



## EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE VIRUS ADENOASOCIADOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/20/08)

### Título del ensayo

Estudio de fase 3, multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo para evaluar la seguridad y la eficacia de PF-06939926 en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne, del promotor Pfizer, S. L.U.

### Características del ensayo

El período de liberación propuesto por el promotor es de noviembre 2020 a noviembre de 2021.

El objetivo principal del estudio es demostrar la mayor eficacia del tratamiento con PF-06939926 en comparación con placebo basándose en la variación de la evaluación de la deambulacion North Star (NSAA) con respecto al momento basal.

En el ensayo participarán el Hospital Universitario Vall d'Hebrón, el Hospital Sant Joan de Deu, el Hospital Universitari i Politecnic La Fe de Valencia y el Hospital de La Santa Creu i Sant Pau.

El producto se administrará en una sola dosis por vía intravenosa. La edad de los pacientes que participan en el ensayo es 4 a 9 años.

### Organismo Modificado Genéticamente

PF-06939926 es un virus adenoasociado recombinante, autocomplementario y sin capacidad de replicación, formado por las proteínas de la cápside del AAV9, el ADN que codifica las repeticiones terminales invertidas (RTI) del AAV2 y una casete de expresión.

La casete de expresión está constituida por un promotor sintético específico del músculo y expresa una versión miniaturizada del gen de la distrofina, que codifica los dominios mínimamente necesarios para la funcionalidad de la proteína distrofina:

- PF-06939926 no contiene genes virales. El casete de expresión está flanqueado por repeticiones terminales invertidas derivadas del AAV de tipo 2. La eliminación de los genes *rep* y *cap* hace que PF-06939926 carezca de capacidad de replicación incluso en presencia de un virus auxiliar, como un adenovirus.
- PF-06939926 se obtiene mediante la transfección de células de riñón de embrión humano HEK293 (PRO10) con ADN plasmídico que codifica los genes necesarios para la amplificación y el empaquetamiento del vector y el vector de transferencia que contienen la casete de expresión:

### Evaluación del riesgo

#### **-Ausencia de formación de virus competentes para la replicación (RCV).**

La transferencia involuntaria de otra información genética solo podría tener lugar en caso de que se produjera una recombinación que diera lugar a la formación de un AAV con capacidad de replicación (rcAAV). A fin de detectar esta circunstancia, se analizarán varios lotes del principio activo (PF-06939926) para identificar la presencia de virus con capacidad de replicación (rcAAV) que puedan surgir durante el proceso de producción. El criterio de liberación es "No detectado". La



recombinación de fragmentos de ADN genómico aleatorios de las líneas celulares en los nuevos vectores de AAV se considera improbable.

Durante la obtención del OMG se lleva cabo la vigilancia y control de la línea celular para garantizar que el proceso de cultivo celular está exento de contaminantes tales como micoplasmas, bacterias y virus extraños. La presencia de virus extraños se comprueba *in vitro* mediante ensayos de virus en líneas celulares indicadoras específicas (MRC-5, Vero, HeLa) durante 28 días. Los ensayos incluyen la detección de AAV tipos 1, 2, 3, 4,6, 7, 8, 9, 10, 11 y 13 mediante qPCR y herpes virus.

El ensayo de rcAAV se realiza durante la liberación del principio activo. Dado que las líneas celulares solo se transducen transitoriamente por cada nuevo lote de fármaco, no se realizarán ensayos de rcAAV en ningún momento antes de la liberación del principio activo. Además, no pueden generarse rcAAV entre la liberación del principio activo y la liberación del producto terminado.

### **-Estabilidad genética del OMG**

El AAV parental es un virus 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 genovares del AAV. Normalmente, el gen *rep* muestra una mayor conservación de secuencia que el gen *cap*, aunque la conservación suele ser mayor del 90 % para el primero y mayor del 80 % para el segundo. Además, el AAV utiliza las ADN-polimerasas del huésped para la replicación vírica, que se caracterizan por una polimerización del ADN de alta fidelidad y una actividad adicional de exonucleasa de corrección de errores que da lugar a una tasa de error muy baja de replicación del ADN, en comparación, por ejemplo, con las ARN-polimerasas utilizadas por los virus ARN.

En apoyo de 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. El análisis filogénico del virus híbrido AAV2/3 hace pensar que se ha producido recombinación homóloga entre los serotipos AAV2 y AAV3. Esto es algo que no se ha observado con otros serotipos, lo que respalda que únicamente en la circunstancia supuestamente rara de que una célula sea infectada de manera simultánea por dos serotipos diferentes de AAV y un virus auxiliar (infección triple) se darían las condiciones adecuadas para que se produjera tal recombinación.

Basándose en esto, se espera también que PF-06939926 sea genéticamente estable. Además, cada lote de PF-06939926 destinado a este ensayo clínico está sujeto a pruebas que reflejan la estabilidad durante el proceso de fabricación. Estas pruebas son las siguientes:

- La pureza de la cápside del vector se analiza mediante electroforesis capilar en gel en condiciones reductoras (rCGE):
- Identificación de la cápsula del vector (mapa peptídico) mediante +
- digestión con tripsina seguida de cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC).
- Secuenciación completa en lotes representativos.
- Ensayos de qQPCR con cebadores específicos del OMG.



Hasta la fecha no se han detectado desviaciones de los valores previstos.

### **-Biodistribución y excreción del vector clínico (Shedding).**

En el estudio PF-06939926 se administra en una sola infusión o inyección intravenosa en dosis de  $2E+14$  genomas de vector por kg de peso corporal (vg/kg). En general, se espera que los pacientes sean inmunocompetentes. La distrofia muscular de Duchenne (DMD) no tiene comorbilidad conocida que afecte al sistema inmunitario.

Para determinar el grado y la duración de la diseminación del vector se obtuvieron muestras de líquido (suero, orina y saliva) de siete perros con distrofia muscular de golden retrievers (DMGR) tratados con PF06939926. Ninguno de los perros alcanzó la madurez sexual durante el estudio, por lo que no se recogieron muestras de semen.

En las muestras obtenidas antes del tratamiento no se detectaron genomas del vector. A los 3 días de la infusión, el primer punto temporal evaluado, el número de genomas del vector detectados en el suero osciló entre el 0,01 % y el 0,32 % de la dosis total inyectada. Este valor disminuyó hasta no más del 0,001 % de la dosis total inyectada 7 días después de la inyección. El número de genomas del vector descendió por debajo del límite de cuantificación 14 días después de la inyección en la saliva y 28 días después de la inyección en el suero y la orina.

En los pacientes la diseminación del vector vírico se determinará mediante un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). Además, se analizará un subgrupo de muestras obtenidas en los puntos temporales inicial, intermedio y tardío para detectar partículas resistentes a la DNasa. Esta evaluación complementaria permite distinguir entre el ADN asociado al virus intacto y el ADN fragmentado que puede detectarse mediante qPCR.

Se analizarán muestras de sangre, la saliva y la orina de los sujetos tras la administración de PF-06939926 hasta que, en dos muestras consecutivas, para cada matriz analizada, se obtenga una señal de qPCR que no supere el límite de detección del análisis, que es el siguiente: sangre completa, 8451 vg/ml; orina, 4263 vg/ml; y saliva, 3670 vg/ml.

No cabe esperar que la exposición a la cantidad de vector que se prevé que se disemine, aun cuando fuera infeccioso, pueda generar un grado biológicamente importante de transducción. Esta suposición se basa en el hecho de que se prevé que la diseminación del vector se produzca en una cantidad varios órdenes de magnitud menor que la dosis eficaz más baja identificada durante los estudios de determinación de la dosis y de que la administración eficaz se realiza por vía intravenosa.

Además, la muy baja cantidad de partículas del vector sería inactivada por las defensas antivirales de la piel y por la función de esta como barrera física frente a la infección. Por lo tanto, no cabe prever que los niveles bajos de diseminación del vector durante un período relativamente breve supongan un problema de seguridad para la población humana en general o el medio ambiente. Aun así, y como medida de precaución, se informa a los padres y cuidadores de los pacientes de las medidas higiénicas a adoptar.

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

Para el transporte del producto dentro del centro hospitalario como mínimo se deberán introducir los viales en una bolsa con cierre hermético que luego se colocará dentro de una segunda bolsa con cierre que posteriormente se introducirá en un contenedor resistente a derrames y con un símbolo de riesgo biológico.



Todas las superficies contaminadas se descontaminarán con un desinfectante adecuado, como hipoclorito de sodio al 10 %, Wescodyne o desinfectante a base de detergente.

Los consumibles usados que puedan haber estado en contacto con el producto se eliminarán como material biopeligroso. Los residuos líquidos se descontaminarán usando un desinfectante químico adecuado o mediante autoclave.

La preparación del producto se realizará en cabina de bioseguridad de clase II.

El personal del centro y todos los que estén presentes durante la preparación y la administración deben llevar un equipo de protección individual para la manipulación de riesgo tipo 2. Como mínimo, bata desechable de cierre posterior, gafas de seguridad, gafas o protector contra salpicaduras en las mucosas, guantes, gorro para el pelo y cubrecalzazas.

Las muestras de los pacientes a los que se ha administrado el OMG serán analizadas tanto en los laboratorios de los centros hospitalarios como en el laboratorio central (Covance en Suiza).

Utilizarán asistencia de enfermería a domicilio para la recogida de muestras y visitas a los pacientes. El personal utilizará guantes, mascarillas, batas y protección para los ojos al tomar las muestras de los pacientes. Cualquier desinfección de las superficies de trabajo debe realizarse con una solución de lejía diluida o desinfectante a base de alcohol ( $> = 70\%$ ) y se realizará según los procedimientos especificados por el fabricante.

Las muestras se transportan en contenedores a prueba de fugas y roturas, con el símbolo de peligro biológico impreso en el exterior.

Las agujas, viales de vidrio y otros objetos punzantes se recogerán en un contenedor a prueba de pinchazos como desecho biopeligroso. Otros desechos generados durante la visita se recolectarían en contenedores homologados para residuos biopeligrosos.

Todos los residuos serán eliminados por un gestor autorizado.

**En el caso de que se produzca cualquier incidencia o accidente se deberá informar de manera inmediata a la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB) y al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG).**

**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 (CNB). 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 2 de julio de 2020