



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DEL VIRUS HERPES SIMPLEX DE TIPO SILVESTRE (VHS-1) MODIFICADO GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/21/29)

Título del ensayo

Estudio de fase 1 abierto, multicéntrico, de RP2 como monoterapia y en combinación con el bloqueo de PD1 en pacientes con tumores sólidos [RP2-001-18].

Características del ensayo

El promotor propone un período para la liberación de febrero 2022 a febrero 2024.

El diseño del estudio consta de tres partes. La parte 1 del estudio es una fase de aumento progresivo de la dosis para evaluar la seguridad y la tolerabilidad de RP2 como monoterapia. La parte 2 está diseñada para evaluar la seguridad y la actividad antitumoral de RP2 en combinación con nivolumab en una cohorte de ampliación con una población de pacientes seleccionada. La parte 3 está diseñada para evaluar RP2 como monoterapia en una población de pacientes seleccionada.

En el ensayo participará el Hospital Universitario HM Sanchinarro.

Características del OMG

El producto de inmunoterapia oncolítica, RP2, (nombre común rHSV-1/hGM-CSF/GALV-GP-R-/ah-CTLA-4), es un virus herpes simple de tipo 1 (VHS-1) de replicación selectiva.

RP2 se generó modificando el genoma del VHS-1 mediante delección en el genoma viral de ambas copias del gen ICP34.5 y del gen ICP47, asociados con la neurovirulencia y el bloqueo de la presentación de antígenos, respectivamente. En lugar de las copias eliminadas de la secuencia ICP34.5, se insertaron dos casetes de expresión que codifican cada una de ellas el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano (hGM-CSF) y la proteína superficial del virus de la leucemia de gibones (GALV-GP) con delección de la secuencia R (R-). Además, RP2 contiene la secuencia correspondiente a un anticuerpo de cadena sencilla frente a la proteína 4 humana asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4).

Las modificaciones genéticas realizadas para producir el virus modificado genéticamente se llevaron a cabo en varios pasos. Las modificaciones constaron de una serie secuencial de eventos de recombinación homóloga *in vitro* en células de cultivo cotransfectadas con ADN viral y vectores plasmídicos que contienen las secuencias de ADN que codifican las regiones a uno u otro lado del sitio de inserción de la casete de expresión en el genoma del VHS-1 junto con la correspondiente casete de expresión.

Evaluación del riesgo. Identificación de riesgos potenciales.

-Patogenicidad

Hay muchos estudios que indican que la patogenicidad del VHS-1 con delección del gen ICP34.5 se ve atenuada sustancialmente en animales y humanos.

VHS-1 no se integra en el ADN celular, no se tiene conocimiento que sea tumorigénico o cancerígeno. No se han realizado modificaciones en RP2 que puedan afectar a estos rasgos.

La zoonosis ocurre de forma natural con mayor frecuencia entre especies huésped estrechamente relacionadas, pero también se puede encontrar transmisión de agentes infecciosos allí donde las



barreras a la transmisión son inherentemente pequeñas o se han reducido de forma artificial. No se tiene conocimiento de que el VHS-1 tenga capacidad zoonótica y es raro que los herpesvirus provoquen infecciones en otras especies.

-Estabilidad genética

Se realizó la secuenciación del genoma completo de distintos lotes del producto final. La secuencia de nucleótidos del inserto hGM-CSF/ah-CTLA-4/GALV-GP-R- en la región de ICP34.5 y la delección en la región de ICP47 eran idénticas a las secuencias esperadas.

Se detectó a uno de los lados del inserto hGM-CSF/ah-CTLA-4/GALV-GP-R-, en la región de ICP34.5, la eliminación de 255 nucleótidos de la secuencia vírica. Además, se insertaron 459 nucleótidos de una secuencia de vector plasmídico entre el final de la secuencia de SV40pA y el inicio de la secuencia vírica.

La delección e inserción se produce en ambas copias de los loci ICP34.5 y siempre entre la secuencia poli A de SV40 (que está inmediatamente aguas abajo de la secuencia codificante de GALV) y la secuencia del virus.

La secuencia insertada procede de una región de los plásmidos utilizados para obtener RP2, que es mayormente no funcional salvo por la corta secuencia de un promotor y una parte muy pequeña del sitio de clonación múltiple. El promotor no es funcional en células de mamíferos y por tanto no se prevé que tenga ningún efecto o consecuencia en la forma en la que está presente en RP2.

En el análisis de varios ensayos clínicos que incluían el uso de ADN plasmídico para el tratamiento de cánceres como melanomas, cáncer pancreático, cáncer cutáneo de células escamosas o cáncer de cabeza y cuello, y también como estrategia de vacunación para el tratamiento de enfermedades infecciosas como la gripe, el VIH y la hepatitis, los datos de seguridad indican que el ADN plasmídico es seguro y en la mayoría de los casos no tiene efectos secundarios o sus efectos secundarios están limitados al lugar de la inyección.

-Potencial de recombinación con el virus parental *in vivo*

La recombinación homóloga puede ocurrir de forma espontánea entre los genomas de cepas diferentes de VHS-1 si ambas se están replicando en la misma célula. No obstante, es muy poco probable que pueda haber recombinación entre RP2 y VHS-1 de tipo silvestre, ya que eso implicaría que una misma célula se ha infectado simultáneamente con RP2 y con VHS-1 de tipo silvestre. Es de esperar que el VHS-1 de tipo silvestre se encuentre solamente en las calenturas o en otros lugares con infección activa de VHS, y RP2 no se administra en esos lugares, sino en tumores. RP2 no es capaz de replicarse y diseminarse de forma eficaz en el tejido normal, lo que significa que, además, es muy poco probable que RP2 esté presente y replicándose en el mismo tejido que el VHS-1 de tipo silvestre. El VHS-1 puede entrar en latencia en los ganglios neuronales. No obstante, la latencia no está asociada a replicación viral y, por lo tanto, incluso si RP2 y VHS-1 de tipo silvestre llegaran a estar ambos presentes en los ganglios espinales, lo que es poco probable, no habría recombinación, ya que para el proceso de recombinación es necesario que haya replicación.

Se ha demostrado experimentalmente que la recombinación no homóloga (recombinación entre regiones diferentes de los dos genomas del VHS-1) no ocurre a niveles detectables entre cepas de VHS. Por lo tanto, incluso si RP2 y el VHS-1 de tipo silvestre estuvieran presentes y replicándose en una misma célula y hubiera recombinación, ésta sería homóloga, lo que significa que cualquier transferencia de ADN entre RP2 y el VHS-1 de tipo silvestre se daría desde o hasta la misma ubicación genética. Por lo tanto, la transferencia recombinante de este casete a una cepa de tipo



silvestre se haría en el locus de ICP34.5, lo que acarrearía la delección del gen ICP34.5. Esto significa que, en términos de capacidad replicativa, los virus resultantes quedarían inhabilitados de forma similar a RP2 (y por lo tanto tendrían una desventaja evolutiva en relación con la población de VHS-1 de tipo silvestre). El rango de huéspedes, la susceptibilidad a los agentes antivirales y la susceptibilidad a los métodos de inactivación física o química serían también iguales a los de las cepas parentales. Por lo tanto, cualquier variante genética que pudiera, teóricamente, crearse en eventos de recombinación no conllevaría ningún cambio en el riesgo medioambiental.

-Excreción (Shedding)

Estudios clínicos

Se dispone de datos de biodistribución y excreción en pacientes participantes en un ensayo clínico con un OMG similar, RP1, que se diferencia de RP2 en que no codifica la secuencia correspondiente al anticuerpo de cadena sencilla frente a la proteína 4 humana asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4). En ese ensayo se administró el OMG mediante inyecciones directamente en lesiones superficiales en la piel o justo por debajo de ella y en inyecciones asistidas mediante métodos de obtención de imágenes (TC o ecografía), en lesiones viscerales profundas.

El lugar de inyección fue el punto con mayor frecuencia de positivos en el caso de las inyecciones superficiales, y la sangre fue positiva con mayor frecuencia para las inyecciones profundas en la prueba qPCR, pero no hubo positivos confirmados con TCID50. El apósito fue positivo con menos frecuencia que el lugar de inyección en la prueba qPCR, pero ningún positivo se confirmó con TCID50, lo que demuestra que se contuvo el virus. Se detectaron niveles bajos en orina. Se encontró que un pequeño número de pacientes presentaron muestras de mucosa positivas en la prueba qPCR en algún momento de la toma de muestra. En todos los casos la muestra tomada en los siguientes puntos temporales siempre fue negativa (aunque ningún positivo se pudo confirmar con TCID50). Los valores positivos en la prueba qPCR para el lugar de inyección fueron bajos en comparación con la dosis administrada.

Estudios preclínicos

Los resultados de un estudio de administración de dosis repetidas de mRP2 (RP2 con casete origen murino) por vía intratumoral en dosis de hasta $2,5 \times 10^6$ UFP/ratón ($12,5 \times 10^7$ UFP/kg) indican que es bien tolerado en el modelo de tumor A20 (linfoma de linfocitos T murino), sin que se observara mortalidad ni efectos adversos significativos. Si bien los análisis de biodistribución en otros puntos temporales se encuentran en curso, a las 24 horas y los 7 días después de la última administración, RP2 se detectaba principalmente en el tumor A20 o en la piel tanto a dosis bajas (5×10^6) como a dosis altas (5×10^7). Los niveles detectados en el tumor son indicativos de niveles altos de replicación vírica. Ningún otro tejido fue positivo a la dosis de 5×10^6 . A la dosis alta, se detectaron niveles bajos de virus RP2 de forma intermitente en un pequeño número de tejidos sólidos. En los puntos más tardíos, los tejidos positivos se detectaban por lo general en el mismo animal. Cinco muestras de tejidos nerviosos (de cerebro, nervio mediano y médula espinal torácica) dieron resultado positivo 24 horas después de la última administración de RP2, pero todas salvo 3 muestras eran negativas 7 días después de la última administración. Hasta el momento, no se ha detectado ninguna muestra con excreción positiva.



Manipulación, control y tratamiento de residuos

El OMG se conserva en una zona con acceso limitado.

La preparación de las cabinas se realizará en cabina de bioseguridad de clase 2. Se utilizarán guantes, protección ocular y bata.

El transporte interno de RP2 desde el lugar de preparación al lugar de administración debe realizarse en un recipiente sellado, desinfectable, hermético e irrompible con el contenido debidamente etiquetado.

La administración correrá a cargo de profesionales sanitarios experimentados y familiarizados con los productos de terapia génica, y con formación adecuada en los procedimientos de higiene y normas relativas a la seguridad y manejo de materiales infecciosos. Se utilizará equipo de protección individual (EPI) que incluirá bata de laboratorio y guantes, que se llevarán siempre que haya posibilidad de contacto directo de la piel con el virus. Se recomienda llevar protección ocular o mascarilla por si acaso se dan salpicaduras.

Las superficies de trabajo y los materiales que puedan estar en contacto con RP2 se descontaminarán con desinfectantes adecuados (como hipoclorito sódico), de acuerdo con los procedimientos de higiene del hospital. En caso de vertido accidental, el centro seguirá sus propios procedimientos de limpieza. RP2 es sensible a los métodos comunes de inactivación, tal como cualquier agente químico (solventes lipídicos y detergentes suaves) o inactivación física (deshidratación, calor, pH bajo) que afecte a la envoltura, lo que reduce su infectividad. RP2 es muy susceptible a la deshidratación y se inactiva rápidamente fuera de su huésped, y es susceptible a medicamentos antivíricos, tal como aciclovir.

Después de la administración, el producto que no se haya utilizado, los materiales que hayan estado en contacto con el OMG, como agujas, jeringas y equipo de protección individual (EPI), se desecharán en recipientes para residuos biológicos.

Se informará a los pacientes de las medidas que deben adoptar 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 20 de diciembre de 2021