



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE VIRUS ADENOASOCIADOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/21/16)

Título del ensayo

Estudio clínico aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, multicéntrico, ininterrumpido, adaptativo, de seguridad y búsqueda de dosis en fase III de la transferencia génica mediada por VAA con UX701 para el tratamiento de la enfermedad de Wilson, del promotor Ultragenyx Pharmaceutical Inc.

Características del ensayo

El promotor propone un período de liberación de marzo de 2022 hasta mayo de 2026.

Participará en el ensayo el Hospital Universitari Vall d'Hebron y el Hospital Universitari i Politecnic La Fe de Valencia.

UX701 se administrará a pacientes de 18 años de edad o más, en una única infusión intravenosa. Según las instrucciones del protocolo del estudio, los participantes que sean asignados aleatoriamente a las cohortes de tratamiento con UX701 recibirán una de las alternativas siguientes:

- Dosis 1: $5,0 \times 10^{12}$ CG/kg,
- Dosis 2: $1,0 \times 10^{13}$ CG/kg, o bien,
- Dosis 3: $2,0 \times 10^{13}$ CG/kg.

Características del organismo modificado genéticamente

El OMG, UX701, consiste en partículas víricas del virus adenoasociado de serotipo 9 (VAA9) recombinante sin capacidad de replicación que incluye un casete de expresión con la secuencia codificante humana ATP7B-MBD456 bajo el control de un promotor específico del hígado. Dado el gran tamaño de la secuencia codificante de ADN natural ATP7B, se ha reducido el tamaño del transgen para facilitar un empaquetamiento eficaz del genoma de longitud completa, que contiene únicamente los últimos 3 de los 6 dominios de unión a metales (ATP-MDB456).

Evaluación del riesgo. Identificación de riesgos potenciales.

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

La presencia de virus adenoasociados competentes para la replicación (AAVcr), se analiza mediante la trasducción de células HeLa con el OMG en presencia o ausencia del Adenovirus de tipo silvestre. Se realizan tres rondas sucesivas de amplificación vírica. Los AAVcr se detectan mediante PCR cuantitativa (qPCRc) en tiempo real, amplificando tres secuencias: 2



específicas para el ADN de *rep2* y *cap9* del AAV, y una para un gen endógeno de las células HeLa (albumina humana).

Si el número de copias de *rep2* y/o *cap9* por célula es ≥ 10 al menos en una de las tres rondas de amplificación, se confirma la replicación y los datos se notifican como “Detectadas en 1×10^8 CG”.

Si la muestra de prueba da negativo para secuencias *rep2* y *cap9*, los datos se notifican como “Ninguna detectada en 1×10^8 CG”.

El análisis de AAVcr se realiza durante la liberación del principio activo ya que las líneas celulares solo se transducen transitoriamente en cada lote de fármaco nuevo,

-Estabilidad

El virus adenoasociado es un virus de ADN monocatenario con una gran estabilidad genética, según pone de manifiesto la estrecha relación existente entre los genes *rep* y *cap* de numerosos serotipos del AAV. Por lo general, el grado de conservación de la secuencia génica del gen *rep* es mayor que el de *cap*, si bien suele ser $>90\%$ y $>80\%$, respectivamente. El AAV utiliza para la replicación ADN polimerasas del hospedador vírico que se caracterizan por una elevada fidelidad de polimerización del ADN y actividad exonucleasa de corrección de errores adicional, lo cual se traduce en una tasa de errores de replicación muy baja en comparación, por ejemplo, con las ARN polimerasas utilizadas por los virus de ARN.

Se espera, por tanto, que UX701 también sea genéticamente estable. Además, cada lote del fármaco UX701 se someterá a análisis. Dichos análisis, que pueden utilizarse como marcadores indirectos de la estabilidad genética, incluyen:

- La identidad del genoma: El genoma del vector UX701 contiene la secuencia codificante ATP7B humana funcional, que se verifica a través de un análisis de reacción en cadena de la polimerasa digital en gotículas (RCPdg) dirigido a la región exclusiva del genoma de UX701. Todos los lotes del principio activo se someten a esta prueba.
- Identidad de la cápside: Se utiliza el método de la cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS) para verificar la identidad del serotipo del AAV9 mediante un análisis de masa exacto de cada una de las proteínas víricas (PV) que componen la partícula del AAV. Todos los lotes del principio activo se someten a esta prueba.
- Secuenciación del ADN del genoma del vector: Esta prueba se realiza para confirmar la fidelidad de la secuencia del ADN empaquetado. La secuencia se ha confirmado y no se han descubierto variaciones de la secuencia de referencia en la región codificante de dos lotes. No se han secuenciado otros lotes.

-Biodistribución y excreción del vector clínico (*shedding*).

Los datos en ratones, perros, primates no humanos y seres humanos indican que la integración de vectores de AAV en el genoma del hospedador es un acontecimiento infrecuente, y la mayoría del vector se encuentra en forma de episomas concatémicos. A diferencia de los vectores retrovíricos, que codifican proteínas víricas para crear rupturas bicatenarias, cuando



se produce la integración del AAV, lo hace en rupturas cromosómicas preexistentes. Los resultados de la integración son deleciones en las ITR del AAV y duplicaciones de las secuencias del hospedador. Teniendo en cuenta el tropismo tisular del AAV9 y los resultados de los estudios preclínicos, el mayor potencial de integración se encuentra dentro de los hepatocitos. En estudios con animales y muestras humanas, no se ha establecido una correlación clara entre la integración genómica del AAV recombinante y el desarrollo de carcinoma hepatocelular. Además, la proteína transgénica no es un factor de proliferación que pueda promover la progresión tumoral, y no está implicada en vías biológicas capaces de iniciar carcinogénesis, como los oncogenes.

Se llevó a cabo un estudio de biodistribución y toxicidad en ratones adultos C57BL/6J para caracterizar la posible toxicidad y biodistribución de UX701 después de una dosis i.v. única. Las dosis media y alta administradas son aproximadamente 3 y 10 veces superiores a la dosis clínica más alta propuesta, respectivamente.

La biodistribución se evaluó a la dosis media debido al potencial de saturación hepática de UX701 con la dosis alta. Se observó que el ADN del genoma del vector UX701 se distribuyó ampliamente en todos los tejidos examinados desde el día 4 hasta el día 92, excepto en sangre completa, que no tenía concentraciones medibles en el día 92. El hígado contenía el nivel más alto de genomas del vector en todos los puntos temporales. Las copias del genoma del vector presentes en el hígado persistieron en general a lo largo de todo el estudio. En todos los demás tejidos, incluidas las gónadas, se observó una disminución de la concentración de ADN del genoma del vector UX701 entre el día 4 y el día 92.

Respecto a la expresión de ATP7B-MBD456, se hallaron concentraciones medibles de ARNm de ATP7B-MBD456 en el hígado en los 3 puntos temporales. La expresión en otros tejidos fue esporádica.

No se han realizado estudios preclínicos para evaluar la excreción de UX701.

Durante el ensayo se evaluará la excreción del vector en saliva, orina y heces. A todos los sujetos aleatorizados en la etapa 1 se les recogerán muestras de saliva, orina y heces para analizar la excreción del vector en puntos temporales especificados y hasta que se seleccione una dosis para la etapa 2.

Posteriormente, se les seguirá recogiendo cada tipo de muestra a los sujetos en los puntos temporales especificados, hasta que se obtengan al menos 3 resultados negativos consecutivos de ese tipo de muestra.

Los ensayos clínicos con otras terapias génicas con AAV han mostrado que se produce una excreción transitoria del vector tras la administración intravenosa de vectores de AAV recombinantes; sin embargo, se espera que los riesgos asociados a la excreción del vector sean insignificantes. El AAV de tipo silvestre no es patógeno y no puede replicarse sin un virus auxiliar.

Manipulación, control y tratamiento de residuos

La preparación y almacenamiento del medicamento en investigación se realizará en el Servicio de Farmacia de los centros hospitalarios que participan en el ensayo. Se almacenará en un



congelador seguro a una temperatura controlada de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ o más bajo, al que solo tendrá acceso el personal autorizado del estudio.

La preparación del medicamento en investigación se realizará en cabina de bioseguridad de clase II por personal cualificado.

Para el transporte interno los viales del medicamento en investigación se colocarán en una bolsa cerrada herméticamente dentro de un envase con paredes laterales duras a prueba de vertidos.

Se deben utilizar equipos de protección individual (EPI) estandarizados, según requerimiento de promotor. Como mínimo, los EPI deben incluir una bata desechable que se cierre por atrás, gafas de seguridad, gafas protectoras o una pantalla de seguridad anti-salpicaduras para proteger de fluidos corporales, guantes, gorro quirúrgico y pantuflas.

Las muestras de los pacientes se mantendrán al servicio del Investigador Principal siguiendo las instrucciones indicadas en el manual del laboratorio del estudio hasta su envío al laboratorio central.

Los materiales fungibles (incluidos, entre otros, los guantes, las mascarillas, las jeringuillas, las agujas y los tubos) y todos los materiales desechables que entren en contacto con el medicamento en investigación deberán desecharse de acuerdo con las prácticas de cada centro para materiales infecciosos.

Los materiales no desechables deberán descontaminarse utilizando un desinfectante apropiado, como hipoclorito de sodio al 1%, glutaraldehído al 2% o dodecilsulfato de sodio al 0,25%. Se pueden usar desinfectantes equivalentes disponibles en el centro si son efectivos contra AAV.

Los residuos líquidos se deben descontaminar y desechar usando un desinfectante químico apropiado o autoclave. Los desinfectantes que son eficaces contra AAV incluyen hipoclorito de sodio al 1%, glutaraldehído al 2% y dodecilsulfato de sodio al 0,25%; Se pueden usar desinfectantes equivalentes disponibles en el sitio de investigación si son efectivos contra AAV.

Una vez efectuado el recuento del fármaco del estudio, los viales de medicamento en investigación usados y sin usar deben devolverse al proveedor responsable del almacén clínico y del envío o descontaminarse utilizando desinfectantes disponibles o con autoclave.

En caso de liberación accidental del contenido de algún vial de UX701 o del producto diluido para infusión y de que entre en contacto con materiales de transporte o superficies, el vertido deberá descontaminarse utilizando un desinfectante apropiado, como hipoclorito de sodio al 1%, glutaraldehído al 2% o dodecilsulfato de sodio al 0,25%; Se pueden usar desinfectantes equivalentes disponibles en el centro de investigación si son efectivos contra AAV.

Las instrucciones para los pacientes recogen las medidas de higiene que deben seguir para evitar la diseminación del OMG



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 del mismo 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 29 de septiembre de 2021