



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE SALMONELLA MODIFICADA GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/24/05)

Título del ensayo

Ensayo clínico multicéntrico de fase I/II, abierto, de NECVAX-NEO1 en adición a una terapia de anticuerpos monoclonales anti-. PD-1 o anti-PD-L1 en pacientes con tumores sólidos, del promotor NEC Bio Therapeutics GmbH, del promotor Allucent S.L.

Organismo modificado genéticamente (OMG)

El OMG, NECVAX-NEO1, es una vacuna terapéutica oral basada en una cepa atenuada de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*; Serovar Typhi, cepa Ty21a que incorpora una secuencia de neoantígenos (mutaciones específicas del paciente) seleccionados por algoritmos.

Salmonella Typhi Ty21a se aisló mediante mutagénesis química aleatoria de la cepa Ty2, lo que condujo a la generación de múltiples mutaciones. Lo más importante es que la cepa Ty21a es completamente deficiente en la enzima uridina difosfato (UDP)-galactosa-4-epimerasa, pero también presenta mutaciones adicionales que conducen a niveles reducidos de enzimas involucradas en la síntesis de UDP-galactosa a partir de galactosa exógena. Además, la cepa Ty21a no puede sintetizar el polisacárido capsular Vi. Otras mutaciones dieron como resultado la auxotrofia de isoleucina y valina, la incapacidad de utilizar H₂S y la inactivación del gen *rpoS*, que en conjunto contribuyen a la avirulencia de Ty21a.

La proliferación depende de las condiciones de cultivo, como la composición del medio de cultivo, la temperatura, el pH y el contenido de oxígeno. Se ha demostrado en diferentes estudios que la cepa Ty21a es altamente susceptible a diversos estreses ambientales, como temperatura elevada, soluciones con alta osmolalidad, pH ácido o alcalino, soluciones con peróxidos o inanición. Se demostró que la cepa no podía sobrevivir en los tejidos, la sangre o las heces humanas. Se cree que la sensibilidad de la cepa a condiciones ambientales adversas se debe a múltiples mutaciones atenuantes, sobre todo el gen *rpoS*, que afectan a una variedad de elementos metabólicos y estructurales.

Modificación genética

Para la generación del banco de células maestras se utilizó como material de partida una cápsula de Typhoral[®] disponible comercialmente. La presencia de las mutaciones atenuantes fue confirmada en este *Master Cell Bank* mediante la secuenciación del genoma bacteriano.

La bacteria se modificó utilizando un plásmido diseñado específicamente para su uso en el desarrollo de vacunas de ADN. Se eliminaron las secuencias que no eran necesarias para la replicación en bacterias o para la expresión de proteínas recombinantes en células de mamíferos para limitar las secuencias de ADN con posible homología con el genoma humano y minimizar la posibilidad de integración cromosómica. Además, el gen de resistencia a la ampicilina fue reemplazado por el gen de resistencia a la kanamicina porque es menos probable que los antibióticos aminoglucósidos provoquen respuestas alérgicas en humanos. Para aumentar la estabilidad genética de la cepa de *Salmonella* transformada reduciendo la carga metabólica de las células huésped, el plásmido contiene un origen de replicación con un número de copias bajo.

El vector plasmídico, que se introduce en la bacteria mediante electroporación, contiene un promotor para expresión de alto nivel en células de mamíferos y un sitio de clonación múltiple para la inserción



del gen de interés. El inserto, la secuencia del poliepítipo, se clonó a continuación del promotor y es seguido por una señal de poliadenilación. Para un procesamiento óptimo de la secuencia del poliepítipo, el ADN complementario de una ubiquitina humana modificada se clona en el extremo N-terminal de la secuencia del poliepítipo. La ubiquitinación es un elemento utilizado con frecuencia para mejorar la presentación del antígeno MHC I a partir de plásmidos.

El ADN que codifica el péptido poliepítipo consta de hasta 20 neoepítipos específicos de tumores dispuestos como una cadena de cuentas. Estos antígenos tumorales surgen debido a mutaciones específicas en el ADN del tumor. Para identificar mutaciones específicas del tumor, se analiza una biopsia del tumor junto con una muestra de tejido sano del paciente (normalmente sangre) mediante técnicas de secuenciación de nueva generación (NGS). Los epítipos se ensamblan en una secuencia de poliepítipos separados por secuencias espaciadoras adecuadas necesarias para el procesamiento celular y la presentación óptima del antígeno.

El inserto es silencioso (sin transcripción/traducción) dentro del OMG, ya que el promotor ejerce su función sólo en células de mamíferos. La secuencia de inserción se expresa cuando el plásmido ingresa en las células presentadoras de antígenos en el tracto intestinal del paciente tras la administración oral del OMG.

Características del ensayo

La cepa atenuada de *Salmonella* actuará como portador para administrar el plásmido que contiene los neoantígenos a las células presentadoras de antígeno intestinal de pacientes con cáncer. La serie de eventos que conducen a la actividad biológica de NECVAX-NEO1 se puede resumir brevemente de la siguiente manera: las bacterias de *Salmonella* administradas por vía oral que llevan el plásmido de expresión que codifica los antígenos tumorales ingresan al huésped a través de las células M en el intestino. Después de la transcitosis, las bacterias son fagocitadas por células fagocíticas como los macrófagos y las células dendríticas. Los plásmidos de expresión se liberan y son seguidamente transferidos al citosol a través de un sistema de transporte específico o por fuga endosómica. El plásmido de expresión transloca al núcleo y se transcribe, lo que lleva a la expresión del antígeno en el citosol de la célula huésped. Los macrófagos infectados entran en apoptosis y son captados por células dendríticas espectadoras que presentan antígenos del material apoptótico vía MHC-I. Estas células presentadoras de antígeno activadas inducen células T CD8+ citotóxicas específicas de antígeno que posteriormente atacan a las células tumorales que expresan los antígenos tumorales.

El medicamento en investigación se administrará por vía oral.

El ensayo se realizará en el Hospital Fundación Jiménez Díaz, el Hospital Universitari Vall d'Hebron, el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago (CHUS) y el Institut Català d'Oncologia.

Evaluación del riesgo

-Estabilidad

No se ha informado de una reversión de *Salmonella* Typhi cepa Ty21a al tipo salvaje. Se ha demostrado que la cepa Ty21a mantiene las mutaciones genéticas que determinan su atenuación durante la fabricación en los últimos 25 años.

La reversión de NECVAX-NEO1 se considera muy improbable ya que no hay motivos para suponer que el plásmido extraño pueda promoverla. En consecuencia, el riesgo de reversión al tipo salvaje no es mayor en NECVAX-NEO1 que en la vacuna contra la fiebre tifoidea Ty21a, algo que nunca se ha observado según los datos publicados.



La estabilidad genética de la presencia del plásmido de expresión en el OMG se confirma para cada lote en las pruebas de liberación. Dichas pruebas constan de ensayos por análisis con enzimas de restricción y secuenciación del plásmido y el inserto. Las secuencias obtenidas y el patrón de bandas obtenidas tras los análisis de restricción se comparan con referencias control.

En el OMG VXM01 la cepa Ty21a se ha utilizado como portadora de un vector plasmídico que contienen un casete de expresión eucariota que codifica el gen del receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF). Se realizaron análisis microbiológicos del *Master Cell Bank* y varios lotes del producto farmacéuticos para cuantificar la cantidad de plásmidos por genoma bacteriano transformado de manera estable (es decir, por célula bacteriana) mediante qPCR. En este contexto, se describió que el número de plásmidos por genoma está en consonancia con la presencia en el plásmido de un origen de replicación de bajo número de copias. Como en el plásmido utilizado para obtener NECVAX-NEO1 solo el casete de expresión de neoantígeno es diferente del casete de expresión del plásmido que porta VXM01, se puede asumir un número de copias de plásmido similar por célula bacteriana en NECVAX-NEO1.

El nivel de expresión del nuevo material genético, es decir, de la secuencia de neoepítos, se determinó mediante análisis semi-cuantitativo en células eucariotas para el plásmido presente en los OMG VXM01, VXM04 (cuyo plásmido codifica el factor potenciador de megacariocitos, MSLN) y para VXM08 (cuyo plásmido codifica para la molécula de adhesión celular antígeno carcinoembrionario, CEACAM5). Teniendo en cuenta que estos plásmidos únicamente se diferencian del utilizado para obtener NECVAX-NEO1 por el casete de expresión, los resultados serían extrapolables.

-Efectos alérgicos o tóxicos

Se han administrado más de 1,4 millones de dosis de Ty21a en ensayos clínicos controlados y se han comercializado en todo el mundo más de 150 millones de dosis de vacuna contra la fiebre tifoidea viva oral Ty21a en la que está basado el producto NECVAX-NEO1. Se realizó una vigilancia activa de las reacciones adversas en un estudio piloto y en un subgrupo de un gran ensayo de campo. Las reacciones adversas detectadas fueron dolor abdominal, náuseas, dolor de cabeza, fiebre, diarrea, vómitos y erupción cutánea. La vigilancia poscomercialización ha revelado que las reacciones adversas son poco frecuentes y leves.

No se espera que el plásmido portador de la secuencia codificante para los neoepítos provoque efectos tóxicos.

-Biodistribución y transferencia

Se ha realizado un análisis de la biodistribución y eliminación de vectores bacterianos de muestras tomadas en estudios clínicos realizados con VXM01 y se considera que los datos serían aplicables a NECVAX-NEO1 al tratarse de la misma bacteria portadora.

En el primer estudio en humanos con VXM01 se tomaron diferentes fluidos corporales y excrementos (heces, orina, sangre, saliva y lágrimas) de todos los pacientes del estudio en el momento de la inclusión y en distintos días durante y después de la vacunación con VXM01. Se analizó la presencia de microorganismos portadores del plásmido. Solo se observó eliminación fecal después de la administración de VXM01 en porcentajes bajos de muestras de pacientes que habían sufrido intervenciones quirúrgicas de reducción de la longitud intestinal (como cirugía de baipás gástrico). En estos casos, la eliminación fue siempre transitoria y se resolvió en un día tras la administración de VXM01 sin la necesidad tratamiento antibiótico. En los pacientes tratados con VXM01 en los



distintos estudios (cáncer de páncreas, glioblastoma y cáncer colorrectal) no se detectó incidencia de transferencia horizontal de plásmido en ninguna de las muestras analizadas.

En conclusión, basándose en datos no clínicos y clínicos, se estima que la probabilidad de una transferencia horizontal del plásmido de la cepa portadora *Salmonella* Typhi Ty21a a otras bacterias en el tracto intestinal de los pacientes tratados, es baja.

Manipulación, control y tratamiento de residuos

La manipulación del OMG será realizada únicamente por profesionales sanitarios cualificados. Todo el personal del estudio, los cuidadores y los pacientes involucrados recibirán capacitación sobre las medidas de precaución higiénicas para evitar la propagación del OMG según lo estipulado en el protocolo del estudio y los procedimientos específicos del centro sanitario.

Por motivos de seguridad, la preparación completa y la reconstitución de la solución oral deben realizarse en cabina de seguridad biológica.

Los materiales de desecho serán destruidos de acuerdo con los procedimientos de los centros hospitalarios, como residuos con riesgo biológico.

El promotor establece las medidas de bioseguridad que debe aplicar el personal sanitario, como el uso y cambio frecuente de ropa de trabajo e higiene de frecuente de las manos, y los pacientes durante su estancia en el centro hospitalario y una vez que sean dados de alta.

En el caso de que se produzca cualquier incidencia o accidente se deberá informar de manera inmediata a la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB) y al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG).

CONCLUSIÓN: Se considera que en el estado actual de conocimientos y con las medidas de uso propuestas, este ensayo clínico no supone un riesgo significativo para la salud humana, la salud animal y/o el medio ambiente.

La CNB señala en que los laboratorios de los centros hospitalarios que manejen o analicen muestras de los pacientes deben aplicar medidas de bioseguridad para nivel de contención 2 (NCB2 o BSL-2).

Una vez concluido el ensayo, se remitirá un informe de resultados del mismo al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG) y a la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB), siguiendo el modelo de informe de resultados elaborado por la CNB, que se encuentra disponible en la [web del MITECO](#). En este informe se deberá incluir información sobre las posibles incidencias, si las hubiera. La remisión de esta información será condición indispensable para la concesión de futuras autorizaciones de ensayos con organismos modificados genéticamente.

Madrid a 21 de abril de 2024