



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE VIRUS ADENOASOCIADOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/18/05)

Título del ensayo

Ensayo clínico de fase I/II, abierto, de seguridad y de búsqueda de dosis de BAY 2599023 (DTX201), una transferencia génica del factor VIII humano con el dominio B eliminado -mediada por el virus adenoasociado (AAV) del serotipo hu37- en adultos con hemofilia A grave de la empresa Bayer AG.

Características del ensayo

Administración y seguimiento

Ensayo internacional en fase 1/2 en el que está previsto que participen centros de los Estados Unidos, Bulgaria, Francia, Alemania, Países Bajos, España y Reino Unido. Está previsto incluir en todo el mundo a 12 a 18 pacientes. Se espera incluir a un máximo de 4 pacientes en España.

Los hospitales que van a participar en el ensayo son:

Complejo Hospitalario Regional de Málaga

Hospital Universitario Central de Asturias

Hospital de la Santa Creu I Sant Pau

Hospital Universitari Vall d'Hebron

Hospital Universitario La Paz

Hospital Universitari I Politecnic La Fe

Los sujetos elegibles recibirán una sola infusión IV de BAY 2599023 (DTX201). Se tratará como mínimo a dos pacientes con cada dosis, con la posibilidad de ampliar la cohorte de dosis a un máximo de seis pacientes basándose en la seguridad y en el porcentaje de actividad del FVIII. El incremento escalonado de la dosis se realizara basándose en las evaluaciones de la seguridad y las variaciones de la actividad del FVIII con respecto a la situación basal.

Se hará un seguimiento de los pacientes durante 52 semanas después de la administración de la medicación.

Una vez finalizado este ensayo, se pedirá a los sujetos elegibles que participen en un estudio de extensión de 4 años para evaluar la seguridad a largo plazo (5 años en total) de BAY 2599023 (DTX201) y su efecto en los criterios de valoración clínicos.

Se ha comprobado que los vectores de AAV se diseminan en la saliva, orina y heces de primates no humanos después de su administración sistémica. Se están efectuando en la actualidad estudios de biodistribución con ratones C57BL/6 empleando el vector clínico candidato. En estudios anteriores en los que se utilizó AAV8 recombinante para el FIX se constató la presencia de genomas del vector detectables, de una manera dependiente de la dosis, en sangre, saliva, orina, heces y semen durante 10 a 50 días después de la dosis. Así pues, AAVhu37 puede persistir en los fluidos corporales humanos durante 1 a 7 semanas tras una infusión IV.



La magnitud y la duración de la diseminación de BAY 2599023 (DTX201) se controlaran como parte del ensayo clínico propuesto.

Organismo receptor

AAV es un parvovirus con un genoma de ADN monocatenario de 4,7 kb; se trata de un virus pequeño que infecta a humanos y algunas otras especies de primates; sin embargo, actualmente no se tiene conocimiento de que cause enfermedades. Se emplea una cepa del AAV9 aislada del ser humano. El AAV9 es un serotipo único en la familia de los virus adenoasociados (AAV) que va dirigido específicamente a las neuronas motoras y que también tiene la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica.

Virus de ADN monocatenario con una cápside icosaédrica sin envoltura. El genoma del AAV consta de repeticiones terminales invertidas (IRT) en ambos extremos de la hebra de ADN, así como dos marcos de lectura abiertos, *rep* y *cap*. El ORF *rep* está compuesto por cuatro genes superpuestos, que codifican las proteínas Rep necesarias para la replicación del ADN, y el ORF *cap* contiene secuencias nucleotídicas superpuestas que codifican las proteínas de la cápside (VP1, VP2 y VP3), las cuales interactúan para formar una cápside de simetría icosaédrica. Las repeticiones terminales invertidas (IRT) flanquean los dos ORF y contienen todas las funciones en *cis* requeridas para la replicación del ADN, el empaquetamiento, la integración en el genoma del huésped y la posterior escisión y rescate.

Los virus AAV solo tienen capacidad de replicación en presencia de un virus auxiliar (por ejemplo, adenovirus o virus del herpes simple).

Organismo Modificado Genéticamente

BAY 2599023 (DTX201), es un AAVhu37FVIII, es decir, un vector de AAVhu37 recombinante sin capacidad de replicación que contiene un genoma de ADN monocatenario que codifica una forma del FVIII humano bajo el control del promotor específico del hígado.

El genoma viral de BAY 2599023 (DTX201) se ha modificado significativamente en comparación con el virus parental para que carezca de capacidad de replicación. Los genes *rep* y *cap* del AAV se han sustituido por un casete de expresión eucariótico y únicamente se han mantenido las secuencias ITR virales, que son secuencias de ADN no codificadoras (< 300 pb). Por tanto, BAY 2599023 (DTX201) no contiene genes virales. La casete de expresión contiene una versión optimizada por códon humana del ADNc del hFVIII DDB que se sintetiza químicamente. Además, contiene secuencias para inducir la expresión del gen de hFVIII-SQ con elevada especificidad por el hígado y una señal de poliadenilación derivada del gen de la alfa-2 globina humana. La casete de expresión está flanqueada por secuencias de ITR de AAV2 que funcionan como origen de la replicación del ADN del vector y señal de acondicionamiento del genoma del vector.

Los AAV requieren para su replicación la presencia de un virus auxiliar (por ejemplo, adenovirus o virus del herpes simple). Para producir el vector de AAV final, se transfecta la línea celular HeLa S3 que contiene funciones virales auxiliares entre ellas las proporcionadas por el virus auxiliar adenovirus de tipo 5 (Ad5), con el plásmido que contienen la casete de expresión.

Se realizan análisis de control de calidad del principio activo purificado AAVhu37FVIII, entre otros, los diseñados para detectar adenovirus infecciosos y no infecciosos, variantes fenotípicas de AAV con



capacidad de replicación (rcAAV) (partículas acondicionadas que pueden replicarse en presencia de un virus auxiliar), ADN de células huésped, proteínas de células huésped, etc.

A diferencia del virus parental, el vector carece de capacidad de replicación incluso en presencia de un virus auxiliar.

Identificación de riesgos potenciales

-Estabilidad

El AAV es un virus ADN monocatenario con una gran estabilidad genética, según pone de manifiesto la estrecha relación existente entre los genes *rep* y *cap* de distintos serotipos y genotipos del AAV.

AAV utiliza una ADN polimerasa del huésped para la replicación viral que no muestra propensión a los errores en comparación con las ARN polimerasas que emplean los virus ARN. En apoyo de la estabilidad genética está la observación de que los episomas de ADN proviral de AAV aislados de diferentes muestras de tejidos humanos poseen sistemáticamente la secuencia *rep* y *cap* canónica esperada de AAV2. En base a estas características del AAV parental, también cabe esperar que BAY 2599023 (DTX201) sea genéticamente muy estable. Además, cada lote de medicamento BAY 2599023 (DTX201) previsto para uso en este ensayo clínico estará sujeto a ensayos de liberación. Estos ensayos incluyen un análisis celular *in vitro* diseñado para determinar la identidad y la potencia de BAY 2599023 (DTX201).

-Formación de partículas víricas competentes para la replicación.

La transferencia involuntaria de la información genética solo podría tener lugar en caso de una recombinación entre las secuencias en el plásmido de expresión que diera lugar a la formación de AAV con capacidad de replicación (rcAAV). Para detectarlo, se analiza la presencia de concentraciones detectables de rcAAV en el principio activo BAY 2599023 (DTX201). Además, se han examinado dos lotes de desarrollo de BAY 2599023 (DTX201) y no se ha observado AAV con capacidad de replicación.

-Riesgo de transferencia genética

La diseminación de estas secuencias en el entorno está fuertemente dificultada porque las partículas del vector no son competentes para la replicación debido a la delección de las secuencias génicas estructurales del AAV. E incluso si el vector estuviera integrado en otros organismos en el medio ambiente, por ejemplo, poblaciones microbianas en plantas de tratamiento de aguas residuales, los organismos resultantes no presentarían un aumento en la tasa de crecimiento en comparación con los organismos de tipo salvaje. Las secuencias de BAY 2599023 (DTX201) no generan una ventaja selectiva, por lo que no tendrían un efecto adverso sobre la población o la diversidad genética del medio ambiente receptor.

-Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación

Los AAV son virus estables que pueden persistir en el ambiente durante periodos prolongados (del orden de varias semanas). Las partículas de AAV son resistentes a un amplio intervalo de pH (pH 3-9) y soportan temperaturas elevadas (55 °C durante 1 hora). El AAV parental puede difundirse a través de aerosoles. Sin embargo, dada la naturaleza dependiente para su replicación de los vectores AAV recombinantes, estas partículas, aunque estables, no se multiplicarían en el medio ambiente, ni siquiera en el interior de la célula huésped.



No se espera que BAY 2599023 (DTX201) se propague desde los sujetos participantes en el ensayo a otras personas o al ambiente. Esta conclusión está basada en varios hechos:

-En primer lugar, el producto se administrará en una única infusión IV en condiciones cuidadosamente controladas, lo que hará improbable la exposición de personas distintas de los sujetos del ensayo una vez que estos hayan recibido el alta.

-En segundo lugar, el producto es un vector AAV recombinante no infeccioso que carece de todos los genes virales y no puede replicarse sin funciones auxiliares específicas del AAV y sin la actividad de un virus auxiliar. La replicación solo podría tener lugar en el caso extraordinariamente improbable de que una célula huésped resultara infectada por tres virus distintos, BAY 2599023 (DTX201), un AAV parental y un virus auxiliar, y se generase un híbrido de AAV parental que contuviese la casete de expresión. Por otro lado, este genoma híbrido sería demasiado grande para acondicionar el ADN híbrido en una partícula de AAV. El riesgo de que esto ocurra es insignificante.

Ya que se espera que BAY 2599023 (DTX201) puede persistir en los líquidos corporales humanos durante 1 a 7 semanas tras una infusión IV, para reducir al mínimo el riesgo de exposición al virus diseminado, los pacientes solo serán dados de alta al menos 8 horas después de la administración del producto, lo que limita la probabilidad de exposición de familiares. Se obtendrán muestras de heces, saliva, orina, plasma y semen con los intervalos de tiempo especificados, hasta la desaparición del virus, y los pacientes tendrán que utilizar métodos anticonceptivos de doble barrera desde el momento de la administración del fármaco hasta que se lo indiquen los investigadores.

Los pacientes deben recoger y transportar muestras de heces y semen al centro clínico siguiendo los procedimientos del centro indicados por el responsable del ensayo clínico o la persona delegada.

-Patogenicidad.

BAY 2599023 (DTX201) carece de capacidad de replicación, no puede diseminarse en el ambiente y no es patógeno en los seres humanos. Además, el tipo de células diana son los hepatocitos, el transgén es un gen humano y cabe prever que la carga viral en la saliva, la orina, las heces sea baja, por lo que es improbable que resulte perjudicial para el personal que se vea expuesto accidentalmente al OMG a través de un paciente del ensayo.

-Efecto sobre la salud humana, otros organismos no diana y el medio ambiente

Dado que BAY 2599023 (DTX201) carece de capacidad de replicación, las partículas virales diseminadas no pueden multiplicarse y, por consiguiente, su dispersión se encuentra limitada de manera inherente. Una exposición de personas distintas de los sujetos que reciban el fármaco no sería una dosis suficiente para representar una expresión génica significativa ni problemas de seguridad para los seres humanos. Cabe esperar que la carga viral en saliva, orina, heces y semen sea baja. Aparte de los posibles huéspedes humanos, no cabe esperar que la exposición al OMG afecte a organismos no diana, ya sea de manera directa o indirecta. Así pues, el riesgo para los seres humanos y el ambiente asociado a la diseminación viral de BAY 2599023 (DTX201) es bajo o insignificante.

-Manipulación, control y tratamiento de residuos

El promotor del ensayo clínico evaluará a los centros en los que se realice el ensayo y se les darán instrucciones sobre los procedimientos de asignación, recepción, dispensación, conservación y contabilidad del medicamento, de conformidad con los manuales de farmacia del ensayo.



El personal utilizara equipo de protección personal (guantes y prendas protectoras como batas de laboratorio) para evitar la contaminación con el producto; esta información se recoge en un documento de instrucciones de seguridad para el producto en investigación.

El producto se conservara en un congelador seguro en el Servicio de Farmacia de los centros participantes en España hasta la preparación, por personal de farmacia debidamente formado, de la dosis requerida según se especifica en el protocolo clínico, en bolsas con solución salina para infusión. Los viales se añadirán a la bolsa de solución salina, según se explica en el manual de farmacia, dentro de una cabina de seguridad Biológica (CSB) para evitar la diseminación del OMG en el medio ambiente. El producto se transferirá a planta en un sistema cerrado para infusión y se administrara a los sujetos del estudio mediante una única infusión IV utilizando equipos de transferencia con sistemas cerrados convencionales, como se indica en el protocolo del ensayo clínico. El producto será utilizado y manipulado únicamente por profesionales sanitarios con la debida formación y autorización. El acceso a las instalaciones destinadas a la conservación, preparación y administración estará restringido a personal autorizado.

El consentimiento informado del ensayo clínico recoge instrucciones para el paciente en relación a la utilización de métodos anticonceptivos para evitar embarazo y la toma de muestras de semen. En este último caso el médico responsable del ensayo clínico le indicará al paciente donde recoger las muestras y como conservarlas y transportarlas.

Todas las superficies que puedan haberse contaminado con el OMG se descontaminaran utilizando un desinfectante adecuado. Los desinfectantes que son eficaces frente al AAV son hipoclorito de sodio al 1%, glutaraldehído al 2% y dodecilsulfato sódico al 0,25%; se podrán usar otros desinfectantes equivalentes disponibles en el centro de investigación siempre que se haya demostrado su eficacia frente a AAV.

Todos los materiales utilizados en la preparación y la administración del OMG que puedan haber entrado en contacto con él se descontaminaran antes de desecharlos (mediante tratamiento en autoclave o con un desinfectante químico adecuado eficaz frente al AAV) o se incineraran.

Los residuos líquidos se descontaminaran utilizando un desinfectante químico adecuado o tratamiento en autoclave. Los desinfectantes que son eficaces frente a AAV son hipoclorito sódico al 1%, glutaraldehído al 2% y dodecilsulfato sódico al 0,25%.

En el caso de que se produzca cualquier incidencia o accidente se deberá informar de manera inmediata a la Comisión Nacional de Bioseguridad.

CONCLUSIÓN: Se considera que en el estado actual de conocimientos y con las medidas de uso propuestas, este ensayo clínico no supone un riesgo significativo para la salud humana, la salud animal y/o el medio ambiente.

La CNB considera que ya que solo van a participar 4 pacientes en España y se incluyen en la notificación seis centros hospitalarios, el notificador deberá informar sobre los centros en los que finalmente se va a realizar en ensayo clínico.

Una vez concluido el ensayo, se remitirá un informe de resultados de los mismos al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG) y a la Comisión Nacional de Bioseguridad. En este informe se deberá incluir información sobre las posibles incidencias, si las hubiera. La remisión de esta



información será condición indispensable para la concesión de futuras autorizaciones de ensayos con organismos modificados genéticamente.

Madrid a 31 de mayo de 2018