



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* MODIFICADA GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/17/02)

Título del ensayo

Ensayo clínico en fase III, multicéntrico, doble ciego, controlado con placebo, de asignación aleatoria de ADXS11-001, administrado en adyuvancia después de completar la quimiorradioterapia, para el carcinoma del cuello del útero avanzado localmente de alto riesgo, después de la terapia de radiación y quimioterapia simultáneas.

Características del ensayo

ADXS11-001 es una inmunoterapia basada en una cepa de *Listeria monocytogenes*-listeriolysin O (*Lm-LLO*) atenuada para el tratamiento de cáncer asociado al virus del papiloma humano (HPV).

El mecanismo de acción propuesto es la estimulación de respuesta inmune innata y adquirida que inicie una respuesta coordinada anti-tumoral que genere de *novo* células T específicas frente a HPV-E7 capaces de infiltrarse y destruir el tumor.

Administración

Participarán aproximadamente 450 pacientes.

ADXS11-001 se administra por vía intravenosa, 1 x 10⁹ UFC, durante unos 60 minutos cada 3 semanas (semanas 1, 4 y 7), un total de 3 dosis (fase preliminar); posteriormente, los pacientes recibirán una dosis adicional cada 8 semanas (en las semanas 15, 23, 31, 39 y 47) un total de 5 dosis (fase de mantenimiento). El período de tratamiento total será de aproximadamente 1 año. Tras la administración del OMG los pacientes son aislados durante 4 horas. 72 horas después, los pacientes son tratados con antibióticos para eliminar la bacteria.

Los centros participantes son:

- Centro Integral Oncológico Clara Campal (CIOCC)
- Institut Català d'Oncologia (ICO) de l'Hospitalet de Llobregat -
- Hospital Duran i Reynals
- Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca
- Hospital Universitario Ramon y Cajal
- Hospital General Universitario de Elche
- Camí de l'Almazara, 11
- Hospital Universitario Central de Asturias
- Fundación Instituto Valenciano de Oncología (IVO)
- Hospital Universitari Vall d'Hebron
- Hospital Universitario Reina Sofía
- Hospital Son Llätzer
- Hospital Universitario Son Espases
- Institut Català d'Oncologia (ICO) de Girona
- Hospital Universitario Virgen de la Victoria
- Corporació Sanitària Parc Taulí
- Hospital de la Santa Creu i Sant Pau
- Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa



- Hospital Universitario Virgen del Rocío
- Hospital Universitario La Paz

Seguimiento

3 años de seguimiento para detectar una posible infección retardada por *Listeria*.

La fase de abordaje y vigilancia consistirá en un tratamiento de 6 meses de duración de trimetoprima/sulfametoxazol, ampicilina o el placebo correspondiente, para destruir las bacterias que aún hayan quedado en el organismo desde el tratamiento con ADXS11-001, administrado por vía oral, durante el cual se extraerán muestras de sangre a intervalos regulares para monitorizar el hemograma completo, el perfil metabólico completo (incluidas la PCR y la VES) y realizar hemocultivos. Estas pruebas se realizarán a todos los pacientes que hayan recibido al menos una dosis del tratamiento del ensayo.

Características del OMG

Organismo receptor

Cepa XFL-7 de *Listeria monocytogenes* atenuada por mutación del gen *prfA*.

El gen *prfA* es un factor de transcripción de distintos genes implicados en la virulencia de *L. monocytogenes*, entre los que se encuentra el gen *hly* que codifica la proteína Listeriolisina O (LLO) necesaria para el crecimiento intracelular y supervivencia de la bacteria. En la cepa XFL-7 el gen *prfA* ha sido delecionado eliminando la secuencia entre la posición 417 y 755 lo que deja una secuencia de 400 pb upstream y 200 pb downstream insuficiente para la recombinación con gen *prfA* que será introducido en el plásmido.

Organismo Genéticamente Modificado

La cepa XFL-7 ha sido modificada mediante transformación con el plásmido pGG55.

Este plásmido es portador de una versión mutada de *prfA* (mutación puntual D133V) que complementa en *trans* la deleción genómica y que codifica para una proteína menos activa que la silvestre en lo que respecta a la unión a ADN y activación de la transcripción de genes de virulencia y. Además, esta complementación asegura *in vivo* la retención del plásmido, es decir, las bacterias que pierden el plásmido no son viables *in vivo*.

Además, el plásmido codifica para una proteína de fusión antígeno-adyuvante bajo el control del promotor del gen *hly* constituida por el extremo C-terminal de la listeriolisina (tLLO listeriolisina truncada) unida a la secuencia de la proteína E7 del papilomavirus humano de tipo 16 (HPV-16). El gen resultante *hly-e7* se transcribe en una proteína de fusión de 48,7 kDa (tLLO-E7).

El plásmido codifica también para las proteínas que confieren resistencia a cloroanfenicol.

La mutación de *prfA* afecta también a la expresión de esta proteína de fusión, disminuyendo su expresión, ya que es un activador de *hly*.

Para la liberación del producto final se realizan los siguientes análisis: confirmación de la presencia de la mutación puntual en el gen *prfA* del plásmido y verificar que no se haya producido la reversión, confirmación de la secreción de la proteína de fusión antígeno-adyuvante utilizando los anticuerpos frente a tLLO y E7, cuantificación del número de copias del plásmido por genoma y antibiograma para confirmar resistencia al cloranfenicol.



Identificación de riesgos potenciales

-Reversión de la mutación.

La delección de la secuencia genómica de *prfA* disminuye la posibilidad de recombinación homóloga con el gen *prfA* del plásmido (la secuencia homóloga se reduce a unos 300pb). Además, no se ha observado *in vivo* y es estadísticamente muy improbable debido al número limitado de generaciones antes de que *Listeria* sea eliminada por el sistema inmunológico. Además se confirma su presencia antes de la liberación del producto.

-Transferencia de material genético

No se ha observado la transferencia del plásmido cuando se ha cultivado conjuntamente la cepa XFL-7 de *L. monocytogenes* portadora del plásmido pGG55 con otras bacterias tales como *E. coli*. La probabilidad de transferencia genética a otras bacterias o células eucariotas es baja debido a la falta de mecanismos de transferencia genética por parte de

-Virulencia

In vitro, el plásmido es retenido por selección con cloranfenicol mientras que la complementación de *prfA* está inactivada. *In vivo*, el plásmido es retenido por el sistema de complementación *prfA* sin presión selectiva con cloranfenicol.

El plásmido recombinante se mantiene estable *in vitro* e *in vivo*. La estabilidad *in vitro* del plásmido ha sido evaluada cultivando las bacterias en presencia y en ausencia de presión de selección, utilizando cloranfenicol. Se ha verificado que el plásmido es estable durante 70 generaciones cuando se cultiva en ausencia de presión selectiva (cloranfenicol). *In vivo*, utilizando ratas y ratones, el cultivo en placa de las bacterias aisladas en bazo ha mostrado que no existe diferencia significativa en la viabilidad bacteriana con o sin presión selectiva, lo que indica que el plásmido se conserva *in vivo* hasta la eliminación de las bacterias por parte del sistema inmunitario. La mutación del gen *prfA* también ha demostrado ser estable durante las 70 generaciones de crecimiento en ausencia presión selectiva.

Además, se examinó el efecto en la virulencia y la inmunogenicidad de Lm-LLOE7 mediante pases por ratón. Tras más de cuatro pases, la bacteria portadora del plásmido pGG55 no mostró incremento en la virulencia o inmunogenicidad después del segundo pase. El aumento observado inicialmente en el primer y segundo pase es común para las cepas de *Listeria* que han sido manipuladas *in vitro*. Una vez que se alcanzó la máxima virulencia, no se observaron incrementos adicionales indicando estabilidad de la cepa vacunal, sin la aparición de mutantes más virulentos similares a la cepa silvestre.

Además el cultivo repetida *in vitro* de la cepa vacunal no ha originado ninguna mutación ventajosa. La población original de la cepa vacunal ha sido multiplicada por los investigadores cada 3-6 meses desde 1998 y no se han observado efectos adversos *in vivo*.

-Riesgos administración

La cepa vacunal será transportada en viales criogénicos cerrados. Cada vial tiene una etiqueta que identifica el contenido y la cantidad de material. Los viales se conservan con hielo seco o bajo otras condiciones de transporte equivalentes, dentro de un recipiente de transporte aislado. Los recipientes de transporte están aislados para evitar la rotura y la descongelación de los viales.



El centro en el que se realice el ensayo clínico tendrá una visita de iniciación. El objetivo de la visita es proporcionar formación al personal del Centro sobre el protocolo del ensayo y las técnicas correctas de manejo del fármaco en investigación. El personal que manipule las muestras utilizará equipos de protección individual estándar (bata, guantes, protección para los ojos) y contención.

-Efecto sobre la salud humana, otros organismos no diana y el medio ambiente

En el documento de información al paciente o consentimiento informado se indica que el paciente deberá utilizar dos métodos anticonceptivos durante el ensayo y hasta 120 días después de la última dosis.

El riesgo para las mujeres embarazadas es bajo.

Se desconoce el riesgo para las personas inmunodeprimidas por lo que en el documento de información al paciente se incluye una advertencia para los contactos del paciente que pudiesen encontrarse en situación inmune comprometida.

Tras la administración del OMG los pacientes son aislados durante 4 horas. 72 horas después, los pacientes son tratados con antibióticos para eliminar la bacteria, con lo que el riesgo potencial para la población general es despreciable. Se ha demostrado en un estudio clínico de Fase 1 que, en ausencia de antibióticos, el OMG se elimina rápidamente de la sangre. No se detectó el OMG en sangre de ningún sujeto transcurridas 48 horas desde la administración y no se detectó en orina ni heces de ningún sujeto a la máxima dosis analizada (Maciag, P.C., S. Radulovic, y J. Rothman. Vaccine, 2009. 27(30): p. 3975-83).

Gestión de Residuos

Todo el producto en investigación se eliminará de acuerdo a los procedimientos de los centros en los que se realice el ensayo clínico.

Los viales cerrados o abiertos y los materiales residuales de preparación de la infusión intravenosa deben ser tratados de conformidad con los procedimientos del centro para los residuos con riesgo biológico. Los materiales que no puedan ser tratados como residuos con riesgo biológico deberán ser desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0,5 % para su desinfección. La solución de lejía diluida al 10 % puede utilizarse para la campana de bioseguridad, y tras haber limpiado con la lejía, es posible realizar una limpieza con alcohol al 70 %. Si no puede utilizar una solución de lejía para la desinfección, los derrames accidentales se tratarán con isopropanol al 70 % por 10 minutos.

En el caso de que se produzca cualquier incidencia o accidente se deberá informar de manera inmediata a la Comisión Nacional de Bioseguridad.

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.

Una vez concluido el ensayo, se remitirá un informe de resultados de los mismos al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG) y a la Comisión Nacional de Bioseguridad. 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 26 de abril de 2017