



## EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE ADENOVIRUS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/18/10)

### **Título del ensayo**

Ensayo clínico en fase I con el adenovirus oncolítico DNX-2440 en pacientes con Glioblastoma recurrente de la Clínica Universidad de Navarra.

### **Características del ensayo**

#### **Administración y seguimiento**

El ensayo clínico se realiza en la clínica Universitaria de Navarra

La administración se realizará mediante inyección intratumoral, en el tumor cerebral, de pacientes con glioblastoma que ha reaparecido después del tratamiento estándar. Se prevé reclutar y tratar 24 pacientes. El OMG se inyectará una sola vez en cada uno de los pacientes reclutados en el ensayo, dentro de un quirófano, en la misma intervención en la que se biopsia el tumor para comprobar que es una recidiva. Se realizará una escalada de dosis, basada en cohortes de 3 pacientes, empezando por una dosis de  $4 \times 10^9$  partículas virales en 1mL, subiendo si la toxicidad lo permite, a la dosis objetivo de  $4 \times 10^{10}$  pv en 1mL, y bajando si fuera necesario a  $4 \times 10^8$  pv en 1mL.

El paciente al que se le administra el agente será seguido estrechamente dentro del protocolo del ensayo clínico, hasta 12 semanas después de la administración. A partir de las 12 semanas se mantendrá un seguimiento menos frecuente, hasta el fallecimiento del paciente o hasta 24 meses. En los ensayos realizados en otros centros con el mismo OMG se ha visto que la liberación del virus es mínima y que no ha tenido ninguna repercusión sobre el medio ambiente. Por lo tanto, durante el seguimiento no se analizará la presencia del OMG en fluidos corporales de los pacientes.

### **Organismo receptor**

Los adenovirus HAd5 (adenovirus humano salvaje del serotipo 5) no se encuentra en ecosistemas naturales ya que necesita células humanas para reproducirse. La especificidad del HAd5 hace que replique solo en células de humanos y muy pocas especies más. Se ha descrito que otras especies son semi-permisivas para el agente, como las ratas aldoneras (*Sigmodon hispidus*), los cerdos (*Sus scrofa*), los chimpancés (*Pan troglodytes*) y algunos tipos de hámster (*Mesocricetus auratus*), pero no se ha detectado la presencia del adenovirus humano serotipo 5 de forma natural en estas especies. Aproximadamente el 70% de la población humana es seropositiva para el adenovirus, indicando exposición al mismo, y se encuentra ampliamente distribuida por toda la población.

La vía común de transmisión del HAd5 es mediante inhalación o contacto con los ojos de aerosoles producidos por tos o estornudos de las personas afectadas. Bajo estas condiciones de humedad la transmisión es eficaz. También es posible la transmisión de adenovirus por la ruta oro-fecal pero esta vía de transmisión requiere contacto íntimo y es muy inusual. La infección por contacto casual tras la administración entérica es improbable incluso con adenovirus plenamente virulentos. Aparte de humanos y chimpancés, no es posible la infección en otros huéspedes.



## **Organismo Modificado Genéticamente**

El OMG, DNX-2440 (Delta 24-EGDOX) es un adenovirus oncolítico derivado del HAd5, que ha sido diseñado para la administración intracerebral en tumores cerebrales. Las modificaciones introducidas son:

-Delección de 24 pares de bases (pb) en la región constante 2 (CR2) del gen E1A. Los virus portadores de esta delección pueden replicarse de forma eficaz en las células cancerosas, pero se ven atenuados en las células normales que no se dividen.

-Inserción en el HI loop de la fibra del serotipo 5 de una secuencia de 27 pb que codifica el péptido RGD-4C. Esta modificación afecta a la infectividad del virus, hace que presente afinidad por células que expresan integrinas alfa 5. Esta modificación se introdujo porque las células de glioblastoma con frecuencia expresan altos niveles de integrinas, mientras que las células cerebrales sanas, no las expresan. Teóricamente la modificación de la fibra podría hacer que el virus fuera capaz de infectar a células del organismo que normalmente no infecta la variante salvaje, sin embargo, la modificación de la proteína E1A hace que solo replique en células tumorales.

-Inserción de la secuencia para la síntesis del OX40 ligando humano u hOX40L. Se trata de una proteína inmunomoduladora, que aumenta la capacidad del virus de producir una respuesta inmune dirigida contra las células tumorales que han sido infectadas.

## **Identificación de riesgos potenciales**

### **-Estabilidad**

Los adenovirus son agentes estables, hay datos epidemiológicos sobre la existencia de HAd5 en la población que muestran que no se ha producido cambios en su estructura genómica durante más de 40 años. En cultivos mantenidos en laboratorio, incluyendo co-cultivo forzado con otros serotipos tampoco se han observado cambios genómicos.

Se ha descrito la recombinación entre adenovirus de los subgrupos B1 y E en pacientes inmunodeprimidos, pero no recombinación con adenovirus del subgrupo C al que pertenece HAd5.

Los adenovirus genéticamente modificados son genéticamente estables siempre y cuando el tamaño de su genoma no exceda el 105% del tamaño del genoma del adenovirus salvaje, como ocurre en este caso, cuyo genoma es menos del 101%.

Durante el proceso de fabricación de DNX-2440 se realizó la secuenciación completa del genoma y el estudio de la estabilidad de las modificaciones, tanto en el master viral bank como en el producto final. No se detectó ADN del tipo salvaje en el master viral bank ni en el producto final en 3 muestras analizadas.

### **-Patogenicidad.**

El adenovirus humano tipo 5 está clasificado como nivel de bioseguridad de clase 2. HAd5 puede causar una serie de enfermedades clínicas, la mayoría de las cuales se presentan en niños menores de 5 años. Las infecciones por adenovirus son de naturaleza leve, mayoritariamente asintomáticas y sólo el 45% de las infecciones se manifiestan como enfermedad del sistema respiratorio, enfermedad febril de la infancia, enfermedad del tipo de la tos ferina y hepatitis.

DNX-2440 está atenuado en comparación con el Ad5 de tipo salvaje en cuanto a la virulencia y la patogenicidad debido a la replicación deficiente en células normales que no se dividen. Es posible que pueda transmitirse a receptores humanos no diana. Sin embargo, en caso de transmisión no



intencionada, no se espera un aumento de los efectos directos que podrían producir respuestas inmediatas como la inflamación.

En caso de fuga del virus modificado genéticamente al torrente sanguíneo, sería rápidamente eliminado de la sangre por las células de Kupffer, y la presencia de anticuerpos neutralizantes antiadenovirus.

Además, si algunas partículas virales escapasen de estas "barreras" iniciales, en teoría, cualquier célula normal podría ser infectada si expresa receptores para ello. Sin embargo, la selectividad de DNX-2401 impediría la infección productiva en los órganos no diana (células no tumorales).

### **-Transferencia génica**

El Adenovirus Ad5 es específico de la especie humana. No se han observado variantes recombinantes entre el Ad5 y otros serotipos. Como se ha descrito la estabilidad genética y la limitación a humanos hacen que no sea esperable su recombinación con otros agentes. Teóricamente, el OMG podría recombinar con el adenovirus salvaje en un receptor humano infectado por ambos, esto no se ha observado. Parece muy improbable por la incapacidad del OMG de replicar fuera de células tumorales. Si llegara a ocurrir, se podría generar un OMG derivado. Las tres características introducidas en el virus lo hacen en todo caso menos patógeno para las células normales. Si se recombinaran, podría regenerarse el agente salvaje, pero no más patógeno. Si recuperara la capacidad de replicación en células normales, manteniendo la modificación de la fibra, eso no lo hace más infeccioso, ya que la fibra del agente es ya altamente eficaz para infectar las células de las vías respiratorias altas, con las que entra en contacto. Teóricamente podría ser capaz de infectar más células normales con expresión de altos niveles de integrinas, en el modelo animal de ratas algodóneras no se ha observado alteración de la biodistribución.

### **-Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación**

Los adenovirus pierden su bioactividad rápidamente a temperatura ambiente. El HAd5 es sensible a hipoclorito de sodio al 1%, al glutaraldehído 2% y dodecilsulfato sódico (SDS) al 0,25%. Es sensible al calor (>56°C). La mejor vía de inactivación del HAd5 es mediante autoclave a 121°C durante 15 minutos; los desinfectantes convencionales (lejía, jabón o similar) también son efectivos contra el HAd5 si están en contacto durante 20-30 minutos. En congelación el virus se puede mantener durante años.

En el OMG la capacidad de reproducción está reducida en comparación con la del HAd5, debida a la modificación Delta24 de la región E1A. El OMG es incapaz de inducir a la célula huésped a sobrepasar el punto de control G2/M y solo se puede replicar en las células con una alteración en la vía pRb. Un defecto en la vía pRb es un marcador tumoral y no se han descrito alteraciones de dicha vía en células sanas. Por lo tanto, el OMG muestra una capacidad de replicación fuertemente reducida en las células quiescentes humanas en comparación con el adenovirus salvaje tipo 5.

El OMG será administrado mediante inyección directa en el tumor cerebral. El principal proceso fisiológico que se espera que ocurra es la replicación viral que conducirá a la lisis y por tanto a la destrucción de las células tumorales, además de potenciar la respuesta inmune contra el tumor en el microambiente local. Las células normales del cerebro son postmitóticas. Debido a su atenuada replicación en células no tumorales, el OMG se espera que sea menos patógeno en esta localización que el adenovirus salvaje. Aun así, es posible que el virus pase al líquido cefalorraquídeo desde el parénquima cerebral en el que inyecta y/o a la sangre. La probabilidad de que esto ocurra es desconocida. En el peor escenario posible el OMG en el torrente circulatorio sería capturado y



destruido por las células de Kupffer en el hígado, como ocurre con el HAd5. El OMG podría tener capacidad para infectar células que habitualmente no son infectadas por el HAd5, aunque esto ocurriera, el OMG tendría una capacidad muy limitada para replicarse en células no tumorales.

El potencial para la eliminación de DNX-2401, similar al DNX2440, se ha evaluado en más de 1.000 muestras de sujetos con glioma maligno recurrente después de la inyección en tumores cerebrales de hasta  $5 \times 10^{10}$  partículas de virus (vp) de DNX-2401, en dos ensayos clínicos diferentes. La mayoría de las muestras dieron negativo en ambos ensayos clínicos. Un número limitado de muestras mostró algún ADN viral detectable ( $\geq 5$  copias de ADN de Ad5). No se han asociado problemas de seguridad con el virus detectado.

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

En caso de que se produjera una transmisión del agente, se esperaría que no replicara en células sanas, en cuyo caso no produciría infección. Si replicara, las características introducidas no harían que produjeran infecciones más severas que las producidas por la variante salvaje. La variante salvaje, produce habitualmente infecciones autolimitadas y asintomáticas. El hecho de que sea capaz de producir OX40L quiere decir que tiene más capacidad de generar respuesta inmune, localmente. OX40L actúa potenciando una respuesta inmune contra la célula que lo expresa, pero no se disemina, ni actúa a distancia.

Teniendo en cuenta las propiedades inherentes de DNX-2440 (la selectividad intrínseca por las células tumorales humanas conferida por sus modificaciones genéticas, su estabilidad genética y las condiciones de liberación propuestas), se puede concluir que la probabilidad de que DNX-2440 establezca infecciones productivas en seres humanos sanos es escasa. En consecuencia, no se espera ningún impacto en la salud humana, como resultado de las interacciones de DNX-2440 y las personas que están involucradas en la manipulación y administración.

Teniendo en cuenta que la transmisión de DNX-2440 de los pacientes con cáncer a los animales es muy poco probable y que no hay reservorios animales naturales para DNX-2440 (la especificidad de DNX-2440, como de HAd5, se limita a los seres humanos), no se prevén efectos sobre otros organismos no diana.

### **-Manipulación, control y tratamiento de residuos**

Los viales que contienen el virus DNX2440 se entregarán en el departamento de farmacia de la Clínica Universitaria para uso clínico, debidamente sellados y etiquetados. Dichos viales se almacenarán y conservarán en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  en un área de acceso restringido (a personal de farmacia exclusivamente). El acceso y manipulación del virus antes de su administración estará bajo la responsabilidad del farmacéutico. La dosis se cargará en una jeringa de 5 ml bajo condiciones asépticas (cabina de seguridad: Clase II, tipo B).

El farmacéutico entregará la medicación al investigador principal/co-investigador en un contenedor hermético cerrado y etiquetado con la información relevante como el código del producto, "contiene un organismo genéticamente modificado (OMG)" y "producto de riesgo biológico". El departamento de farmacología y el quirófano están en la misma planta y conectados directamente, por lo que el riesgo durante el transporte es mínimo.

El personal presente en el quirófano llevará bata desechable, guantes, gafas de seguridad, mascarilla. Antes de empezar el tratamiento con DNX2440 se colocarán en la puerta del quirófano un letrero visible advirtiendo del tratamiento, las restricciones y los posibles riesgos, y se colocarán dentro del quirófano los contenedores de residuos biopeligrosos de tipo III.



Todos los materiales que hayan estado en contacto directo con el OMG, (restos de viales, agujas, guantes, etc.) deberán ser colocados dentro del contenedor para residuos sanitarios del grupo III. Los residuos de tipo III se identifican oportunamente y son procesados y eliminados por una empresa especializada, según el protocolo vigente actualmente en el centro para este tipo de residuos.

Tras la administración del OMG, todo el equipo y las superficies de trabajo que potencialmente pudieran entrar en contacto con el agente serán desinfectados con Limoseptic®, desinfectante que contiene Glutaraldehído al 2,5%, al cual es muy sensible el adenovirus y Desinfect®, hipoclorito sódico 5%, al cual también es sensible. Para el resto del quirófano se seguirá el protocolo de "limpieza final" vigente en los quirófanos del centro, que incluye, Limoseptic® y Desinfect®.

La vía común de transmisión del HAd5 es mediante inhalación o contacto con los ojos de aerosoles producidos por tos o estornudos de las personas afectadas. Bajo estas condiciones de humedad la transmisión es eficaz. También es posible la transmisión de adenovirus por la ruta oro-fecal pero esta vía de transmisión requiere contacto íntimo in es muy inusual. La infección tras contacto casual tras la administración entérica es improbable incluso con adenovirus plenamente virulentos.

Teniendo en cuenta los resultados de la biodistribución en otros ensayos clínicos con un OMG similar, no se va a hacer biodistribución en este ensayo. Como medida de seguridad se comunicará a los pacientes, a través de la "Hoja de información al paciente" las medidas de higiene a adoptar tras el alta médica. Estas medidas incluyen el lavado de manos frecuente y especialmente evitar contacto con población vulnerable, personas inmunodeprimidas, ancianos, niños y mujeres embarazadas. Para ello se evitará acudir a lugares con elevada concentración de personas, como centros comerciales o utilizar medios transporte públicos. Evitar el embarazo, el médico del estudio comentará con usted las medidas anticonceptivas apropiadas que no interfieran con el estudio. Además se recomienda añadir lejía al sanitario tras su utilización durante los 7 días siguientes a la administración del virus.

**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.

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 12 de julio de 2018