



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE UN VIRUS ADENOASOCIADO (AAV9-*hSulfamidasa*) MODIFICADO GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/14/09)

Título del ensayo:

Ensayo clínico de fase I/II de búsqueda de dosis para establecer la seguridad, tolerabilidad y eficacia inicial del producto de terapia génica *AAV9-hSulfamidasa* tras su administración a dosis única por vía intracerebroventricular a pacientes con Mucopolisacaridosis tipo IIIA (Síndrome de Sanfilippo A), de la empresa Laboratorios Esteve.

Características del ensayo:

El ensayo propuesto por Laboratorios del Dr. Esteve, S.A tiene como objetivo la realización del ensayo clínico de fase I/II de administración única con el vector recombinante adeno-asociado humano de serotipo 9 (AAV9) que codifica para la Sulfamidasa humana. Se propone para el tratamiento con el *AAV9-hSulfamidasa* a pacientes diagnosticados de la Mucopolisacaridosis tipo IIIA (Síndrome de Sanfilippo A).

Este OMG se usará como medicamento de terapia génica para tratar enfermos de Sanfilippo (MPS IIIA), cuya descripción fisiopatológica es la no funcionalidad de la proteína Sulfamidasa. Esta enzima está involucrada en el catabolismo del heparan sulfato y la no funcionalidad proteica genera una acumulación del heparan sulfato con efectos deletéreos.

Cuando el OMG se administre a los pacientes, se espera que el material genético contenido en el OMG se transfiera a las células del paciente, y que en ellas se sintetice la proteína humana Sulfamidasa. Si se restituye los niveles de la proteína Sulfamidasa se espera una normalización de los niveles proteicos y del metabolismo del heparan sulfato y una mejora en las manifestaciones clínicas de la enfermedad. El genoma del OMG se mantiene en las células huésped sin integrarse, formando concatámeros y manteniéndose de forma episomal.

Este OMG se administrará por vía intracerebroventricular a 6 pacientes que serán hospitalizados en el Hospital Sant Joan de Déu de Barcelona y a los que se les realizará una intervención quirúrgica en el Quirófano de Neurocirugía del Hospital Sant Joan de Déu. El tiempo estimado para la intervención no superará una hora.

El ensayo clínico se quiere realizar desde Septiembre de 2015 hasta Mayo 2016.

Una vez se haya realizado la administración quirúrgica del OMG el paciente será trasladado a la unidad de cuidados intensivos durante 24 horas y posteriormente 7-10 días a una habitación del área de Hospitalización. La gestión de la habitación de UCIP y Hospitalización estará bajo la supervisión de personal de enfermería.



Características del OMG:

El *AAV9-hSulfamidasa* es un vector recombinante derivado del virus adeno-asociado de serotipo 9 (AAV9) que ha sido modificado eliminando la secuencia codificadora de las proteínas virales del organismo receptor AAV9 y se ha sustituido por el *cassette* de expresión que contiene la secuencia codificante optimizada de la enzima Sulfamidasa humana (SGSH) y las secuencias regulatorias necesarias para la expresión de la proteína. La eliminación de la secuencia proteica completa del AAV9 permite que el OMG resultante, *AAV9-hSulfamidasa*, no tenga capacidad replicativa.

Como vector se ha utilizado dos construcciones de Baculovirus diferentes conteniendo las secuencias requeridas para la generación y fabricación de *AAV9-hSulfamidasa*: Baculovirus Rep2Cap9 y Baculovirus SGSH. La infección se ha realizado por Co-infección simultánea en las células Sf9 con los dos Baculovirus diferentes que contienen las secuencias para la generación del OMG.

El material genético (genoma) que se introduce dentro del organismo receptor (AAV9) tiene varios componentes con distinto origen biológico.

En primer lugar, el genoma está flanqueado por secuencias de ADN del virus adeno-asociado humano de serotipo 2 llamadas inverted terminal repeats (ITR). Estas secuencias son necesarias para poder encapsidar el genoma dentro de las cápsidas del AAV9 durante el proceso de producción del OMG.

En segundo lugar, el genoma consta de un *cassette* de expresión con promotor, secuencia codificante para la Sulfamidasa humana y señal de poliadenilación (PolyA), ya que se pretende expresar el gen de interés en las células transducidas por el OMG.

El promotor del constructo es un promotor híbrido y ubicuo (CAG), formado por el *enhancer* de citomegalovirus (CMV) y el promotor de la β -actina de pollo. La secuencia codificante que se pretende expresar corresponde a la Sulfamidasa humana, un enzima importante para la degradación del heparan sulfato en las células de mamífero. Se ha optimizado la secuencia de codones para conseguir una expresión más óptima. Y, por último, la señal de poliadenilación proviene de la β -globina de conejo.

Las secuencias ITR, CAG, y de poliadenilación escogidas han sido ampliamente testadas en animales y humanos previamente.

Identificación de riesgos potenciales

1) Estabilidad genética:

La estabilidad genética del vector es equivalente a la del tipo silvestre de AAV, sin embargo, como su replicación es deficiente la estabilidad tras la replicación no es relevante. La estabilidad genética de los stocks de Baculovirus utilizadas para la fabricación del OMG es confirmada en cada pase mediante qPCR y secuenciación. La estabilidad genética de los lotes utilizados en el ensayo clínico se verificará mediante la técnica anteriormente mencionada.



La identidad del genoma del OMG se comprueba durante el proceso de producción a través de varios controles que demuestran la identidad del vector (qPCR y secuenciación). De la misma manera que el AAV9 silvestre, el AAV recombinante mantiene el genoma de forma estable. Además, debido a la incapacidad de replicar del OMG generado, y de no presentar mecanismos intrínsecos para la variación genética, se consideran unos organismos genéticamente estables.

2) Patogenicidad:

Los vectores recombinantes AAV son capaces de infectar células de humano y animales pero no son patogénicos, toxicogénicos, virulentos, alergénicos o vectores de un patógeno. No son capaces de replicar y, consecuentemente, no puede formar colonias en otros organismos, pero tienen una expresión duradera en el huésped. Por ese motivo, tanto los virus AAV como los vectores recombinantes AAV se clasifican como nivel de bioseguridad de la clase o grupo I (riesgo nulo o insignificante).

Debido estas características, la probabilidad que haya un intercambio de material genético con otros microorganismos es casi nula y la liberación de los OMG no representarían un riesgo ambiental.

3) Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación:

El tipo silvestre de AAV se transmite entre humanos por vía respiratoria (transmisión aérea), vía fecal-oral (transmisión digestiva), por contacto directo del virus con la conjuntiva de los ojos o las mucosas y por transmisión sexual (fluido seminal). Es la primera vez que se utiliza el vector AAV9-hSulfamidasa en humanos. Basado en estudios en animales, no se espera encontrar restos del vector después de 30 días de la administración.

En los estudios de biodistribución realizados hasta la fecha con los AAV y vectores recombinantes se ha detectado secreción de vectores en orina, saliva, heces y semen. Por otro lado, se espera una excreción limitada del OMG en aguas residuales en los primeros días tras la administración de los pacientes, aunque la detección de partículas virales por PCR no implica que los vectores secretados sean infectivos.

No obstante, se continuará con la evaluación de la posible excreción del OMG en fluidos biológicos del paciente tratado de acuerdo al protocolo de estudio que contempla la recogida de sangre, saliva, orina y heces de manera regular hasta demostrar la negatividad en dos muestras consecutivas. Se utilizará un método de PCR cuantitativa específica para el vector.

4) Control y tratamiento de residuos

Los protocolos de limpieza y desinfección y esterilización se han considerados adecuados. La limpieza del instrumental y de las habitaciones de UCIP y Hospitalización se realizarán según el protocolo de limpieza del Hospital aprobado por la comisión de infecciones, que incluye el uso de glutaraldehído al 1,25% (Limoseptol). Se suministrarán contenedores de riesgo biológico para la eliminación de secreciones o fluidos biológicos potencialmente contaminantes (orina, secreciones respiratorias,



sangre). Todo el material en contacto directo con el OMG (viales, agujas, jeringas, guantes, etc.) serán depositados en un contenedor de residuos peligrosos tipo III. Una vez cerrados los contenedores de forma hermética serán transportados a una sala de residuos de riesgos dentro del recinto de residuos del Hospital. Cada 48 horas, un camión autorizado de la empresa gestora de residuos de riesgo transporta los contenedores a una planta esterilizadora.

Las gasas, toallas desechables y residuos clínicos generados en la intervención quirúrgica se depositarán en bolsas negras en contenedores especiales que serán incinerados.

Para todas las superficies que potencialmente hubieran podido entrar en contacto con el agente en las habitaciones de UCIP y Hospitalización se realizará también una desinfección con aldehídos eliminándose los residuos biológicos en contenedores de riesgo biológico. Las sábanas y ropa no desechable seguirán un protocolo de desinfección específico (lavado durante 15 minutos a una temperatura de 85°C seguido por un ciclo de lavado a temperatura inferior y un secado en calandra a 160°C).

También las muestras biológicas procesadas en el laboratorio clínico se eliminarán en contenedores de riesgo biológico. Los cuidadores de los pacientes serán informados de las medidas de desinfección y tratamiento de residuos biológicos: desinfección de superficies, sanitarios y ropa contaminada con aldehídos o lejía diluida.

En caso de vertido accidental de producto biológico se seguirá el protocolo de actuación del Servicio de Prevención y Medio Ambiente del Hospital, que incluye el uso de material absorbente y desinfectantes para contener el derrame. El material derramado, así como los guantes, batas y mascarilla, será considerado residuo biopeligroso tipo III y como tal será eliminado. En caso de lesión, la herida será desinfectada con antisépticos.

5) Seguimiento

Se realizará un seguimiento exhaustivo de los pacientes de 5 años de duración según el protocolo del ensayo clínico. Los efectos adversos serán registrados y evaluados por los investigadores del ensayo clínico y se notificarán a las autoridades sanitarias cuando sean relevantes. No se consideran planes específicos para el medio ambiente debido a que el OMG utilizado no es replicativo y a que se espera una eliminación muy residual al medio. Si se observa que el efecto sobre el medio ambiente es relevante, la utilización del OMG se paralizará hasta que se apliquen las medidas adecuadas que eliminen el posible riesgo. También está previsto un seguimiento específico para los contactos de los pacientes.

Si se observan efectos de que el efecto sobre el medio ambiente es relevante, la utilización del OMG será parada hasta que se apliquen las medidas adecuadas que eliminen el posible riesgo. También está previsto un seguimiento específico para los contactos de los pacientes.



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 concluidos los ensayos, 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 11 de diciembre de 2014