



## EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE ADENOVIRUS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/18/27)

### **Título del ensayo clínico**

Ensayo en fase 1/2a, aleatorizado, con observador ciego, controlado para evaluar la seguridad, reactogenicidad e inmunogenicidad de Ad26.RSV.preF en niños seronegativos para Virus Respiratorio Sincitial de 12 a 24 meses de edad, de la empresa Janssen Vaccines & Prevention B.V.

### **Características del ensayo**

El ensayo clínico se realizará en el Hospital Universitario 12 de Octubre, Hospital Universitario Gregorio Marañón, Hospital Universitario La Paz y Hospital Clínico Universitario de Santiago. Se estima que se reclutará un máximo de 20 personas en España.

Ad26.RSV.preF es una vacuna profiláctica contra el virus respiratorio sincitial (VRS) para niños a partir de 2 meses de edad. Se administrará vía intramuscular (IM) a las personas que participen en este estudio en una dosis de  $2 \times 10^{10}$  pv en niños seronegativos de 12 a 24 meses de edad.

La duración prevista de este estudio será de 30 meses, incluido el seguimiento de 2 años.

### **Organismo Modificado Genéticamente (OMG)**

El OMG, Ad26.RSV.preF, es un vector basado en el adenovirus humano tipo 26, es incompetente para la replicación, y codifica para la proteína de Fusión (F) del Virus Respiratorio Sincitial (VRS).

La proteína F del VRS es una proteína que media la fusión de membranas entre la membrana viral y la membrana celular o, cuando se expresa por medio de células huésped, también entre las membranas celulares cercanas. La proteína F del VRS se seleccionó como transgén porque está altamente conservada y porque forma un importante objetivo de anticuerpos neutralizantes.

En Ad26.RSV.preF se ha eliminado la región E1 del genoma del adenovirus, que se requiere para la replicación, y una gran parte de la región E3 relacionada con la supervivencia dentro de la célula huésped.

Para crear el OMG, se utilizaron un vector plasmídico y un cósmido. La parte izquierda del genoma lineal de doble cadena del Adenovirus 26 se clonó en un vector plasmídico y la parte derecha, más grande, se clonó en un vector cósmido. Las modificaciones genéticas adicionales se llevaron a cabo en el plásmido o en el cósmido, respectivamente, para garantizar la seguridad y crear espacio para el transgén. La casete de expresión transgénica se coloca en la región E1 eliminada.

El plásmido y el cósmido fueron linearizados y cotransfectados en la línea celular de producción PER.C6®. Para infecciones productivas y replicación durante la producción, el defecto en E1 es suplementado mediante el E1 diseñado desde el adenovirus tipo 5 (Ad5) presente en las líneas celulares complementarias (HEK293, PER.C6®).

### **Identificación de riesgos potenciales**

#### **-Estabilidad fenotípica y genotípica**

El genoma de ADN bicatenario de los vectores Ad26 es relativamente estable en comparación con otros virus. La frecuencia esperada de reversión o de pérdida de modificación genética es baja, sin



embargo, la posibilidad de una mutación espontánea existe y se mitiga con el siguiente enfoque. Los vectores Ad26 purificados se utilizan en la producción de lotes de virus semilla. Los lotes de virus semilla se someten a pruebas exhaustivas que incluye análisis de secuencias y comparación con las secuencias teóricas. Los lotes de virus semilla que contienen la secuencia correcta sirven como material de partida para la producción de cada lote de virus. Ya que durante la producción de lotes de virus pueden producirse mutaciones se somete a un análisis de secuencia un pase de virus más allá del utilizado para la producción.

#### **-Adenovirus competentes para la replicación**

La tecnología que se utiliza para la generación de Ad26.RSV.preF no permite la generación de adenovirus competentes para la replicación (RCA). La ausencia de solapamiento de cualquier secuencia de ADN entre el vector adenoviral y la línea celular PER.C6® evita la formación de RCA. Se realizan pruebas de seguridad específicas para confirmar la ausencia de RCA en lotes de Ad26.RSV.preF. Se han realizado pruebas para detectar la presencia de RCA en más de 90 lotes obteniendo un resultado  $<1 \text{ RCA}/3 \times 10^{10}$  partículas vectoriales. Aun así, se realizarán distintas pruebas durante la fabricación para verificar la ausencia de RCA, entre ellas ensayos de infectividad utilizando la línea celular detectora A549.

#### **-Patogenicidad**

Los huéspedes naturales del virus Ad26 son los seres humanos. No se ha descrito transferencia zoonótica.

Los adenovirus causan generalmente infecciones suaves del tracto respiratorio, autolimitantes y generalmente asintomáticas. Para Ad26, solo se ha informado de un número limitado de estudios que describen infecciones gastrointestinales e infecciones oculares que pueden ser causadas por Ad26.

En comparación con el Adenovirus parental, el OMG está altamente atenuado ya que no puede replicarse en células que no expresen la región E1 adenoviral y, por tanto, se considera no patógeno.

La proteína F no forma parte de la cápside del Ad26.RSV.preF y, por tanto, no influye en la capacidad de infección de Ad26 y no cambia el rango de huésped, el tropismo celular o la estabilidad ambiental del vector Ad26.

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

Ad26 no tiene huéspedes animales. Además, la modificación genética no produce cambios en el rango del huésped y el tropismo celular. Por lo tanto, no se esperan efectos en animales.

Los estudios preclínicos apuntan a una limitada biodistribución. Estos estudios indican que los vectores adenovirales infectan principalmente células en el músculo del sitio de inyección. Además, el genoma del vector adenoviral también se puede detectar en el bazo y en los ganglios linfáticos adyacentes al sitio de inyección. Se cree que la detección del vector en el bazo y en los ganglios linfáticos no indica un fenómeno de biodistribución sino que es el resultado de la captación del vector por las células presentadoras de antígeno y por el tráfico de esas células hacia los tejidos linfoides. Por otra parte, independientemente del inserto génico, diferentes tipos de vectores de adenovirus, entre otros el Ad26, tienen una biodistribución limitada y muestran una eliminación dentro de los 3 meses posteriores a la vacunación.

No se dispone de datos de pacientes respecto a la eliminación del Ad26.RSV.preF, pero si se dispone de los datos para otras vacunas basadas en Ad26 administradas por vía intramuscular. Se analizaron



muestras de orina, garganta y bucofaríngeas en diferentes momentos del estudio no detectándose la propagación del adenovirus en ninguna muestra clínica.

Tampoco se ha detectado la propagación de RCA en un ensayo clínico de una vacuna para el virus del Ébola basada en Ad26.

### **-Riesgo de transferencia genética**

Tras la administración vía intramuscular (IM), el vector del adenovirus existirá transitoriamente en forma episomal y, por consiguiente, no se prevé integración alguna en el genoma de la célula huésped.

Además, durante la construcción de Ad26.RSV.preF, no se han insertado genes que confieran ventajas selectivas tales como genes de resistencia bacteriana y fármacos antivirales, ni tampoco contiene promotores procariontes por lo que el riesgo de transferencia genética a otras especies según las condiciones de liberación propuesta es insignificante.

Podría darse el caso que Ad26.RSV.preF infectase una célula, a su vez infectada con un adenovirus, originándose un nuevo OMG con capacidad de recombinación que podría propagarse en el entorno. Para que esto suceda, se necesitan secuencias homólogas entre Ad26.RSV.preF y otros adenovirus de tipo silvestre. El ADN del OMG se localiza en el punto de administración en el músculo, los ganglios linfáticos de drenaje y el bazo, mientras que el ADN de adenovirus de tipo silvestre se localizaría, probablemente, en el tejido linfoide mucoso. La localización del ADN del OMG y el ADN de adenovirus silvestre en distintos compartimentos imposibilita los eventos de recombinación. En el teórico caso de recombinación, el virus resultante sería menos apto que el virus infeccioso y, por tanto, no podría propagarse, por lo que el riesgo es insignificante:

- Recombinación de la región E1 del virus silvestre con la región transgénica (recombinación con una secuencia de Ad26 silvestre): en este caso, el OMG Ad26.RSV.preF podría intercambiar su región E1 modificada que contiene el casete de expresión del transgén con una región E1 silvestre. Como resultado, Ad26.RSV.preF perdería el casete de expresión del transgén y reconstituiría la región E1 silvestre. El producto de la recombinación recupera la capacidad replicativa conservando la delección de E3 y la sustitución de E4 5orf6, lo que da lugar a un virus con un nivel de riesgo comparable o menor que el del virus silvestre originalmente presente.

- Recombinación con introducción del casete de expresión del transgén en Adenovirus silvestre (recombinación con un virus Ad26 silvestre): esta situación hipotética podría dar lugar a un virus que ha perdido la E1 silvestre y podría, por tanto, considerarse incompetente para la replicación. Este virus incompetente para la replicación expresaría el RSV preF y también podría incluir la región E3 silvestre. Las proteínas codificadas en E3 ya estarían presentes en una célula donde podría llevarse a cabo la recombinación debido al hecho de que estarían infectadas con un virus silvestre también. Dado que la recombinación resultante sería incompetente para la replicación, no se prevé la propagación a otras células y el nivel de riesgo es menor que en el caso de una infección silvestre.

- Recombinación con introducción de E3 silvestre en Ad26.RSV.preF: en este caso el vector resultante sería incompetente para la replicación, ya que incluiría el casete del transgén en lugar de la región E1, excluyendo la difusión. La presencia de la región E3 en el vector tampoco representaría un riesgo adicional.

En cuanto al riesgo de transcomplementación de las funciones eliminadas de E1 por proteínas virales alternativas de otros virus, en la bibliografía se describe que los vectores Ad5 no replicativos pueden



transcomplementarse con proteínas virales alternativas de otros virus como el virus de Epstein-Barr (EBV) o el virus del papiloma humano (HPV). Mientras que el virus de Epstein-Barr se encuentra principalmente en las células B y en las células epiteliales, las infecciones por HPV se restringen a las superficies mucosas en el tracto genital y la orofaringe. En el hipotético caso de que el OMG esté presente en el lugar de la infección por HPV o EBV, solamente una infección por HPV o EBV lítica podría, en teoría, dar lugar a la replicación del OMG restringido a las células infectadas por HPV o EBV. El OMG podría infectar células vecinas. No habrá una mayor propagación ya que el OMG continúa siendo no replicativo en todas las demás células. El riesgo de transcomplementación se considera insignificante.

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

Antes de iniciar el estudio, el centro médico donde se llevará a cabo será evaluado exhaustivamente por el promotor para garantizar que las instalaciones sean suficientes para almacenar y administrar la vacuna, así como tener las instalaciones adecuadas para la recolección y almacenamiento de muestras humanas.

El promotor proporciona el documento de “Preparación y administración del producto” y una “Declaración de seguridad y manipulación segura de la vacuna experimental” en los que se especifican las medidas de control del riesgo en las distintas etapas.

La preparación deberá realizarse utilizando técnica aséptica, es preferible que la preparación se realice en una cabina de flujo laminar o cabina de bioseguridad. El personal deberá usar batas y guantes y lavarse las manos antes y después de la manipulación. El transporte desde el lugar de preparación al de administración se realizará utilizando un contenedor cerrado asegurándose de que no se produzcan un derrame accidental. El transporte de las muestras de los pacientes lo realizará un transportista cualificado.

Se deberán desinfectar y limpiar las superficies tras su utilización con un desinfectante adecuado. Entre los métodos validados de limpieza se incluyen: exposición a solución de 0,1 M NaOH durante al menos 15 minutos. Los adenovirus son resistentes a los desinfectantes lipídicos, pero se inactivan con el uso de formaldehído o cloro. Se pueden inactivar por contacto durante 1 minuto con una dilución 1:5 de lejía, o por contacto durante 2 minutos con geles para manos a base de alcohol

Se cubrirá con un apósito la zona donde se aplicó la vacuna. Las salas del centro médico utilizadas para preparar y administrar la vacuna deberán limpiarse con un desinfectante convencional para adenovirus antes y después de la manipulación.

Todos los materiales en contacto con Ad26.RSV.preF se considerarán contaminados y todos los residuos (incluidos los viales de vacuna, las agujas, jeringas y apósitos) se colocarán en contenedores para residuos de riesgo biológico de categoría III.

El producto no utilizado se eliminará en el centro médico como residuos biológicos y con la autorización del promotor del estudio clínico.

Las muestras de los pacientes serán analizadas en distintos laboratorios<sup>i</sup> a los que serán transportadas de forma segura para evitar derrames accidentales.

**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 7 de mayo de 2019

---

<sup>i</sup> **Los laboratorios en los que se analicen muestras clínicas de pacientes deben cumplir, como mínimo, con los requisitos del nivel de bioseguridad 2.**

Documento de apoyo:

- Manual de seguridad en el laboratorio de la OMS. 2005.
- Guía Técnica para la evaluación y la prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos. Instituto Nacional de Higiene y Seguridad en el Trabajo. 2014.
- Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo.
- Real Decreto 178/2004, del 3 de enero.