



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE ADENOVIRUS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/16/06)

Título del ensayo

Ensayo clínico en fase I con un virus oncolítico DNX-2401 para el tratamiento gliomas difusos de protuberancia recién diagnosticados en pacientes pediátricos de la Clínica Universidad de Navarra.

Características del ensayo

La Clínica Universidad de Navarra presenta una solicitud para realizar un estudio de fase I, con un virus oncolítico DNX-2401 para el tratamiento gliomas difusos de protuberancia recién diagnosticados en pacientes pediátricos. En este ensayo se estudiará la seguridad del tratamiento con el DNX-2401 combinado con temozolomida, el fármaco con mayor eficacia frente a ese tipo de tumor.

El mecanismo de acción de DNX-2401 se basa en que la replicación viral conducirá a la lisis de las células tumorales que permiten su replicación y, por tanto, a su destrucción.

El ensayo se realizará en la Clínica Universidad de Navarra entre Septiembre 2016 y Septiembre 2018.

Características del OMG

El OMG es un adenovirus oncolítico derivado del HAd5, que ha sido diseñado para la administración intracerebral en tumores cerebrales. Las modificaciones introducidas son:

- Deleción de 24 pares de bases (pb) en la región constante 2 (CR2) del gen E1A. La proteína E1A disfuncional es incapaz de unirse a la proteína celular del retinoblastoma (Rb) para producir la liberación del factor de transcripción E2F del Rb, lo que da lugar a la necesidad de E2F libre para la transcripción génica del adenovirus. El E2F libre es abundante en las células cancerosas, donde normalmente hay una alteración de la vía Rb/p16. De esta forma, los virus con la deleción de los 24 pares de bases en E1A pueden replicarse de forma eficaz en las células cancerosas, pero se ven atenuados en las células normales que no se dividen.
- Inserción en el HI loop de la fibra del serotipo 5 de una secuencia de 27 pb que codifica el péptido RGD-4C. Esta modificación afecta a la infectividad del virus, hace que presente afinidad por células que expresan integrinas alfa 5. Esta modificación se introdujo porque las células de glioblastoma con frecuencia expresan altos niveles de integrinas, mientras que las células cerebrales sanas, no las expresan. Teóricamente la modificación de la fibra podría hacer que el virus fuera capaz de infectar a células del organismo que normalmente no infecta la variante salvaje, sin embargo, la modificación de la proteína E1A hace que solo replique en células tumorales.



Identificación de riesgos potenciales

1) Estabilidad genética

Los adenovirus son agentes estables, hay datos epidemiológicos sobre la existencia de HAd5 en la población que muestran ausencia de cambios no ha producido cambios en su estructura genómica, durante más de 40 años. En cultivos mantenidos en laboratorio, incluyendo co-cultivo forzado con otros serotipos tampoco se han observado cambios genómicos.

Se ha descrito la recombinación entre adenovirus de los subgrupos B1 y E en pacientes inmunodeprimidos, pero no recombinación con adenovirus del subgrupo C al que pertenece HAd5.

Los adenovirus genéticamente modificados son generalmente estables genéticamente siempre y cuando el tamaño de su genoma no exceda el 105% del tamaño del genoma del adenovirus salvaje, como ocurre en este caso, cuyo genoma es menos del 101%.

Durante el proceso de fabricación de DNX-2401 se realizó secuenciación completa del genoma y estudio de la estabilidad de las modificaciones, tanto en el master viral bank como en el producto final. Mediante qPCR con un límite de detección de 15 copias de Ad5E1a en 3×10^4 proteína viral, equivalente a 1 copia de la proteína salvaje por 2.000 copias de la proteína del OMG. No se detectó ADN del tipo salvaje en el master viral bank ni en el producto final en 3 muestras analizadas.

Teóricamente, el OMG se podría recombinar con la forma salvaje en un receptor infectado por ambos virus, pero es muy improbable encontrarse con esta situación en la práctica. La imposibilidad del OMG para replicar fuera de células tumorales hace que esta teórica recombinación sea casi imposible. Aún así, suponiendo que la recombinación tuviera lugar, la transmisión de este nuevo OMG ocurriría mediante la infección del tracto respiratorio similar al adenovirus salvaje, causando los mismos síntomas leves y siendo autolimitada.

Los adenovirus no se integran en el ADN del huésped, por lo que no es posible su transmisión al genoma del huésped ni la transmisión a la descendencia.

2) Virulencia/Patogenicidad

El adenovirus humano tipo 5 está clasificado como nivel de bioseguridad de clase 2. HAd5 puede causar una serie de enfermedades clínicas, la mayoría de las cuales se presentan en niños menores de 5 años. Las infecciones por adenovirus son de naturaleza leve, mayoritariamente asintomáticas y sólo el 45% de las infecciones se manifiestan como enfermedad del sistema respiratorio, enfermedad febril de la infancia, enfermedad del tipo de la tos ferina y hepatitis.

DNX-2401 está atenuado en comparación con el Ad5 de tipo salvaje en cuanto a la virulencia y la patogenicidad debido a la replicación deficiente en células normales que no se dividen. Es posible que pueda transmitirse a receptores humanos no diana. Sin embargo, en caso de transmisión no intencionada, no se espera un aumento de los efectos directos que podrían producir respuestas inmediatas como la inflamación.



En caso de fuga del virus modificado genéticamente al torrente sanguíneo, sería rápidamente eliminado de la sangre por las células de Kupffer, y la presencia de anticuerpos neutralizantes antiadenovirus.

Además, si algunas partículas virales escapasen de estas "barreras" iniciales, en teoría, cualquier célula normal podría ser infectada si expresa receptores para ello. Sin embargo, la selectividad de DNX-2401 impediría la infección productiva en los órganos no diana (células no tumorales).

3) Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación

Los adenovirus pierden su bioactividad rápidamente a temperatura ambiente. El HAd5 es sensible a hipoclorito de sodio al 1%, al glutaraldehído 2% y dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,25%. Es sensible al calor (>56°C). La mejor vía de inactivación del HAd5 es mediante autoclave a 121°C durante 15 minutos; los desinfectantes convencionales (lejía, jabón o similar) también son efectivos contra el HAd5 si están en contacto durante 20-30 minutos. En congelación el virus se puede mantener durante años.

La vía común de transmisión del HAd5 es mediante inhalación o contacto con los ojos de aerosoles producidos por tos o estornudos de las personas afectadas. Bajo condiciones de humedad y contacto cercano la transmisión es eficaz. También es posible la transmisión de adenovirus por la ruta oro-fecal pero esta vía de transmisión requiere contacto íntimo y es muy inusual. La infección tras contacto casual tras la administración entérica es improbable incluso con adenovirus plenamente virulentos. Aparte de humanos y chimpancés, no es posible la infección en otros huéspedes.

Administración

Se prevé reclutar y tratar 12 pacientes. El OMG se inyectará una sola vez en cada uno de los pacientes reclutados, cada 1-3 meses, dentro de un quirófano, en la misma intervención en la que se biopsia el tumor para comprobar que es una recidiva o se extirpa el resto tumoral. En cada paciente se administrarán 5×10^{10} partículas virales en 1 ml. Los pacientes tratados se mantendrán en el hospital durante al menos las 24 horas posteriores a la inyección.

Seguimiento

El paciente al que se le administra el agente será seguido estrechamente dentro del protocolo del ensayo clínico, hasta 12 semanas después de la administración, mucho más del tiempo que puede persistir una infección por adenovirus salvaje. Cualquier efecto adverso inesperado será notificado dentro del protocolo de reacciones adversas del ensayo clínico. A partir de las 12 semanas se mantendrá un seguimiento menos frecuente, hasta el fallecimiento del paciente o hasta 24 meses.

En los ensayos realizados en otros centros con el mismo OMG se ha visto que la liberación del virus es mínima y que no ha tenido ninguna repercusión sobre el medio ambiente. En el artículo publicado del ensayo clínico en pacientes con tumores ginecológicos malignos recurrentes (Kinball K et al, *Clin Cancer Res* 2010) uno de los objetivos principales del ensayo fue el estudio de la diseminación del virus en sangre, orina y saliva, concluyendo que era insignificante y solo aparecía a dosis 100 veces superiores a las usadas en este ensayo. También se realizó esta misma monitorización en otro ensayo



clínico sobre en pacientes con glioblastoma, en el que se vio que la presencia del virus en la orina, saliva y suero de pacientes tratados era muy baja y ocurría a dosis mayores de las que están previstas para este ensayo. Basados en estos datos, la monitorización del ensayo se basará únicamente en la estrecha evaluación clínica del paciente.

Manipulación, control y tratamiento de residuos

El centro dispone de procedimientos normalizados de trabajo para descontaminación, derrames, preparación y dispensación, recepción y almacenamiento y trazabilidad de residuos biopeligrosos del grupo III.

Los viales que contienen el virus DNX2401 se entregarán en el departamento de farmacia de la Clínica Universitaria para uso clínico, debidamente sellados y etiquetados. Dichos viales se almacenarán y conservarán en un congelador a -80°C en un área de acceso restringido (a personal de farmacia exclusivamente). El acceso y manipulación del virus antes de su administración estará bajo la responsabilidad del farmacéutico. La dosis se cargará en una jeringa de 3 ml bajo condiciones asépticas (cabina de seguridad: Clase II, tipo B) y de acuerdo con los requerimientos locales para el OMG.

El farmacéutico entregará la medicación al investigador principal/co-investigador en un contenedor hermético cerrado y etiquetado con la información relevante como el código del producto, "contiene un organismo genéticamente modificado (OMG)" y "producto de riesgo biológico". El departamento de farmacia y el quirófano están en la misma planta y conectados directamente, por lo que el riesgo durante el transporte es mínimo.

El personal presente en el quirófano llevará bata desechable, guantes, gafas de seguridad, mascarilla protectora tipo FFP3. Antes de empezar el tratamiento con DNX2401 se colocarán en la puerta del quirófano un letrero visible advirtiendo del tratamiento, las restricciones y los posibles riesgos, y se colocarán dentro del quirófano los contenedores de residuos biopeligrosos de tipo III.

Toda la medicación restante y el material empleado para la preparación de la dosis de OMG será destruido localmente de acuerdo a los procedimientos de destrucción institucionales.

Todos los materiales que hayan estado en contacto directo con el OMG, (restos de viales, agujas, guantes, etc.) deberán ser colocados dentro del contenedor para residuos sanitarios del grupo III. Los residuos de tipo III se identifican oportunamente y son procesados y eliminados por una empresa especializada, según el protocolo vigente actualmente en el centro para este tipo de residuos.

Tras la administración del OMG, todo el equipo y las superficies de trabajo que potencialmente pudieran entrar en contacto con el agente serán desinfectados con Limoseptic®, desinfectante que contiene Glutaraldehído al 2,5%, al cual es muy sensible el adenovirus y Desinfect®, hipoclorito sódico 5%, al cual también es sensible. Para el resto del quirófano se seguirá el protocolo de "limpieza final" vigente en los quirófanos del centro, que incluye, Limoseptic® y Desinfect®.

El la "Hoja de información al paciente" se incluye información relativa a las medidas de higiene a adoptar tras el alta médica. Estas medidas incluyen el lavado de manos frecuente y especialmente



evitar contacto con población vulnerable, personas inmunodeprimidas, ancianos, niños y mujeres embarazadas. Para ello se evitará acudir a lugares con elevada concentración de personas, como centros comerciales o utilizar medios transporte públicos. Además se recomienda añadir lejía al sanitario tras su utilización durante los 7 días siguientes a la administración del virus.

En el caso de pacientes pediátricos menores de 12 años se aconseja que sean una o dos personas las que realicen el cuidado durante los 4 días siguientes a la inyección del virus y que los pañales y toallitas sean introducidos en bolsas en las que se añadirá lejía antes de ser cerradas y posteriormente eliminadas como residuos urbanos. Se cambiarán los baberos tras cada comida y se secarán con frecuencia las babas. Si tiene hermanos pequeños, durante estos días se tratará de evitar el contacto con ellos.

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

Teniendo en cuenta las propiedades inherentes de DNX-2401 (la selectividad intrínseca por las células tumorales humanas conferida por sus modificaciones genéticas, su estabilidad genética y las condiciones de liberación propuestas), se puede concluir que la probabilidad de que DNX-2401 establezca infecciones productivas en seres humanos sanos es escasa. En consecuencia, no se espera ningún impacto en la salud humana, como resultado de las interacciones de DNX-2401 y las personas que están involucradas en la manipulación y administración.

Teniendo en cuenta que la transmisión de DNX-2401 de los pacientes con cáncer a los animales es muy poco probable y que no hay reservorios animales naturales para DNX-2401 (la especificidad de DNX-2401, como de HAd5, se limita a los seres humanos), no se prevén efectos sobre otros organismos no diana.

En el caso de que se produzca cualquier incidencia o accidente se deberá informar de manera inmediata a la Autoridad Competente y 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 6 de junio de 2016