30
Summary of the dossier	32

Samenvatting en conclusies

De aanvrager, de firma Gnosis, heeft een veiligheidsdossier ingediend over chondroïtinesulfaat, dat uitsluitend bedoeld is voor gebruik als ingrediënt van voedingssupplementen. Dit chondroïtinesulfaat wordt biosynthetisch geproduceerd waarbij gebruik wordt gemaakt van een fermentatieproduct van een specifieke stam van de bacterie *Escherichia coli*, dat na opzuivering vervolgens chemisch wordt gesulfateerd.

De overeenkomsten tussen het nieuwe product en de al op de markt zijnde traditionele vormen van chondroïtinesulfaat, geïsoleerd uit dierlijk weefsel, worden door de aanvrager toegelicht. Volgens de commissie VNV zijn er ook verschillen tussen het nieuwe chondroïtinesulfaat en de bestaande producten, en geeft de huidige productspecificatie adequaat de kenmerken van het nieuwe product weer (zie pagina 28 van dit advies). De aanvrager heeft door analyse van meerdere chondroïtinesulfaat-batches laten zien dat een consistente productie volgens deze specificatie mogelijk is.

Tijdens het productieproces, dat duidelijk is beschreven in het dossier, worden kritieke parameters systematisch gecontroleerd. Verder zijn er voor alle relevante parameters grenswaarden vastgelegd in de specificatie en heeft men ook de stabiliteit van het product experimenteel bevestigd. Hiermee lijkt de kwaliteit van het chondroïtinesulfaat product gewaarborgd.

De commissie stelt vast dat er voedingskundig gezien geen verschil is tussen het nieuwe chondroïtinesulfaat product en de bestaande preparaten uit dierlijke bronnen. De informatie over absorptie en metabolisme van verschillende vormen chondroïtinesulfaat is erg beperkt, ook omdat dit type onderzoek volgens de commissie VNV lastig is te interpreteren. Toxicologisch onderzoek dat is uitgevoerd met het chondroïtinesulfaat van de aanvrager toonde aan dat het product niet genotoxisch is. Ook in een 90 dagen durend onderzoek met ratten werden geen nadelige effecten waargenomen bij een dosering van 1000 mg chondroïtinesulfaat per kg lichaamsgewicht per dag. Deze blootstelling is 50 maal hoger dan bij gebruikers van de maximaal voorgestelde dagdosering van het nieuwe chondroïtinesulfaat, te weten 1200 mg.

De commissie VNV concludeert dat het chondroïtinesulfaat van de aanvrager veilig kan worden gebruikt in voedingssupplementen op basis van de volgende argumenten. Het belangrijkste is dat het nieuwe product goed gekarakteriseerd is en van hoge zuiverheid. Daarnaast gebruiken veel mensen al langdurig allerlei chondroïtinesulfaat preparaten afkomstig van dierlijk weefsel zonder dat dit aantoonbaar leidt tot gezondheidsproblemen. Er is daarom geen reden om bij het specifieke preparaat van de aanvrager bezorgd te zijn over de veiligheid en dit wordt door proefdieronderzoek ondersteund.

1 Inleiding

Het Bureau Nieuwe Voedingsmiddelen (BNV) van het Agentschap voor het College ter Beoordeling van Geneesmiddelen adviseert het ministerie van VWS over de veiligheid van nieuwe voedingsmiddelen. Deze advisering is onderdeel van de Europese toelatingsprocedure voor nieuwe voedingsmiddelen, die is vastgelegd in EU verordening 258/97 (EU97). Dit rapport is het verslag van een zogenoemde eerste beoordeling volgens deze procedure. De tekst van het rapport is opgesteld door het Bureau Nieuwe Voedingsmiddelen, in nauwe samenspraak met de Commissie Veiligheidsbeoordeling Nieuwe Voedingsmiddelen (commissie VNV). De samenstelling van deze commissie is als bijlage opgenomen in dit rapport.

Op 26 juni 2015 ontving het BNV het veiligheidsdossier voor het product chondroïtinesulfaat (Gno15). De aanvrager verstreekte op verzoek van BNV gedetailleerde informatie over het productieproces in september 2015 (Gno15a) en over het onderzoek bij mensen in november 2015 (Gno15b). In antwoord op formele vragen van de commissie VNV stuurde de firma aanvullende informatie in april, juli en september 2016 (Gno16, Gno16a, Gno16b). Vervolgens informeerde de aanvrager in november 2016 het BNV over een aanpassing van de specificatie (Gno16c). De commissie VNV besprak het dossier voor het laatst in haar vergadering op 29 november 2016. Dit rapport is het verslag van haar bevindingen en werd vastgesteld in de commissievergadering van 11 april 2017.

2 Volledigheid en juistheid van het dossier

2.1 Administratieve gegevens

De aanvrager is de firma Gnosis S.p.A (Via Laboratori Autobianchi 1, 20832 Desio (MB), Italië).

2.2 Algemene beschrijving van het voedingsmiddel

Deze aanvraag betreft het natriumzout van chondroïtinesulfaat¹. Chondroïtinesulfaat is een gesulfateerd glycosamineglycaan. Dergelijke verbindingen bestaan uit een polymeerketen van suikerderivaten, waarin N-acetylgalactosamine en glucuronzuur elkaar afwisselen. Deze glycosamineglycanen vormen, gebonden aan eiwit, een essentieel bestanddeel van de extracellulaire matrix in weefsels van mens en dier. Zo is chondroïtinesulfaat een van de belangrijkste componenten van kraakbeenweefsel.

Het chondroïtinesulfaat van deze aanvraag, in het dossier aangeduid als Mythocondro, wordt biosynthetisch geproduceerd waarbij gebruik wordt gemaakt van een fermentatieproduct van een specifieke stam van de bacterie *Escherichia coli*. Het huidige voorstel betreft alleen het gebruik van chondroïtinesulfaat in voedingssupplementen.

2.3 Classificatie van het voedingsmiddel voor beoordeling

Volgens de aanvrager valt het nieuwe ingrediënt onder categorie d 'voedingsmiddelen en voedsel ingrediënten bestaande of geïsoleerd uit micro-organismen, schimmels of algen' conform de verordening nieuwe voedingsmiddelen (EC97). In deel I van Aanbeveling 97/618 van de Europese Commissie (EC97a) worden zes klassen nieuwe voedingsmiddelen onderscheiden om als basis te dienen voor de opbouw van het veiligheidsdossier. De aanvrager meent dat het nieuwe product hoort in klasse 2 (complex voedingsmiddel uit niet genetisch gemodificeerde bronnen), en daarbinnen in subklasse 2.2 omdat de bron van het nieuwe voedsel ingrediënt in de Europese Unie niet eerder voor de voeding is gebruikt.

De commissie VNV is het hiermee eens.

2.4 Informatievergaring over het voedingsmiddel

De informatie die essentieel is voor de beoordeling van de veiligheid van consumptie van het voedingsmiddel in klasse 2.2, is gespecificeerd aan de hand van de onderstaande thema's die zijn voorgeschreven in Aanbeveling 97/618 van de Europese Commissie (EC97a):

- I Specificatie van het nieuwe voedingsmiddel
- II Effecten van het gevolgde productie procedé op het voedingsmiddel
- III Achtergrondinformatie over het als bron voor het voedingsmiddel gebruikte organisme
- IX Verwachte opname en gebruiksfrequentie van het voedingsmiddel

¹ In dit rapport wordt de term chondroïtinesulfaat gebruikt voor zowel het product van deze aanvraag (het natrium zout van chondroïtinesulfaat) als voor chondroïtinesulfaat in het algemeen.

- XI Informatie over de voedingswaarde van het voedingsmiddel
- XII Microbiologische informatie over het voedingsmiddel
- XIII Toxicologische informatie over het voedingsmiddel

De aanvrager bespreekt in het dossier de bovenstaande thema's en heeft ook een hoofdstuk toegevoegd over thema X uit de Europese aanbeveling 'Informatie op basis van eerdere blootstelling van de mens aan het voedingsmiddel of zijn bron'. Hierin bespreekt men het gebruik van bestaande chondroïtinesulfaat producten. Het dossier inclusief aanvullende gegevens bevat volgens de commissie VNV voldoende informatie om de veiligheid van het nieuwe ingrediënt te kunnen beoordelen. Ook heeft de commissie VNV wetenschappelijke literatuur geraadpleegd.

2.5 Beknopt overzicht door de aanvrager

Het dossier bevat een samenvatting die als bijlage bij dit rapport is gevoegd (Gno17). Deze samenvatting is ook aan de andere EU lidstaten toegezonden, zoals is vereist volgens Verordening (EG) nr. 258/97 (EC97).

2.6 Overige beoordelingen

In de Verenigde Staten heeft de Food and Drug Administration (FDA) een zogenoemde GRAS ('Generally Recognized As Safe') notificatie van de firma Gnosis in maart 2017 geaccepteerd (zie nummer 666 van de lijst met aanvragen, beschikbaar via <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices>).

2.7 Etiketteringsvoorstel van de aanvrager

Etikettering dient in overeenstemming te zijn met de Europese Verordening 1169/2011 (EC11). Daarnaast wordt artikel 8 van Verordening (EG) nr. 258/97 (EC97) doorgaans zo toegepast, dat tenminste de aanwezigheid van het nieuwe voedingsmiddel op het etiket wordt vermeld. In Nederland wordt de etikettering van voedingsmiddelen overigens niet beoordeeld door het Bureau Nieuwe Voedingsmiddelen, maar door het Regulier Overleg Warenwet.

Het dossier bevat geen voorstel voor etikettering. Wel heeft de aanvrager aangegeven dat op de verpakking duidelijk zal worden vermeld dat het ingrediënt chondroïtinesulfaat afkomstig is van microbiële fermentatie (Gno16). De commissie VNV wijst op de meer specifieke aanduiding van ditzelfde product in diervoeder².

² "(subtitel) Product verkregen door sulfatering van chondroitine afkomstig van microbiële fermentatie". De aanvrager verwijst naar deze aanduiding in de aanvullende informatie van 6 april 2016 (Gno16, zie referentie European Feed Business Sector Representatives(2016)).

3 Interpretatie en evaluatie van de voorgelegde gegevens

3.1 I Specificatie van het nieuwe voedingsmiddel

De aanvrager beschrijft in het dossier uitgebreid de kenmerken en samenstelling van het chondroïtinesulfaat. Het wordt biosynthetisch geproduceerd waarbij eerst een fermentatieproduct van *Escherichia coli* 05:K4:H4 wordt geïsoleerd dat vervolgens chemisch wordt gesulfateerd. De samenstelling van het nieuwe chondroïtinesulfaat is volgens de aanvrager vergelijkbaar met chondroïtinesulfaat dat uit dierlijk kraakbeen wordt geëxtraheerd en een gangbaar bestanddeel is van diverse voedingssupplementen die al lang op de markt zijn. Analytische details van dergelijke traditionele producten afkomstig van vogels, runderen en in de zee voorkomende dieren, zijn daarom ook opgenomen in het dossier.

De identiteit en de structuur van chondroïtinesulfaat wordt in het dossier uitgebreid besproken. Het is een lineair polymeer van repeterende disachariden die elk bestaan uit glucuronzuur dat via een $\beta(1 \rightarrow 3)$ binding is gekoppeld aan N-acetylgalactosamine. Omdat het aantal en de positie van de sulfaatgroep(en) per eenheid varieert, bestaat chondroïtinesulfaat dat van nature aanwezig is bij mens en dier, structureel gezien uit een heterogene groep van verbindingen. Over het algemeen bevat de meerderheid van de disacharide eenheden één sulfaatgroep.

De aanvrager heeft verschillende type analyses uitgevoerd voor de identificatie van het eigen chondroïtinesulfaat. De structuur van de polymeren werd bevestigd met infrarood spectroscopie en $^1\text{H-NMR}$ spectroscopie en is in het dossier geïllustreerd met representatieve spectra. De aanvrager beschrijft dat door de regioselectieve chemische sulfatering van het bacteriële polysacharide, dat afgezien van het eindstandige fructose identiek is aan eukaryotisch chondroïtine, een consistent mengsel van polysachariden wordt gevormd, het chondroïtinesulfaat. Om aan te tonen dat het eindstandige fructose adequaat verwijderd was, heeft men bij vier producties het $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum van het tussenproduct, het bacteriële 'chondroïtine', vergeleken met het spectrum van het corresponderende chondroïtinesulfaat eindproduct. Verder is met de chromatografische HPLC methode het sulfateringspatroon uitgebreid onderzocht van drie batches van chondroïtinesulfaat. De polymeren bestaan hoofdzakelijk uit enkelvoudig gesulfateerde disacharide eenheden, waarvan ongeveer 83 % is gesulfateerd op de C6-positie van N-acetylgalactosamine (Gno15, Gno16). Dit wordt hierna aangeduid als chondroïtine 6-sulfaat (en is hetzelfde als ' $\Delta\text{Di-6S}$ ' in het dossier). Daarnaast is ruwweg 10 % van de disachariden niet gesulfateerd en ongeveer 6 % bevat twee sulfaatgroepen.

De productspecificatie in het dossier betreft het chondroïtinesulfaat eindproduct in gedroogde vorm en vermeldt dat de meetwaarden van het totaal gehalte chondroïtinesulfaat niet meer dan 5 % mogen afwijken van 100% (Gno15). Verder omvat de specificatie, naast enkele fysisch-chemische kenmerken, grenswaarden voor het gewichtsverlies bij drogen en voor de gloeirest ('residue on ignition'). Omdat volgens de commissie VNV de oorspronkelijke beschrijving de wezenlijke kenmerken van het biosynthetische chondroïtinesulfaat onvoldoende weerspiegelde, heeft de aanvrager het aantal parameters in de specificatie uitgebreid met het sulfateringspatroon (vermeld als maximaal gehalte chondroïtine 6-sulfaat) en de molecuulmassa (spreiding van de

gewichts- en getalgemiddelden en dispersiteit³) (Gno16, Gno16a). Tevens zijn grenswaarden voor de gehalten aan eiwit en mogelijke verontreiniging met endotoxines in de specificatie opgenomen, evenals voor het totaal gehalte aan residuen organische verbindingen die als proceshulpstoffen zijn gebruikt. De specificatie van de specifieke optische rotatie is later door de aanvrager nog aangepast, zodat ook de meetwaarden van de meest recent geproduceerde partijen binnen de range vallen. De uitgebreide toelichting hierbij is aan het dossier toegevoegd (Gno16c). Voor de duidelijkheid is de vernieuwde specificatie die de aanvrager voorstelt, als bijlage opgenomen in dit advies.

De aanvrager heeft gegevens verstrekt van analyses volgens de volledige productspecificatie voor zeven onafhankelijke batches van chondroïtinesulfaat, geproduceerd in 2015 en 2016 (Gno16a; Gno16c), in aanvulling op de drie batches uit 2013 waarvan de gegevens al waren gepresenteerd in het oorspronkelijk dossier (Gno15, Gno16). De aanvrager verklaart dat al deze producten op commerciële schaal zijn gefabriceerd (Gno16c). Alle gevonden waarden lagen binnen de specificaties (met uitzondering van de concentraties organische verbindingen van de producten uit 2013; zie het commentaar van de commissie VNV hieronder).

De aanvrager bespreekt de aanwezigheid van mogelijke onzuiverheden die verband houden met het productieproces. Dit betreft bepaalde organische onzuiverheden, eiwitten en endotoxines waarvoor limieten in de specificatie zijn vastgelegd. Daarnaast wordt gecontroleerd of eventuele restanten chloride en sulfaat in het chondroïtinesulfaat eindproduct de limieten die aanvrager hanteert, niet overschrijden. Testresultaten hiervan zijn in het dossier gepresenteerd voor de drie productbatches uit 2013. Deze partijen zijn ook onderzocht op de zware metalen arseen, cadmium, lood en kwik. Volgens de aanvrager zouden dergelijke verontreinigingen afkomstig kunnen zijn van externe bronnen. Alle meetwaarden voldeden ruim aan de norm die de aanvrager hanteert. Deze eigen grenswaarden zijn voor lood en cadmium lager dan die wettelijk vastgelegd voor voedingssupplementen en die voor kwik gelijk aan de wettelijke norm (voor arseen ontbreekt een dergelijke norm). De commissie VNV is van mening dat de mogelijk aanwezige verschillende zware metalen geen gezondheidsrisico vormen. Eventuele restanten chloride en sulfaat zullen niet schadelijk zijn.

Het dossier bevat informatie over de stabiliteit van chondroïtinesulfaat. Materiaal van drie batches, die in 2011 en 2012 op commerciële schaal waren geproduceerd, werd onder standaardomstandigheden (temperatuur van 25°C en 60% luchtvochtigheid) gedurende twee jaar bewaard en met regelmatige intervallen onderzocht. Daarnaast werd bij een temperatuur van 40°C en 75% luchtvochtigheid getest of er versnelde afbraak plaats vond. In beide gevallen was er geen afname te zien in het gehalte chondroïtinesulfaat gedurende de onderzochte tijdsperiode. Ook deden zich geen veranderingen voor in het uiterlijk en infrarood spectrum van het product, evenmin in het gehalte onzuiverheden en gloeirest.

De commissie VNV stelt vast dat de samenstelling van het chondroïtinesulfaat voldoende duidelijk is beschreven in het dossier en vastgelegd in de productspecificatie, zie bijlage. Dit omvat de karakteristieke informatie over het sulfateringspatroon en over de grootte

³ De polydispersiteit van het polymeer is een maat voor de breedte van de verdeling van de moleculaire massa's uitgezet in een distributiecurve (het aantal moleculen met een bepaalde molecuulmassa als functie van de moleculaire massa).

van de polymeren (inclusief de dispersiteit). De grondige analyses van meerdere batches van het chondroïtinesulfaat tonen volgens de commissie VNV aan dat het nieuwe product vrijwel uitsluitend bestaat uit chondroïtinesulfaat. Hieruit blijkt ook dat de chemische synthese goed reproduceerbaar is en resulteert in een consistent sulfateringspatroon met een hoog gehalte chondroïtine 6-sulfaat. Naast eisen voor de identificatie van chondroïtinesulfaat bevat de productspecificatie ook grenswaarden voor relevante verontreinigingen. Daarmee is het product volgens de commissie VNV voldoende gespecificeerd.

Een belangrijk aandachtspunt van commissie VNV betrof de restanten van de organische verbindingen die als proceshulpstof worden gebruikt bij de chemische omzetting van chondroïtine in chondroïtinesulfaat. Voor geen van deze verbindingen is een limiet voor het residu gehalte in levensmiddelen vastgesteld. De commissie VNV was met name bezorgd over een eventueel gezondheidsrisico van het restant van een van de proceshulpstoffen. De aanvrager heeft daarom de bovengrens voor het gehalte van deze specifieke organische verbinding in het eindproduct zodanig verlaagd dat geen veiligheidsrisico te verwachten is bij de voorgestelde dagelijkse inname van 1,2 g chondroïtinesulfaat als voedingssupplement. Voor de berekening van dit maximum gehalte heeft de aanvrager de zogenoemde TTC-grenswaarde (Threshold of Toxicological Concern, EFSA16) gebruikt, omdat veiligheidsgegevens voor deze specifieke stof ontbreken. De commissie VNV accepteert dit als onderbouwing voor de definitieve grenswaarde. Verder zijn de analysemethoden die worden gebruikt voor de verschillende proceshulpstoffen, gevoelig genoeg om betrouwbaar te kunnen vaststellen of de gehalten hiervan in het eindproduct de afzonderlijke normen van de aanvrager niet overschrijden (Gno15, Gno16b).

Verder is het de commissie VNV opgevallen dat de residu gehalten endotoxines in de meerderheid van de onderzochte productbatches minstens een grootte orde lager waren dan de grenswaarde van de specificatie. De aanvrager noemt dat er voor voedingsmiddelen geen wettelijke bovengrenzen zijn vastgelegd voor endotoxine verontreiniging en heeft beargumenteerd dat deze hogere bovengrens geen veiligheidsrisico met zich mee brengt (Gno16). De commissie accepteert dit.

Tot slot meent de commissie VNV dat over de stabiliteit van het nieuwe product voldoende gegevens zijn verstrekt.

3.2 II Effecten van het gevolgde productieproces op het voedingsmiddel

Voor de productie van chondroïtinesulfaat van deze aanvraag wordt eerst tijdens fermentatie door *E. coli* O5:K4:H4 een kapsel polysaccharide gevormd. Afgezien van het eindstandige fructose heeft dit zogeheten K4-polysaccharide dezelfde structuur als chondroïtine. Dit polysaccharide wordt vervolgens gescheiden van de biomassa, waarna het fructose wordt verwijderd. Door een reeks van verschillende bewerkingen met gebruikelijke technieken wordt het chondroïtine, als natriumzout, gezuiverd. Hieraan worden tenslotte sulfaatgroepen geplaatst door chemische synthese en wordt het grondig gezuiverde chondroïtinesulfaat (natriumzout) gedroogd tot poeder.

Het dossier bevat een schematisch overzicht van de drie onderdelen van het proces. Van elke fase (fermentatie, downstream verwerking en chemische sulfatering) beschrijft de aanvrager duidelijk de verschillende bewerkingen voorzien van de relevante

chemische en technische details (Gno15, Gno15a, Gno16). Volgens de aanvrager is het aannemelijk dat, als gevolg van al deze bewerkingen, het productieorganisme afwezig is in het eindproduct. Dit wordt niet alleen onderbouwd met resultaten van microbiologische analyses van zes productbatches (2012 – 2013), ook is de afwezigheid van het DNA van het productieorganisme bevestigd in deze batches.

De commissie VNV meent dat de beschrijving van het productieproces voldoende informatie bevat en dat dit geen aanleiding tot bedenkingen geeft. Over het gebruikte antischuimmiddel merkt zij op dat de aanvrager niet kan bevestigen of dit van levensmiddelenkwaliteit is. De aanvrager verklaart echter niet bezorgd te zijn over achtergebleven resten van dit middel, omdat alle sporen voldoende worden verwijderd tijdens het zuiveringsproces (Gno16). De commissie VNV deelt deze mening. Zij heeft geen reden te twifelen aan de kwaliteit van het chondroïtinesulfaat. Tijdens het proces worden kritieke parameters systematisch gecontroleerd en voor alle relevante parameters zijn grenswaarden vastgelegd in de specificatie.

3.3 III Achtergrondinformatie over het als bron voor het voedingsmiddel gebruikte organisme

De aanvrager beschrijft duidelijk de algemene kenmerken van het productieorganisme *E. coli* O5:K4:H4 stam U1-41 (ATCC 23502). Deze *E. coli* stam is afkomstig van de officiële kweekverzameling van de Universiteit van Göteborg (Zweden). Het dossier bevat een ondertekende verklaring van de beheerder waarin behalve de herkomst, ook expliciet staat vermeld dat de bacterie niet genetisch gemodificeerd is (Gno15, Gno15a). Het dossier noemt verder dat voor de genotypische karakterisatie een analyse is uitgevoerd van een specifiek deel van het kapsel-gen-cluster. Dit deel omvat onder andere het zogeheten kfoC-gen, dat codeert voor het enzym chondroitine synthase. De aanvrager noemt dat *E. coli* niet is opgenomen in de lijst met soorten micro-organismen waarvan EFSA veronderstelt dat die veilig aan levensmiddelen kunnen worden toegevoegd ('QPS approach'). Het dossier bevat daarom een evaluatie van eventuele toxicogene eigenschappen van de productiestam. Uit DNA analyse van deze stam bleek dat de genen die coderen voor bekende toxinen en virulentiefactoren niet aanwezig zijn. De aanvrager concludeert dat de *E. coli* O5:K4:H4 stam U1-41 daarom veilig kan worden gebruikt voor de productie van het precursor polysacharide van chondroïtinesulfaat.

De commissie VNV is het eens met de aanvrager en vindt dat er op dit punt voldoende informatie is verstrekt.

3.4 IX Verwachte opname en gebruiksfrequentie van het voedingsmiddel

De aanvrager noemt dat het nieuwe chondroïtinesulfaat alleen zal worden toegepast als ingrediënt van voedingssupplementen. Het is bedoeld als alternatief voor traditionele producten met chondroïtinesulfaat uit dierlijke bronnen en de voorgestelde dagelijkse dosering is ten hoogste 1,2 g.

De commissie VNV constateert dat de dosering van het nieuwe chondroïtinesulfaat vergelijkbaar is met die van bestaande producten en heeft verder geen opmerkingen over het voorgestelde gebruik.

3.5 X Informatie op basis van eerdere blootstelling van de mens aan het voedingsmiddel of zijn bron

Volgens de aanvrager heeft chondroïtinesulfaat, veelal samen met glucosamine, als ingrediënt van voedingssupplementen, een lange geschiedenis van gebruik in de EU. Ter illustratie worden vier representatieve producten beschreven. De fabrikanten adviseren om 1,2 g per dag te gebruiken.

De commissie VNV merkt op dat de aanvrager de dierlijke herkomst van de geselecteerde producten niet heeft gespecificeerd. Hoewel gestructureerde informatie ontbreekt over ervaringen met langdurig gebruik van bestaande voedingssupplementen, constateert de commissie VNV dat dit blijkbaar niet leidt tot gezondheidsproblemen. De informatie in het dossier over blootstelling aan het nieuwe chondroïtinesulfaat bij mensen beperkt zich tot een onderzoek naar de biologische beschikbaarheid van een eenmalige dosis van 200 mg (zie verder hoofdstuk 3.8). Bijzonderheden zijn niet gerapporteerd.

3.6 XI Informatie over de voedingswaarde van het voedingsmiddel

Volgens de aanvrager is er vanuit voedingskundig oogpunt geen verschil tussen het nieuwe chondroïtinesulfaat product en de bestaande preparaten afkomstig van dierlijk weefsel. Deze traditionele vormen van chondroïtinesulfaat kennen een gevarieerde structuur (afhankelijk van diersoort en weefseltype), maar de basisonderdelen zijn telkens hetzelfde en dat geldt eveneens voor het product van deze aanvraag. Het dossier benadrukt dat als gevolg van de chemische sulfatering van het bacterieel 'chondroïtine', dit nieuwe product beter is gestandaardiseerd dan chondroïtinesulfaat uit traditionele bronnen dat veel natuurlijke variatie vertoont.

De commissie VNV heeft geen opmerkingen over de voedingswaarde.

3.7 XII Microbiologische informatie over het voedingsmiddel

Volgens de aanvrager zijn een viertal microbiologische parameters relevant voor het biosynthetisch chondroïtinesulfaat, te weten standaard kiemgetal, gisten en schimmels, *E. coli* en *Salmonella* sp. Men hanteert hiervoor de normen die zijn vastgelegd in de Europese farmacopee voor chondroïtinesulfaat geïsoleerd uit dierlijk weefsel. De aanvrager verstrekt analyse gegevens van drie productbatches uit 2013 waaruit blijkt dat aan deze microbiologische criteria kan worden voldaan.

Volgens de commissie VNV beheerst de aanvrager de microbiologische kwaliteit van chondroïtinesulfaat voldoende. De commissie VNV meent dat er geen reden is om bezorgd te zijn voor microbiologische gevaren, ook niet met betrekking tot het productieorganisme. Zo wordt de aanwezigheid van micro-organismen door de productbewerkingen tijdens de fabricage waaronder een hittebehandeling, geminimaliseerd. Ook zijn, zoals eerder is besproken in hoofdstuk 3.3, geen virulentiefactoren aangetoond, evenmin levende *E. coli* bacteriën of DNA van de productiestam.

3.8 XIII Toxicologische informatie over het voedingsmiddel

De aanvrager noemt dat geen ernstige bijwerkingen zijn gerapporteerd in onderzoeken naar de mogelijke werkzaamheid van chondroïtinesulfaat uit dierlijke bronnen bij patiënten met artrose. In klinisch onderzoek dat twee of drie jaar duurde, was de hoogste dagelijkse dosis 1,2 gram en dit werd goed verdragen door verschillende patiëntengroepen. Verder licht de aanvrager toe waarom het nieuwe product even veilig is als de traditionele chondroïtinesulfaat preparaten met als belangrijkste argumenten a) de overeenkomst tussen beide typen chondroïtinesulfaat, en b) de veiligheid van het productieorganisme en -proces. Aanvullend heeft de aanvrager toxicologisch onderzoek met het eigen product uitgevoerd ter onderbouwing van de veiligheid. De hierbij gebruikte teststoffen zijn afkomstig van industriële productbatches uit 2011 en 2012, en de verschillende onderzoeken werden uitgevoerd volgens OECD richtlijnen.

Het dossier bevat een toxicologisch onderzoek naar de gevolgen van herhaalde blootstelling gedurende 90 dagen van ratten aan het chondroïtinesulfaat van de aanvrager, dat direct in de maag werd toegediend. De geteste doseringen waren 0, 250, 500 en 1000 mg/kg BW/d. Bij geen van de behandelingen was er sprake van voortijdige sterfte en evenmin van klinische verschijnselen die met de blootstelling aan de teststof zouden samenhangen. Verder werden tussen de testgroepen en de controlegroep geen statistisch significante verschillen opgemerkt in lichaamsgewicht en voerinnname, of bij onderzoek van het oog (ophthalmoscopie) en van urine. Het dossier vermeldt verscheidene statistisch significante verschillen tussen de testgroepen en controlegroep, die zich voordeden bij het onderzoek aan bloed (standaard biochemische en hematologische kenmerken) en ook in de gewichten van bepaalde organen. Vervolgens beargumenteert de aanvrager waarom deze veranderingen niet toxicologisch relevant zijn. Verder beschouwt de aanvrager alle zichtbare afwijkingen en histopathologische bevindingen aan organen en weefsels als hetzij toevallig, hetzij als leeftijdsafhankelijke veranderingen die in vergelijkbare mate voorkomen in de controles en behandelde groepen. Gebaseerd op deze onderzoeksresultaten concludeert de aanvrager dat de NOAEL ('No Observed Adverse Effect Level') gelijk is aan de hoogst geteste dosis omdat hierbij geen behandelingsgerelateerde effecten zijn waargenomen.

De aanvrager heeft de eventuele genotoxiciteit van het chondroïtinesulfaat product onderzocht en bespreekt de resultaten van drie *in vitro* mutageniteitsonderzoeken. Elk van deze testen werd uitgevoerd zowel met en zonder metabole activatie door S9-homogenaat. Op basis van de terugmutatietest (Ames) met bacteriestammen van *Salmonella typhimurium* en *Escherichia coli*, concludeert de aanvrager dat chondroïtinesulfaat geen puntmutaties induceert. Ook bleek chondroïtinesulfaat niet mutageen in het onderzoek met zoogdiercellen (L5178Y-muizenlymfoomcellen). Tenslotte lieten resultaten van de *in vitro* chromosoom aberratietest zien dat chondroïtinesulfaat geen chromosoomafwijkingen veroorzaakt in de onderzochte zoogdiercellen (Chinese hamster ovarium cellen).

Voor zover de aanvrager heeft kunnen nagaan zijn er geen meldingen van allergische reacties of ernstige bijwerkingen van chondroïtinesulfaat beschreven in de wetenschappelijke literatuur. Over het algemeen wordt chondroïtinesulfaat als niet allergeen beschouwd volgens de aanvrager. Ook meent de aanvrager dat de hoeveelheid

eiwit in het nieuwe product verwaarloosbaar is en dat men daarom niet bezorgd is voor allergene effecten.

De commissie VNV is van mening dat in het dossier en de aanvullende informatie voldoende gegevens zijn verstrekt om te concluderen dat het beoogde gebruik van chondroïtinesulfaat van de aanvrager veilig is. De commissie VNV wijst, in aanvulling op het uitgebreide onderzoek bij mensen waar de aanvrager aan refereert (Verbruggen *et al*, 2000), op een meer recent overzichtsartikel van Henrotin en co-auteurs (Hen10). Dit bevat onder andere een grondige evaluatie van verschillende onderzoeken bij mensen met pijnlijke gewrichten (artrose). Deze auteurs concluderen dat er geen ernstige bijwerkingen zijn waargenomen bij mensen die aan hoge doseringen chondroïtinesulfaat werden blootgesteld. Hoewel specifieke informatie over het sulfateringspatroon van de geconsumeerde producten ontbreekt in de publicaties van Verbruggen(2000) en Henrotin(2010), vindt de commissie VNV dat deze resultaten het veilig gebruik van chondroïtinesulfaat bij de mens voldoende onderbouwen.

Volgens de aanvrager zal het nieuwe product zich in het lichaam niet anders gedragen dan chondroïtinesulfaat uit dierlijke bronnen. Dit wordt in het dossier toegelicht aan de hand van uiteenlopende onderzoeken met proefdieren en ook enkele trials bij mensen. Sommige onderzoeken suggereren dat door hydrolyse in het maag-darmkanaal voornamelijk het ongesulfateerde chondroïne systemisch beschikbaar komt (Gno16). Van de informatie over absorptie en metabolisme van verschillende vormen chondroïtinesulfaat lijkt de relevantie voor de mens beperkt, omdat veel onderzoek volgens de commissie VNV lastig is te interpreteren. Dit geldt ook voor het onderzoek naar de biologische beschikbaarheid bij mensen dat is uitgevoerd met het product van de aanvrager en uitgebreid beschreven in Bijlage N van het dossier (Gno15, Gno15b). Hiervan is recent alleen een zeer beknopte samenvatting gepubliceerd (Mir16). De commissie VNV meent dat dit onderzoek geen toegevoegde waarde heeft voor de beoordeling van de veiligheid, omdat zij twijfelt aan de betrouwbaarheid van de farmacokinetische analysemethoden die zijn gebruikt (Gno15b, Gno16).

De commissie VNV meent dat eventuele toxiciteit voldoende is onderzocht in modelsystemen en proefdieren. Nadelige effecten zijn niet waargenomen wat afwezigheid van toxicologisch relevante verontreinigingen bevestigt. Verder noemt zij dat in het subchronisch onderzoek met ratten, significante verschillen werden geconstateerd voor bepaalde parameters tussen de testgroepen en controlegroep. Omdat het hier veelal om marginale effecten ging, werden deze verschillen volgens de commissie VNV terecht als niet relevant beoordeeld, ook omdat histopathologische afwijkingen uitbleven. Wel tekent de commissie VNV hierbij aan dat de samenvatting van het subchronisch onderzoek met ratten in de kerntekst van het dossier, niet voor alle details een correcte weergave is van de resultaten. De commissie VNV heeft zich gebaseerd op de bijlage met het volledige onderzoeksrapport. Hoewel de aanvrager in het subchronisch onderzoek met ratten extra metingen van het gehalte van de immunoglobulinen IgG, IgA en IgE heeft gedaan, volstaan dergelijke analyses volgens de commissie VNV niet om te kunnen concluderen dat een specifieke immunologische reactie achterwege blijft.

De commissie VNV merkt op dat in zijn algemeenheid voor chondroïtinesulfaat producten (ongeacht de herkomst) geldt, dat er weinig inzicht is in de biologische eigenschappen, en dat betrouwbaar onderzoek bij de mens ontbreekt. Zij is echter

bekend met verschillende wetenschappelijke publicaties die suggereren dat specifieke typen chondroïtinesulfaat bijzondere eigenschappen zouden hebben. Op verzoek van de commissie VNV heeft de aanvrager daarom toegelicht of biologische, en in het bijzonder immunologische, effecten te verwachten zijn bij blootstelling aan het nieuwe product vanwege het relatief hoog gehalte chondroïtine 6-sulfaat (Gno16). De commissie VNV is het eens met de aanvrager dat er geen aanwijzingen zijn dat het nieuwe chondroïtinesulfaat leidt tot ongewenste veranderingen in het immuunsysteem (Gno16). Echter subtiele effecten, die ook zouden kunnen optreden bij de producten die al op de markt zijn, kunnen niet volledig worden uitgesloten.

De commissie VNV stelt vast dat op grond van de gegevens in mensen er geen reden tot bezorgdheid is over de veiligheid van het nieuwe chondroïtinesulfaat. Dit wordt ondersteund door subchronisch onderzoek bij ratten.

Executive summary

The applicant company, Gnosis, has submitted a safety dossier on chondroitin sulphate, which is solely intended for use as an ingredient for food supplements. This chondroitin sulphate is produced biosynthetically. It is based on a fermentation product derived from a specific strain of the bacterium *Escherichia coli*. That product is first purified, then chemically sulphated.

The applicant has supplied details of the similarities between the novel product and traditional forms of chondroitin sulphate (isolated from animal tissue), which are already available on the market. The VNV Committee takes the view that there are differences between the novel form of chondroitin sulphate and existing products, and that the current product specification adequately presents the characteristics of the novel product (see page 28 of this advisory report). By analysing several batches of chondroitin sulphate, the applicant has demonstrated that it is possible to achieve consistent production according to this specification.

During the production process, which is clearly described in the dossier, critical parameters are systematically monitored. Furthermore, limit values for all relevant parameters are defined in the product specification. The stability of the product has also been confirmed experimentally. Accordingly, it appears that the quality of the chondroitin sulphate product has been safeguarded.

The Committee has determined that, in nutritional terms, there is no difference between the novel chondroitin sulphate product and existing preparations from animal sources. Very limited information is available concerning the absorption and metabolism of various forms of chondroitin sulphate, partly because – according to the VNV Committee – this type of research is difficult to interpret. Toxicological tests carried out on the applicant's chondroitin sulphate have shown that the product is not genotoxic. Also, in a 90-day study in rats, no adverse effects were observed at doses of up to 1000 mg of chondroitin sulphate per kg of body weight per day. This exposure is 50 times higher than the proposed maximum daily dose (1200 mg) for users of the novel chondroitin sulphate. The VNV Committee concludes that the applicant's chondroitin sulphate can be safely used in food supplements. This conclusion is based on the following arguments. The most important of these is that the novel product has been well characterised and is of high purity. Furthermore, large numbers of people have already been using all kinds of chondroitin sulphate preparations (derived from animal tissue) for lengthy periods of time, and this has not been shown to cause health problems. Accordingly, there is no reason to be concerned about the safety of the applicant's specific preparation. This view is supported by experimental animal studies.

1 Introduction

The Novel Foods Unit (NFU) of the Medicines Evaluation Board Agency advises the Ministry of Health, Welfare and Sport regarding the safety of novel foods. This advice is given within the context of the European approval procedure for novel foods, which is set out in EU Regulation 258/97 (EU97). This document is the report of a so-called initial assessment, carried out in accordance with this procedure. The text of the report was drawn up by the Novel Foods Unit, in close consultation with the Committee on Safety Assessment of Novel Foods (VNV Committee). The composition of this committee is appended to this report.

On 26 June 2015, the NFU received the safety dossier for the product chondroitin sulphate (Gno15). At the request of the NFU, the applicant submitted detailed information about the production process in September 2015 (Gno15a) and about studies in human subjects in November of that year (Gno15b). In response to a formal request by the VNV Committee, the applicant company submitted additional information in April, July and September of 2016 (Gno16, Gno16a, Gno16b). The applicant subsequently informed the NFU (in November 2016) about a modification to the specification (Gno16c). The VNV Committee last discussed the dossier when it met on 29 November 2016. This document, the report of its findings, was adopted in the committee meeting of 11 April 2017.

2 Completeness and accuracy of the dossier

2.1 Administrative data

The applicant company is Gnosis S.p.A (Via Laboratori Autobianchi 1, 20832 Desio (MB), Italy).

2.2 General description of the food

This application concerns the sodium salt of chondroitin sulphate¹. Chondroitin sulphate is a sulphated glycosaminoglycan. Compounds of this type consist of a polymer chain of alternating sugar derivatives, i.e. N-acetylgalactosamine and glucuronic acid. When bound to protein, these glycosaminoglycans make up an essential component of the extracellular matrix in human and animal tissues. For instance, chondroitin sulphate is one of the key components of cartilage.

The chondroitin sulphate that is the subject of this application (referred to as Mythocondro in the dossier) is produced biosynthetically. It is based on a fermentation product derived from a specific strain of the bacterium *Escherichia coli*. The present proposal is restricted to the use of chondroitin sulphate in food supplements.

2.3 Classification of the food for assessment

According to the applicant, the novel ingredient falls into category d 'Foods and food ingredients consisting of, or isolated from, micro-organisms, fungi or algae', in conformity with the regulation regarding novel foods (EC97). Part I of European Commission Recommendation 97/618 (EC97a) defines six classes of novel foods, as a basis for compiling the safety dossier. The applicant feels that the novel product belongs in class 2 (Complex novel food from non-GM source), more specifically, in sub-class 2.2 as the source of the novel food has no history of food use in the Community.

The VNV Committee concurs with this view.

2.4 Information on the food

The information necessary for assessment of the safety of the food for consumption, in sub-class 2.2, was specified based on the following themes, which are prescribed in European Commission Recommendation 97/618 (EC97a).

- I Specification of the novel food
- II Effects of the production process applied to the food
- III History of the organism used as the source of the food
- IX Anticipated intake and extent of use of the food
- XI Nutritional information on the food
- XII Microbiological information on the food
- XIII Toxicological information on the food

¹ In this report, the term 'chondroitin sulphate' refers both to the product that is the subject of this application (the sodium salt of chondroitin sulphate) and to chondroitin sulphate in general.

In the dossier, the applicant discusses the above themes and has also added a section on theme X, from the European recommendation 'Information from previous human exposure to the novel food or its source'. That section discusses the use of existing chondroitin sulphate products. The VNV Committee takes the view that the dossier and the additional information contain sufficient information for an assessment of the safety of the novel ingredient to be carried out. The VNV Committee has also consulted the scientific literature.

2.5 Brief summary by the applicant

The dossier contains a summary which is appended to this report (Gno17). Copies of this summary have also been sent to the other EU Member States, as required under Regulation (EC) no. 258/97 (EC97).

2.6 Other assessments

In the United States, the Food and Drug Administration accepted in March, 2017, a GRAS (Generally Recognized As Safe) notice submitted by the applicant company Gnosis (see number 666 on the list of applications, available via <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices>).

2.7 Applicant's labelling proposal

Labelling should conform to European Regulation 1169/2011 (EC11). In addition, Article 8 of Regulation (EC) No. 258/97 (EC97) is usually applied to the extent that at least the presence of a novel food is indicated on the label. It should be noted that, in the Netherlands, the labelling of foods is not assessed by the Novel Foods Unit, but by the Regular Consultation Meetings on the Consumer Goods Act.

The dossier contains no proposals with regard to labelling. However, the applicant has indicated it will be clearly stated on the packaging that the ingredient (chondroitin sulphate) is derived from microbial fermentation (Gno16). The VNV Committee points out that, in animal feed, a more specific designation is used for the very same product.²

² "(subtitle) Product obtained by sulphation of chondroitin derived from microbial fermentation". The applicant makes reference to this designation in the additional information dated 6 April 2016 (Gno16, see reference to European Feed Business Sector Representatives (2016)).

3 Interpretation and evaluation of data submitted

3.1 I Specification of the novel food

In the dossier, the applicant gives comprehensive details of the characteristics and composition of the chondroitin sulphate in question. This substance is produced biosynthetically. A fermentation product synthesised by *Escherichia coli* 05:K4:H4 is first purified and then chemically sulphated. According to the applicant, the novel chondroitin sulphate is similar in composition to the chondroitin sulphate extracted from animal cartilage, which is a common component of various food supplements that have long been available on the market. Accordingly, analytical details of similar traditional products derived from birds, bovine and marine animals have also been included in the dossier.

The dossier includes a comprehensive discussion of the identity and structure of chondroitin sulphate. Chondroitin sulphate is a linear polymer of repeating disaccharide units comprised of glucuronic acid and N-acetylgalactosamine linked by $\beta(1 \rightarrow 3)$ bonds. The number and position of the sulphate group (or groups) per unit varies, so – in terms of its structure – the chondroitin sulphate that is naturally present in humans and animals, consists of a heterogeneous group of compounds. In general, the majority of the disaccharide units contain a single sulphate group.

The applicant company has conducted various types of analysis to identify its own chondroitin sulphate. The structure of the polymers was confirmed by infrared spectroscopy and $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. This is illustrated in the dossier by representative spectra. The applicant states that the site-selective chemical sulphation of the bacterial polysaccharide (which, aside from the terminal fructose, is identical to eukaryotic chondroitin) results in the formation of a consistent mixture of polysaccharides – the chondroitin sulphate. To demonstrate that the terminal fructose had been adequately removed, the $^{13}\text{C-NMR}$ spectra of the intermediate product (bacterial ‘chondroitin’) from four production runs was compared to the spectrum of the corresponding chondroitin sulphate final product. In addition, the sulphation pattern of three batches of chondroitin sulphate was examined in detail, using high-performance liquid chromatography. The polymers consist mainly of mono-sulphated disaccharide units, about 83% of which are sulphated at the C6 position on N-acetylgalactosamine (Gno15, Gno16). This is hereinafter referred to as a chondroitin 6-sulphate (which corresponds to ‘ $\Delta\text{Di-6S}$ ’ in the dossier). In addition, roughly 10% of the disaccharides are not sulphated at all, while about 6% contain two sulphate groups.

The product specification in the dossier, which relates to the chondroitin sulphate final product in dried form, states that the values measured for the total content of chondroitin sulphate must not deviate from 100% by more than 5% (Gno15). Aside from various physico-chemical characteristics, the specification gives limit values for weight loss on drying, and for residue on ignition. The VNV Committee takes the view that the original description did not adequately reflect the fundamental characteristics of biosynthetic chondroitin sulphate. In response, the applicant has increased the number of parameters in the specification to include the sulphation pattern (stated as a maximum concentration of chondroitin 6-sulphate) and the substance’s molecular weight (range of the weight

average and number average, and dispersity³) (Gno16, Gno16a). The specification also includes limit values for protein concentrations and possible endotoxin contamination, as well as for the total concentration of residues of organic compounds used as processing aids. The specification for specific optical rotation was later modified by the applicant, such that the values measured for the most recently produced batches also fall within the range. Detailed accompanying explanatory notes have been added to the dossier (Gno16c). For clarity, the revised specification proposed by the applicant has been appended to this advisory report.

The applicant has provided details of the analyses (in accordance with the full product specification) carried out on seven individual batches of chondroitin sulphate, produced in 2015 and 2016 (Gno16a; Gno16c), in addition to the three batches from 2013 for which data had already been presented in the original dossier (Gno15, Gno16). The applicant states that all of these products were manufactured on a commercial scale (Gno16c). All the measured values were within specifications (except for the concentrations of organic compounds in the products from 2013; see the VNV Committee's comments below).

The applicant discusses the possible presence of impurities related to the production process. This concerns specific organic impurities, proteins and endotoxins for which limits are defined in the specification. In addition, tests are carried out to check that any residual chloride and sulphate in the chondroitin sulphate final product do not exceed the limits used by the applicant. The test results for the three product batches from 2013 are presented in the dossier. These batches were also analyzed for the presence of the heavy metals arsenic, cadmium, lead and mercury. According to the applicant, contaminants of this kind could originate from external sources. All of the measured values were fully compliant with the standard used by the applicant. The applicant's own limit values for lead and cadmium are lower than the statutory limit values for food supplements. Their limit value for mercury is identical to the regulatory standard (there is no such standard for arsenic). The VNV Committee takes the view that the possible presence of various heavy metals does not pose any health risks. Any residual chloride and sulphate will not be harmful.

The dossier contains information about the stability of chondroitin sulphate. Material taken from three batches (which had been produced on a commercial scale in 2011 and 2012) was stored under standard conditions (at a temperature of 25°C and at 60% humidity) for two years, and examined at regular intervals. In addition, material was stored at a temperature of 40°C and at 75% humidity, to see whether this resulted in accelerated breakdown. In both cases, there was no visible decrease in chondroitin sulphate content during the test period. Neither were there any changes in the product's appearance and infrared spectrum, nor in the levels of impurities and residue on ignition.

The VNV Committee has determined that the composition of the chondroitin sulphate is sufficiently clearly described in the dossier and defined in the product specification (see annex). This includes characteristic information about the sulphation pattern and about the size of the polymers (including their dispersity). According to the VNV Committee,

³ The polydispersity of the polymer is a measure of the breadth of the distribution of the molecular weights plotted as a distribution curve (the number of molecules with a given molecular weight as a function of molecular weight).

thorough analyses of several batches of chondroitin sulphate show that the novel product consists almost exclusively of chondroitin sulphate. This also shows that the chemical synthesis is highly reproducible and that it results in a consistent sulphation pattern, with a high chondroitin 6-sulphate content. In addition to the identification of chondroitin sulphate, the product specification contains limit values for relevant contaminants. For this reason, the VNV Committee takes the view that the product is adequately specified.

A major focal point for the VNV Committee concerned the residues of organic compounds used as processing aids in the chemical conversion of chondroitin to chondroitin sulphate. No limits for the level of residues in foods have been established for any of these compounds. The VNV Committee was particularly concerned about a possible health risk posed by a residue of one of the processing aids. For this reason, the applicant has reduced the upper limit for the concentration of this specific organic compound in the final product such that no safety risk is to be expected at the proposed daily intake of 1.2 g of chondroitin sulphate as a food supplement. The applicant used the TTC limit value (Threshold of Toxicological Concern, EFSA16) when calculating this maximum concentration, as no safety data is available for this particular substance. The VNV Committee accepts this as a basis for the definitive limit value. Furthermore, the analytical methods used for the various processing aids are sufficiently sensitive to reliably determine whether the concentrations of these substances in the final product exceed the applicant's individual standards (Gno15, Gno16b).

In addition, it has come to the attention of the VNV Committee that the residual levels of endotoxin in most of the product batches tested was at least an order of magnitude lower than the limit value cited in the specification. Pointing out that there are no statutory upper intake levels for endotoxin contaminants in foods, the applicant argues that this upper limit does not involve any safety risks (Gno16). The Committee accepts this.

Finally, the VNV Committee takes the view that sufficient information has been provided about the stability of the novel product.

3.2 II Effects of the production process applied to the food

The initial step in the production of the chondroitin sulphate that is the subject of this application involves the synthesis of a capsular polysaccharide by *E. coli* O5:K4:H4, during fermentation. Apart from the terminal fructose, this K4 polysaccharide has the same structure as chondroitin. This polysaccharide is then separated from the biomass, after which any fructose is removed. In a series of processing steps, the chondroitin is purified (in the form of its sodium salt) by means of conventional techniques. Finally, sulphate groups are added by chemical synthesis and the highly purified chondroitin sulphate (sodium salt) is dried to powder form.

The dossier contains a schematic overview of the three parts of the process. The applicant has provided a clear description of each phase (fermentation, downstream processing and chemical sulphation), together with the relevant chemical and technical details (Gno15, Gno15a, Gno16). According to the applicant, as a result of all these processing steps, the production organism will not, in all likelihood, be present in the final product. This is supported by the results of microbiological analysis of six product batches (2012 – 2013). In addition, it has been confirmed that these batches contain no trace of the production organism's DNA.

The VNV Committee feels that the description of the production process contains sufficient information, and that this does not give rise to any concerns. It notes that the applicant is unable to confirm whether the anti-foaming agent used is of food grade. However, the applicant states that they have no concerns about any remaining residues of this agent, as all traces are effectively removed during the purification process (Gno16). The VNV Committee concurs with this view. It has no reason to doubt the quality of the chondroitin sulphate. During the process, critical parameters are systematically monitored, and the specification defines limit values for all relevant parameters.

3.3 III History of the organism used as the source of the food

The applicant clearly describes the general characteristics of the production organism, *E. coli* O5:K4:H4 strain U1-41 (ATCC 23502). This strain of *E. coli* is derived from the official culture collection of the University of Gothenburg (Sweden). The dossier contains a declaration signed by the collection's administrator, which – aside from giving details of the strain's origin – specifically states that the bacteria have not been genetically modified (Gno15, Gno15a). In addition, the dossier states that the process of genotypic characterisation included the analysis of a specific part of the capsule gene cluster. This part includes the *kfoC* gene, which codes for the enzyme chondroitin synthase. The applicant states that *E. coli* does not appear on the list of microbial species that, in the view of the European Food Safety Authority, can be safely added to food ('QPS approach'). Accordingly, the dossier contains an assessment of any potential toxigenic properties of the production strain. A DNA analysis showed that this strain contains no genes encoding for known toxins and virulence factors. Accordingly, the applicant concludes that *E. coli* O5:K4:H4 strain U1-41 can be safely used for the production of chondroitin sulphate's precursor polysaccharide.

The VNV Committee concurs with the applicant and considers that, with regard to this point, sufficient information has been provided.

3.4 IX Anticipated intake and extent of use of the food

The applicant states that the novel chondroitin sulphate will only be used as an ingredient in food supplements. It is intended as an alternative to traditional products containing chondroitin sulphate from animal sources. The proposed daily dose is no more than 1.2 g.

The VNV Committee notes that the dose of the novel chondroitin sulphate is comparable to that of existing products. It has no further comments on the proposed use.

3.5 X Information from previous human exposure to the food or its source

According to the applicant, chondroitin sulphate has a long history of use in the EU as an ingredient of food supplements (usually in combination with glucosamine). For the purposes of illustration, four representative products are described. The manufacturers recommend using 1.2 g per day.

The VNV Committee notes that the applicant has not specified the animal origin of the selected products. While there is no structured information concerning experience with the long-term use of existing food supplements, the VNV Committee concludes that this

apparently does not cause health problems. The information in the dossier about human exposure to the novel chondroitin sulphate is limited to a study of the bioavailability of a single dose of 200 mg (see section 3.8). Nothing unusual was reported.

3.6 XI Nutritional information on the food

According to the applicant, from the nutritional point of view there is no difference between the novel chondroitin sulphate product and existing preparations derived from animal tissue. These traditional forms of chondroitin sulphate have a varied structure (depending on the animal species and tissue type involved), but the basic components are always the same. The same is true of the product that is the subject of this application. The dossier emphasises that, due to the chemical sulphation of the bacterial 'chondroitin', this novel product is more standardized than chondroitin sulphate from traditional sources, which displays considerable natural variation.

The VNV Committee has no comments regarding nutritional value.

3.7 XII Microbiological information on the food

According to the applicant, four microbiological parameters are relevant to the biosynthetic chondroitin sulphate. These are standard plate count, yeast and moulds, *E. coli* and *Salmonella* sp. The standards used for this purpose are those laid down in the European Pharmacopoeia for chondroitin sulphate that has been isolated from animal tissues. The applicant has provided test data on three product batches dating from 2013, showing that they comply with these microbiological criteria.

The VNV Committee takes the view that the applicant adequately manages the microbiological quality of chondroitin sulphate. The VNV Committee feels that – particularly with regard to the production organism – there is no reason to be concerned about possible microbiological hazards. For instance, the way in which the product is processed during production (which includes heat treatment) minimises the presence of microorganisms. Nor (as previously discussed in section 3.3) were any virulence factors, live *E. coli* bacteria, or DNA fragments from the production strain detected.

3.8 XIII Toxicological information on the food

The applicant states that no severe adverse effects have been reported in studies of the possible efficacy of chondroitin sulphate from animal sources in arthritis patients. In one clinical trial that lasted two or three years, the highest daily dose (1.2 g) was well tolerated by various patient groups. The applicant's main arguments in support of their contention that the novel product is just as safe as traditional chondroitin sulphate preparations are a) the similarities between the two types of chondroitin sulphate, and b) the safety of the production organism and the production process. In addition, the applicant company has carried out toxicological tests on its own product, to confirm its safety. The test substances used for this purpose were derived from industrial product batches dating from 2011 and 2012, and the various tests were conducted in accordance with OECD guidelines.

The dossier includes details of a 90-day toxicological study, in rats, of the effects of repeated exposure to the applicant's chondroitin sulphate, which was administered

directly into the stomach. The test doses used were 0, 250, 500, and 1000 mg/kg BW/d. None of these treatments resulted in premature mortality, nor were there any clinical signs that might be associated with exposure to the test substance. In addition, no statistically significant differences were found between the experimental groups and the control group in terms of weight and feed intake. The same was true of eye examinations (ophthalmoscopy) and urine tests. The dossier does report several statistically significant differences between the experimental groups and the control group in terms of blood tests (standard biochemical and haematological characteristics) and the weights of certain organs. The applicant then puts forward various arguments in support of the view that these changes have no toxicological relevance. In addition, the applicant considers all of the histopathological observations and visible abnormalities of organs and tissues to be either incidental or age-related changes that occur to a similar extent in both the control group and the treated groups. Based on these study findings, the applicant concludes that the NOAEL ('No Observed Adverse Effect Level') is equal to the highest dose tested, as no treatment-related effects were observed at this dose.

The applicant has investigated the potential genotoxicity of the chondroitin sulphate product. An evaluation is included of the results of three *in vitro* mutagenicity studies. Each of these tests was carried out both with and without metabolic activation by S9 homogenate. Based on the reverse mutation assay (Ames), using strains of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*, the applicant concludes that the chondroitin sulphate does not induce point mutations. A mammalian-cell study (using L5178Y mouse lymphoma cells) also showed that chondroitin sulphate was not mutagenic. Finally, the results of the *in vitro* chromosome aberration test showed that chondroitin sulphate caused no chromosomal abnormalities in the mammalian cells tested (Chinese hamster ovary cells).

As far as the applicant has been able to ascertain, the scientific literature contains no reports of allergic reactions or severe adverse effects associated with chondroitin sulphate. According to the applicant, chondroitin sulphate is generally considered to be non-allergenic. The applicant company also takes the view that the novel product contains negligible amounts of protein, so it has no concerns about possible allergenic effects.

The VNV Committee takes the view that sufficient data has been provided in the dossier and in the additional information to conclude that the intended use of the applicant's chondroitin sulphate is safe. In addition to the extensive study in human subjects to which the applicant refers (Verbruggen *et al*, 2000), the VNV Committee points to a more recent review article by Henrotin and co-authors (Hen10). This includes a thorough evaluation of several studies in people with osteoarthritis. The authors conclude that no severe adverse effects were observed in subjects who were exposed to high doses of chondroitin sulphate. Although the publications by Verbruggen (2000) and Henrotin (2010) include no specific details about the sulphation pattern of the products consumed, the VNV Committee feels that these results provide sufficient evidence that the use of chondroitin sulphate in humans is safe.

According to the applicant, the novel product will not behave any differently in the body than chondroitin sulphate from animal sources. This is illustrated in the dossier on the basis of a wide range of experimental animal studies, as well as a few trials in humans. Some studies suggest that hydrolysis in the gastro-intestinal tract would mainly

produce unsulphated chondroitin, which would then become systemically available (Gno16). The information concerning the absorption and metabolism of various forms of chondroitin sulphate appears to be of only limited relevance to humans, because – according to the VNV Committee – much of the associated research is difficult to interpret. The same applies to the study into bioavailability in humans, which was carried out using the applicant's product and which is described in detail in Annex N of the dossier (Gno15, Gno15b). A very concise summary of this study was recently published (Mir16). Due to its doubts concerning the reliability of the pharmacokinetic analysis methods used, the VNV Committee feels that this study has no added value in terms of the assessment of safety (Gno15b, Gno16).

The VNV Committee feels that any potential toxicity has been sufficiently investigated in model systems and experimental animals. No adverse effects were observed, which confirms that no toxicologically relevant contaminants are present. In addition, the Committee states that, in the sub-chronic study in rats, significant differences in certain parameters were observed between the experimental groups and the control group. As they often involved marginal effects, these differences were – in the VNV Committee's view – rightly assessed as being irrelevant. This view is supported by the absence of histopathological abnormalities. In this connection, however, the VNV Committee notes that, in the main text of the dossier, some details in the summary of the subchronic study in rats are not a correct representation of the actual results. The VNV Committee's views in this matter are based on the annex containing the full report of the study in question. As part of the subchronic study in rats, the applicant carried out additional measurements of immunoglobulin (IgG, IgA, and IgE) concentrations. However, the VNV Committee takes the view that analyses of this kind are not sufficient to support the conclusion that there is no specific immune response.

The VNV Committee notes that, for chondroitin sulphate products in general (regardless of their origin), little is known about their biological properties, nor have any reliable studies in human subjects been carried out. However, it is aware of several scientific publications suggesting that specific types of chondroitin sulphate have unusual properties. Accordingly, at the request of the VNV Committee, the applicant has provided an explanation about whether any biological (and, more particularly, immunological) effects can be expected to result from exposure to the novel product, given its relatively high concentration of chondroitin 6-sulphate (Gno16). The VNV Committee concurs with the applicant that there is no evidence that the novel chondroitin sulphate will lead to any adverse changes in the immune system (Gno16). However, the existence of very subtle effects (which could also be induced by products that are already on the market) cannot be completely ruled out.

Based on data from human subjects, the VNV Committee has concluded that the safety of the novel chondroitin sulphate is not a cause for concern. This is supported by sub-chronic studies in rats.

Product specification

A Dutch language version of the product specification proposed by the applicant is not included.

(Van de productspecificatie die de aanvrager voorstelt, is geen Nederlandstalige versie opgenomen in dit advies.)

Parameter	Gnosis' Chondroitin Sulphate Sodium
Appearance	White to off-white powder
Identification	
- Infrared	Positive
- Sodium	Positive
Chondroitin sodium sulphate content (% dry basis)	95 to 105
Clarity and Colour of Solution (5% aqueous solution - Absorbance at 420 nm)	≤ 0.35
Specific optical rotation (3% aqueous solution)	-2 to -12
Intrinsic viscosity (m ³ /kg)	0.01 to 0.15
MWw (weight avg.) (kDa)	12 to 5
MWn (number avg.) (kDa)	11 to 4
Dispersity (w _h /w _{0.05})	≤ 0.7
Sulphation pattern (ΔDi-6S) (%)	≤ 85
pH (1% aqueous solution)	5.5 to 7.5
Loss on drying (%) (105°C to constant weight)	≤ 10.0
Residue on ignition (% dry basis)	20.0 to 30.0
Protein (% dry basis)	≤ 0.5
Endotoxins (EU/mg)	≤ 100
Total organic impurities (mg/kg)	≤ 50

Literatuur / Literature

- EC97 Verordening (EG) nr. 258/97 van het Europees Parlement en de Raad van 27 januari 1997 betreffende nieuwe voedingsmiddelen en nieuwe voedselingredienten. Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen 1997; L43: 1-6.
(Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients. Official Journal of the European Communities 1997; L43: 1-6.)
- EC97a Aanbeveling (EG) nr. 97/618/EG van de Commissie van 29 juli 1997 betreffende de wetenschappelijke aspecten en de presentatie van de informatie die nodig is om aanvragen voor het in de handel brengen van nieuwe voedingsmiddelen en nieuwe voedselingredienten te ondersteunen alsmede het opstellen van de verslagen van de eerste beoordeling uit hoofde van Verordening (EG) nr. 258/97 van het Europees Parlement en de Raad. Publicatieblad van de Europese Gemeenschappen 1997; L253: 1-36.
(97/618/EC - Commission Recommendation of 29 July 1997 concerning the scientific aspects and the presentation of information necessary to support applications for the placing on the market of novel foods and novel food ingredients and the preparation of initial assessment reports under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Communities 1997; L253: 1-36.)
- EC11 Verordening (EU) nr. 1169/2011 van het Europees Parlement en de Raad van 25 oktober 2011 betreffende de verstrekking van voedselinformatie aan consumenten, tot wijziging van Verordeningen (EG) nr. 1924/2006 en (EG) nr. 1925/2006 van het Europees Parlement en de Raad en tot intrekking van Richtlijn 87/250/EEG van de Commissie, Richtlijn 90/496/EEG van de Raad, Richtlijn 1999/10/EG van de Commissie, Richtlijn 2000/13/EG van het Europees Parlement en de Raad, Richtlijnen 2002/67/EG en 2008/5/EG van de Commissie, en Verordening (EG) nr. 608/2004 van de Commissie.
(Regulation (EU) No 1169/2011 of the European Parliament and of the Council of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) No 608/2004.)
- EFSA16 European Food Safety Authority and World Health Organization (Event report). Review of the Threshold of Toxicological Concern (TTC) approach and development of new TTC decision tree, 2016.
<https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/1006e>
- Gno15 Application for the Approval of Chondroitin Sulphate Sodium as a Novel Food Ingredient in the European Union Pursuant to Regulation (EC) No 258/97. Gnosis S.p.A., 25 June 2015.
- Gno15a Additional information concerning the production process of Gnosis' Chondroitin Sulphate Sodium, in response to questions by the Dutch Novel Foods Unit. Gnosis S.p.A., 23 September 2015.
- Gno15b Additional information as requested by the Dutch Novel Foods Unit. Appendix 16.2.5 (Compliance and/or concentration data) of Appendix N 'Bioavailability of MYTHOCONDRO [Unpublished Study Report]' of the dossier. Gnosis S.p.A., 5 November 2015.
- Gno16 Response to the additional data request by the VNV Committee for Gnosis' Chondroitin Sulphate Sodium Novel Food Application. Gnosis S.p.A., 6 April 2016.

- Gno16a Additional Information as requested by the VNV Committee to Support the Application for the Approval of Chondroitin Sulphate Sodium as a Novel Food in the EU. Gnosis S.p.A., 27 July 2016.
- Gno16b Additional information on organic impurities as requested by the VNV Committee (analytical validation documents). Gnosis S.p.A., 22 September 2016.
- Gno16c Additional information on Chondroitin sulfate, revision of specification limit for the specific optical rotation (SOR) parameter. Gnosis S.p.A., 18 November 2016 (final version). This information was completed with certificates of Analysis of four recent batches, received 8 November 2016.
- Gno17 Summary document, revised. Gnosis S.p.A., 6 January 2017.
- Hen10 Henrotin Y, Mathy M, Sanchez C, Lambert C. Chondroitin sulfate in the treatment of osteoarthritis: from in vitro studies to clinical recommendations. In: Ther Adv Musculoskelet Dis 2010; 2(6): 335–348, en beschikbaar via http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3383492/pdf/10.1177_1759720X10383076.pdf.
- Mir16 Miraglia N, Bianchi D, Trentin A, Volpi N, Soni MG. Safety assessment of non-animal chondroitin sulfate sodium: Subchronic study in rats, genotoxicity tests and human bioavailability. Food Chem Toxicol. 2016; 93: 89-101.

De commissie / The Committee

- Prof. dr. G.J. Mulder, *voorzitter / chairman*
emeritus hoogleraar toxicologie, Universiteit Leiden
professor emeritus toxicology, Leiden University
- Prof. dr. C.A.F.M. Bruijnzeel-Koomen, *adviseur / advisor* (tot 1-1-2017)
hoogleraar dermatologie/allergologie; UMC Utrecht
professor of dermatology/allergology; University Medical Centre Utrecht
- Dr. ir. M. Dekker
levensmiddelentechnoloog; Wageningen Universiteit en Researchcentrum
food technologist; Wageningen University and Research Centre
- Dr. ir. E.J. Kok
toxicoloog; RIKILT Instituut voor Voedselveiligheid, Wageningen
toxicologist; RIKILT, Institute of Food Safety, Wageningen
- Dr. C.F. van Kreijl
moleculair-bioloog (gepensioneerd); RIVM Bilthoven
molecular biologist (retired); National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven
- Dr. F.M. Nagengast
MDL-arts (gepensioneerd); UMC St Radboud, Nijmegen
gastroenteroloog (retired); University Medical Centre St Radboud, Nijmegen
- Dr. ir. J.M.A. van Raaij
voedingsfysioloog (gepensioneerd); Wageningen Universiteit en Researchcentrum;
RIVM Bilthoven
food physiologist (retired); Wageningen University and Research Centre; National
Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven
- Dr. G.J.A. Speijers
toxicoloog (gepensioneerd); RIVM Bilthoven
toxicologist (retired); National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven
- Dr. ir. E.H.M. Temme
voedingskundige; RIVM Bilthoven
nutritional expert; National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven
- Drs. A.I. Vilorio Alebesque, *adviseur / advisor*
Ministerie van VWS, Den Haag
Ministry of Health, Welfare and Sport, The Hague
- Prof. dr. R.A. Woutersen
hoogleraar translationele toxicologie / toxicologisch patholoog; TNO Kwaliteit van
Leven, Zeist
professor translational toxicology / toxicologic pathologist; TNO Quality of Life, Zeist
- Prof. dr. ir. M.H. Zwietering
hoogleraar levensmiddelenmicrobiologie; Wageningen Universiteit en

Researchcentrum
professor food microbiology; Wageningen University and Research Centre

Bureau Nieuwe Voedingsmiddelen, CBG/ Novel Foods Unit, MEB

- H.W. Buitenhuis, M.Sc., *regulatory project officer*
- Dr. C.M.A. van Rossum, *beoordelaar voedselveiligheid / scientific assessor food safety*
- Dr. ir. M. Rutgers, *beoordelaar voedselveiligheid / scientific assessor food safety*
- Drs. E. van Galen, *hoofd BNV / head NFU*

**Application for the Approval of
Chondroitin Sulphate Sodium**

Under

***Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and the
Council of 27 January 1997 Concerning Novel Foods and Novel
Food Ingredients***

NON-CONFIDENTIAL SUMMARY

Gnosis S.p.A.
Via Laboratori Autobianchi 1
20832 Desio (MB)
Italy

25 June 2015

Revised 5 January 2017

Application for the Approval of Chondroitin Sulphate Sodium

Under

Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and the Council of 27 January 1997 Concerning Novel Foods and Novel Food Ingredients

Table of Contents

	Page
INTRODUCTION	4
ADMINISTRATIVE DETAILS	5
Applicant Details.....	5
I SPECIFICATION OF THE NOVEL FOOD	5
Identity and Specifications	5
Analytical Data	8
Manufacturing Impurities and External Contaminants.....	10
Stability.....	11
II EFFECT OF THE PRODUCTION PROCESS APPLIED TO THE NOVEL FOOD.....	13
Production Process and Controls	13
Comparison of the Production Process of MYTHOCONDRO to Traditional Chondroitin Sulphate from Animals.....	13
III HISTORY OF THE ORGANISM USED AS THE SOURCE OF THE NOVEL FOOD.....	13
IX ANTICIPATED INTAKE/EXTENT OF USE OF THE NOVEL FOOD.....	14
Anticipated Scope of Use	14
Exposure Assessment.....	14
X INFORMATION FROM PREVIOUS HUMAN EXPOSURE TO THE NOVEL FOOD OR ITS SOURCE	15
XI NUTRITIONAL INFORMATION ON THE NOVEL FOOD	15
Nutritional Equivalence of the Novel Food to the Traditional Chondroitin Sulphate	15
XII MICROBIOLOGICAL INFORMATION ON THE NOVEL FOOD.....	15
XIII TOXICOLOGICAL INFORMATION ON THE NOVEL FOOD.....	16
REFERENCES	18

List of Figures and Tables

Figure I-1	Representative ¹ H-NMR Spectrum of MYTHOCONDRO	6
Table I-2	Distribution of Disaccharide Species for 3 Batches of MYTHOCONDRO	7
Table I-3	Compositional Specification for Gnosis' MYTHOCONDRO and Comparison with Existing Animal-Derived Chondroitin Sulphate.....	8
Table I-4	Analysis of 3 Batches of Gnosis' MYTHOCONDRO and Comparison with Existing Animal-Derived Chondroitin Sulphate.....	9
Table I-5	Results of Related Polysaccharides, Sulphate, and Chloride Analyses for 3 Batches of MYTHOCONDRO	10
Table I-6	Results of Residual Total Organic Impurities Analysis for 3 Batches of MYTHOCONDRO	10
Table I-7	Analysis of Residual Protein for 3 Batches of MYTHOCONDRO	10
Table I-8	Results of Endotoxin Analyses for 3 Batches of MYTHOCONDRO Through the Manufacturing Process	11
Table I-9	Results of Heavy Metals Analyses for 3 Batches of MYTHOCONDRO	11
Table I.7-1	Stability of MYTHOCONDRO Under Real-Time and Accelerated Conditions.....	12
Table III -1	Taxonomic Classification of ATCC 23502	14
Table XII-1	Microbial Analysis for 3 Batches of MYTHOCONDRO	16

Application for the Approval of Chondroitin Sulphate Sodium

Under

Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and the Council of 27 January 1997 Concerning Novel Foods and Novel Food Ingredients

INTRODUCTION

Gnosis S.p.A. (hereafter 'Gnosis') wishes to market a chondroitin sulphate sodium (trade name MYTHOCONDRO) obtained by sulphation of the chondroitin sodium product of *Escherichia coli* O5:K4:H4 (*E. coli* O5:K4:H4) fermentation for use as an ingredient in food supplements in the European Union (EU).

Chondroitin sulphate is a linear polymer of differently sulphated repeating disaccharide units comprised of D-glucuronic acid (GlcA) and N-acetyl-D-galactosamine (GalNAc) linked by $\beta(1\rightarrow3)$ bonds. It is one of the major glycosaminoglycans that form part of the extracellular matrix of virtually all animal species and tissues. The product isolated from the cartilage of terrestrial and marine animal origin has a long history of use as an ingredient in food supplements in the EU. However, while chondroitin sulphate produced by sulphation of chondroitin sodium isolated from fermentation using *E. coli* O5:K4:H4 is compositionally comparable to the traditional food ingredient, it does not have a history of use as an ingredient in food supplement products in the EU. Thus, MYTHOCONDRO is considered to be "novel source" of chondroitin sulphate under Regulation (EC) No 258/97 (European Parliament and the Council of the European Union, 1997).

According to *Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients* (European Parliament and the Council of the European Union, 1997), MYTHOCONDRO would fall under category (d): "*foods and food ingredients consisting of or isolated from microorganisms, fungi or algae*". Furthermore, according to Section 4 of Commission Regulation 97/618/EC (Commission of the European Communities, 1997), MYTHOCONDRO belongs to Class 2.2: "*complex novel food from non-GM source; the source of the novel food has no history of food use in the Community*". While not normally considered for Class 2.2 ingredients, given that there is a substantial history of consumption of chondroitin sulphate from animal origin, information from previous human exposure to the novel food or its source was also examined as relevant to the safety evaluation.

ADMINISTRATIVE DETAILS

Applicant Details

Renzo Berna
Managing Director
Gnosis S.p.A.
Via Laboratori Autobianchi 1
20832 Desio (MB)
Italy

Telephone: +39.0362.48.84.62

Fax: +39.0362.48.84.38

Email: renzo.berna@gnosis-bio.com

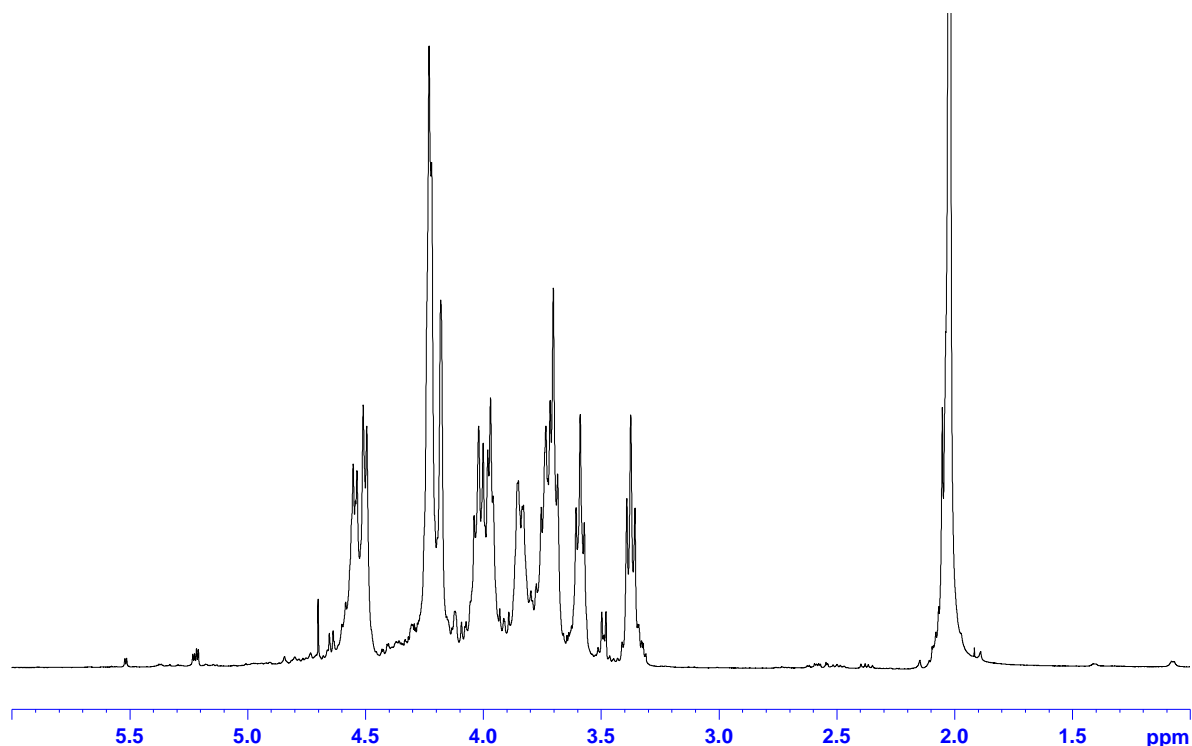
I SPECIFICATION OF THE NOVEL FOOD

Identity and Specifications

Chondroitin sulphate is characterised as a linear polymer of differently sulphated repeating disaccharide units comprised of GlcA and GalNAc linked by $\beta(1\rightarrow3)$ bonds. The basic structure of chondroitin sulphate is composed of repeating $[\rightarrow4\text{GlcA}\beta1\rightarrow3\text{GalNAc}\beta1\rightarrow]$ subunits. MYTHOCONDRO is a product of the sulphation of chondroitin sodium derived from the K4 polysaccharide precursor isolated from the fermentation of *E. coli* 05:K4:H4.

A representative ^1H NMR spectrum for MYTHOCHONDRO is provided in Figure I-1, which confirms the identity of the ingredient as chondroitin sulphate.

Figure I-1 Representative ¹H-NMR Spectrum of MYTHOCONDRO



δ (ppm)	Multiplicity	N. of H	Assignment
2.0	S	3	CH ₃ CO-
3.3-3.4	M	1	-CH-(G2)
3.5-3.6	M	1	-CH-(G3)
3.65-3.90	M	3(*)	-CH-(G5,G4,A3) and -CH ₂ -(A6 un-sulphated) (lower amount)
3.9-4.1	M	2	-CH- (A5) and (-CH-) (A2)
4,1-4.3	M	3	-CH ₂ - (A6, sulphated) and -CH-(A4)
4.45-4.60	M	2	-CH- (A1,G1)

"A" signal refers to GalNAc residue and "G" signals refer to GlcA residue. *-CH₂- signals of un-sulphated GalNAc residue at C-6 present in small amount are included in the range.

High performance liquid chromatography (HPLC) analysis of MYTHOCONDRO confirms the consistency and regioselectivity of the synthetic sulphation process. MYTHOCONDRO consists primarily of mono-sulphated disaccharides (>80%), of which the 6-sulphated GalNAc species is the predominant form (>80%) and un-sulphated disaccharides are present at low levels ranging from 9.6 to 11.2% (Table I-2).

Disaccharide Species	Analytical Data (%)		
	Batch GN47 13D13DS	Batch GN47 22+23L13DS	Batch GN47 24M13DS
$\sum\Delta S0$	10	10	11
$\sum\Delta S1$	83	84	82
$\sum\Delta S2$	6	6	6
$\sum\Delta S3$	1	1	0
$\Delta Di-0S$	10.2	9.6	11.2
$\Delta Di-4S$	0.0	0.2	0.2
$\Delta Di-6S$	82.5	83.1	81.7
$\Delta Di-2S$	0.3	0.4	0.4
$\Delta Di-4,6diS$	1.5	1.5	1.4
$\Delta Di-2,4diS$	0.0	0.2	0.0
$\Delta Di-2,6diS$	4.5	4.4	4.9
$\Delta Di-2,4,6triS$	1.0	0.5	0.2

$\Delta Di-0S$ = un-sulphated chondroitin; $\Delta Di-4S$ = 4-sulphated chondroitin; $\Delta Di-6S$ = 6-sulphated chondroitin; $\Delta Di-2S$ = 2-sulphated chondroitin; $\Delta Di-4,6diS$ = 4,6-disulphated chondroitin; $\Delta Di-2,4diS$ = 2,4-disulphated chondroitin; $\Delta Di-2,6diS$ = 2,6-disulphated chondroitin; $\Delta Di-2,4,6triS$ = 2,4,6-trisulphated chondroitin; $\Delta S0$ = un-sulphated disaccharides; $\Delta S1$ = monosulphated disaccharides; $\Delta S2$ = disulphated disaccharides; $\Delta S3$ = trisulphated disaccharides.

The capsular K4 polysaccharide precursor isolated from *E. coli* O5:K4:H4 is structurally identical to the un-sulphated chondroitin of eukaryotic origin, with the exception of a terminal furanose residue of fructose. The β -linked terminal fructose residue is removed in the downstream production of MYTHOCONDRO and the absence of significant residual amounts of fructose (ranging from 1.2 to 2.1%) has been confirmed by ^{13}C -NMR spectroscopy for chondroitin sodium.

The compositional specifications for MYTHOCONDRO are presented in Table I-3 and are comparable to the specifications established by the European Pharmacopeia for chondroitin sulphate sodium. The specifications are also comparable to the specifications for Gee Lawson and Frutarom's chondroitin sulphate of animal origin which may be considered reflective of the food ingredient marketed in the EU. The only exception where a deviation is noted is for specific optical rotation which differs slightly from the values established by the European Pharmacopeia. The specific optical rotation of a particular chondroitin sulphate ingredient will be a direct reflection of its sulphation pattern and structural conformation, and as such, will vary with source and is not considered pertinent to safety. MYTHOCONDRO is structurally well-defined with a consistent molecular weight distribution, conformation and sulphation pattern.

Non-Confidential Summary

Parameter	European Pharmacopeia Standards ¹	Gnosis' Chondroitin Sulphate Sodium (MYTHOCONDRO)	Animal-Derived Chondroitin Sulphate ²		
			Gee Lawson		Frutarom
			Marine	Avian	Bovine
Appearance	White or almost white powder	White to off-white powder	White to off-white powder	White to off-white powder	White to off-creamy powder
Identification IR Sodium	Positive Positive	Positive Positive	NS NS	Positive Positive	Positive NS
Chondroitin sodium sulphate content (% dry basis)	95 to 105	95 to 105	>90	>90	>90
Clarity and Colour of Solution	NS	≤0.35	NS	≤0.35	≤0.35
Specific optical rotation (°)	-20 to -30 (terrestrial origin) -12 to -19 (marine origin)	- 7.0 to - 19.0	-12 to -19	-20.0 to -30.0	-20 to -30
Intrinsic viscosity (m ³ /kg)	0.01 to 0.15	0.01 to 0.15	NS	NS	NS
pH	5.5 to 7.5	5.5 to 7.5	5.5 to 7.5	5.5 to 7.5	5.5 to 7.5
Loss on drying (%)	≤12	≤10.0	≤12.0	≤10.0	≤10.0
Residue on ignition (% dry basis)	NS	20.0 to 30.0	20.0 to 30.0	20.0 to 30.0	20.0 to 30.0

IR = infrared; NS = not specified

¹ Standards for chondroitin sulphate sodium.

² Derived from product specifications.

Analytical Data

MYTHOCONDRO is manufactured to a high purity (95 to 105%) that conforms to the established specifications and is comparable to the specifications laid down by the European Pharmacopeia for animal cartilage-derived chondroitin sulphate sodium as well as representative commercial products marketed by Gee Lawson and Frutarom (Table I-4).

Non-Confidential Summary

Parameter	European Pharmacopeia ¹	Gnosis MYTHOCONDRO				Animal-Derived Chondroitin Sulphate ²		
		Internal Specifications	Batch GN47 13D13DS	Batch GN47 22+23L13DS	Batch GN47 24M13DS	Gee Lawson		Frutarom
						Marine	Avian	Bovine
Appearance	White or almost white powder	White to off-white powder	Conforms	Conforms	Conforms	White to off-white powder	White to off-white powder	White to off-creamy powder
Identification IR Sodium	Positive Positive	Positive Positive	Positive Positive	Positive Positive	Positive Positive	NS NS	Positive Positive	Positive NS
Chondroitin sodium sulphate content (% dry basis)	95 to 105	95 to 105	100.3	102.2	103.1	>90	>90	>90
Clarity and Colour of Solution	NS	≤0.35	0.18	0.03	0.05	NS	≤0.35	≤0.35
Specific optical rotation (°)	-20 to -30 (terrestrial origin) -12 to -19 (marine origin)	-7.0 to -19.0	-7.3	-10.7	-11.3	-12 to -19	-20.0 to -30.0	-20 to -30
Intrinsic viscosity (m ³ /kg)	0.01 to 0.15	0.01 to 0.15	0.02	0.01	0.01	NS	NS	NS
pH	5.5 to 7.5	5.5 to 7.5	6.6	6.8	6.9	5.5 to 7.5	5.5 to 7.5	5.5 to 7.5
Loss on drying (%)	≤12	≤10.0	3.4	8.4	8.6	≤12.0	≤10.0	≤10.0
Residue on ignition (%)	NS	20.0 to 30.0 dry basis	24.6	24.3	24.0	20.0 to 30.0	20.0 to 30.0	20.0 to 30.0

IR = infrared; NS = not specified

¹Standards for chondroitin sulphate sodium. ²Derived from product specifications.

Non-Confidential Summary

Manufacturing Impurities and External Contaminants

MYTHOCONDRO is manufactured by sulphation of chondroitin sodium produced by fermentation using *E. coli* O5:K4:H4, rather than being directly isolated from animal cartilage, generating a consistent, highly purified and standardised ingredient. It is anticipated that this ingredient will meet or exceed the quality of the ingredients isolated from animal cartilage which exhibit significant natural variation.

No impurities or contaminants were identified at levels of potential toxicological concern.

Related Substances, Sulphate and Chloride

Table I-5 Results of Related Polysaccharides, Sulphate, and Chloride Analyses for 3 Batches of MYTHOCONDRO					
Parameter	Specifications (%)		Analytical Data (%)		
	European Pharmacopeia (animal cartilage)	Gnosis' Product (MYTHOCONDRO)	Batch GN47 13D13DS	Batch GN47 22+23L13DS	Batch GN47 24M13DS
Related Substances (any individual impurity) ¹	≤2	≤2	Conforms	Conforms	Conforms
Sulphate	NS	≤0.24	0.06	0.01	0.01
Chloride	≤0.5	≤0.50	0.28	0.00	0.02

NS = not specified

¹ Measured by electrophoresis.

Organic Impurities Arising from the Sulphation Process

Table I-6 Results of Residual Total Organic Impurities Analysis for 3 Batches of MYTHOCONDRO				
Parameter	Gnosis Internal Specifications (mg/kg)	Analytical Data (mg/kg)		
		Batch no.		
		Batch GN47 13D13DS	Batch GN47 22+23L13DS	Batch GN47 24M13DS
Total organic impurities	≤100	71	65	78

Protein

Table I-7 Analysis of Residual Protein for 3 Batches of MYTHOCONDRO				
Parameter	Gnosis Internal Specification	Analytical Data (%)		
		Batch GN47 13D13DS	Batch GN47 22+23L13DS	Batch GN47 24M13DS
Protein	≤0.5% (dry basis)	Complies	Complies	Complies

Non-Confidential Summary

Endotoxins

Fraction	Internal Expected Value (EU/mg)	Analytical Data (EU/mg)		
		Batch no.		
		11/13-24	RB142052-1	RB142052-2
Chondroitin sodium intermediate	$\leq 10^3$	6.7×10^2	5.8×10^2	6.0×10^2
		GN47 13D13DS	GN47 22+23L13DS	GN47 24M13DS
Finished spray-dried MYTHOCONDRO	$\leq 10^2$	2.7	1.0	2.0

EU = endotoxin units.

Heavy Metals

Parameter	Regulatory Specifications ¹ (mg/kg)	Gnosis' Internal Specifications (mg/kg)	Analytical Data (mg/kg)		
			Batch GN47 13D13DS	Batch GN47 22+23L13DS	Batch GN47 24M13DS
Lead	≤ 3.0	≤ 1.0	0.030	0.015	0.010
Arsenic	NA ²	≤ 1.5	0.015	0.010	0.027
Cadmium	≤ 1.0	≤ 0.5	<0.005	<0.005	<0.005
Mercury	≤ 0.10	≤ 0.1	<0.005	<0.005	<0.005

¹The regulatory limits for heavy metals in food supplements as specified in Commission Regulation (EC) No 629/2008 amending Regulation (EC) 1881/2006 (Commission of the European Communities, 2008).

²No applicable regulatory specifications for food supplements. NA = not applicable

Stability

MYTHOCONDRO has been confirmed to be stable for a period of at least 24 months when stored in tight containers far from humidity. Chondroitin sulphate from animal-cartilage and sold commercially by Gee Lawson and Frutarom has a recommended shelf-life of 2 or 3 years depending on the source. The thermal decomposition of MYTHOCONDRO, as measured by thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC), show comparable behaviour to a representative terrestrial cartilage-derived chondroitin sulphate sodium ingredient meeting appropriate European Pharmacopeia specifications.

Non-Confidential Summary

Table I.7-1 Stability of MYTHOCONDRO Under Real-Time and Accelerated Conditions										
Gnosis Batch No.	Specification	Long-Term Stability Under Conditions of 25 ± 2°C, 60 ± 5% RH						Accelerated Stability Under Conditions of 40 ± 2°C, 75 ± 5% RH		
		Time (Months)								
		0	3	6	12	18	24	0	3	6
Appearance										
GN47 385N11DS	White to off-white powder	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms
GN47 389N11DS		Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms
GN47 100H12DS		Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms
Infrared Identification										
GN47 385N11DS	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
GN47 389N11DS		Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
GN47 100H12DS		Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive	Positive
Assay (% as sodium salt on dry basis)										
GN47 385N11DS	95 to 105	96.8	97.2	95.5	96.5	96.0	95.5	96.8	95.0	95.5
GN47 389N11DS		97.6	98.3	97.0	96.2	97.0	95.2	97.6	96.0	97.0
GN47 100H12DS		104.2	103.5	104.0	102.5	102.8	103.0	104.2	104.8	102.1
Electrophoretic Purity (%)										
GN47 385N11DS	Any individual impurity ≤2%	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms
GN47 389N11DS		Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms
GN47 100H12DS		Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms	Conforms
Loss on Drying (%)										
GN47 385N11DS	≤10.0	2.5	2.8	2.7	3.0	2.8	3.1	2.5	3.2	3.5
GN47 389N11DS		1.7	2.0	2.5	2.3	2.5	2.6	1.7	2.5	3.1
GN47 100H12DS		3.0	3.3	3.2	3.5	3.8	4.0	3.0	3.8	4.4

II EFFECT OF THE PRODUCTION PROCESS APPLIED TO THE NOVEL FOOD

Production Process and Controls

The production of MYTHOCONDRO requires the fermentative production of a capsular polysaccharide (K4 polysaccharide) from *E. coli* O5:K4:H4 which is structurally comparable to the un-sulphated chondroitin. The resultant K4 polysaccharide is then used as a precursor for downstream processing to isolate chondroitin sodium salt, prior to chemical synthesis and sulphation to produce MYTHOCONDRO.

MYTHOCONDRO is manufactured in a facility compliant with food safety systems standards. Process controls are utilised throughout production to monitor and maintain the quality of the final product in regards to manufacturing contaminants such as the source organism and its related impurities. No hazards are anticipated to arise from the use of *E. coli* O5:K4:H4 as the fermentation organism and no undesirable substances resulting from the fermentation organism (DNA, proteins, endotoxins) are present in the final MYTHOCONDRO product at any levels of toxicological concern

Comparison of the Production Process of MYTHOCONDRO to Traditional Chondroitin Sulphate from Animals

MYTHOCONDRO is produced from the sulphation of chondroitin sodium precursor derived from a well-controlled microbial source relative to the sulphated product obtained from animal cartilage. Chondroitin sulphate of animal origin is subject to variability and poor batch to batch reproducibility along with possible hygiene concerns such as the persistence and transmission of infective agents inherent to the source animals that could potentially occur when using animal tissues for the production of food products. In contrast, from a product quality perspective, MYTHOCONDRO is a consistent and standardised product manufactured under controlled production processes that permits isolation of a consistent chondroitin sodium intermediate with a well-defined molecular weight distribution and incorporates a chemical sulphation process that ensures that a standardised sulphation pattern is obtained. As such MYTHOCONDRO is a high quality consistent product that exhibits significantly less variability than the chondroitin sulphate derived from animal sources.

III HISTORY OF THE ORGANISM USED AS THE SOURCE OF THE NOVEL FOOD

The source microorganism used in the fermentation step of the manufacturing process of MYTHOCONDRO is *E. coli* O5:K4:H4 strain U1-41 (ATCC 23502). ATCC 23502 is a Gram-negative, rod-shaped, and non-spore-forming bacterium. It is an aerobic and facultative anaerobe and grows at an optimum temperature of 37°C.

Non-Confidential Summary

Class	Scientific Classification
Kingdom	<i>Prokaryota</i>
Division	<i>Bacteria</i>
Subdivision	<i>Proteobacteria</i>
Class	<i>Proteobacteria Gamma</i>
Order	<i>Enterobacteriales</i>
Family	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	<i>Escherichia</i>
Species	<i>Escherichia coli</i>
Subspecies	<i>E. coli</i> O5:K4:H4
Strain	U1-41

Genetic determinants for known toxins and virulence factors of *E. coli* were confirmed to be absent from ATCC 23502 used in the production of MYTHOCONDRO. Additionally, analyses for residual DNA, protein, and endotoxins in the final ingredient revealed that potential contaminants from the source organism were not a significant concern.

All raw materials and processing aids used in the manufacture of MYTHOCONDRO have been confirmed by the suppliers to not contain genetically modified organisms (GMOs) or materials derived from GMOs. *E. coli* O5:K4:H4 strain U1-41 (ATCC 23502) used as the fermentation organism in the production of Gnosis' MYTHOCONDRO is not derived from genetic engineering or modifications as confirmed by the Culture Collection, University of Gothenburg (CCUG).

IX ANTICIPATED INTAKE/EXTENT OF USE OF THE NOVEL FOOD

Anticipated Scope of Use

MYTHOCONDRO is intended for use as an alternative source of chondroitin sulphate to existing animal cartilage-derived products as an ingredient in food supplement products in the EU. MYTHOCONDRO is proposed for use at comparable levels to products already available on the market. As such, use of MYTHOCONDRO as an ingredient in food supplements would not exceed 1,200 mg/day.

Exposure Assessment

Given that MYTHOCONDRO is intended to be a direct replacement of animal-derived chondroitin sulphate as an ingredient in food supplements, there would be no change in exposure by the EU population to chondroitin sulphate from the proposed conditions of use of the novel ingredient. Thus, maximum intakes of 1,200 mg/day would be expected and similar to the existing intakes of chondroitin sulphate from traditional sources.

X INFORMATION FROM PREVIOUS HUMAN EXPOSURE TO THE NOVEL FOOD OR ITS SOURCE

Chondroitin sulphate has a long and established history of use as an ingredient in food supplement products in Europe and is commonly available for consumption at daily use-levels of 1,200 mg/day as recommended by the manufacturer. It is frequently used in conjunction with glucosamine sulphate, other functional ingredients and/or vitamins and minerals. Use-levels of up to 1,300 mg/day have also been identified.

XI NUTRITIONAL INFORMATION ON THE NOVEL FOOD

Nutritional Equivalence of the Novel Food to the Traditional Chondroitin Sulphate

Chondroitin sulphate isolated from animal cartilage and produced by sulphation of chondroitin sodium from *E. coli* O5:K4:H4 are both comprised of a repeating disaccharide unit of GlcA and GalNAc, which is primarily sulphated at the C-4 and C-6 positions of the GalNAc. Various other sulphation patterns have been observed in commercial products isolated from animal cartilage depending on the species, tissues, proteoglycan source, and physiological and pathological conditions. This structural heterogeneity in chondroitin sulphate from animal sources is well-recognised and documented; however, the basic constituents of chondroitin sulphate remain the same in that it is comprised of GlcA, GalNAc, and acetic and sulphuric acid in equimolar ratios. Thus, as MYTHOCONDRO is a highly purified product that does not differ substantially in its composition to existing chondroitin sulphate derived from animal sources, it is reasonable to conclude that there will be no significant differences in their nutritional value and MYTHOCONDRO is nutritionally comparable to chondroitin sulphate of animal origin.

XII MICROBIOLOGICAL INFORMATION ON THE NOVEL FOOD

MYTHOCONDRO is absent of microorganisms at levels considered to be a toxicological concern and the limits fall within the specifications established by the European Pharmacopeia for chondroitin sulphate sodium where *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and bile tolerant gram-negative bacteria would not be expected contaminants of an ingredient produced by fermentation and chemical sulphation rather than isolated from an animal cartilage source. No endotoxins were found to be present in the final ingredient at any levels of toxicological concern.

Non-Confidential Summary

Parameter	Units	Specifications		Analytical Data		
		European Pharmacopeia	Gnosis Internal	Gnosis's Product (batch no.)		
				GN47 13D13DS	GN47 22+23L13DS	GN47 24M13DS
Total viable aerobic count	CFU/g	$\leq 10^3$	$\leq 10^3$	1×10^3	4×10^2	$< 10^2$
Total yeasts and moulds	CFU/g	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$< 10^2$	1.3×10	$< 10^2$
<i>Salmonella sp.</i>	/1, 10, or 25g	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
<i>Escherichia coli</i>	/1, 10, or 25g	Negative	Negative	Negative	Negative	Negative
<i>Staphylococcus aureus</i>	/1, 10, or 25g	Negative	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	/1, 10, or 25g	Negative	-	-	-	-
Bile-tolerant gram-negative bacteria	/1, 10, or 25g	Negative	-	-	-	-

CFU = colony forming units

XIII TOXICOLOGICAL INFORMATION ON THE NOVEL FOOD

The equivalence of MYTHOCONDRO to the traditional counterpart (*i.e.*, chondroitin sulphate of animal origin) provides a baseline to which to facilitate the toxicological assessment. In general, chondroitin sulphate is well tolerated in human studies at doses up to 1,200 mg/day for 3 years and a risk assessment of chondroitin sulphate as a dietary ingredient in food supplements conducted by the Council of Responsible Nutrition concluded that the available human data were sufficient to establish an observed safe level of 1,200 mg/day. Given that MYTHOCONDRO is substantially equivalent to chondroitin sulphate of animal origin, it is reasonable to assume that the safety of MYTHOCONDRO will be comparable to existing chondroitin sulphate and no additional safety concerns are anticipated relative to the traditional counterpart.

The only difference in the safety of MYTHOCONDRO to its existing counterpart remains in the differing source organisms; however, *E. coli* O5:K4:H4 strain U1-41 (ATCC 23502) does not express virulence factors and toxins known to confer pathogenicity to *E. coli* strains and analyses have confirmed the absence of viable cells, DNA, and protein from the source organism in the final ingredient. The absence of endotoxins at any levels of toxicological concern was also confirmed in the final ingredient. Thus, no additional toxicological concerns are anticipated as a result of the use of this microorganism in the production of MYTHOCONDRO.

While the metabolic fate of orally administered chondroitin sulphate continues to be debated in the published literature, findings from human metabolism studies have shown that between 5 and 15% of chondroitin sulphate may be absorbed following oral administration

Non-Confidential Summary

depending on the dose, nature, and physiochemical properties of the chondroitin sulphate, with peak plasma levels occurring between 3 to 5 hours. However, uptake is primarily of smaller lower molecular weight oligosaccharides formed on hydrolysis of chondroitin sulphate during digestion. A comparative bioavailability and pharmacokinetic 2-way cross-over study was conducted in healthy human volunteers (12/sex, mean age of 37.4 ± 11.2 years) randomised into 2 groups to receive a single oral dose of MYTHOCONDRO (200 mg/capsule) or a reference formulation of chondroitin sulphate¹ (600 mg/capsule) (NOW® Foods, U.S.) at a total dose of 2,400 mg. The mean plasma chondroitin sulphate over time profile was comparable between MYTHOCONDRO and the reference formulation and no significant differences were observed in the peak plasma levels and time to peak between groups. Moreover, both compounds were observed to be absorbed systemically.

The safety of MYTHOCONDRO has been evaluated in a 90-day repeated-dose oral toxicity study in Sprague-Dawley rats (10/sex/group) conducted in accordance to Organisation for Economic Co-Operation and Development (OECD) Test Guideline No. 408 (OECD, 1998). No compound-related adverse effects were observed throughout the study at concentrations up to 1,000 mg/kg body weight/day. On this basis the no-observed-adverse-effect level of MYTHOCONDRO was determined to be 1,000 mg/kg body weight/day (highest dose tested). A series of mutagenicity and genotoxicity tests including the reverse mutation assay, *in vitro* chromosomal aberration test, and *in vitro* mammalian cell gene mutation test have consistently shown that MYTHOCONDRO does not induce mutagenic or genotoxic effects.

MYTHOCONDRO is not anticipated to be an allergenic concern. Adverse events identified in the published literature have only reported minor effects of chondroitin sulphate in human efficacy studies limited to an increase in intestinal gasses and soft stools with no reports of allergies. Furthermore, the protein content of the final ingredient is $\leq 0.5\%$. Given that MYTHOCONDRO is compositionally comparable to existing animal-derived chondroitin sulphate, the concern for allergenicity is minimal. Additionally, no changes in immunoglobulin (*Ig*)G, *Ig*A, or *Ig*E were observed in the 90-day repeated-dose oral toxicity study in rats to suggest that allergenicity is a concern.

Taken together, the safety of MYTHOCONDRO is supported by its substantial equivalence to chondroitin sulphate of animal origin in terms of its composition, nutritional value/metabolism, intended use, and levels of undesirable substances. Safety is further supported by product-specific toxicological studies conducted on MYTHOCONDRO. Thus, no safety concerns are anticipated under the intended use of MYTHOCONDRO as a direct replacement for the traditional chondroitin sulphate counterpart as an ingredient in food supplements.

¹ While the origin of the commercially representative chondroitin sulphate was not specified in the study report, Now Foods indicates that they only use bovine sources (<http://www.nowfoods.com/Quality/Do-Supplements-Work/M088946.htm> - NOW® Foods, 2014).

REFERENCES

- Commission of the European Communities. Commission Recommendation of 29 July 1997 concerning the scientific aspects and the presentation of information necessary to support applications for the placing on the market of novel foods and novel food ingredients and the preparation of initial assessment reports under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council (97/618/EC) [L253]. *Official Journal of the European Communities* 1997, 40: 1-36. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31997H0618:EN:HTML>.
- Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) No 629/2008 of 2 July 2008 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs [L173]. *Official Journal of the European Union* 2008, 51: 6-9. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32008R0629&qid=1415896866855>.
- European Parliament and the Council of the European Union. Regulation EC No 258/97 of the European Parliament and of the Council of 27 January 1997 concerning novel foods and novel food ingredients [L43]. *Official Journal of the European Communities* 1997, 40: 1-6. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:31997R0258&qid=1415897104676>.
- NOW® Foods. *Chondroitin Sulphate*. NOW® Foods, Bloomingdale (IL); 2014. Available from: <http://www.nowfoods.com/Quality/Do-Supplements-Work/M088946.htm>.
- OECD. Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. In: *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. (OECD Guideline no 408) [Updated & Adopted 21st September 1998]. Organisation for Economic Co-Operation and Development (OECD), Paris, France; 1998. Available from: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-408-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070707-en;jsessionid=1m6bvwpup322.delta.