



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE ARENAVIRUS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/21/20)

Título del ensayo

Estudio en fase I/II de los vectores TheraT[®] que expresan antígenos específicos del virus papiloma humano 16 positivo (VPH 16+) en pacientes con cánceres VPH 16+ confirmados, del promotor Hookipa Biotech GmbH.

Características del ensayo

El período de liberación propuesto es de octubre 2021 a noviembre 2023.

En el ensayo participarán el Hospital Clinic de Barcelona, el Hospital Universitari Vall d'Hebron, el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, el Centro Integral Oncológico Clara Campal y el Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz.

Es un ensayo con dos vectores virales (LCMV TheraT[®] HB-201 y vector de PICV TheraT[®] HB-202). Es el primer estudio en humanos de HB-201 en monoterapia y de HB-201 y HB-202 en terapia alternada con los dos vectores.

La dosis inicial para la monoterapia con HB-201 es de 5×10^5 VCR UFF. La dosis más alta de HB-201 que se propone administrar es de 5×10^8 VCR UFF, aunque es posible que se añadan otras dosis durante el transcurso del estudio.

La dosis inicial propuesta para la terapia alternada de dos vectores, con HB-201 y HB-202, es HB-202 a una dosis de 1×10^6 VCR UFF en régimen de alternancia secuencial con la dosis más elevada de HB-201 que se habrá determinado que es segura durante la monoterapia con HB-201. HB-201 se administrará por vía intravenosa o intratumoral y el HB-202 sólo por vía intravenosa.

Los ciclos de tratamiento se administrarán mientras el paciente los tolere, ya sea cada tres semanas, cada cuatro semanas o cada seis semanas, dependiendo de los grupos de tratamiento, con la suposición de un tiempo total de 6 meses con el fármaco del estudio.

El seguimiento de los pacientes con diseminación viral persistente podrá prolongarse más allá de los 30 días después de la última dosis del fármaco del estudio y podrá continuar cada 30 días a partir de entonces, hasta que los resultados de la diseminación viral sean negativos o debajo del límite de detección.

Características del organismo modificado genéticamente

Vector de LCMV TheraT[®] HB-201 y vector de PICV TheraT[®] HB-202:

- El OMG HB-201 se obtienen a partir del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), del clon 13 de la cepa Armstrong con la glicoproteína (GP) de la cepa WE, en el que se inserta el gen que codifica para una proteína de fusión inactivada (E7E6) basada en la proteína temprana 7 (E7) y en la E6 del virus del papiloma humano 16 (VPH16).



- El OMG HB-202 se obtienen a partir del virus Pichindé (PICV), pase 18 (p18), en el que se inserta el gen que codifica para una proteína de fusión inactivada (E7E6) basada en la proteína temprana 7 (E7) y en la E6 del virus del papiloma humano 16 (VPH16).

Tanto el LCMV como el PICV son virus de ARN monocatenario, bisegmentados y negativos de la familia Arenaviridae. Los Arenavirus están compuestos por un complejo de ribonucleoproteína rodeado por una bicapa lipídica procedente de las células hospedadoras y presentan espículas de glicoproteína (GP). La proteína viral *RING finger Z*, un componente estructural del virión, forma una capa debajo de la envoltura viral. El complejo ribonucleoprotéico está formado por la nucleoproteína viral (NP), la ARN polimerasa viral dependiente del ARN (L) y el ARN genómico.

El genoma del ARN de tipo salvaje (ts) consta de dos segmentos de ARN monocatenarios negativos, designados como segmento pequeño (S) y segmento grande (L). El segmento S codifica las proteínas de la superficie vírica GP y NP. El segmento L codifica las proteínas Z y L. Las regiones no traducidas (UTR) 5' y 3' flanquean cada segmento genómico. Los marcos de lectura abierta (ORF) de los genes individuales están codificados en orientación de ambisentido y separados por una región intergénica (IGR).

Para diseñar HB-201 y HB-202, se modificaron los respectivos genomas parentales segregando la GP y la NP, que en el contexto de los virus de tipo silvestre están codificadas en un solo segmento S, en segmentos S duplicados artificialmente. Cada OMG, por tanto, contiene tres segmentos genómicos, incluido un segmento L y dos segmentos S, y los segmentos S codifican GP o NP, pero no ambas. Además, la GP en el segmento S se ha puesto bajo el control artificial de la UTR 3'. Cada segmento S también porta la secuencia de nucleótidos de la proteína de fusión E7E6.

Evaluación del riesgo. Identificación de riesgos potenciales.

-Patogenicidad

LCMV

Por lo general, los reservorios son roedores y no están adaptados a hospedadores humanos.

El hospedador natural es el ratón doméstico (*Mus musculus*), pero otros roedores, incluidos los hámsteres, pueden ser reservorios alternativos.

En ratones y otros mamíferos

En las colonias de ratones portadores, el virus se mantiene a lo largo de generaciones mediante transmisión a través de la placenta y no provoca ninguna enfermedad clínica. La infección aguda en ratones adultos se controla mediante una vigorosa respuesta inmunitaria celular, mientras que los ratones infectados *in utero* o poco después de nacer se vuelven inmunológicamente tolerantes al virus y desarrollan una infección persistente por LCMV de por vida. La infección en ratones de varios días de edad por contacto con ratones con infección crónica puede o bien ser asintomática y los ratones eliminan el virus o bien desarrollan enfermedad aguda (acompañada de blefaritis, debilidad, convulsiones, temblores, retraso del crecimiento y otros síntomas).

Los ratones con enfermedad aguda o mueren o se recuperan por completo, sin infección crónica.



En seres humanos

A diferencia de los roedores, no hay casos documentados de infección crónica por el LCMV en primates no humanos o en seres en humanos. En seres humanos, la gran mayoría de individuos infectados por el LCMV permanecen completamente asintomáticos o pueden experimentar una enfermedad pseudogripal inespecífica. De los que experimentan el síndrome pseudogripal leve, entre el 1 y el 2 % pueden progresar a una segunda fase de enfermedad con manifestaciones en el sistema nervioso central (SNC), que normalmente incluyen dolor de cabeza generalizado, náuseas, vómitos, fotofobia y rigidez de cuello compatible con la meningitis aséptica.

Se ha documentado desde hace décadas la infección accidental por la cepa Armstrong del LCMV y su variante, el clon 13, a causa de la inhalación de aerosol o por una lesión por pinchazo con una aguja y la perforación de la piel con objetos punzantes infectados en un contexto de laboratorio/sanitario. La evolución clínica de estas infecciones accidentales ocasionales osciló entre lo extremadamente leve y lo normal (infecciones subclínicas, enfermedades similares a la gripe) o lo grave (meningitis aséptica autolimitada).

En sujetos fuertemente inmunodeprimidos, el LCMV puede provocar una enfermedad más grave (coriomeningitis), como la observada en pacientes de trasplantes de órganos tras una inmunodepresión intensa concomitante con el injerto de tejido infectado por LCMV. En estos pacientes receptores de trasplantes de vísceras macizas, la inmunodepresión intensa aparentemente impidió un control inmunitario normal y eficiente de la infección por LCMV.

Hasta el momento, no hay constancia de casos documentados de transmisión entre humanos. Puede producirse transmisión vertical mediante infección congénita cuando la madre contrae la infección durante el embarazo. La transmisión vertical puede provocar abortos o enfermedad clínica en el feto, incluidas malformaciones del sistema nervioso central del feto. No hay estudios que sugieran que el LCMV o cualquier otro arenavirus sea oncogénico.

PICV

Se ha aislado principalmente de *Oryzomys albigularis* (rata guliblanca de Bosque Nublado) en la cordillera de los Andes de Colombia y con menor frecuencia en otra especie de roedor, *Thomasomys fuscatus*, también endémica en esta región geográfica. De forma similar a otros mamarenavirus, el PICV se propaga de forma natural por *Oryzomys albigularis*, que pueden infectarse de forma crónica y mantener el virus en su sangre y eliminar el virus de forma persistente en sus excreciones. El PICV se transmite por inhalación de partículas transportadas por el aire o por ingestión de alimento o agua contaminados.

En ratones y otros mamíferos

Los ratones infectados por el PICV pueden eliminar la infección en varios días sin síntomas clínicos externos. No en todos los roedores el virus demuestra una patogenicidad similar. Por ejemplo, se sabe que un PICV de pase bajo (cepa de p2 de PICV) provoca una enfermedad febril limitada en cobayas que acaba eliminando; sin embargo, se ha demostrado que el pase en serie del PICV en cobayas aumenta drásticamente la patogenicidad del virus en esta especie. La variante de p18 del PICV adaptada resultante es letal para cobayas endógamas. Sin embargo, se ha demostrado que es benigna en primates, hámsteres sirios dorados y ratones suizos inoculados por vía periférica. Por consiguiente, se considera que la adaptación de la cepa de p2 ancestral del PICV a p18, que se usa para la generación del vector TheraT[®], tiene pocas probabilidades de aumentar la capacidad del virus para replicarse y provocar enfermedad en seres humanos.



Aunque el PICV de tipo salvaje puede infectar de manera crónica a su hospedador natural, la rata guliblanca de Bosque Nublado, no se ha esclarecido si esto afecta a la aptitud reproductiva de los animales del reservorio natural. Se dispone de poca información fiable acerca de la infección por PICV en perros, gatos, ganado o vertebrados no mamíferos.

En seres humanos

En un ambiente de laboratorio, el PICV puede causar infecciones asintomáticas en seres humanos. En un estudio, aproximadamente un 50 % de los individuos que trabajaban con el virus se infectó accidentalmente, según se demostró por su seroconversión, es decir, desarrollo de una respuesta inmunitaria dirigida contra el PICV, aunque no se notificó una enfermedad identificable. Además, en este estudio no se observaron indicios de infección entre trabajadores del mismo laboratorio que no trabajaban con el PICV, lo que podría indicar que este virus no parece transmitirse fácilmente entre humanos.

-Determinación de virus competentes para la replicación

La atenuación de los vectores TheraT[®] de Hookipa se basa en dos principios:

- Control artificial de la GP por medio de la 3'UTR (en lugar de la 5'UTR) para evitar la formación de productos recombinantes activos en caso de que se produzca recombinación entre los dos segmentos S.
- Segregación de elementos genómicos esenciales en segmentos S duplicados, obteniéndose un genoma trisegmentado.

La plataforma del vector vírico TheraT[®] de Hookipa está diseñada específicamente para inhibir la reversión a un virus natural no atenuado. Como resultado del posicionamiento artificial de la 3'UTR, el hipotético evento de recombinación entre los dos segmentos S ocurriría a expensas de la pérdida de la 5'UTR, lo que crearía productos recombinantes inactivos desprovistos de un promotor vírico funcional. Por lo tanto, el diseño genético de los segmentos S impide por completo la recombinación intersegmentaria y la reversión a un segmento S único natural y funcional que codifique tanto la GP como la NP, tal y como se ha demostrado *in vivo* en un modelo experimental de ratones altamente inmunodeficientes incapaces de controlar la replicación del vector vírico.

La estructura del genoma trisegmentado es la base de la menor eficiencia de empaquetado de TheraT[®] en comparación con los virus bisegmentados. Dado que los genes L Z, GP y NP son necesarios para la replicación del genoma viral y la formación de partículas de virus infecciosas, es necesario el empaquetado conjunto de los tres segmentos génicos para la proliferación del vector viral TheraT[®]. Sin embargo, los arnavirus han evolucionado para empaquetar preferentemente dos segmentos genómicos (un segmento L y un segmento S). Por lo tanto, el empaquetamiento conjunto de los tres segmentos del genoma de TheraT[®] resulta en un vector viral competente para la replicación, pero atenuado (Kallert *et al.*, 2017; Bonilla *et al.*, 2021).

Pruebas experimentales del fenotipo de replicación atenuada en los vectores víricos TheraT[®]

HB-201

En pocas ocasiones, se ha observado meningitis o meningoencefalitis en casos de infección por LCMV en humanos inmunocompetentes, lo que indica un riesgo específico solo para la infección en el sistema nervioso central. En un ejemplo de infección intracraneal por LCMV en ratones, la neurovirulencia inducida por HB-201 se atenuó considerablemente (100 veces) en



comparación con el LCMV natural. La replicación de HB-201 también se vio significativamente afectada en comparación con el LCMV natural en células humanas cultivadas y en un ejemplo de infección sistémica en ratones (Schmidt *et al.*, 2020).

HB-202

Se demostró que la replicación de HB-202 estaba significativamente deteriorada en comparación con su cepa natural parental en células HEK293 cultivadas, así como en un modelo establecido de infección en cobayas Hartley, que se sabe que son muy susceptibles al PICV natural. Los animales infectados con una dosis elevada de HB-202 desarrollan una viremia transitoria nula o muy leve y no presentan signos de enfermedad. En comparación, las cobayas Hartley infectadas con PICV natural tenían virus detectables en suero a todos los niveles de dosis probados y sucumbieron o fue necesario sacrificarlas de manera prematura incluso a un nivel de dosis dos veces menor, lo que sugiere una atenuación de al menos 100 veces (Bonilla *et al.*, 2021).

-Tropismo

No se espera que las modificaciones genéticas introducidas para generar HB-201 y HB-202 alteren la naturaleza de la interacción con el huésped, confieran ventajas a los OMG en términos de susceptibilidad al sistema inmunitario humano o animal o aumento de la tendencia a la transmisibilidad entre humanos en comparación con sus respectivas cepas parentales.

Salvo por su genoma trisegmentado, se espera que la composición de las partículas de HB-201 y HB-202 sea comparable a la de LCMV parental y PICV parental, respectivamente, por lo que cabe esperar un tropismo y un rango de huéspedes similares.

Los mammarenavirus, como el PICV y el LCMV, se dirigen a las células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales, proporcionando antígenos para la inducción eficiente de linfocitos T citotóxicos (LTC) CD8+.

Al igual que sus virus parentales, HB-201 y HB-202 demuestran tropismo hacia las CPA y entregan el antígeno asociado al tumor E7E6 para la inducción eficiente de una potente respuesta de las células T dirigida contra las células tumorales del VPH 16+.

-Potencial de recombinación con virus parentales

Los episodios de recombinación entre virus ARN monocatenarios negativos como LCMV o PICV parecen producirse con una frecuencia muy baja en la naturaleza. No se prevé que las modificaciones genéticas introducidas para generar los vectores víricos de TheraT[®]-LCMV y TheraT[®]-PICV den lugar a una mayor frecuencia de episodios de recombinación. En su lugar, los vectores TheraT[®] como HB-201 y HB-202 se han diseñado para evitar la reversión a un fenotipo de tipo silvestre y no se prevé la reversión de su fenotipo de replicación atenuada en el hipotético caso de un episodio de recombinación no homóloga.

Si bien existe la posibilidad de que los dos productos estén activos en sujetos al mismo tiempo debido a la naturaleza alternativa secuencial de la liberación propuesta, no se prevén reordenamientos genéticos entre HB-201 y HB-202, basándose en los datos experimentales que sugieren que el material reordenado se atenuaría sustancialmente o no sería viable en absoluto.

La aparición de los vectores quiméricos TheraT[®]-LCMV/TheraT[®]-PICV por recombinación o reordenamiento genético entre HB-201 o HB-202 con sus respectivas cepas parentales, si bien es hipotética, no se puede descartar. Para que se produzca la recombinación o el reordenamiento



de las células hospedadoras con los vectores virales TheraT[®] y las respectivas cepas parentales, sería necesaria la coinfección de estas últimas. Sin embargo, la inhibición de la superinfección observada en las células infectadas por el arnavirus podría impedir la posibilidad de transferencia de material genético.

En el caso de que se produzca dicho intercambio entre HB-201 y LCMV de tipo silvestre, no existe ningún motivo para creer que el virus recombinante o reordenado resultante sería más patógeno (tampoco para poblaciones vulnerables) que las respectivas cepas modificadas en el laboratorio o de tipo salvaje de LCMV que se encuentran en poblaciones de ratón alrededor del mundo y ampliamente distribuidas por el medio ambiente.

Ni PICV de tipo silvestre ni su huésped natural, la rata de Montane Rice, son endémicos en Estados Unidos o en países de Europa donde está prevista la liberación intencionada. Si se produjese el virus recombinante o reordenado de HB-202 y la PICV silvestre, no se esperaría que fuesen más patógenos que las respectivas cepas de PICV modificadas en el laboratorio o de tipo salvaje, que no provocan enfermedades en seres humanos.

Por lo tanto, el riesgo global de que se produzcan recombinantes o reordenamientos del LCMV/HB-201 o del PICV/HB-202 que causen daños se considera insignificante.

-Biodistribución y excreción del vector clínico (Shedding).

La biodistribución de HB-201 y HB-202 se ha investigado en ratones durante el programa de desarrollo preclínico de HB-200. No hubo evidencias de eliminación del vector viral en orina y heces, analizadas por RT-qPCR, en los ratones que recibieron HB-201 o HB-202 por vía intravenosa.

HB-201 en monoterapia y, HB-201 y HB-202, en terapia alternada con dos vectores se está investigando actualmente en un primer estudio en humanos en pacientes con cáncer HPV16+ confirmado en EE. UU. Se dispone de datos clínicos limitados sobre la diseminación del vector vírico HB-201 en monoterapia a partir del primer estudio en curso en humanos en pacientes de ≥ 18 años con cáncer VPH16+ confirmado y, en este momento, no se pueden extraer conclusiones sobre la caracterización o transmisión del HB-201. El análisis de la caracterización de la diseminación del vector vírico está en curso. No se dispone de datos preliminares de los pacientes con cáncer HPV16+ que recibieron HB-201 y HB-202 en terapia alternada con dos vectores. La diseminación del HB-202 procedente de pacientes tratados es posible. La diseminación del vector vírico también se está controlando en pacientes que reciban HB-201 y HB-202 en terapia alternada con dos vectores.

La diseminación viral se analizará mediante PCR de transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR) para cuantificar las copias del ARN de la nucleoproteína y puede ir acompañado del ensayo de infectividad para caracterizar el material diseminado para confirmar la ausencia de virus infeccioso (muestras de sangre, saliva, orina y heces).

Manipulación, control y tratamiento de residuos

Todos los centros deben cumplir con los requisitos de bioseguridad establecidos para el nivel de bioseguridad 2 en el almacenamiento, preparación y administración del producto en investigación.

En las respectivas hojas de datos de seguridad de materiales se instruye al personal, que puede entrar en contacto con HB-201 o HB-202, para que siga las precauciones y los procedimientos



del laboratorio y utilice el equipo adecuado de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio (BPL) cuando manipule el material bajo contención BSL-2, como:

- minimizar la generación de polvo o aerosol durante su uso.
- llevar puesto el equipamiento protector personal adecuado (gafas de seguridad o gafas de protección aprobadas, bata de laboratorio, guantes protectores u otros soportes de protección).
- evitando el contacto con la piel y los ojos.
- lavarse bien las manos después de la manipulación.

El transporte interno de las muestras se efectuará en un envase cerrado, a pruebas de roturas y fugas. Las muestras se almacenarán en un recipiente cerrado en las instalaciones bajo circunstancias de acceso restringido.

Los centros reciben un manual de laboratorio central que informa al personal sanitario, en particular a los laboratorios locales, sobre cómo obtener muestras de pacientes y cómo enviar las muestras de pacientes para los análisis al laboratorio central.

Los centros tienen instrucciones para gestionar las liberaciones accidentales de acuerdo con las medidas descritas en las hojas de seguridad respectivas.

Todos los productos sin utilizar, envases contaminados y materiales usados para preparar y administrar HB-201 y/o HB-202 se deben eliminar como residuos biopeligrosos de acuerdo a la normativa de los centros hospitalarios.

Se informará a los pacientes que participan en el ensayo de las medidas a seguir para evitar la diseminación de los OMG

Bibliografía

-Bonilla, W. V., N. Kirchhammer, A. F. Marx, S. M. Kallert, M. A. Krzyzaniak, M. Lu, D. S., S. Schmidt, J. Raguz, U. Berka, I. Vincenti, M. Pauzuolis, R. Kerber, S. Hoepner, S. Günther, C. Magnus, D. Merkler, K. K. Orlinger, A. Zippelius and D. D. Pinschewer (2021). "Heterologous arenavirus vector prime – boost overrules self-tolerance for efficient tumor-specific CD8 T cell attack." *Cell Reports Medicine* 2(3): 100209.

-Kallert, S. M., S. Darbre, W. V. Bonilla, M. Kreutzfeldt, N. Page, P. Muller, M. Kreuzaler, M. Lu, S. Favre, F. Kreppel, M. Lohning, S. A. Luther, A. Zippelius, D. Merkler and D. D. Pinschewer (2017). "Replicating viral vector platform exploits alarmin signals for potent CD8(+) T cell-mediated tumour immunotherapy." *Nat Commun* 8: 15327.

-Schmidt, S., W. V. Bonilla, A. Reiter, F. Stemeseder, T. Kleissner, D. Oeler, U. Berka, A. ElGazzar, B. Kiefmann, S. C. Schulha, J. Raguz, M. Habbedine, M. Scheinost, Q. Xiaopping, H. Lauterbach, I. Matushansky, D. D. Pinschewer and K. K. Orlinger (2020). "Live-attenuated lymphocytic choriomeningitis virus-based vaccines for active immunotherapy of HPV16-positive cancer." *Oncoimmunology* 9(1): 1809960.



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 27 de septiembre de 2021