

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/22/19
c) Fecha del acuse de recibo de la notificación: 9-Jun-2022
d) Título del proyecto: Estudio abierto, de dos partes, de administración génica sistémica, para evaluar la seguridad y la expresión de RO7494222 (SRP 9001) en sujetos menores de cuatro años con distrofia muscular de Duchenne
a) Período propuesto para la liberación: Inicio (España): Oct-2022; Fin (España): Dic-2032

2. Notificador

Nombre de la institución o empresa: F. Hoffmann-La Roche Ltd
--

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	<input type="checkbox"/>
- otro animal	<input type="checkbox"/> especifique el phylum y la clase

Otro, especifíquese (reino, phylum y clase)
<p>b) Identidad del OMG (género y especie)</p> <p>Género: Dependoparvovirus Especie: Virus adenoasociado (VAA), serotipo rh74 (vector vírico incapaz de replicarse que contiene ADNc <i>hMicro-Dys</i> humano)</p>
<p>c) Estabilidad genética, de acuerdo con el punto 10 de la letra A de la sección II del anexo III A:</p> <p>Se espera que la estabilidad genética de RO7494222 (SRP-9001) sea equivalente a la del VAA sin mutaciones (VAAsm). También se sabe que el ADN del VAA sin mutaciones, así como el de los vectores basados en VAA, persiste en células transducidas como concatémeros episómicos circulares (extracromosómicos) en tejidos humanos (Chen, 2005, Penaud-Budloo, 2018 y Schnepf, 2005). Sin embargo, debido a la falta de genes Rep y Cap víricos, se espera que RO7494222 (SRP-9001) permanezca en las células como episomas y que no se replicará y producirá partículas víricas. El casete de expresión se transcribirá y traducirá por las enzimas de la célula huésped, lo que ocasionará la expresión de microdistrofina. La estabilidad de RO7494222 (SRP-9001) se considera comparable a la del VAAsm.</p> <p>Existe la posibilidad de una recombinación genómica homóloga espontánea en la naturaleza entre los genomas víricos de las cepas de VAA si el organismo huésped resulta infectado simultáneamente por dos cepas diferentes de VAA y un virus auxiliar.</p>

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"/>
<p>En caso afirmativo, indique el código del país:</p> <p><i>BE</i> <i>DE</i> <i>FR</i> <i>IT</i></p>	

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

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
<p>En caso afirmativo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estado miembro de la notificación: - Número de la 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"/>
<p>En caso afirmativo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estado miembro de la notificación: Estados Unidos; Reino Unido - Número de la notificación: IND 017763; CTA 43810/0008/001-0001 	

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

RO7494222 (SRP-9001) es un vector VAA incapaz de replicarse que contiene el gen de micro-distrofina para el tratamiento de pacientes con distrofia muscular de Duchenne. No se prevé que RO7494222 (SRP-9001) ejerza un impacto medioambiental, ni en la población de pacientes, por las distintas razones que se listan a continuación.

Patología

Los virus adeno-asociados (VAA) son virus de ADN monocatenario que no se ha observado que provoquen patologías en el ser humano.

Productividad de sustancias nocivas

El virus recombinante expresa la proteína micro-distrofina y no produce sustancias nocivas. No se han insertado en el OMG genes para oncogenes, toxinas o genes potencialmente nocivos.

Propiedad de transmisión del ácido nucleico horizontalmente

El VAA recombinante utilizado para la administración del transgén RO7494222 (SRP-9001) ha mostrado liberar un muy pequeño porcentaje del número total de genomas virales inyectados en la población de pacientes en una matriz de fluidos (sangre completa, suero, orina, saliva), y se considera que su capacidad de transmitir el ácido nucleico horizontalmente es sustancialmente menor que la del VAA de tipo natural, que es la especie taxonómica a la que pertenece el organismo alterado. Además, no se prevén exposiciones a organismo no diana o exposiciones medioambientales.

Como resultado, no cabría esperar que RO7494222 (SRP-9001) conlleve la transmisión horizontal del ácido nucleico.

Incompetencia para la replicación y mutagénesis por inserción

La tecnología de VAA recombinante es diferente de la del VAA sin mutaciones (sm). Los vectores recombinantes de VAA (VAAr) no contienen secuencias codificantes víricas y no expresan la proteína Rep, que desempeña un papel fundamental, no solo para la replicación del ADN, sino también para la integración en el sitio específico y los efectos inhibidores del crecimiento celular. Los productos recombinantes para genoterapia humana se utilizan para suministrar (y, en última instancia, expresar) un «transgén» terapéutico en células somáticas con el fin de tratar enfermedades genéticas hereditarias. Las células somáticas contribuyen a los diversos tejidos del organismo, pero no a la estirpe germinal. Los efectos de los cambios realizados en las células somáticas se limitan a la persona tratada y no los heredarían las generaciones futuras.

La tumorigenicidad debida a mutagénesis por inserción es una inquietud teórica para cualquier vector de genoterapia. Por lo general se supone que las secuencias de las RTI (repeticiones terminales invertidas) víricas pueden tener una estructura con posibilidad de recombinación incluso en ausencia de proteína Rep. Aunque la integración de secuencias del vector en el genoma celular parece ocurrir en el ratón preferentemente en regiones de transcripción activa, no se ha observado formación tumoral después del tratamiento mediado por VAAr en primates no humanos, perros, ratas o ningún paciente en los ensayos clínicos hasta la fecha, incluso después de un seguimiento a largo plazo (Colella, 2018).

Inmunogenicidad

El producto transgénico y la cápside del virus son las únicas fuentes de antígeno exógeno que se cree que tienen la posibilidad de inducir una respuesta inmunitaria. Además, la inmunidad preexistente al VAA en una gran proporción de la población humana podría complicar el uso de vectores de VAAr derivados de serotipos aislados de muestras humanas. Se van a vigilar los pacientes en cuanto a respuestas inmunitarias y se tratarán profilácticamente con corticosteroides desde las primeras semanas a unos meses después de la transferencia génica.

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

Virus ARN

Virus ADN

Bacteria

Hongo

Animal

- mamíferos

- insectos

- peces

- otro animal

(especifique el phylum y la clase)

Otros, (especifíquense):

2. Nombre

i) Orden y taxón superior (animales): Familia Parvoviridae
ii) Género: Dependovirus
iii) Especie: Virus adenoasociado
iv) Subespecie: NA
v) Cepa: NA
vi) Patovar (biotipo, ecotipo, raza, etc.): Serotipo rh74
vii) Nombre vulgar: VAA rh74

3. Distribución geográfica del organismo

a) Autóctono del país que notifica o establecido en él: Sí <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/>
b) Autóctono de otros países de la Comunidad o establecido en ellos: i) Sí <input checked="" type="checkbox"/> En caso afirmativo, indíquese el tipo de ecosistema en que se encuentra: Atlántico <input checked="" type="checkbox"/> Mediterráneo <input checked="" type="checkbox"/> Boreal <input checked="" type="checkbox"/> Alpino <input checked="" type="checkbox"/> Continental <input checked="" type="checkbox"/> Macaronésico <input checked="" type="checkbox"/> ii) No <input 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

Suelo, en libertad

Suelo, en simbiosis radiculares de plantas

En simbiosis con sistemas foliares o caulinares de plantas

En simbiosis con animales

Otros , (especifíquense): El VAA rh74 se ha aislado de primates no humanos (*Macaca mulatta*), aunque pueden ser huéspedes otros animales o los seres humanos .

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

5. a) Técnicas de detección

Pruebas serológicas

5. b) Técnicas de identificación

Anticuerpos específicos por serotipo y secuenciación de ADN

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: El VAA sin mutaciones no está clasificado en los grupos de riesgo 2, 3 o 4 en la Unión Europea (UE) de conformidad con la Directiva 2000/54/CE sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo (Anexo III). Se designa de forma más adecuada como un agente biológico del grupo de riesgo 1, definido en la UE como «un agente biológico que resulte poco probable que cause enfermedad en el hombre».

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	<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 11 del anexo III A de la Directiva 2001/18/CE. NA

8. Información sobre reproducción

a) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:
 La replicación del VAA rh74 recombinante en una célula huésped infectada depende de la coinfección por un virus auxiliar, como un adenovirus. El tiempo de generación del VAA sin mutaciones en un ecosistema natural será significativamente muy alto, en función del momento de la coinfección.

b) Tiempo de generación en el ecosistema en el que vaya a ser liberado:
 rAAV no es competente para la replicación sin la coinfección con un virus auxiliar, como un adenovirus; por tanto, el tiempo de generación es variable, dependiendo de la presencia o la ausencia de un virus auxiliar.

c) Modo de reproducción: NA Sexual Asexual

d) Factores que afectan a la reproducción:
 La presencia de un virus auxiliar, como un adenovirus o un virus herpes simplex, estimula la expresión génica del AAV, la replicación de su genoma y la producción de partículas virales. En ausencia de un virus auxiliar, el AAV de tipo natural es incompetente para la replicación. Téngase en cuenta que el OMG final, RO7494222 (SRP-9001), es incompetente para la replicación incluso en presencia de un virus auxiliar, debido a la eliminación de los genes rep y cap virales

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)

El AAV no forma estructuras de supervivencia

b) Factores pertinentes que afectan a la capacidad de supervivencia

Las partículas de VAA son estables fuera de los organismos huésped durante varias semanas en condiciones ambientales normales en un amplio intervalo de pH y temperatura. Debido a la alta estabilidad de la cápside, el VAA puede seguir siendo infeccioso por lo menos durante un mes a temperatura ambiente (Tenenbaum, 2003). Para garantizar la seguridad se deben emplear procedimientos adecuados de descontaminación, como lejía al 10 %, detergentes iónicos o soluciones alcalinas (pH >9,5) (Howard, 2017).

10. a) Vías de diseminación

Los vectores sin mutaciones se transmiten posiblemente por ingestión, inhalación de aerosoles o gotículas, contacto con mucosas, líquidos corporales y materia fecal.

10. b) Factores que afectan a la diseminación

Para la infección se necesita una coinfección con un virus auxiliar.

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)

Ninguna

C. Información sobre la modificación genética

1. Tipo de modificación genética:

i) Inserción de material genético

ii) Eliminación de material genético

iii) Sustitución de una base

iv) Fusión celular

v) Otro (especifíquese)

2. Resultado que se pretende obtener mediante la modificación genética

Después de la administración de RO7494222 (SRP-9001), el vector se transloca al núcleo y se convierte en ADN bicatenario y existe independientemente del cromosoma. La persistencia de la expresión génica es muy alta en las células no mitóticas. El objetivo del tratamiento con RO7494222 (SRP-9001) es aumentar el nivel de expresión de la proteína microdistrofina en el músculo esquelético y

cardíaco para aumentar su resistencia y protegerlo de lesiones inducidas por la contracción. En los estudios clínicos realizados para evaluar la seguridad y la eficacia de RO7494222 (SRP-9001), este parece mostrar un perfil de seguridad favorable y ser generalmente bien tolerado.

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 type="checkbox"/>
En caso negativo, pase a la pregunta 5	

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 plásmido contiene el genoma viral (AAV.Micro-dys)	
c) Gama de organismos huéspedes del vector: Células (bacterianas) de <i>E. coli</i> .	
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:

Los genes de resistencia a los antibióticos solo están presentes en el plásmido. El vector vírico RO7494222 (SRP-9001) no contiene ningún gen de resistencia a los antibióticos

e) Fragmentos constituyentes del vector

El vector RO7494222 (SRP-9001) se produce por un proceso denominado «triple transfección», que utiliza 3 construcciones diferentes de ADN plasmídico.

1. Plásmido vector de VAA; gen de interés: pAAV.MHCK7.Micro-Dystrophin; plásmido vector que codifica una proteína microdistrofina humana de 138 kDa y elementos reguladores flanqueados por repeticiones terminales invertidas (RTI) derivadas de VAA2.
2. Plásmido auxiliar de VAA; pNLREP2-Caprh74; plásmido de encapsidación que contiene el gen *rep* del VAA para codificar proteínas no estructurales y el gen *cap* para codificar proteínas estructurales.
3. Plásmido auxiliar de Ad; pHELP; plásmido auxiliar de adenovirus que codifica los ARN de los genes de tipo 2 *E2A*, *E4* y *VA* necesarios para la replicación de VAA en células HEK 293.

f) Método de introducción del vector en el organismo receptor

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

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

- i) transformación
- ii) microinyección
- iii) macroencapsulación
- iv) macroinyección
- v) otros, (especifíquense)

6. Información sobre el fragmento de inserción:

a) Composición del fragmento de inserción:
El genoma del vector VAA recombinante encapsulado contiene un promotor MHCK7, el transgén de la microdistrofina y una señal poliadenilación flanqueados por respuestas terminales invertidas del VAA

b) Fuente de cada parte constitutiva del fragmento de inserción:
Promotor MHCK7: *Mus musculus*, modificado y sintetizado químicamente
Transgén de microdistrofina: *Homo sapiens*, codón humano optimizado y sintetizado químicamente
Señal de poliadenilación: PolyA de síntesis.

c) Función prevista de cada parte constitutiva del fragmento de inserción en el OMG
Promotor MHCK7: Dirige la expresión génica específica esquelética y cardíaca
Transgén de microdistrofina: Codifica las partes del gen de la distrofina que son críticas para la función muscular
Señal de poliadenilación (PolyA): Especifica la terminación transcripcional y es también de importancia para la estabilidad del ARNm y su exportación nuclear.
Repeticiones terminales invertidas del VAA (RTIs): Funciones como el origen de la replicación del ADN del vector y la señal de encapsulación del genoma del VAAr, cuando las funciones del adenovirus auxiliar se proporcionan en trans

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

- en un plásmido libre
- integrado en el cromosoma
- Otros especifíquense):

Se presenta la estructura del transgén (hMicro-Dys) que incluye las RTI. El vector se localiza en forma de concatémeros episómicos como cuerpos extracromosómicos

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

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)	

2. Nombre completo

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

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 checked="" 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? No procede

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

a) ¿Se diferencia el OMG del receptor en lo que a capacidad de supervivencia se refiere?
Sí <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/>
Especifíquese
Dado que la partícula de la cápside de RO749222 (SRP-9001) es similar a la del VAA rh74 sin mutaciones, las características de supervivencia <i>ex vivo</i> son idénticas tanto para el serotipo recombinante como para el natural
b) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta al modo o índice de reproducción?
Sí <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/>
Especifíquese:
Debido a la eliminación de los genes rep y cap, RO749222 (SRP-9001) es incapaz de replicarse, incluso en presencia de un virus auxiliar VAA sin mutaciones

c) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta a la diseminación?

Sí

No

No se sabe

Especifíquese:

Las proteínas de la cápside vírica tienen la misma diseminación/tropismo que el virus VAA rh74 progenitor. Sin embargo, dado que RO749222 (SRP-9001) es incapaz de replicarse, la diseminación se limita a la administración de RO749222 (SRP-9001) al paciente

d) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad?

Sí

No

No se sabe

Especifíquese:

Ni el VAA rh74 sin mutaciones ni RO749222 (SRP-9001) son patógenos para los seres humanos y los animales en el medio ambiente. Dado que RO749222 (SRP-9001) es incapaz de replicarse, no puede iniciar un ciclo infeccioso, ni siquiera en presencia de funciones auxiliares

2. Estabilidad genética del organismo modificado genéticamente

La estabilidad de RO749222 (SRP-9001) se confirma caracterizando su identidad, pureza y calidad. La administración de RO749222 (SRP-9001) a sujetos con Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) infecta las células diana formando múltiples genomas de RO749222 (SRP-9001) que se ensamblan para formar concatémeros de ADN bicatenario más grandes. Sin embargo, no se forman nuevas partículas víricas en los sujetos. Estos concatémeros persisten en la célula como estructuras episómicas estables y tienen actividad transcripcional. Sobre la base de la estabilidad genética conocida del VAA sin mutaciones y la ausencia de un mecanismo intrínseco para la variación genética o la inestabilidad, se espera que los rasgos genéticos de RO749222 (SRP-9001) sean estables.

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

Letra d) del punto 11 de la letra A de la sección II del anexo III A. Los VAA recombinantes genomanipulados para ensayos clínicos de genoterapia no se incorporan al genoma, sino que forman concatémeros episómicos en el núcleo de la célula huésped (Kimura, et al., 2019). Los datos preclínicos también indican que los vectores de VAA persisten predominantemente como elementos extracromosómicos (episomas) en lugar de integrarse en los genomas de las células huésped (McCarty, et al., 2004). Sobre la base de los datos clínicos y preclínicos disponibles, se concluye que RO749222 (SRP-9001) no se integra en el genoma de la célula huésped. Sin embargo, aún no se han estudiado las consecuencias a largo plazo de la administración de vectores víricos de VAA a los seres humanos. Dado que el producto RO749222 (SRP-9001) utiliza VAA rh74 con todo el ADN sin mutaciones eliminado, excepto las repeticiones terminales invertidas, se considera que el riesgo potencial de incorporación de RO749222 (SRP-9001) val ADN cromosómico del paciente es muy reducido.

El vector recombinante RO749222 (SRP-9001) que contiene el gen *DMD* podría interactuar con otros virus con los que los pacientes entren en contacto y provocar viremia. Este improbable supuesto se ha estudiado en cultivos celulares (Favre et al., 2001). Sin embargo, los experimentos de rescate *in vivo* no han demostrado rescate y replicación, excepto en un caso en el que se administraron dosis muy altas de VAAsm y adenovirus en un entorno concreto (Afione et al., 1996). Por lo tanto, el riesgo de infección como consecuencia de la interacción del VAA rh74 con otros virus parece ser mínimo en el contexto de este ensayo clínico multinacional de fase 3, como consecuencia de la exclusión de la presencia a gran escala de elementos interferentes adicionales, como pueden ser VAA de tipo natural y adenovirus.

Inciso i) del punto 2 de la letra C de la sección II: En general, se observa excreción de virus en un período corto después de la administración de RO749222 (SRP-9001) no replicativo, con una exposición muy limitada al medio ambiente. Por lo tanto, no se espera la exposición de plantas o animales. RO749222 (SRP-9001) no es patógeno y la proteína de la distrofina humana no ha demostrado tener efectos tóxicos. No se han comunicado efectos secundarios para el medio ambiente ni para la salud humana después de la liberación de OMG similares (virus adenoasociados de los serotipos 2 y 9).

En el análisis de la excreción vírica de RO749222 (SRP-9001) se hallaron los niveles máximos el día 2, tanto en animales con C57BL/6J como en animales con DMD^{MDX} en ambos niveles de dosis. Los niveles de RO749222 (SRP-9001) descendieron progresivamente según transcurría el tiempo desde la administración. El vector se elimina del organismo principalmente por la orina y las heces, encontrándose en plasma por debajo del límite de cuantificación el día 44 después de la infusión. En este momento no se conocen los riesgos asociados al vector excretado; sin embargo, son poco probables, ya que el vector no es infeccioso y no se puede replicar. No obstante, se deben dar instrucciones a los familiares y a los cuidadores de los pacientes sobre el uso de guantes protectores si entran en contacto directo con líquidos corporales y/o desechos de los pacientes, así como en cuanto a una buena higiene de manos durante unas semanas después de la inyección. Además, se prohíbe a los pacientes donar sangre durante los dos años siguientes a la inyección del vector. Véanse también los resultados del estudio de excreción y biodistribución de virus descritos en la sección A de Información General, en respuesta a la pregunta 7 anterior.

4. Descripción de los métodos de identificación y detección

a) Técnicas utilizadas para detectar el OMG:

El vector recombinante de microdistrofina (SRP-9001) se evalúa mediante un ensayo de RCPc/ddPCR utilizando cebadores y una sonda específica para el promotor MHCK7.

b) Técnicas utilizadas para identificar el OMG:

El vector recombinante de microdistrofina (SRP-9001) se evalúa mediante un ensayo de RCPc/ddPCR utilizando cebadores y una sonda específica para el promotor MHCK7.

F. Información sobre la liberación

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

Para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne. No se espera ningún beneficio potencial.

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

No

En caso afirmativo, especifíquese:

RO749222 (SRP-9001) se administra por vía intravenosa a pacientes con distrofia muscular de Duchenne.

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

a) Localización geográfica (región administrativa y coordenadas de referencia cuando proceda):

La idoneidad del paciente se determinará basándose en el análisis genético del gen DMD. Se identificarán centros de tratamiento especializados para administrar RO749222 (SRP-9001) a sujetos pediátricos

El ensayo se llevará a cabo en el siguiente centro: Hospital Sant Joan de Deu de Barcelona

b) Área del lugar (m²): No procede

i) lugar real de la liberación (m²):

ii) área de liberación más amplia (m²):

c) Proximidad a biotipos reconocidos internacionalmente o zonas protegidas (incluidos depósitos de agua potable) que pudieran verse afectados:

No procede, dado que el material excretado, si lo hay, no es infeccioso
d) Flora y fauna, incluidos cultivos, ganado y especies migratorias que pueden potencialmente interactuar con el OMG: Ninguno

4. Método y amplitud de la liberación

<p>a. Cantidad de OMG que vaya a liberarse:</p> <p>RO749222 (SRP-9001) se administrará a los pacientes con una dosis única de $1,33 \times 10^{14}$ gv/kg para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne. Se reclutarán unos 21 pacientes en distintos países para los estudios clínicos fundamentales. La cantidad que se liberará al medio ambiente por excreción serán una proporción muy pequeña del número total de genomas víricos. RO749222 (SRP-9001) se puede detectar mediante RCPC/ddPCR en las muestras excretadas desde el día 1 posterior a la inyección.</p>
<p>b. Duración de la operación:</p> <p>Los viales se deberán descongelar antes de su administración, lo que llevará aproximadamente de 90 minutos a 2 horas, según el <i>Pharmacy Manual</i>. RO749222 (SRP-9001) se administrará a lo largo de aproximadamente 1-2 horas en una vena periférica de una extremidad, según los procedimientos que se describen en <i>las Administration Instructions</i> (o en el <i>Dose Administration Manual</i>).</p>
<p>c. Métodos y procedimientos para evitar o reducir al mínimo la propagación de los OMG más allá del lugar de liberación:</p> <p>Los profesionales sanitarios y el personal del centro recibirán capacitación sobre las mejores prácticas de bioseguridad acerca de los VAA que se deberán aplicar durante la preparación de RO749222 (SRP-9001) en la farmacia, que comprenden su transporte a la sala de administración, las precauciones durante la administración y la eliminación de los desechos biológicos en contacto con el producto y el medicamento sobrante.</p> <p>La capacitación también incluirá el uso de ropa protectora adaptada, guantes y gafas protectoras, la presencia constante de un kit para vertidos y la descontaminación de los desechos antes de su eliminación.</p> <p>El equipo de protección individual (EPI) utilizado para el procedimiento incluye:</p> <ul style="list-style-type: none"> – Guantes (valoren la posibilidad de usar guantes dobles) – Gafas de seguridad – Bata de aislamiento desechable – También se debe utilizar el EPI adecuado para los antebrazos, como manguitos o asegurar los guantes sobre los manguitos de la bata de laboratorio. – No deberá trabajar con el VAA personal con heridas o

rasguños cutáneos.

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

RO749222 (SRP-9001) se administrará a los pacientes con una dosis única de $1,33 \times 10^{14}$ gv/kg para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne. Se reclutará a unos 21 pacientes de distintos países para los estudios clínicos fundamentales.

Los viales de RO749222 (SRP-9001) se enviarán congelados y se conservarán a ≤ -60 °C. Los viales de RO749222 (SRP-9001) SOLAMENTE se retirarán de su conservación a ≤ -60 °C cuando se esté dispuesto para utilizarlos. Se descongelarán en la farmacia del hospital, con ambiente controlado, antes de su administración. Una vez que se haya aspirado a la jeringa el volumen de la dosis deberá administrarse antes de transcurridas 12 horas a 2-8°C (36-46°F). A lo largo de este periodo de conservación de 12 horas, la solución de la dosis puede mantenerse temporalmente a 9-25°C (47-77°F) un máximo de 4 horas.

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

La administración de RO749222 (SRP-9001) aumenta la expresión de la distrofina *in vivo* y podría mejorar la función muscular del sujeto y, lo que es más importante, preservar el diafragma y el músculo cardíaco. Estas mejoras aumentarían la calidad de vida del paciente y, según los estudios de fase 1 y fase 2 en EE. UU., podrían prolongar su supervivencia.

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): Primate
ii) Familia (plantas): NA
iii) Género: Homo
iv) Especie: Sapiens
v) Subespecies: NA
vi) Cepa: NA
vii) Cultivar/Línea de reproducción: NA
viii) Patovar: NA

ix) Nombre vulgar: Ser humano

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

La distrofia muscular de Duchenne afecta a todos los músculos esqueléticos del organismo, además de al diafragma y al corazón. Como tal, es necesario un abordaje sistémico para ofrecer la mejor perspectiva posible de beneficio directo para los pacientes. Utilizar el serotipo VAAr rh74 permite una transducción eficaz del músculo cardíaco, esquelético y diafragmático.

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

Ninguna

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

No se sabe

Especifíquese:

Dado que RO749222 (SRP-9001) es incapaz de replicarse, no se espera un aumento de la competitividad ni de la invasividad.

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

Teóricamente, RO749222 (SRP-9001) no puede infectar a otras células de mamíferos en el ecosistema porque es incapaz de replicarse.

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 procede

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:

No existe ningún efecto ni peligro para la biodiversidad por la transmisión horizontal por difusión del material genético. Incluso si se produjera una transferencia horizontal de genes, las secuencias no conferirían una ventaja selectiva a otros organismos, como las bacterias, ya que RO749222 (SRP-9001) no contiene ningún promotor procariótico, genes de resistencia ni de otro tipo, que pudieran potenciar su crecimiento. Por lo tanto, es poco probable que RO749222 (SRP-9001) influya en la dinámica natural de las poblaciones microbianas o en los ciclos biogeoquímicos en ningún sitio concreto del medio ambiente.

b) De otros organismos al OMG:

Insignificante. Dado que RO749222 (SRP-9001) contiene las secuencias de RTI, existe una posibilidad muy baja de recombinación homóloga del vector con VAA sin mutaciones en caso de coinfección en personas expuestas. El resultado de dicha recombinación sería que RO749222 (SRP-9001) obtendría los genes funcionales del VAA necesarios para la replicación y la encapsidación. Por lo tanto, la recombinación ocasionaría la formación de virus que serían idénticos a la cepa recombinante, que es incapaz de multiplicarse.

c) Consecuencias probables de la transferencia de genes:

Expresión de la proteína microdistrofina humana (hMicro-Dys).

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 hay referencias bibliográficas disponibles.

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

No se dispone de interacciones ambientales con procesos biogeoquímicos.

H. Información sobre el seguimiento

1. Métodos de seguimiento de los OMG

RCPc/ddPCR

2. Métodos de seguimiento de las repercusiones en el ecosistema

Ninguno.

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

La transferencia de material genético de RO749222 (SRP-9001) a otros organismos es insignificante. Se puede utilizar RCPc/ddPCR para detectar el material genético.

4. Tamaño del área de seguimiento (m2)

No procede.

5. Duración del seguimiento

No procede.

6. Frecuencia del seguimiento

No procede.

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

1. Tratamiento del lugar tras la liberación

Tras la administración de RO749222 (SRP-9001) a los pacientes, la sala de intervención se desinfectará según el manual de la farmacia y las normas habituales de la institución. Todos los materiales utilizados para la preparación que entren en contacto con RO749222 (SRP-9001) se sellarán en contenedores principales y secundarios estancos, que se introducirán después en bolsas de riesgo biológico rojas para su incineración.

2. Tratamiento del OMG tras la liberación

Todos los viales, tanto utilizados como no utilizados, se sellarán en contenedores estancos y se conservarán hasta que el monitor practique la contabilidad del fármaco y el promotor autorice su destrucción, ya sea en el centro o su devolución al depósito para su destrucción. Si los procedimientos normalizados de trabajo (PNT) locales no permitieran el mantenimiento del producto en investigación para su contabilidad, el Centro deberá guardar una copia de los PNT en el manual de farmacia y documentar la destrucción del fármaco del estudio después de la infusión.

Tras la administración del producto, los componentes del sistema de administración que hayan estado en contacto (filtros en línea, agujas y jeringas de inyección), gasas y equipo protector personal se desinfectarán o incinerarán de acuerdo con las normas de tratamiento de residuos médicos del usuario final.

3. a) Tipo y cantidad de residuos producidos

Tras la administración de RO749222 (SRP-9001) se generan los siguientes residuos: viales vacíos, viales usados, equipo de administración (con filtro en línea, capuchón para tapar la jeringa, agujas y jeringas de inyección), gasas y guantes.

3. (b) Tratamiento de residuos

Se aconsejará a los familiares de los pacientes que sigan las instrucciones para el manejo adecuado de las heces de los pacientes, lleven guantes y observen una buena higiene de manos cuando entren en contacto directo con los desechos corporales del paciente durante un mínimo de un mes después del tratamiento con RO749222 (SRP-9001). Los pañales se deben precintarse en bolsas dobles y se pueden desechar en la basura doméstica.

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

En caso de vertido accidental de RO749222 (SRP-9001) durante la preparación de la dosis y su administración al paciente por parte del profesional sanitario, se seguirán las instrucciones facilitadas por el manual de la farmacia del Promotor para contener y desinfectar inmediatamente el vertido, para evitar más diseminación. Todos los materiales contaminados se eliminarán localmente mediante incineración o se esterilizarán en autoclave. Todos los demás lugares o superficies se limpiarán de acuerdo con los procedimientos normales de descontaminación, según la orientación de los NIH/CDC para el manejo de agentes con un nivel de bioseguridad 1 y el Manual de la Farmacia.

- Evacuen el área, retiren el EPI contaminado y dejen que los agentes reposen durante un mínimo de 30 minutos. Inicien el procedimiento de respuesta a vertidos.
- Cubran el vertido con material absorbente, empezando por los bordes y siguiendo hacia el centro.
- Viertan con cuidado desinfectante (solución de lejía, seguida de toallitas con alcohol) sobre el vertido absorbido, empezando de nuevo por los bordes. Saturen el área con desinfectante.
- Dejen suficiente tiempo de contacto para desactivar el material del vertido. Los vertidos no viscosos requieren 15-20 minutos; los vertidos viscosos requieren 30 minutos.
- Utilicen toallas de papel para limpiar el vertido, actuando desde el borde hasta el centro. Utilicen tenazas o pinzas para recoger plásticos o vidrio rotos, u otros objetos punzantes que puedan perforar los guantes.

- Desechen el material absorbente en bolsas de residuos biológicos.
- Limpie el área del vertido con toallas de papel limpias empapadas en desinfectante. Humedezcan a fondo el área del vertido, dejen que se desinfecte durante 15-20 minutos más y limpie con toallas.
- Desechen todos los materiales de limpieza (empapados con desinfectante) en una bolsa/contenedor de productos químicos, y cualquier EPI contaminado, en una bolsa de riesgo biológico. Cierren y aseguren las bolsas.
- Coloquen la bolsa en una segunda bolsa de peligro biológico, asegúrenla y deséchela según las directrices de la institución para residuos biológicos peligrosos.

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

Todos los materiales utilizados en la limpieza se desecharán como residuos clínicos de riesgo biológico y se incinerarán.

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 procede.

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

Se debe obtener la autorización del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos (CEIm)/Comité Independiente de Ética (CIE) y de la administración sanitaria local de acuerdo con la legislación y la normativa locales.

References

Afione SA, Conrad CK, Kearns WG, Chunduru S, Adams R, Reynolds TC, Guggino WB, Cutting GR, Carter BJ, Flotte TR. In vivo model of adeno-associated virus vector persistence and rescue. *J Virol.* 1996 May;70(5):3235-41. doi: 10.1128/JVI.70.5.3235-3241.1996. PMID: 8627804; PMCID: PMC190187.

Chen YW, Nagaraju K, Bakay M, McIntyre O, Rawat R, Shi R, Hoffman EP. Early onset of inflammation and later involvement of TGFbeta in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2005 Sep 27;65(6):826-34. doi: 10.1212/01.wnl.0000173836.09176.c4. Epub 2005 Aug 10. PMID: 16093456.

Colella P, Ronzitti G, Mingozzi F. Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017 Dec 1;8:87-104. doi: 10.1016/j.omtm.2017.11.007. PMID: 29326962; PMCID: PMC5758940.

Howard, D. and Harvey, B., 2017. Assaying the Stability and Inactivation of AAV Serotype 1 Vectors. *Human Gene Therapy Methods*, 28(1), pp.39-48.

Kimura, T., Ferran, B., Tsukahara, Y., Shang, Q., Desai, S., Fedoce, A., Pimentel, D., Luptak, I., Adachi, T., Ido, Y., Matsui, R. and Bachschmid, M., 2019. Production of adeno-associated virus vectors for in vitro and in vivo applications. *Scientific Reports*, 9(1).

McCarty DM, Young SM Jr, Samulski RJ. Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annu Rev Genet.* 2004;38:819-45. doi: 10.1146/annurev.genet.37.110801.143717. PMID: 15568995.

Penaud-Budloo M, François A, Clément N, Ayuso E. Pharmacology of Recombinant Adeno-associated Virus Production. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2018 Jan 8;8:166-180. doi: 10.1016/j.omtm.2018.01.002. PMID: 29687035; PMCID: PMC5908265.

Schnepf BC, Jensen RL, Chen CL, Johnson PR, Clark KR. Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. *J Virol.* 2005 Dec;79(23):14793-803. doi: 10.1128/JVI.79.23.14793-14803.2005. PMID: 16282479; PMCID: PMC1287572.

Tenenbaum L, Lehtonen E, Monahan PE. Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. *Curr Gene Ther.* 2003 Dec;3(6):545-65. doi: 10.2174/1566523034578131. PMID: 14683451.