

MODELO DE RESUMEN DE LA NOTIFICACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE DISTINTOS DE LAS PLANTAS SUPERIORES DE ACUERDO CON EL ARTÍCULO 11 DE LA DIRECTIVA 2001/18/CE

A. Información de carácter general:

1. Detalles de la notificación

a) Estado miembro de la notificación:	España
b) Número de la notificación:	B/ES/20/23
c) Fecha del acuse de recibo de la notificación:	18 de Noviembre de 2020
d) Título del proyecto:	Estudio de fase 1/2 de escalada de dosis para evaluar la seguridad, tolerabilidad y eficacia de una infusión intravenosa de dosis única de SPK-3006 en adultos con enfermedad de Pompe de inicio tardío
e) Período propuesto para la liberación:	1 de Enero de 2021 al 31 de Marzo de 2022

2. Notificador

Nombre de la institución o empresa:	Spark Therapeutics Ireland Limited
-------------------------------------	------------------------------------

3. Definición del OMG

a) Indíquese si el OMG es:	
	Viroide <input type="checkbox"/>
	Virus ARN <input type="checkbox"/>
	Virus ADN <input checked="" type="checkbox"/>
	Bacteria <input type="checkbox"/>
	Hongo <input type="checkbox"/>
	Animal <input type="checkbox"/>
	- mamíferos <input type="checkbox"/>
	- insectos <input type="checkbox"/>

- peces

- otro animal especifique el phylum y la clase

Otro, especifíquese (reino, phylum y clase)

b) Identidad del OMG (género y especie)

Orden: Piccovirales

Género: Dependoparvovirus

Especie: Virus Adeno-asociado (AAV)

Cepa: el OMG es un AAV seudotipado. Las repeticiones invertidas terminales (ITRs) presentes en el genoma del vector son derivadas del AAV salvaje. La cápside ha sido biotecnológicamente derivada de la cápside de un serotipo salvaje de AAV de primates no humanos.

Nombre común: SPK-3006

- c) Estabilidad genética, de acuerdo con el punto 10 de la letra A de la sección II del anexo III A:

SPK-3006 es un OMG no replicante y contiene un genoma recombinante de AAV que no contiene las secuencias virales codificantes. El genoma del vector sí que contiene las repeticiones terminales invertidas (ITR) derivadas del AAV silvestre y necesarias para la encapsidación. La falta de secuencias virales codificantes limita en gran medida el riesgo de propagación y el potencial de recombinación homóloga con otros AAV.

Los virus AAV salvajes son deficientes en replicación, no patógenos que naturalmente infectan a humanos. Los AAVs salvajes persisten en el núcleo de la célula mayoritariamente como episomas extra-cromosomales, sin embargo, se ha observado integración con baja frecuencia en una forma dependiente de la proteína Rep, principalmente en el sitio AAVS1, una región situada en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13-qter), como parte de su ciclo de vida (Deyle *et al.*, 2009).

La secuencia que codifica para las proteínas Rep ha sido eliminada de los vectores AAV recombinantes, y por lo tanto, la integración en el genoma del huésped se reduce significativamente (Penaud-Budloo *et al.*, 2008).

Cada lote de SPK-3006 se produce mediante el proceso de triple transfección libre de virus auxiliar (*helper*) (Matsushita *et al.*, 1998; Ayuso *et al.*, 2010). Los genes necesarios para la expresión y ensamblaje son aportados solo en *trans*, lo que reduce el riesgo de recombinación homóloga. Además, si la recombinación se produjese entre los plásmidos utilizados en la producción, el tamaño del nuevo genoma de AAV generado por tal evento sería demasiado grande para una encapsidación eficiente (Grieger *et al.*, 2005).

Los controles de calidad de SPK-3006 incluyen evaluación de impurezas de ADN, y un test de virus de replicación competente, para asegurar que no se detecta recombinación o reordenamientos genéticos durante la producción.

4. Tiene previsto el mismo notificador la liberación de ese mismo OMG en algún otro lugar de la Comunidad (de acuerdo con el apartado 1 del artículo 6)?

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo, indique el código del país: FR; DK (UK)	

5. Ha notificado ese mismo notificador la liberación de ese mismo OMG en algún otro lugar de la Comunidad?

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
--	-----------------------------

En caso afirmativo:

- Estado miembro de la notificación: NL; DE; IT;
- Número de la notificación: La aplicación en NL tiene el número de notificación B/NL/19/016

Las notificaciones de Alemania e Italia se encuentran bajo evaluación y no se dispone de número de notificación.

6. Ha notificado el mismo notificador u otro la liberación o comercialización de ese mismo OMG fuera de la Comunidad?

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
--	-----------------------------

En caso afirmativo:

- Estado miembro de la notificación: Estados Unidos
- Número de la notificación: No se dispone de numero de notificación.

7. Resumen del impacto ambiental potencial de la liberación de los OMG

El impacto medioambiental de SPK-3006 se considera insignificante por las razones resumidas a continuación:

- SPK-3006 es un vector AAV recombinante, deficiente en replicación, que será administrado por vía intravenosa mediante una infusión única a pacientes con enfermedad de Pompe. La administración de SPK-3006 se llevará a cabo en un único centro hospitalario en España (así como en centros de estudio adicionales en otros estados miembros) y se espera tratar a un total de 100 pacientes en un periodo de aproximadamente 10 años.
- Los AAVs son virus ubicuos en el medioambiente y en muchas (o la mayoría) especies son considerados como huéspedes naturales (varios serotipos). Además, la mayoría de humanos tienen anticuerpos detectables contra AAV, sugiriendo una exposición previa que puede haber ocurrido en algún periodo posterior al nacimiento (Gao *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2012; Baldo *et al.*, 2013; Zinn *et al.*, 2014; Fitzpatrick *et al.*, 2018). Asimismo, la infección de AAV no ha sido asociada con ninguna patología en ninguna especie.
- Los AAV son virus naturalmente deficientes en replicación en la ausencia de virus auxiliares mientras que en el vector viral obtenido por modificación genética se han eliminado todas las secuencias virales necesarias para la replicación y el empaquetamiento excepto las ITRs. Esta eliminación reduce de forma significativa el riesgo de recombinación potencial. La recombinación homóloga puede ocurrir teóricamente entre las ITRs del vector y las ITRs de un AAV salvaje que co-infeste el huésped, pero los virus resultantes de la recombinación serían igualmente deficientes en replicación, tal y como es el virus salvaje, y por lo tanto no podría propagar el material genético adquirido. La recombinación no-homóloga está considerada como muy rara y es improbable que genere genomas virales que puedan ser fácilmente encapsidados dado al límite de tamaño y, de nuevo, a

que el virus resultante sería deficiente en replicación, como el virus salvaje.

- En el caso del virus salvaje AAV se ha observado integración en una forma dependiente de la proteína Rep, principalmente en el sitio AAVS1 (Deyle *et al.*, 2009). La secuencia que codifica para las proteínas Rep ha sido eliminada de los vectores AAV recombinantes, y por lo tanto, la integración en el genoma del huésped se reduce significativamente (Penaud-Budloo *et al.*, 2008). El extremo 3' de la región no traducida (UTR) del AAV de tipo silvestre puede tener actividad de promotor/potenciador para la transcripción de genes vecinos (Logan *et al.*, 2017), pero SPK-3006 no contiene estas secuencias. Por lo tanto, el riesgo de integración se considera bajo.
- El proceso de producción es estándar y ha sido previamente utilizado por el Promotor para producir los vectores AAV de calidad clínica y comercial. Los agentes adventicios y externos son controlados en la sustancia activa y el producto terminado. Evaluaciones adicionales incluyen controles para la posible aparición de virus competentes para la replicación.
- En base a la disposición de datos preclínicos y clínicos del mismo producto, o de productos altamente similares incluyendo el mismo serotipo (cápside), se espera un número limitado de partículas en las excreciones de los pacientes (*shedding*). Dichas partículas son no-replicativas y pueden ser inactivadas potencialmente cuando se excretan en orina y heces.
- Durante la preparación y la administración del OMG, se toman medidas específicas para evitar que el OMG entre en contacto con personas diferentes a los pacientes. Incluso en el caso de que se produzca una exposición accidental, el OMG es una partícula vírica defectiva en replicación, con genes no víricos y con una capacidad de empaquetamiento limitada, haciendo que las rutas de movilización sean altamente improbables y que la difusión en el medioambiente sea insignificante. En personas o animales que se espongan accidentalmente, hay probablemente mínima o incluso ninguna consecuencia dado que la dosis recibida se anticipa que sea limitada y/o la exposición sistémica sea insignificante. Además, el promotor hepático específico limita la expresión en otros tejidos, y el hígado es poco probable que sea infectado tras exposición accidental. Por lo tanto, se considera insignificante el riesgo de la liberación del OMG para el medio ambiente y la salud humana.
- La cápside usada para la generación de SPK-3006 deriva de un serotipo de AAV, aislado de primates no humanos, el cual muestra un perfil hepatotrópico fuerte en ratones y primates no humanos. Con el objetivo de aumentar el tropismo hepático que posee el serotipo silvestre de AAV, el Promotor aplicó diseño racional para crear una nueva variante de proteína de cápside de AAV. Aunque el OMG puede infectar primates no humanos el ensayo clínico se va a realizar en el contexto de un ensayo clínico en centros hospitalarios.. Otros animales, como los humanos, podrían ser infectados, pero los efectos son probablemente mínimos por las razones descritas anteriormente (falta de patogenicidad natural, falta de secuencias víricas, baja dosis asociada con exposición accidental, etc). No existe riesgo para plantas. Los AAVs son partículas relativamente estables, pero se degradan y desactivan con calor y con productos químicos, tal como ácidos o

detergentes. Por lo tanto, cualquier liberación de OMG es poco probable que dé lugar a su propagación, y por lo tanto, el OMG quedaría en el medioambiente hasta su destrucción natural.

Por lo tanto, el impacto medioambiental de SPK-3006 se considera insignificante.

B. Información sobre el organismo receptor o sobre los organismos parentales de los que se deriva el OMG

1. Identificación del organismo receptor o parental

a) Indíquese si el organismo receptor o parental es :	
Viroide	<input type="checkbox"/>
Virus ARN	<input type="checkbox"/>
Virus ADN	<input checked="" type="checkbox"/>
Bacteria	<input type="checkbox"/>
Hongo	<input type="checkbox"/>
Animal	<input type="checkbox"/>
- mamíferos	<input type="checkbox"/>
- insectos	<input type="checkbox"/>
- peces	<input type="checkbox"/>
- otro animal	<input type="checkbox"/>
(especifique el phylum y la clase)	
Otros, (especifíquense):	

2. Nombre

i) Orden y taxón superior (animales): Piccovirales
ii) Género: Dependoparvovirus
iii) Especie:
iv) Subespecie: Virus Adeno-asociado.
v) Cepa: Las proteínas de la cápside derivan de un serotipo que presenta un perfil fuerte hepatotrópico en ratones y primates no humanos.
vi) Patovar (biotipo, ecotipo, raza, etc.):
vii) Nombre vulgar:

3. Distribución geográfica del organismo

a) Autóctono del país que notifica o establecido en él:

SÍ <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
b) Autóctono de otros países de la Comunidad o establecido en ellos:		
i) Sí <input type="checkbox"/>		
En caso afirmativo, indíquese el tipo de ecosistema en que se encuentra:		
Atlántico	<input type="checkbox"/>	
Mediterráneo	<input type="checkbox"/>	
Boreal	<input type="checkbox"/>	
Alpino	<input type="checkbox"/>	
Continental	<input type="checkbox"/>	
Macaronésico	<input type="checkbox"/>	
ii) No <input checked="" type="checkbox"/>		
iii) No se sabe <input type="checkbox"/>		
c) ¿Se usa frecuentemente en el país que notifica?		
SÍ <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/>		
d) ¿Es frecuente su tenencia en el país que notifica?		
SÍ <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/>		

4. Hábitat natural del organismo

a) Si es un microorganismo:	
Agua	<input type="checkbox"/>
Suelo, en libertad	<input type="checkbox"/>
Suelo, en simbiosis radiculares de plantas	<input type="checkbox"/>
En simbiosis con sistemas foliares o caulinares de plantas	<input type="checkbox"/>
En simbiosis con animales	<input type="checkbox"/>

Otros , (especifíquense):

El huésped específico son los primates no humanos. Con la excepción de los humanos, que habitan en todos los continentes, la mayoría de los primates no humanos viven en regiones tropicales o subtropicales en América, África y Asia.

Además de primates, se ha descrito que los AAV pueden infectar muchas especies animales adicionales

b) Si es un animal , hábitat natural o ecosistema agrícola habitual: No aplica.

5. a) Técnicas de detección

Las mismas que para identificación.

5. b) Técnicas de identificación

La identidad del virus salvaje AAV se confirma típicamente mediante una combinación de análisis genéticos (secuenciación y/o PCR para detectar todas o algunas partes específicas del genoma) así como análisis de proteínas (*Western Blot* y/o electroforesis de gel de proteínas) para confirmar el patrón correcto de bandas de las proteínas de la cápside. En el caso del virus salvaje, debido a cierta homología entre los diferentes serotipos, no todos los anticuerpos pueden ser 100% específicos, por lo que la complementación del *Western Blot* con tests genéticos es usualmente requerido.

6. Está clasificado el organismo receptor con arreglo a las normas comunitarias vigentes en relación con la protección de la salud humana y el medio ambiente?

Sí

No

En caso afirmativo, especifíquese:

Los AAVs no aparecen en la Directiva 2000/54 (protección de los trabajadores de riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos en el trabajo).

No se conocen efectos patológicos relacionados con AAVs. Sin embargo, los vectores basados en AAV recombinante son clasificados usualmente como Nivel de Bioseguridad 1 o 2 dependiendo en el Estado Miembro. Un microorganismo es normalmente clasificado en Clase 2 cuando puede causar una enfermedad en humanos o animales pero que tiene baja probabilidad de difusión entre la población ya que hay una profilaxis efectiva, tratamiento, o estrategia de control, o bien cuando sea un organismo que cause enfermedades en plantas.

7. ¿Es el organismo receptor, vivo o muerto (incluidos sus productos extracelulares), apreciablemente patógeno o nocivo de cualquier otra forma?

Sí

No

No se sabe

En caso afirmativo

a) ¿Para cuál de los organismos siguientes?:

humanos

animales

plantas

otros

b) Aporte la información pertinente especificada en la letra d) del punto 11 de la letra A de la sección 11 del anexo III A de la Directiva 2001/18/CE.

Los AAVs salvajes son virus deficientes en replicación y no patogénicos, que normalmente infectan humanos. En la literatura no hay asociación clara entre la infección de AAV y enfermedades humanas.

Una relación entre la infección de AAV y abortos espontáneos fue propuesta tras un estudio de 81 casos clínicos, sin embargo no se ha evaluado si existe relación causal o no (Burguete *et al.*, 1999; Pereira *et al.*, 2010). La mayoría de los humanos (hasta el 60% o más) muestra anticuerpos a AAV, sugiriendo infección (Li *et al.*, 2012; Fitzpatrick *et al.*, 2018).

Los AAV salvajes persisten en el núcleo de las células mayoritariamente como episomas extra-cromosomales, sin embargo, se ha observado integración, con baja frecuencia, en una manera dependiente de la proteína Rep, principalmente en el sitio AAVS1, una región del brazo largo del cromosoma 10 (19q13-qter), como parte de su ciclo de vida. La secuencia que codifica para las proteínas Rep ha sido eliminada de los vectores AAV recombinantes, y por lo tanto, la integración en el genoma del huésped se reduce significativamente (Penaud-Budloo *et al.*, 2008).

8. Información sobre reproducción

a) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

La generación de virus salvajes AAV es estimada entre 24 y 48 horas, aunque los AAV silvestres dependen de la co-infección con otros virus auxiliares, tales como adenovirus o herpesvirus, para poder replicar.

b) Tiempo de generación en el ecosistema en el que vaya a ser liberado:

La generación de virus salvajes AAV es estimada entre 24 y 48 horas, aunque los AAV silvestres dependen de la coinfección con otros virus auxiliares, tales como adenovirus o herpesvirus, para poder replicar.

c) Modo de reproducción Sexual Asexual

La reproducción del virus silvestre AAV es dependiente de la coinfección con un virus auxiliar (adenovirus o herpesvirus).

d) Factores que afectan a la reproducción:

La reproducción del virus silvestre AAV depende de la coinfección con virus auxiliares (adenovirus o herpesvirus).

9. Capacidad de supervivencia

a) Capacidad de formar estructuras que favorezcan la supervivencia o el letargo

- i) endosporas
- ii) quistes
- iii) esclerocios
- iv) esporas asexuales(hongos)
- v) esporas sexuales (hongos)
- vi) huevos
- vii) pupas
- viii) larvas
- ix) otras (especifíquense)

Los AAVs tienen habilidad para formar concámeros extracromosomales que permanecen de forma episomal durante periodos extendidos de tiempo. Los AAVs son partículas que de forma natural son relativamente estables, pero que son degradadas y desactivadas con calor y en presencia de ácidos o detergente.

b) Factores pertinentes que afectan a la capacidad de supervivencia

Los AAV son virus sin envoltura que son relativamente estables en el medio ambiente (Baldo *et al.*, 2013) y estables a la desecación. Sin embargo, son destruidos mediante autoclave, 0.25% ácido peracético, iodo, 10% lejía Clorox, 0.5% hipoclorito sódico y agentes de limpieza y alcohol en gel para manos son efectivos contra virus sin envoltura (Howard *et al.*, 2017). Se prevé que la estabilidad disminuya con la exposición a calor, radiación ultravioleta, o pH extremo.

10. a) Vías de diseminación

Los virus salvajes AAV pueden ser transmitidos a través de contacto directo con un individuo infectado (aerosoles, sangre) o a través de contacto indirecto con ambiente contaminado. Las rutas de transmisión incluyen las vías respiratorias, gastrointestinal y probablemente sexual. Como los virus salvajes AAV son dependientes de un virus auxiliar, tal como adenovirus o herpesvirus, para la replicación, durante la infección con un virus auxiliar activo, las partículas de AAV podrían teóricamente ser distribuidas junto al virus auxiliar. En la ausencia de coinfección con un virus auxiliar, el virus salvaje AAV no es capaz de replicar o

diseminarse.

La transmisión vertical de madre a feto es un asunto de preocupación (Burguete *et al.*, 1999). El virus salvaje AAV se ha detectado en tejidos genitales humanos, incluyendo semen en algunos estudios (Erles *et al.*, 2001).

10. b) Factores que afectan a la diseminación

Los factores que afectan la diseminación incluyen la co-infección con un virus auxiliar, que es necesario para la replicación del virus salvaje.

11. Modificaciones genéticas previas del organismo receptor o parental de las que ya se ha notificado la liberación en el país notificador (se darán los números de la notificación)

No aplica.

C. Información sobre la modificación genética

1. Tipo de modificación genética:

- | | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| i) Inserción de material genético | <input checked="" type="checkbox"/> |
| ii) Eliminación de material genético | <input checked="" type="checkbox"/> |
| iii) Sustitución de una base | <input type="checkbox"/> |
| iv) Fusión celular | <input type="checkbox"/> |
| v) Otro (especifíquese) | |

2. Resultado que se pretende obtener mediante la modificación genética

SPK-3006 es una nueva sustancia medicinal en investigación, clasificada como terapia avanzada, o producto medicinal de terapia génica. SPK-3006 está siendo desarrollado para el tratamiento de pacientes (masculinos y femeninos) con enfermedad de Pompe. SPK-3006 es un OMG derivado de un serotipo de AAV natural aislado de primates no humanos, el cual muestra un perfil con fuerte hepatotropismo en ratones y primates no humanos. SPK-3006 codifica una forma optimizada del gen humano de la alfa-glucosidasa ácida (GAA). La transferencia genética en el hígado tras la administración sistémica de SPK-3006 tiene el propósito de alcanzar niveles circulantes de GAA suficientes para corregir la deficiencia de la enzima en todo el cuerpo. En un modelo de ratón de la enfermedad de Pompe, el tratamiento con SPK-3006 resultó en una actividad elevada de enzima circulante, y una eficacia terapéutica mejorada comparada con la GAA no secretada.

3. a) ¿Se ha usado un vector en el proceso de modificación?

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
En caso negativo, pase a la pregunta 5.	

3. b) En caso afirmativo, ¿está presente el vector, total o parcialmente, en el organismo modificado?

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso negativo, pase a la pregunta 5	
El plásmido de transferencia contiene el casete del transgén, pero las secuencias propias del vector (tales como el promotor wt P5, pUC 19 Ori, o el gen de resistencia a kanamicina) no están presentes en el organismo modificado.	

4. Si ha contestado afirmativamente a la pregunta 3 b), aporte la información siguiente

a) Tipo de vector	
plásmido	<input checked="" type="checkbox"/>
bacteriófago	<input type="checkbox"/>
virus	<input type="checkbox"/>
cósmido	<input type="checkbox"/>
Elemento de transposición	<input type="checkbox"/>
Otros (especifíquense):	
b) Identidad del vector:	
El vector es un plásmido de 11,641 pares de bases (bp) que codifica un gen de la alfa-glucosidasa ácida bajo el control de elementos reguladores específicos de hígado. Este plásmido contiene el casete de expresión y las ITRs.	
c) Gama de organismos huéspedes del vector:	
Bacterias. El plásmido contiene un origen de replicación bacteriano. No se replica en células de mamíferos	
d) Presencia en el vector de secuencias que den un fenotipo seleccionable o identificable	
Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
Resistencia a los antibióticos	<input checked="" type="checkbox"/>
Otras, (especifíquense)	

Indique qué gen de resistencia a los antibióticos se inserta:

Resistencia a kanamicina.

e) Fragmentos constituyentes del vector

El vector contiene el casete de expresión con el transgén terapéutico. El vector solo contiene regiones cortas del ADN del AAV salvaje que contienen las ITRs, requeridas para el empaquetamiento del genoma terapéutico en las partículas de la cápside durante la producción del vector, y para la formación de concámeros estables en el núcleo celular. Además, el esqueleto del plásmido contiene el gen KanR, que confiere resistencia a kanamicina, un origen de replicación F1, un origen de replicación en bacterias pUC, y un fragmento espaciador de ADN eucariótico.

f) Método de introducción del vector en el organismo receptor

- i) transformación
- ii) electroporación
- iii) macroinyección
- iv) microinyección
- v) infección
- vi) otros, (especifíquense)

SPK-3006 no se ha construido o producido a partir de un stock vivo de virus parental. Cada lote de producto no se deriva de un stock semilla de virus o un equivalente que contenga el vector salvaje y/o el vector modificado. Cada lote se fabrica vía a un proceso de transfección triple libre de virus auxiliar (Matsushita *et al.*, 1998; Ayuso *et al.*, 2010) por el cual los genes necesarios para la expresión de las proteínas víricas y el ensamblaje son aportadas solo en *trans*. El proceso de transfección triple usado para la fabricación de la sustancia medicinal se basa en cultivo celular y transfección transitoria de células humanas epiteliales embrionarias de riñón (HEK293) con tres constructos de plásmido.

1. Plásmido que contiene el casete de expresión para dirigir la expresión específicamente en el hígado de una forma que se secreta de la enzima alfa-glucosidasa ácida (GAA)
2. Plásmido que contiene los genes *rep* (AAV2) y *cap* (específico de serotipo)
3. Plásmido que contiene las secuencias derivadas de virus auxiliar (*helper*) (tres genes de adenovirus E2A, E4 y VA)

Por lo tanto, los tres elementos requeridos para la generación de partículas de AAV funcionales, con elementos de AAV importantes, son aportados en *trans*.

5. Si las repuestas a C. 3) a) y b) son negativas, ¿qué método se siguió en el proceso de modificación?

i) transformación	<input type="checkbox"/>
ii) microinyección	<input type="checkbox"/>
iii) macroencapsulación	<input type="checkbox"/>
iv) macroinyección	<input type="checkbox"/>
v) otros, (especifíquense)	

6. Información sobre el fragmento de inserción:

<p>a) Composición del fragmento de inserción:</p> <p>El casete de expresión genéticos contiene los siguientes componentes:</p> <ul style="list-style-type: none">• Las repeticiones invertidas terminales (ITRs)• Un elemento potenciador específico de hígado que estimula la actividad del promotor• Un promotor específico de hígado que dirige la expresión del gen de GAA.• Un intrón sintético derivado la hemoglobina beta (HBB2) para promover aún más la expresión• Una versión optimizada en codones, de la alfa-glucosidasa acida (GAA).• Una señal de poliadenilacion de la hormona de crecimiento bovina (bGH) para mediar la terminación de la transcripción del ARNm de la GAA.
<p>b) Fuente de cada parte constitutiva del fragmento de inserción:</p> <p>El promotor, el potenciador, el intrón HBB2, y la secuencia del transgén GAA derivan de secuencias humanas. La secuencia codificante fue optimizada en cuanto uso de codones para incrementar la expresión proteica. Asimismo, se redujo el número de dinucleótidos CpG para disminuir la inmunogenicidad y mantener una expresión duradera.</p> <p>La hormona de crecimiento bovina y el elemento de poliadenilacion derivan de secuencias de <i>Bos Taurus</i> y también han sido optimizadas.</p> <p>Todos los elementos han sido construidos mediante amplificación por PCR de las secuencias.</p>

c) Función prevista de cada parte constitutiva del fragmento de inserción en el OMG

Cada elemento incluido en el casete final de expresión sirve para un propósito importante en el producto final. El potenciador combinado con el promotor están diseñados para conseguir unos niveles de expresión altos del transgén terapéutico, específicamente en hepatocitos. El intrón HBB2 esta diseñado para incrementar aun más la expresión del transgén terapéutico mediante estabilización del ARNm. El transgén terapéutico ha sido optimizado para obtener una expresión elevada y secreción de proteína de los hepatocitos al plasma. La secuencia de poliadenilacion de bGH has sido incluida para terminar el transcrito terapéutico y para obtener una expresión de ARNm estable. Finalmente, las ITR están presentes en los extremos del casete de expresión.

d) Localización del fragmento de inserción en el organismo receptor:

- en un plásmido libre

- integrado en el cromosoma

- Otros especifíquense):

El inserto esta localizado entre las ITRs del vector.

e) ¿Contiene el fragmento de inserción partes cuyo producto o función no se conozcan?

Sí

No

En caso afirmativo , especifíquese:

D. Información sobre el organismo u organismos de los que se deriva el fragmento de inserción (donante)

1. Indíquese si es:

Viroide	<input type="checkbox"/>
Virus ARN	<input type="checkbox"/>
Virus ADN	<input type="checkbox"/>
Bacteria	<input type="checkbox"/>
Hongo	<input type="checkbox"/>
Animal	<input type="checkbox"/>
- mamíferos	<input checked="" type="checkbox"/>
- insectos	<input type="checkbox"/>
- peces	<input type="checkbox"/>
- otro animal	<input type="checkbox"/> (especifique el phylum y la clase):

Otros (especifíquense)

El potenciador, promotor, intrón HBB2, y la secuencia del transgen se derivan de secuencias humanas. La secuencia codificante fue optimizada en cuanto uso de codones para incrementar la expresión proteica. Asimismo, se redujo el número de dinucleótidos CpG para disminuir la inmunogenicidad y mantener una expresión duradera. El elemento de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina deriva de *Bos Taurus*.

2. Nombre completo

i)	Orden y taxón superior (animales): Primates, Hominidae
ii)	Familia (plantas): N/A
iii)	Género: Homo
iv)	Especie: Homo Sapiens
v)	Subespecie: Sapiens
vi)	Cepa: N/A
vii)	Cultivar/línea de reproducción: N/A
viii)	Patovar: N/A

ix) Nombre vulgar: **Humano**

x) Orden y taxón superior (animales): Artiodactyla
xi) Familia (plantas):
xii) Género: Bos
xiii) Especie: Bos Taurus
xiv) Subespecie: Bos Taurus primigenius, Bos Taurus indicus
xv) Cepa:
xvi) Cultivar/línea de reproducción:
xvii) Patovar:
xviii) Nombre vulgar: Vaca doméstica

3. ¿Es el organismo vivo o muerto (incluidos sus productos extracelulares), apreciablemente patógeno o nocivo de cualquier otra forma?

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo, especifíquese		
a) ¿para cuál de los organismos siguientes?	humanos	<input type="checkbox"/>
	animales	<input type="checkbox"/>
	plantas	<input type="checkbox"/>
	otros	<input type="checkbox"/>
b) ¿están implicadas de alguna forma las secuencias donadas en las propiedades patógenas o nocivas del organismo?		
Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo, proporcione la información pertinente de conformidad con la letra d) del punto 11 de la letra A de la sección II del Anexo III A:		

4. ¿Está clasificado el organismo donante con arreglo a normas comunitarias vigentes en relación con la protección de la salud humana y el medio ambiente

como, por ejemplo, la Directiva 90/679/ CEE sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo?

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo , especifíquese:	

5. ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural?

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
-----------------------------	--	-------------------------------------

E. Información sobre el organismo modificado genéticamente

1. Rasgos genéticos y características fenotípicas del organismo receptor o parental que hayan sufrido algún cambio como resultado de la modificación genética

<p>a) ¿Se diferencia el OMG del receptor en lo que a capacidad de supervivencia se refiere?</p> <p>Sí <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/></p> <p>Especifíquese</p> <p>Debido a la modificación genética (el genoma de SPK-3006 carece de las secuencias genéticas de <i>rep</i> y <i>cap</i>), SPK-3006 es completamente deficiente en replicación, aun en la presencia de un virus auxiliar, a diferencia del AAV salvaje. El AAV salvaje es un parvovirus dependiente de virus auxiliar, que requiere sus funciones (las del virus auxiliar) en <i>trans</i> para la replicación. Este cambio no debería modificar la supervivencia y estabilidad de SPK-3006 respecto al AAV salvaje, o en todo caso podría incluso empeorarla respecto al virus silvestre.</p>
<p>b) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta al modo o índice de reproducción?</p> <p>Sí <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/></p> <p>Especifíquese:</p> <p>SPK-3006 es completamente deficiente en replicación aun en presencia de un virus auxiliar. En contraste, el virus AAV salvaje es un parvovirus dependiente de virus auxiliar en <i>trans</i> para la replicación. Por lo tanto, la capacidad reproductiva está reducida en comparación al AAV salvaje.</p>
<p>c) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta a la diseminación?</p> <p>Sí <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/></p>

<p>Especifíquese:</p> <p>El OMG no puede entrar en el ciclo infeccioso incluso en la presencia de la función auxiliar.</p>
<p>d) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad?</p> <p>Sí <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/></p> <p>Especifíquese:</p> <p>Ni el AAV salvaje ni SPK-3006 son considerados patógenos para los humanos ni un riesgo para el medio ambiente.</p>

2. Estabilidad genética del organismo modificado genéticamente

<p>SPK-3006 es un virus no replicativo y contiene un genoma de AAV recombinante que carece de las secuencias virales codificantes excepto por las terminaciones invertidas terminales (ITRs) para el pseudotipaje y por lo tanto, esto limita en gran medida el riesgo para la dispersión y el potencial de recombinación homóloga con otros AAVs.</p> <p>Los AAV salvajes son virus deficientes en replicación, no patógenos que naturalmente infectan a humanos. Los AAV salvajes persisten en el núcleo celular mayoritariamente como episomas extracromosomales. Sin embargo, se ha observado que puede integrarse en bajas frecuencias en una manera dependiente de la proteína Rep, principalmente en el sitio AAVS1, una región en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13qter), como parte de su ciclo de vida (Deyle <i>et al.</i>, 2009). La secuencia que codifica las proteínas Rep ha sido eliminada de los vectores recombinantes de AAV, y por lo tanto, la integración en el genoma del huésped queda significativamente reducida (Penaud-Budloo <i>et al.</i>, 2008. Cada lote se fabrica a través de un proceso de transfección triple libre de virus auxiliares (Matsushita <i>et al.</i>, 1998; Ayuso <i>et al.</i>, 2010), mediante el cual los genes necesarios para la expresión de las proteínas víricas y el ensamblaje son aportadas solo en <i>trans</i>, lo que reduce el riesgo de recombinación homóloga. Además, si la recombinación ocurriera entre los plásmidos, el tamaño del nuevo genoma de AAV generado por tales eventos sería (según predicción) demasiado grande para obtener una encapsidación eficiente (Grieger <i>et al.</i>, 2005).</p> <p>Las impurezas de ADN se controlan en SPK-3006, y un test de virus replicativos competentes se incluye para asegurar que no se detecta recombinación o reestructuraciones genéticas durante la fabricación.</p>
--

3. ¿Es el OMG, vivo o muerto (incluidos sus productos extracelulares), apreciablemente patógeno o nocivo de cualquier forma?

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo:		

a) ¿Para cuál de los organismos humanos siguientes?	<input type="checkbox"/>
animales	<input type="checkbox"/>
plantas	<input type="checkbox"/>
otros	<input type="checkbox"/>

b) Aporte la información pertinente especificada en la letra d) del punto 11 de la letra A de la sección II y en el inciso i) del punto 2 de la letra C de la sección II del anexo III A

Los AAV son considerados virus deficientes en replicación y requieren la presencia de un virus auxiliar (adenovirus o herpes virus) para la replicación. Normalmente los AAV infectan humano u otros primates en el medio ambiente. Aunque las infecciones humanas son comunes (Boutin *et al.*, 2010; Zinn *et al.*, 2014; Fitzpatrick *et al.*, 2018), los AAV salvajes no son conocidos por ser patogénicos, virulentos, alergénicos, o portadores (vectores) de un patógenos, no activan virus latentes y no son capaces de colonizar otros organismos. Los AAV recombinantes usados como vectores terapéuticos tienen casi ninguna secuencia viral, excepto por las ITRs, y por lo tanto, aunque hubiera genes patogénicos en el AAV parental, éstos han sido eliminados. Los estudios preclínicos también apoyan la falta de toxicidad incluso a dosis mucho más elevadas. Los AAVs pueden ser clasificados como agentes biológicos de Grupo de Riesgo 1, definidos en la Unión Europea como “improbable de causar enfermedades humanas”, de acuerdo con la Directiva 2000/54/EC de la protección de los trabajadores de riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos en el trabajo.

El análisis de la frecuencia de integración de los vectores derivados de AAV en músculo esquelético e hígado de primates no humanos, demostró que la administración de vectores derivados de AAV1 o AAV8 por vía intramuscular o intravenosa regional a dosis terapéuticamente relevantes, provocaba una frecuencia baja de integración, entre 1×10^{-4} y 1×10^{-5} en ambos tejidos, sin preferencia para ningún *loci* genómico (Nowrouzi *et al.*, 2012). Un perfil similar, con inserción en baja frecuencia y de forma arbitraria se observó en muestras de tejidos de pacientes deficientes en lipoproteína lipasa tratados con inyección intramuscular de vectores derivados de AAV1 (Kaepfel *et al.*, 2013). En el caso de vectores derivados de AAV, no se ha observado oncogénesis relacionada con mutagénesis insercional en la clínica. En ratones, sin embargo, la formación de hepatocarcinoma se ha descrito tras la administración de vectores derivados de AAV en neonatos (Donsante *et al.*, 2001).

4. Descripción de los métodos de identificación y detección

a) Técnicas utilizadas para detectar el OMG: PCR cuantitativa con los cebadores específicos para las secuencias del vector.
b) Técnicas utilizadas para identificar el OMG:

Los siguientes test se utilizan para confirmar la identidad del OMG durante la fabricación:

- *Test de identidad de PCR cuantitativa:* el ensayo de qPCR utiliza cebadores específicos para amplificar regiones del casete de expresión y la secuencia de la cápside para confirmar que el proceso de fabricación ha producido el vector planeado.
- *Test de endonucleasas de restricción:* un test de endonucleasas de restricción es usado para digerir el genoma de ADN y confirmar que el patrón de bandas es como el esperado y compararlos con una muestra de referencia caracterizada.
- *SDS-PAGE/Tinción de plata:* el patrón de bandas producido por el vector debe ser el mismo que el de la muestra standard de referencia.
- *AAV competentes en replicación:* la presencia de AAV competentes en replicación se usa para confirmar que no hay contaminación, recombinación o reversión.

F. Información sobre la liberación

1. Finalidad de la liberación (incluido todo beneficio ambiental potencial significativo esperado)

La enfermedad de Pompe es un desorden autosómico recesivo causado por mutaciones en el gen que codifica la enzima lisosomal alfa-glucosidasa ácida (GAA), la cual cataliza la degradación de glucógeno. La deficiencia en la enzima produce la acumulación patogénica de glucógeno y alteraciones lisosomales en todos los tejidos del cuerpo, resultando en disfunciones cardíacas, respiratorias y del músculo esquelético. SPK-3006 es una sustancia medicinal en investigación nueva de terapia génica en desarrollo para el tratamiento de pacientes (hombres y mujeres) diagnosticados con enfermedad de Pompe. SPK-3006 codifica para una forma modificada genética de la enzima GAA que se secreta mejor que la proteína *wild-type*. El propósito de la liberación voluntaria de SPK-3006 es permitir la transferencia natural genética en el hígado de pacientes para conseguir niveles circulantes de GAA suficientes para corregir la deficiencia enzimática en todo el cuerpo.

2. ¿Es diferente el lugar de liberación del hábitat natural o del ecosistema en el que se utiliza, se mantiene o se encuentra regularmente el organismo receptor o parental?

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo, especifíquese: SPK-3006 será administrado por vía intravenosa exclusivamente a pacientes con enfermedad de Pompe en pocos centros hospitalarios en Europa, y solo uno en España. Los huéspedes naturales son humanos y primates no humanos, y muchos de los humanos ya han sido previamente expuestos a AAVs.	

3. Información relativa a la liberación y a la zona circundante

a) Localización geográfica (región administrativa y coordenadas de referencia cuando proceda): Hospital Universitario Virgen del Rocío Av. Manuel Siurot, s/n 41013 Sevilla (España) La administración será en una sala estándar de hospital para el tratamiento de pacientes (un único sitio).
b) Área del lugar (m ²): i) lugar real de la liberación (m ²): N/A ii) área de liberación más amplia (m ²):
c) Proximidad a biotipos reconocidos internacionalmente o zonas protegidas (incluidos depósitos de agua potable) que pudieran verse afectados: No aplica. El material excretado (<i>shedding</i>) es potencialmente no-infectivo y no plantea ninguna amenaza medioambiental.
d) Flora y fauna, incluidos cultivos, ganado y especies migratorias que pueden potencialmente interactuar con el OMG: No aplica.

4. Método y amplitud de la liberación

a. Cantidad de OMG que vaya a liberarse: SPK-3006 será administrado en un único punto de tiempo como dosis única, por infusión. Dosis de hasta 1×10^{14} vg/kg podrán ser evaluadas durante el desarrollo clínico de SPK-3006. Sin embargo, los estudios preclínicos sugieren que no será necesario usar la dosis máxima en este estudio. Se espera que ocurra una baja excreción (<i>shedding</i>) del ADN del vector en los fluidos corporales durante varios días tras la administración. Sin embargo, no se ha observado que
--

los vectores de AAV excretados sean infectivos.

b. Duración de la operación:

La ruta de administración es intravenosa (iv) como infusión durante aproximadamente 1 hora usando una bomba de infusión. El procedimiento de administración completo, que incluye descongelar y preparar el vector y el sistema de infusión, se prevé que durará menos de 6 horas.

La cantidad de SPK-3006 que será liberada en España es aproximadamente:

Dosis SPK-3006	vg/persona estimados (70 kg)	Numero de pacientes	Total vg
2×10^{12} vg/kg	1.4×10^{13} vg/persona	0	
6×10^{12} vg/kg	4.2×10^{13} vg/persona	0	
2×10^{13} vg/kg	1.4×10^{14} vg/persona	6	8.4×10^{14} vg
TOTAL	-	#	8.4×10^{14} vg

c. Métodos y procedimientos para evitar o reducir al mínimo la propagación de los OMG más allá del lugar de liberación:

Durante el procedimiento de administración, solo procedimientos estándar de seguridad hospitalaria serán utilizados para limitar la contaminación, ya que los riesgos del OMG son considerados bajos, tanto el riesgo de dispersión (es defectuoso en replicación) como el riesgo de seguridad/patogenicidad (no se espera que cause problemas serios o patogenicidad). Como el procedimiento de infusión es relativamente simple, no hay aspectos adicionales de riesgo importantes que deban ser introducidos.

Los procedimientos de seguridad incluirán:

- Formación del personal de farmacia sobre el producto y los riesgos potenciales. Esto reducirá el riesgo de accidentes creando familiaridad con los procedimientos y los procesos.
- Uso de equipo de protección (batas de laboratorio) así como guantes, que limitaran la contaminación y exposición del personal en caso de derramame accidental.
- La preparación del vector se realizará en una cabina de seguridad biológica (BSL-2). Eso limitará los aerosoles y cualquier otra exposición del personal trabajando en la misma instalación.
- Todos los desechables que entren en contacto con el OMG serán eliminados en contenedores homologados herméticos sellados

etiquetados como “RESIDUOS BIOSANITARIOS” de acuerdo a los procedimientos de los centros hospitalarios. Los contenedores estarán disponibles en la sala de preparación y en la sala de administración.

- La desinfección de superficies contaminadas se realizará con agentes químicos comúnmente utilizados para desinfectar materiales bio-peligrosos y superficies (hipoclorito al 10% o alcohol al 70%).

5. Descripción resumida de las condiciones ambientales medias (clima, temperatura, etc.)

El producto se almacenará a $\leq -65^{\circ}\text{C}$ hasta el uso, momento en el cual los viales se descongelarán a temperatura ambiente. La preparación se realizará en una cabina de seguridad biológica. El ensayo clínico se realizará en España en un único hospital aunque el riesgo de liberación del OMG al medio ambiente no está relacionado con las características climatológicas.

6. Datos pertinentes sobre liberaciones anteriores del mismo OMG. si los hubiera, específicamente relacionados a las repercusiones potenciales de la liberación en el medio ambiente y la salud humana

No hay datos disponibles.

G. Interacciones del OMG con el medio ambiente y repercusiones potenciales sobre este, si es apreciablemente diferente del organismo receptor o parental

1. Nombre del organismo diana (si procede)

i) Orden y taxón superior (animales):	Primates, Hominidae
ii) Familia (plantas):	N/A
iii) Género:	Homo
iv) Especie:	Homo Sapiens
v) Subespecies:	Sapiens
vi) Cepa:	N/A
vii) Cultivar/Línea de reproducción:	N/A
viii) Patovar:	N/A
ix) Nombre vulgar:	Humano

2. Mecanismo previsto y resultado de la interacción entre los OMG liberados y el organismo diana (si procede)

Se espera que SPK-3006 se localice preferentemente en el hígado, ya que la cápside muestra un fuerte tropismo hepático. Una característica atractiva de la expresión en hígado de un transgén es la habilidad para inducir tolerancia inmune específica al transgén (Mingozzi *et al.*, 2003; Finn *et al.*, 2010; Markusic *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2017). A este respecto, se ha observado que la expresión hepática de una versión que se secreta de GAA tiene un potencial terapéutico alto, (Puzzo *et al.*, 2017) posiblemente dado que unos niveles circulantes elevados del antígeno promueven una inducción más robusta de la tolerancia inmunológica (Perrin *et al.*, 2016). Los AAV salvajes y los vectores recombinantes basados en AAV persisten en células transfectadas como concatémeros episomales circulares (extracromosomales) en tejidos humanos (Schnepp *et al.*, 2009; Sonntag *et al.*, 2011). Debido a la falta de los genes víricos *rep* y *cap*, se espera que SPK-3006 permanezca en las células como episomas y no replicará ni producirá partículas virales. Los datos preclínicos demuestran que tras la transferencia génica hepática, GAA se secreta de los hepatocitos hacia la circulación y que es capturada por las células musculares, resultando en una mejora a largo plazo del fenotipo de la enfermedad.

3. Otras interacciones potencialmente significativas con otros organismos en el medio ambiente

No se espera interacción con otros organismos en el medio ambiente.

4. ¿Es probable que se dé una selección posterior a la liberación del OMG como, por ejemplo, una competencia mayor un carácter más invasivo, etc.?

Sí	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe
Especifíquese: El vector no puede replicar y tiene una capacidad limitada de empaquetamiento por lo que no hay posibilidades de que incremente su competitividad o capacidad invasiva. Además, la mayor parte del material genético vírico ha sido eliminado, por lo que la capacidad de recombinación y/o la habilidad de aportar secuencias ventajosas a otros organismos es reducida.		

5. Tipos de ecosistemas a los que puede extenderse el OMG desde el lugar de liberación y en los cuales puede quedar establecido

No se espera una diseminación importante del OMG ya que es un organismo incompetente en replicación. La supervivencia de las partículas inertes puede ser posible, pero estas serán incapaces de transmitir material genético y se degradarán con el tiempo. El rango natural de huéspedes del AAV es humanos y primates no humanos. Aproximadamente el 90% de los humanos han sido previamente expuestos a AAV salvajes en la adolescencia, y la presencia de anticuerpos neutralizantes contra AAV (aun en niveles bajos) puede bloquear la transducción del vector en células permisivas. Además, como el vector recombinante es incapaz de replicar, aún en presencia de un virus auxiliar, la consecuencia de una infección sería insignificante.
--

6. Nombre completo de los organismos que no son el organismo diana, pero que (teniendo en cuenta la naturaleza del medio ambiente receptor) pueden sufrir accidentalmente daños importantes por la liberación del OMG

No aplica.

i) Orden y taxón superior (animales):
ii) Familia (plantas):
iii) Género:
iv) Especie:
v) Subespecie:
vi) Cepa:
vii) Cultivar/línea de reproducción:
viii) Patovar
ix) Nombre vulgar:

7. Probabilidad de intercambio genético en vivo

a) Del OMG a otros organismos del ecosistema de liberación:

Poco probable. Hay un riesgo muy bajo de que otros humanos puedan resultar infectos por cantidades ínfimas de SPK-3006 que puedan ser potencialmente liberadas al medio ambiente a través de excreción (*shedding*). Sin embargo, el OMG es un virus incompetente en replicación. Además, en el caso del virus parental salvaje AAV, no es conocido por infectar otros organismos en el medio ambiente con la excepción de los primates. Sin embargo, cabe remarcar que SPK-3006 posee una proteína de cápside no presente en la naturaleza, y que por tanto no existe la versión salvaje del OMG en el ecosistema de liberación. La información del AAV salvaje se considera de apoyo en esta sección.

b) De otros organismos al OMG:

Insignificante. La presencia de las secuencias ITRs de AAV en SPK-3006 crea una posibilidad baja de recombinación homóloga con AAV salvajes, pero solo cuando haya co-infección en los sujetos tratados. La única consecuencia de cualquier recombinación homóloga mediada por las ITRs sería la obtención de los genes funcionales de AAV (genes *rep* y *cap*) requeridos para la replicación y la encapsidación. A su vez, SPK-3006 perdería el transgén, obteniendo virus incompetentes en replicación idénticos al material de partida.

c) Consecuencias probables de la transferencia de genes:

La transferencia genética hepática al paciente tras la administración sistémica de SPK-3006 pretende conseguir niveles circulantes de GAA suficientes para corregir la deficiencia enzimática en todo el cuerpo. En un modelo de ratón de la enfermedad de Pompe, el tratamiento con SPK-3006 resultó en una actividad enzimática circulante elevada, y en una eficacia terapéutica mejorada comparada con la GAA que no se secreta. Los pacientes que reciban el OMG mediante infusión intravenosa pueden desarrollar una respuesta inmune a la cápside del vector, y consecuentemente tras la transducción hepática, puede ocurrir un incremento transitorio de las transaminasas (ALT y AST). Eso puede ser limitado mediante tratamiento inmunosupresivo.

La transferencia del material genético del vector (recombinación homóloga) es poco probable. La única consecuencia de cualquier recombinación homóloga mediada por las ITRs sería la adquisición de los genes funcionales de AAV (genes *rep* y *cap*) requeridos para la replicación y encapsidación, la pérdida del transgén, y la creación de un virus incompetente en replicación. Es poco probable que la recombinación resulte en un vector competente en replicación y que contenga al mismo tiempo el transgén.

8. Referencias de los resultados pertinentes (si los hay) de estudios sobre el comportamiento y las características del OMG sobre su repercusión ecológica llevados a cabo en ambientes naturales simulados (por ejemplo, microcosmos, etc.)

No se han realizado estudios específicos del potencial impacto ecológico.

9. Posibles interacciones ambientalmente significativas con procesos biogeoquímicos (si son diferentes del organismo receptor o parental)

No aplicable.

H. Información sobre el seguimiento

1. Métodos de seguimiento de los OMG

Cuando haya material suficiente, el número de genomas de vector puede ser determinado por PCR cuantitativa con cebadores específicos para las secuencias del vector. La monitorización de los sujetos (y excreciones – *shedding*) se realizará mediante la colección de fluidos corporales y realizando qPCR.

2. Métodos de seguimiento de las repercusiones en el ecosistema

Normalmente el vector (OMG) no está presente en el medio ambiente/ecosistema en niveles suficientes para la detección. No se considera necesaria la monitorización y se considera un riesgo insignificante para el medio ambiente.

3. Métodos de detección de la transferencia del material genético donado del OMG a otros organismos

El método más sensible para detectar transferencia del material genético del vector a otros organismos (el huésped) será la qPCR. La presencia de secuencias de ADN del vector será determinada en varias matrices biológicas incluyendo plasma, orina, saliva, etc. Otros estudios han demostrado que el material de AAV que se puede encontrar en excreciones puede ser no infeccioso y por lo tanto no se prevé la transferencia de material genético (aportado por el vector) del paciente a otros organismos, y de este modo, no será monitoreado.

4. Tamaño del área de seguimiento (m²)

No aplicable.

5. Duración del seguimiento

El principal biomaterial que será obtenido y evaluado de pacientes tratados en el ensayo clínico será sangre total y derivados del plasma y células mononucleares de sangre periférica, para evaluación de eficacia y seguridad. Se recogerá biopsias musculares en un subgrupo de los sujetos que participan en el ensayo. Se recogerá varios fluidos corporales, incluyendo orina, saliva y semen, así como heces y sangre, de forma periódica para los estudios de excreción (*shedding*), hasta que se puedan establecer conclusiones de seguridad relacionadas con el *shedding*. El material de OMG puede estar presente teóricamente en las excreciones y material biológico, sin embargo, la probabilidad de que las partículas de vector sean infecciosas es extremadamente baja (Reuter et al., 2012).

6. Frecuencia del seguimiento

Los fluidos corporales (saliva, orina y, cuando sea aplicable, semen) y heces serán recogidos para analizar la excreción (*shedding*) del vector tras la administración del OMG. La frecuencia del muestreo dependerá de la muestra y puede llegar a ser de una a dos semanas en etapas iniciales del ensayo. También se podrá tomar muestras adicionales caso por caso en base a la práctica médica actual y de acuerdo a las necesidades medicas de los participantes, que puedan o no puedan ser relacionadas con el ensayo (preocupaciones de salud estándar considerando la enfermedad subyacente).

I. Información sobre el tratamiento posliberación y el tratamiento de residuos

1. Tratamiento del lugar tras la liberación

La preparación de la solución para la infusión será realizada en la farmacia hospitalaria en cabinas de bioseguridad (BSL-2). Todos los materiales desechables que puedan entrar en contacto con la sustancia activa serán eliminados en contenedores de residuos específicos de hospital (“RESIDUOS BIOSANITARIOS”), localizados tanto la sala de preparación como en la de administración. Los contenedores cerrados serán etiquetados para el transporte (UN3291) y transportados al punto de salida logística del hospital, donde los contenedores serán entregados a la compañía encargada del transporte hasta la empresa de destrucción de material (CESPA Gestion de Resdious, S.A.). Para la desinfección regular se utilizará hipoclorito al 10% o alcohol al 70%.en superficies usadas. En caso de derramamiento, el personal deberá adoptar las siguientes medidas:

- Ponerse dos pares de guantes
- Cubrir el derrame con tela o papel absorbente
- Verter un desinfectante y parar el trabajo, al menos, durante 30 minutos
- Retirar la tela o papel y el material dañado con un recogedor y eliminarlos en el contenedor de residuos biosanitarios
- Coger los fragmentos de cristal, si hubiese, con pinzas
- Limpiar y desinfectar las superficies contaminadas
- Desinfectar el material en autoclave o mantenerlo sumergido en desinfectante (hipoclorito al 10% o alcohol al 70%) durante al menos 24 horas.

2. Tratamiento del OMG tras la liberación

Tanto muestras de vector sin usar, así como materiales auxiliares serán eliminados como “RESIDUOS BIOSANITARIOS” de acuerdo a los procedimientos del hospital. Los contenedores estarán disponibles en la sala de preparación y en la sala

de administración.

3. a) Tipo y cantidad de residuos producidos

Los residuos que potencialmente puedan contener OMG incluyen los siguientes tipos de materiales: viales, tubos, inyecciones, agujas, bolsas de infusión y artículos relacionados, guantes, batas, etc.

3. (b) Tratamiento de residuos

Todo el material que entre en contacto con la sustancia activa será eliminado en contenedores específicos para residuo hospitalario (“RESIDUOS BIOSANITARIOS”) tanto en la sala de preparación como en la de administración. Los contenedores cerrados serán etiquetados para el transporte (UN3291) y transportados al punto de salida logística del hospital, donde los contenedores serán entregados a la compañía encargada del transporte hasta la empresa de destrucción de material (CESPA Gestión de Residuos, S.A.). Para la desinfección regular y en caso de derramamiento, ver sección I.1.

J. Información sobre planes de actuación en caso de emergencia

1. Métodos y procedimientos de control de la diseminación del OMG o de los OMG en caso de dispersión imprevista

La preparación de la solución para infusión se realizará en la farmacia hospitalaria en cabinas/campanas de seguridad (BSL-2). Para desinfección regular en las superficies usadas se utilizará hipoclorito al 10% o alcohol al 70%. En caso de derrame accidental, el personal será instruido para llevar doble guantes y para tratar la superficie tal y como detallado en la sección I.1. Todo el material adicional, tal como material absorbentes usados para absorber el material serán eliminados y destruidos como lo descrito anteriormente. Cualquier material roto (como el sistema de cierre, jeringas, etc.) será también eliminado de forma similar.

Las personas que de forma no intencional entren en contacto directo con el OMG como por ejemplo a través de exposición cutánea accidental, herida por inyección o aguja, tendrán que adoptar las siguientes medidas:

- Quitarse guantes y ropa protectora
- Lavarse las manos y parte afectada con abundante agua
- Desinfección y cura tópica de la herida con una solución yodada o alcohol al 70%
- Acudir al médico indicando la causa de la herida y el agente involucrado.

2. Métodos de eliminación del OMG o de los OMG de las áreas potencialmente afectadas

Ver la sección anterior. Las personas que de forma no intencional entren en contacto directo con el OMG, a través de por ejemplo inyección accidental o heridas de aguja, inhalación de aerosol, etc., tendrán que limpiar el sitio de exposición con

abundante agua y curar la herida posteriormente con una solución al 70% de alcohol o con una solución yodada..

3. Métodos de eliminación o saneamiento de plantas, animales, suelos, etc. que pudieran ser expuestos al organismo durante la dispersión o después de la misma

No aplicable.

4. Planes de protección de la salud humana y del medio ambiente en caso de que se produzca un efecto no deseable

Se tomarán medidas para evitar que el personal que manipula el OMG entre en contacto directo o indirecto con él. EL OMG será transportado a la farmacia del hospital como viales de producto congelado, por un transportista acreditado para el transporte de productos biológicos. El transporte y el almacenamiento en el hospital será realizado de acuerdo a los principios cGMP.

Todo el personal involucrado en el ensayo clínico será instruido en las mejores prácticas de bioseguridad para ser aplicadas durante la preparación en la farmacia, el transporte a la sala de administración, durante administración y eliminación de cualquier residuo biológico. Todo el personal deberá llevar las batas adecuadas y/o guantes.

Incluso si una persona entra en contacto con el OMG, durante la manipulación o después de la liberación, no se esperan efectos inmediatos y/o no inmediatos en su salud, ya que la infección de AAV no se ha asociado con patologías conocidas en ninguna especie. La respuesta inmune limitaría la persistencia en la mayoría de los casos, mientras que la restricción de la expresión específica al tejido impuesta por los elementos de promotor/potenciador limitarían también la expresión fuera del lugar diana (hígado). Finalmente, no se espera propagación del virus ya que es defectuoso en replicación aún en la presencia de virus auxiliares.

Bibliografía

Ayuso, E, Mingozi, F and Bosch, F (2010). "Production, purification and characterization of adeno-associated vectors." Curr Gene Ther **10**(6): 423-436.

Baldo, A, van den Akker, E, Bergmans, HE, Lim, F and Pauwels, K (2013). "General considerations on the biosafety of virus-derived vectors used in gene therapy and vaccination." Curr Gene Ther **13**(6): 385-394.

Boutin, S, Monteilhet, V, Veron, P, Leborgne, C, Benveniste, O, Montus, MF and Masurier, C (2010). "Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors." Hum Gene Ther **21**(6): 704-712.

Burguete, T, Rabreau, M, Fontanges-Darriet, M, Roset, E, Hager, HD, Koppel, A, Bischof, P and Schlehofer, JR (1999). "Evidence for infection of the human embryo with adeno-associated virus in pregnancy." Hum Reprod **14**(9): 2396-2401.

Deyle, DR and Russell, DW (2009). "Adeno-associated virus vector integration." Curr Opin Mol Ther **11**(4): 442-447.

Donsante, A, Vogler, C, Muzyczka, N, Crawford, JM, Barker, J, Flotte, T, Campbell-Thompson, M, Daly, T and Sands, MS (2001). "Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors." Gene Ther **8**(17): 1343-1346.

Erles, K, Rohde, V, Thaele, M, Roth, S, Edler, L and Schlehofer, JR (2001). "DNA of adeno-associated virus (AAV) in testicular tissue and in abnormal semen samples." Hum Reprod **16**(11): 2333-2337.

Finn, JD, Ozelo, MC, Sabatino, DE, Franck, HW, Merricks, EP, Crudele, JM, Zhou, S, Kazazian, HH, Lillcrap, D, Nichols, TC and Arruda, VR (2010). "Eradication of neutralizing antibodies to factor VIII in canine hemophilia A after liver gene therapy." Blood **116**(26): 5842-5848.

Fitzpatrick, Z, Leborgne, C, Barbon, E, Masat, E, Ronzitti, G, van Wittenberghe, L, Vignaud, A, Collaud, F, Charles, S, Simon Sola, M, Jouen, F, Boyer, O and Mingozi, F (2018). "Influence of Pre-existing Anti-capsid Neutralizing and Binding Antibodies on AAV Vector Transduction." Mol Ther Methods Clin Dev **9**: 119-129.

Gao, G, Vandenberghe, LH, Alvira, MR, Lu, Y, Calcedo, R, Zhou, X and Wilson, JM (2004). "Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues." J Virol **78**(12): 6381-6388.

Grieger, JC and Samulski, RJ (2005). "Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps." J Virol **79**(15): 9933-9944.

Han, SO, Ronzitti, G, Arnson, B, Leborgne, C, Li, S, Mingozi, F and Koeberl, D (2017). "Low-Dose Liver-Targeted Gene Therapy for Pompe Disease Enhances Therapeutic Efficacy of ERT via Immune Tolerance Induction." Mol Ther Methods Clin Dev **4**: 126-136.

Howard, DB and Harvey, BK (2017). "Assaying the Stability and Inactivation of AAV Serotype 1 Vectors." Hum Gene Ther Methods **28**(1): 39-48.

Kaepfel, C, Beattie, SG, Fronza, R, van Logtenstein, R, Salmon, F, Schmidt, S, Wolf, S, Nowrouzi, A, Glimm, H, von Kalle, C, Petry, H, Gaudet, D and Schmidt, M (2013). "A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy." Nat Med **19**(7): 889-891.

Li, C, Narkbunnam, N, Samulski, RJ, Asokan, A, Hu, G, Jacobson, LJ, Manco-Johnson, MJ and Monahan, PE (2012). "Neutralizing antibodies against adeno-associated virus examined prospectively in pediatric patients with hemophilia." Gene Ther **19**(3): 288-294.

Logan, GJ, Dane, AP, Hallwirth, CV, Smyth, CM, Wilkie, EE, Amaya, AK, Zhu, E, Khandekar, N, Ginn, SL, Liao, SHY, Cunningham, SC, Sasaki, N, Cabanes-Creus, M, Tam, PPL, Russell, DW, Lisowski, L and Alexander, IE (2017). "Identification of

liver-specific enhancer-promoter activity in the 3' untranslated region of the wild-type AAV2 genome." Nat Genet **49**(8): 1267-1273.

Markusic, DM, Hoffman, BE, Perrin, GQ, Nayak, S, Wang, X, LoDuca, PA, High, KA and Herzog, RW (2013). "Effective gene therapy for haemophilic mice with pathogenic factor IX antibodies." EMBO Mol Med **5**(11): 1698-1709.

Matsushita, T, Elliger, S, Elliger, C, Podsakoff, G, Villarreal, L, Kurtzman, GJ, Iwaki, Y and Colosi, P (1998). "Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus." Gene Ther **5**(7): 938-945.

Mingozzi, F, Liu, YL, Dobrzynski, E, Kaufhold, A, Liu, JH, Wang, Y, Arruda, VR, High, KA and Herzog, RW (2003). "Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer." J Clin Invest **111**(9): 1347-1356.

Nowrouzi, A, Penaud-Budloo, M, Kaepfel, C, Appelt, U, Le Guiner, C, Moullier, P, von Kalle, C, Snyder, RO and Schmidt, M (2012). "Integration frequency and intermolecular recombination of rAAV vectors in non-human primate skeletal muscle and liver." Mol Ther **20**(6): 1177-1186.

Penaud-Budloo, M, Le Guiner, C, Nowrouzi, A, Toromanoff, A, Cherel, Y, Chenuaud, P, Schmidt, M, von Kalle, C, Rolling, F, Moullier, P and Snyder, RO (2008). "Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle." J Virol **82**(16): 7875-7885.

Pereira, CC, de Freitas, LB, de Vargas, PR, de Azevedo, ML, do Nascimento, JP and Spano, LC (2010). "Molecular detection of adeno-associated virus in cases of spontaneous and intentional human abortion." J Med Virol **82**(10): 1689-1693.

Perrin, GQ, Zolotukhin, I, Sherman, A, Biswas, M, de Jong, YP, Terhorst, C, Davidoff, AM and Herzog, RW (2016). "Dynamics of antigen presentation to transgene product-specific CD4(+) T cells and of Treg induction upon hepatic AAV gene transfer." Mol Ther Methods Clin Dev **3**: 16083.

Puzzo, F, Colella, P, Biferi, MG, Bali, D, Paulk, NK, Vidal, P, Collaud, F, Simon-Sola, M, Charles, S, Hardet, R, Leborgne, C, Meliani, A, Cohen-Tannoudji, M, Astord, S, Gjata, B, Sellier, P, van Wittenberghe, L, Vignaud, A, Boisgerault, F, Barkats, M, Laforet, P, Kay, MA, Koeberl, DD, Ronzitti, G and Mingozzi, F (2017). "Rescue of Pompe disease in mice by AAV-mediated liver delivery of secreted acid alpha-glucosidase." Sci Transl Med **9**(418).

Reuter, JD, Fang, X, Ly, CS, Suter, KK and Gibbs, D (2012). "Assessment of hazard risk associated with the intravenous use of viral vectors in rodents." Comp Med **62**(5): 361-370.

Ronzitti, G, Bortolussi, G, van Dijk, R, Collaud, F, Charles, S, Leborgne, C, Vidal, P, Martin, S, Gjata, B, Sola, MS, van Wittenberghe, L, Vignaud, A, Veron, P, Bosma, PJ, Muro, AF and Mingozzi, F (2016). "A translationally optimized AAV-UGT1A1 vector drives safe and long-lasting correction of Crigler-Najjar syndrome." Mol Ther Methods Clin Dev **3**: 16049.

Schnepp, BC, Jensen, RL, Clark, KR and Johnson, PR (2009). "Infectious molecular clones of adeno-associated virus isolated directly from human tissues." J Virol **83**(3): 1456-1464.

Sonntag, F, Kother, K, Schmidt, K, Weghofer, M, Raupp, C, Nieto, K, Kuck, A, Gerlach, B, Bottcher, B, Muller, OJ, Lux, K, Horer, M and Kleinschmidt, JA (2011). "The assembly-activating protein promotes capsid assembly of different adeno-associated virus serotypes." J Virol **85**(23): 12686-12697.

Zinn, E and Vandenberghe, LH (2014). "Adeno-associated virus: fit to serve." Curr Opin Virol **8**: 90-97.