



## EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE UN VIRUS ADENO-ASOCIADO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/18/02)

### **Título del ensayo**

Estudio de fase 1/2, abierto, de seguridad y búsqueda de dosis de la transferencia del gen de la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) mediada por el virus adeno-asociado (AAV) de serotipo 8 (AAV8) en adultos con glucogenosis de tipo Ia (GSD-Ia), de la empresa Ultragenyx Pharmaceutical, Inc.

### **Organismo receptor**

El virus adeno-asociado de serotipo 8 (AAV8) se aisló originalmente a partir de tejidos de mono Rhesus. Es un virus ADN monocatenario sin envoltura. El genoma viral está rodeado de una cápside icosaédrica. El genoma del AAV consta de repeticiones terminales invertidas (ITR) que flanquean los extremos de la cadena de ADN y dos marcos de lectura abierta (*rep* y *cap*). El *rep* contiene cuatro genes necesarios para el ciclo vital del AAV; *cap* consta de los genes que codifican las proteínas de la cápside del AAV (VP1, VP2 y VP3). Los AAV solo tienen capacidad de replicación en presencia de un virus auxiliar (por ejemplo, adenovirus o virus del herpes simple).

Los AAV no son patógeno. Desde hace tiempo se sabe que los AAV se integran en cultivo celular en el contexto de una infección natural, aunque requiere la proteína Rep para su integración de forma dirigida. Sin embargo, existen pocos datos *in vivo* que avalen una integración eficiente (dirigida o aleatoria) tras la infección natural por AAV en el huésped primate. Tras la infección natural, es probable que el ADN del AAV persista predominantemente en forma de episoma circular extracromosómico y se integre con mucha menos frecuencia en el genoma del huésped.

Los serotipos de AAV aislados de primates no humanos son suficientemente diferentes de los serotipos humanos endémicos para sortear los anticuerpos neutralizantes existentes en la mayoría de los seres humanos, lo que reduce al mínimo la inhibición de la transducción *in vivo*, al tiempo que mantienen un tropismo tisular semejante. El serotipo 8 (AAV8), muestra un fuerte tropismo por el hígado

### **Organismo Modificado Genéticamente**

DTX401 consiste en un AAV en el que se ha modificado el genoma de forma importante en comparación con el virus parental para hacer que carezca de capacidad replicativa. Los genes *rep* y *cap* del AAV se han sustituido por un casete de expresión eucariótico y únicamente se han mantenido las secuencias ITR virales, que son secuencias de ADN no codificadoras (< 300 pb). La eliminación de los genes *rep* y *cap* hace que carezca de capacidad de replicación incluso en presencia de un virus colaborador. La replicación requeriría la presencia de un AAV silvestre y una infección simultánea por un virus colaborador (adenovirus o virus herpes).

Las secuencias ITR que contienen el OMG proceden de AAV2 y actúan como origen de replicación y como señal de acondicionamiento del genoma del vector, cuando las funciones colaboradoras de AAV y adenovirus se proporcionan en *trans*

La casete de expresión entre las ITR está formada por:



- Promotor/potenciador humano con actividad prácticamente exclusiva en el hígado y mínima en el riñón.
- Intrón quimérico para mejorar la expresión génica.
- ADNc de G6PC humano, con optimización codónica
- Terminador del virus de simio 40.

### **Características del ensayo**

#### **Administración y seguimiento**

Los hospitales que participan en el ensayo clínico son el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago y el Hospital Universitario 12 de Octubre y el Hospital Universitario Cruces.

Los sujetos elegibles recibirán una infusión por vía intravenosa (IV) única. Se incluirán tres sujetos en la cohorte 1 y en cada una de las cohortes posteriores. Los sujetos de cada cohorte recibirán tratamiento durante 2 semanas (14 días) como mínimo. Se dejará un intervalo mínimo de 12 semanas (84 días), seguido de una revisión por el comité de vigilancia de los datos (CVD) de la cohorte de dosis, entre el tratamiento del último sujeto de una cohorte y el primer sujeto de la cohorte siguiente.

Se hará un seguimiento de los sujetos incluidos en el estudio durante 52 semanas después del tratamiento. Una vez finalizado el estudio, se ofrecerá a los sujetos la posibilidad de participar en un estudio de extensión de seguimiento de 4 años para evaluar la seguridad y eficacia a largo plazo (5 años en total) de DTX401.

En el estudio se controlará estrechamente la diseminación del vector. Se obtendrán muestras de saliva, orina y heces en los momentos especificados en el calendario de actividades con el fin de controlar la diseminación del vector. Se entregará a los sujetos un recipiente adecuado para que recojan una muestra de heces en el domicilio. Las muestras de saliva y de orina se obtendrán en el centro, durante las visitas con ingreso, o bien en el domicilio por personal cualificado con formación clínica. Se seguirán obteniendo muestras para analizar la diseminación del vector hasta que se observen al menos 3 resultados negativos consecutivos para cada matriz de muestras.

### **Identificación de riesgos potenciales**

#### **-Estabilidad**

Los AAV son virus de ADN monocatenario con una gran estabilidad genética, según pone de manifiesto la estrecha relación existente entre los genes *rep* y *cap* de distintos serotipos y genomovares.

En respaldo de estos datos sobre homologías de secuencias está el hecho de que los AAV utilizan una ADN polimerasa del huésped para la replicación viral que no muestra propensión a los errores en comparación con las ARN polimerasas que emplean los virus ARN. En apoyo a la estabilidad genética está la observación de que los episomas de ADN proviral de AAV aislados de diferentes muestras de tejidos humanos poseen sistemáticamente la secuencia *rep* y *cap* canónica esperada de AAV2.

A tenor de estas características del AAV silvestre, también cabe esperar que DTX401 sea muy estable desde el punto de vista genético. Además, cada lote de principio activo se caracterizará mediante secuenciación del genoma del vector vírico. Se confirmará, además de la estabilidad genética, la integridad del casete de expresión de G6Pasa y las ITR.



### **-Formación de virus adeno-asociados recombinantes**

La transferencia involuntaria de información genética solo podría tener lugar en caso de una recombinación entre los plásmidos *cis* y *trans* que diera lugar a la formación de AAV con capacidad de replicación (rcAAV, partículas acondicionadas que pueden replicarse en presencia de un virus colaborador).

El principio activo de DTX401 será analizado para detectar AAV infecciosos y no infecciosos, variantes fenotípicas de AAV con capacidad de replicación (rcAAV), además de presencia de ADN de células hospedadoras, proteínas de células hospedadoras y pureza de la proteína total.

### **-Patogenicidad.**

Los primates son huéspedes de los AAV. A pesar de una seroprevalencia de hasta el 90% de algunos serotipos humanos frecuentes, no se han identificado efectos patógenos de los AAV. Por otra parte, en DTX401 se ha eliminado casi todo el ADN vírico (94%), el serotipo empleado para la encapsidación, AAV8, muestra tropismo por los hepatocitos y el transgén G6Pasa está bajo el control de un elemento potenciador y un elemento promotor específicos del hígado, lo que limita la expresión del transgén en células no diana. Las únicas secuencias víricas que persisten en DTX401 son las pequeñas repeticiones terminales invertidas (ITR) que flanquean el casete de expresión del transgén. A diferencia del virus originario, DTX401 carece de capacidad de replicación incluso en presencia de un virus auxiliar.

### **-Genotoxicidad**

Aunque no se prevé que DTX401 se integre en el genoma de la célula hospedadora, las consecuencias a largo plazo de la administración de vectores de AAV a los seres humanos aún no se conocen por completo. Por el contrario, el AAV parental, que tampoco es patógeno, tiene la capacidad de integrarse de forma estable en el genoma de la célula hospedadora, concretamente en un lugar específico del cromosoma 19 humano. Dado que en el producto se han eliminado los genes responsables de la integración en el genoma, cabe prever que la inmensa mayoría de los genomas de vector DTX401 presentes en el interior de las células de los sujetos sean episómicos, en lugar de quedar integrados en el ADN de las células huésped.

### **-Transferencia génica**

Las modificaciones genéticas no afectan a la especificidad por su hospedador natural ni al tropismo tisular.

Es posible que pueda interactuar con otros virus con los que el paciente entre en contacto, por ejemplo, rinovirus, adenovirus o herpesvirus. Si sucediera, el OMG podría formar un virus que causaría una infección si el paciente y las células para el rescate, la replicación y el empaquetamiento también estuvieran expuestos al AAV parental. Sin embargo, el rescate, la replicación y el empaquetamiento se detendrían a medida que el sistema inmunitario del paciente fuera eliminando los virus colaboradores.

Por otro lado, el genoma híbrido sería demasiado grande para acondicionar el ADN híbrido en una partícula vírica. Se sabe que el AAV posee un límite de acondicionamiento de unas 5 kb y sería previsible que una molécula híbrida que contuviera los genes *rep-cap* más el casete de expresión de G6Pasa superase este límite. Por tal motivo, los riesgos asociados a la transferencia génica se consideran insignificantes.



### **-Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación**

Cabe esperar que la capacidad de supervivencia de DTX401 sea equiparable a la del AAV silvestre. Los parvovirus, como el AAV, son virus estables que pueden persistir en el ambiente durante períodos prolongados (del orden de varias semanas). Las partículas de AAV son resistentes a una amplia variedad de pH (pH 3-9) y soportan temperaturas elevadas (55 °C durante 1 hora).

Las partículas de AAV, y por extensión, de DTX401, son sensibles al hipoclorito de sodio (solución al 10% de lejía doméstica), a desinfectantes con eficacia frente a virus sin envoltura, a la luz ultravioleta y a la radiación ionizante.

El AAV parental carece de capacidad de replicación y requiere la presencia de un virus colaborador, como adenovirus humano o virus del herpes simple, para replicarse. Dado que se han eliminado todas las secuencias del AAV silvestre, a excepción de las ITR, el organismo no puede replicarse ni siquiera en presencia de un virus colaborador, por lo que no se multiplicará en el medio ambiente, ni siquiera en el interior de una célula huésped.

Puesto que DTX401 se administrará a seres humanos por primera vez en el estudio clínico, aún no se dispone de datos sobre su diseminación desde el paciente. En estudios anteriores en los que se utilizaron OMG derivados de AAV8 se analizó su diseminación. Tras administrar una dosis única de AAV8 que contenía el transgén FIX, se detectaron copias de genoma en sangre, saliva, heces, semen y orina de manera proporcional a la dosis durante un máximo de 10 a 50 días después de la administración, observándose las concentraciones máximas en torno a dos días después de la administración. El análisis de diseminación detecta copias de genoma, no partículas virales encapsidadas, y se desconoce si el ADN del vector en la matriz biológica representa material infeccioso. No cabe esperar que la exposición a la cantidad de OMG en fluidos biológicos, aun cuando fuera infeccioso, pueda generar un grado biológicamente importante de transducción, especialmente mediante contacto pasajero. En estos trabajos no hubo presencia de una concentración evidente de ADN del vector en el semen, por lo que probablemente existe un riesgo escaso de transmisión por esta vía. A fin de evitar una posible exposición de las parejas sexuales, los sujetos que participen en el estudio clínico tendrán que utilizar métodos anticonceptivos de barrera durante un período de 52 semanas después de la administración de DTX401.

No cabe prever que los niveles bajos de diseminación del OMG durante un breve período supongan un problema de seguridad para la salud humana o el medio ambiente. En caso de que alguno de los OMG detectados en los análisis represente un virus infeccioso, seguirá careciendo de capacidad de replicación. Aun cuando fuera infeccioso, el OMG codifica para una versión con optimización codónica de una proteína humana normal, lo que previsiblemente no tendría consecuencias adversas para los seres humanos.

Cualquier OMG diseminado que infectara a un nuevo huésped humano tendría que desplazarse al hígado (algo improbable sin administración IV) y tendría que infectar en una dosis suficientemente alta para producir una transducción eficiente.

En el estudio se controlará estrechamente la diseminación del vector. Se obtendrán muestras de saliva, orina y heces.

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

Los posibles riesgos de exposición a DTX401 están basados en la administración sistémica de DTX401. Una exposición mínima, como la exposición ambiental, de organismos distintos a los sujetos que reciban DTX401 como parte del estudio no constituiría una dosis suficiente para



representar una expresión génica significativa ni posibles riesgos de seguridad para los seres humanos. Dado que DTX401 también carece de capacidad de replicación, cabe esperar una eliminación rápida del vector de cualquier organismo que no sea objeto de la investigación sin causar ningún efecto perjudicial. Además, la expresión del transgén se ha diseñado para que tenga lugar exclusivamente en los hepatocitos. Aparte de los posibles huéspedes humanos, no cabe esperar que la exposición a DTX401 afecte a organismos que no sean objeto de la investigación, ya sea de manera directa o indirecta.

### **-Manipulación, control y tratamiento de residuos**

En el manual de farmacia del estudio y en el material de formación facilitado a los centros que participan en el ensayo clínico se proporcionan instrucciones al personal de farmacia y clínico sobre el uso, conservación y destrucción del OMG. Además, los centros recibirán una visita de inicio por parte de la organización de investigación por contrato (CRO) en la que se repasará la conservación, manipulación, dilución, administración y eliminación del producto en investigación de acuerdo con el manual de farmacia del estudio.

DTX401 será conservado, preparado y administrado por profesionales médicos cualificados en un entorno hospitalario. En los centros se conservará en el departamento de farmacia, en un congelador seguro, con acceso restringido a personal autorizado. El producto llevará una etiqueta en el envase primario y una etiqueta secundaria. La etiqueta secundaria incluye la mención de que se trata de un "producto OMG".

El personal de la unidad de farmacia tendrá formación para manipular el OMG asépticamente en una cabina de seguridad biológica (CSB).

El personal de farmacia cualificado preparará la dosis necesaria en una bolsa de solución salina. Los viales de DTX401 se añadirán a la bolsa usando el procedimiento definido en el manual de farmacia en una cabina de seguridad biológica (CSB) para evitar la dispersión del OMG al entorno. Los procedimientos de limpieza y desinfección del lugar de preparación se recogen en el documento "Instrucciones sobre seguridad para los productos en investigación y el personal que trabaje con DTX401 en el estudio clínico".

DTX401 se transferirá a planta en un sistema cerrado para su infusión al sujeto del estudio con arreglo a los procedimientos de transporte de productos para infusión IV del centro. No hay ningún procedimiento adicional específicamente requerido para DTX401.

DTX401 se administrará a los sujetos del estudio en una única infusión IV periférica, usando sistemas de transferencia cerrados convencionales. No se requiere ningún procedimiento específico de limpieza o desinfección aparte de los procedimientos convencionales para la infusión de productos IV.

Todas las superficies contaminadas con DTX401 se desinfectarán de acuerdo a los procedimientos del centro relacionados con el tratamiento de sustancias biológicas peligrosas y utilizando un desinfectante eficaz contra AAV (por ejemplo, hipoclorito sódico al 1%, glutaraldehído al 2% o dodecilsulfato sódico al 0,25%), recogidas en el documento "Instrucciones sobre seguridad para los productos en investigación y el personal que trabaje con DTX401 en el estudio clínico".

Las muestras de los pacientes se recogerán y manipularán siguiendo las precauciones universales para prevenir la transmisión de microorganismos. Cabe esperar que la carga viral en la sangre, la saliva, las heces y la orina de los pacientes sea baja; además, DTX401 no es patógeno y carece de capacidad de replicación; en consecuencia, se considera que el riesgo resultante para el personal que manipule las muestras es insignificante.



Todos los viales de DTX401 usados y sin usar deberán conservarse en el centro del estudio hasta que se complete la contabilidad del fármaco del estudio. Los consumibles usados en la preparación del OMG se descontaminarán antes de su eliminación (mediante autoclave o mediante tratamiento con un desinfectante químico adecuado eficaz contra el AAV) y/o se incinerarán.

Los residuos líquidos se descontaminarán usando un desinfectante químico adecuado o mediante autoclave. Los desinfectantes eficaces contra el AAV son hipoclorito sódico al 1%, glutaraldehído al 2% y dodecilsulfato sódico al 0,25%.

Se proporciona a los participantes en el ensayo clínico, sus familiares y cuidadores una “Hoja de información” en la se recogen recomendaciones de higiene generales:

Utilice guantes de protección (de plástico, látex o vinilo) al recoger o manipular sus muestras de orina, saliva o heces, así como cualquier otro fluido corporal. Una vez que haya terminado, puede tirar los guantes al cubo de la basura.

- Mantenga un nivel alto de higiene; para ello, lávese bien las manos con jabón regularmente, especialmente después de ir al baño y antes de comer o manipular alimentos o materiales que entren en contacto con los alimentos.
- Los objetos domésticos (vasos, platos, etc.) y el inodoro no necesitan un tratamiento especial.
- Limpie con lejía diluida (1 parte de lejía y 9 partes de agua) las superficies u objetos que se manchen con fluidos corporales. Si se trata de ropa, su limpieza dependerá del tipo de prenda. Por ejemplo: una mancha de sangre seca en una camisa no supone ningún riesgo; una toalla empapada de sangre debe manipularse con guantes y lavarse por separado con lejía.

**La CNB recomienda que la información que se transmite a los pacientes que participan en el ensayo clínico, sus familiares y/o cuidadores, sea clara y comprensible, en concreto, en lo que se refiere a la dilución de la lejía para la desinfección de superficies y objetos manchados con fluidos corporales.**

**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 24 de septiembre de 2018