



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE VIRUS ADENO-ASOCIADOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/18/12)

Título del ensayo clínico

Estudio de fase 3, sin enmascaramiento, con un único grupo, en el que se evalúan la eficacia y la seguridad de BMN 270 (transferencia génica del factor VIII humano mediante un vector vírico adenoasociado) en una dosis de 4^{13} vg/kg en pacientes con hemofilia A y concentración residual del FVIII ≤ 1 UI/dl, que reciben infusiones profilácticas de FVIII (número de protocolo: 270-302), de la empresa Bio Marin Pharmaceutical Inc.

Organismo Modificado Genéticamente

BMN 270, VAA5-hFVIII-SQ, es un vector recombinante, incapaz de replicarse, derivado del virus adeno-asociado de serotipo 5 (VAA5), que contiene la secuencia génica con optimización de codones que codifica el FVIII sin el dominio B, reemplazado por una secuencia conectora "SQ" de 14 aminoácidos, procedente de la secuencia normal del dominio B, bajo un promotor híbrido específico de hígado y una señal de poliadenilación sintética, flanqueado por las ITR de VAA 2.

El VAA5-hFVIII-SQ se obtiene mediante la coinfección de células Sf9 con dos baculovirus recombinantes (BVR) que contienen las secuencias génicas que codifican el hFVIII y *rep/cap*.

El proceso de producción del VAA5-hFVIII-SQ tras la coinfección consiste en el cultivo, la obtención y la purificación de los lotes de células. Posteriormente se sigue un proceso de purificación riguroso para producir el principio activo a granel, que incluye una etapa de tratamiento con detergente como primer paso para la eliminación del baculovirus, una etapa de cromatografía por afinidad y una etapa de congelación/descongelación. El proceso se ha diseñado y estudiado para el aclaramiento del virus, de conformidad con la directriz Q5A del ICH sobre seguridad vírica. A lo largo del proceso de fabricación se evalúa la presencia de ADN del baculovirus.

Entre los análisis del producto terminado que se realizan se incluye un ensayo de amplificación para detectar VAA con capacidad de replicación.

Características del ensayo

Administración y seguimiento

En el ensayo está previsto que participen 10 pacientes en España cada uno de los cuales recibirá una dosis única de BMN 270 de 4^{13} vg/kg.

Los hospitales que van a participar en el ensayo son:

- Hospital Teresa Herrera, Departamento de Hematología y Hemoterapia, Unidad de Hemostasia y Trombosis.
- Hospital Universitario La Paz, Departamento de Hematología, Unidad de Hemostasia.
- Hospital Universitario Virgen del Rocío (HUVR), Hematología pediátrica.

La administración se realizará mediante bomba de jeringa eléctrica a través de un filtro en línea de 0,22 micrones, con baja afinidad por proteínas.



Los pacientes permanecerán en el centro durante al menos 8 horas para identificar cualquier toxicidad inmediata del procedimiento.

Los pacientes se someterán a seguimiento a largo plazo. Se analizará la presencia del OMG en sangre, semen, saliva, orina y heces, cada cuatro semanas (durante el segundo año) y cada 6 semanas (del tercer al quinto año posterior a la dosis). Los análisis continuarán al menos hasta que se obtengan 3 resultados negativos consecutivos. El análisis del semen se continuará realizando al menos hasta la semana 12, aun cuando se obtengan 3 resultados negativos consecutivos en este análisis antes.

Identificación y evaluación 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 base a estas características del AAV natural, también cabe esperar que VAA5-hFVIII-SQ sea genéticamente muy estable.

-Capacidad de transferencia génica debido a la formación de partículas competentes para la replicación.

El VAA5-hFVIII-SQ no puede replicarse de forma independiente, aun en la presencia de un virus cooperador, dado que no incluye los genes *rep* y *cap* necesarios para el rescate/empaquetamiento. La recombinación genómica homóloga puede ocurrir de forma espontánea en la naturaleza entre los genomas virales de cepas de AAV solo cuando una célula del organismo hospedador es infectada de manera simultánea por dos cepas diferentes de AAV y un virus colaborador para el que dicha especie es permisiva (triple infección). Dicha recombinación solo podría originar el intercambio del casete de expresión del hFVIII-SQ con los genes *rep* y *cap* del virus parental. No es posible que el genoma de AAV contenga los genes *rep/cap* y el transgén, ya que está más allá del límite de empaquetamiento del virión.

Los ensayos del fármaco incluyen un ensayo de amplificación infecciosa para detectar VAA con capacidad de replicación.

-Riesgo de transferencia genética

El VAA5-hFVIII-SQ es un virus derivado del virus VAA5, incapaz de replicarse. Las modificaciones genéticas no afectan su tropismo por el huésped ni el tropismo tisular naturales. No se prevé que se produzca transferencia de material genético entre el OMG y otros organismos.

Por tanto, la transferencia de material genético se limita, teóricamente, al intercambio genético de ADN mediante recombinación homóloga con el VAA natural, lo que solo podría producirse si las células humanas se infectaran simultáneamente con el VAA natural y el VAA5-hFVIII-SQ, en presencia de un virus cooperador.

Se espera que esta situación se dé en raras ocasiones y, de producirse, únicamente provocaría la producción de más cantidad del VAA natural y más partículas del vector VAA5-hFVIII-SQ (que tampoco presentarían los genes *rep* and *cap* y, por lo tanto, no serían autosuficientes).

Dado que el gen FVIII es humano, existe homología con el gen endógeno y las variantes relacionadas, lo que podría dar lugar a mutagénesis por inserción. Las células afectadas (hepáticas) no se replican



de forma considerable, y cualquier riesgo teórico de recombinación entre el vector y el gen del VAA5-FVIII se limitaría a las células en división, si se consideran los mecanismos aceptados de recombinación homóloga durante la replicación del ADN. El riesgo real de inserción del vector en un gen de cualquier célula es varios órdenes de magnitud inferior a la tasa de mutación espontánea en los genes humanos.

-Genotoxicidad

A una multiplicidad de infección alta, el VAA natural se integra en el cromosoma 19 humano en el ~ 60% de las líneas celulares infectadas de forma latente. Sin embargo, se ha demostrado que solo aproximadamente 1 de cada 1.000 unidades infecciosas puede integrarse. Para que se produzca esta integración específica se precisan las proteínas Rep del VAA, que no se incluyen en el VAA5-hFVIII-SQ.

En líneas celulares establecidas se ha demostrado la integración aleatoria de secuencias de vectores, aunque solo en algunos casos y con una frecuencia baja en cultivos primarios e *in vivo*. En tejido muscular se ha demostrado que, 80 días después de la infección, aún existen intermediarios circulares con una configuración cabeza-cola, lo que sugiere que un gran porcentaje de los genomas del virus adeno-asociado recombinante (VAAr) se mantiene en forma episomal. También se ha demostrado que, tras la transducción hepática el VAAr se estabiliza predominantemente en una forma no integrada; sin embargo, se observa un grado bajo de integración.

-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 VAA son resistentes a un amplio intervalo de pH (pH 3-9) y soportan temperaturas elevadas (55 °C durante 1 hora). El VAA natural puede difundirse a través de aerosoles. Sin embargo, dada la naturaleza dependiente para su replicación de los vectores de VAA recombinantes, estas partículas, aunque estables, no se multiplican en el medio ambiente, ni siquiera en el interior de la célula huésped.

No se espera que las modificaciones genéticas del VAA5-hFVIII-SQ respecto al VAA5 silvestre afecten su sensibilidad frente a la inactivación física y química.

El VAA5-hFVIII-SQ PI se destruye con la solución SPRINT H-100 / Quacide Pq60 y productos de limpieza o desinfectantes para manos eficaces frente a virus sin envoltura. También puede destruirse con un pH alto, luz ultravioleta, radiación ionizante o mediante incineración.

En el estudio en curso con BMN 270 se ha detectado ADN del VAA5-hFVIII-SQ en la sangre, el semen, la saliva, la orina y las heces de los pacientes. La concentración máxima se alcanzó en el transcurso de las 4 semanas posteriores a la infusión. En general, en todos los líquidos corporales se observaron cantidades decrecientes de ADN residual del vector a lo largo del estudio. El último punto temporal posterior a la administración en el que se detectó el ADN del vector en la sangre fue la semana 78. El líquido corporal en el que el aclaramiento fue más rápido fue la orina.

De acuerdo con la concentración de ADN detectado en el semen de los pacientes el riesgo de transmisión horizontal es insignificante.

Si se considera la vía de administración del producto (intravenosa) y el bajo grado (transitorio) de excreción previsto, el riesgo de que otras personas, la flora o la fauna se vean expuestos de forma involuntaria al VAA5-hFVIII-SQ es mínimo. El número de genomas del vector presentes en los líquidos corporales es bajo y aparentemente casi todos están incluidos en células, no como partículas



vectoriales libres, lo que hace que la transmisión horizontal de los genomas infecciosos a otros sea aún menos probable. Por otra parte el vector VAA5-hFVIII-SQ se ha modificado de tal manera que no puede infectar ni replicarse o sobrevivir fuera del ser humano.

Se realiza el seguimiento de la excreción del vector en la sangre, la saliva, las heces, el semen y la orina para detectar específicamente ADN del vector. Se considera que el paciente presenta aclaramiento en el líquido de un espacio si obtiene resultados negativos en 3 muestras consecutivas.

Los pacientes incluidos en el estudio recibirán formación sobre cómo tratar las excreciones que puedan contener el OMG, en particular la orina y las heces. Para este fin, el paciente verterá por las paredes del inodoro al menos 100 ml de lejía doméstica comercial que contenga al menos un 4 % de hipoclorito de sodio (40 g/l, 40 000 ppm) cada vez que orine o haga una deposición, antes de tirar de la cadena. Este tratamiento continuará hasta que los controles de la presencia del vector así lo recomienden (3 muestras consecutivas negativas). Igualmente, los pacientes masculinos se abstendrán de mantener relaciones sexuales, dado que el OMG puede estar presente en el semen.

-Patogenicidad.

El VAA5 no es patógeno y no se espera que el VAA5/FVIII lo sea, dado que no contiene genoma vírico (los genes *rep* y *cap* se han eliminado y reemplazado por el hFVIII-SQ), no puede replicarse y el transgén humano hFVIII que se expresa es de naturaleza benigna.

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

Dado que VAA5-hFVIII-SQ carece de capacidad de replicación, las partículas virales diseminadas no pueden multiplicarse y, por consiguiente, su dispersión se encuentra limitada de manera inherente. Además, una exposición mínima, como la exposición ambiental, de personas distintas de los sujetos que reciban VAA5-hFVIII-SQ como parte del ensayo, 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 del paciente en saliva, orina, heces y semen sea baja.

En caso de transferencia involuntaria del vector a un receptor humano, se espera que los riesgos se reduzcan considerablemente, ya que el vector no puede replicarse y el orden de magnitud de la “dosis” que posiblemente se transfiera (por ejemplo, en forma de aerosol, salpicaduras o fómites) será inferior al de la dosis que reciban los pacientes.

No se prevé que se produzca transferencia de material genético entre el OMG y otros organismos.

-Manipulación, control y tratamiento de residuos

El promotor proporcionará formación al personal que participe en el ensayo clínico, tanto sobre la manipulación del producto como sobre las cuestiones relacionadas con la farmacia, de conformidad con el manual de farmacia. Disponen, además de instrucciones para hospitales españoles relativas a la manipulación de OMG y eliminación de residuos.

El producto en investigación se conservará en instalaciones seguras de la farmacia de los centros. Se conservará en una caja cerrada, dentro de un congelador con una temperatura máxima de -65 °C, situado en una estancia cerrada y con acceso restringido. Únicamente el personal que participe en el estudio podrá abrir la caja, que se identificará con el código del estudio y se mantendrá separada del resto de medicamentos.

En todos los centros, la preparación de la dosis deberá realizarse en una cabina de bioseguridad de tipo IIA.



El PEI se transportará de forma segura desde su lugar de almacenamiento hasta la farmacia, donde se preparará, y de ahí a la estancia del departamento de hematología en la que lo administrará personal del estudio con la debida formación. El transporte se realizará en un recipiente cerrado y hermético para el transporte interno de material biológico, adecuado para este fin (puede utilizarse un contenedor secundario aprobado para el transporte de sustancias infecciosas de categoría B).

Todos los materiales desechables (entre otros, guantes, mascarillas, jeringas, agujas, catéteres y tubos) que entren en contacto con el producto en investigación se eliminarán como materiales de riesgo biológico (residuos sanitarios o biosanitarios de clase III, de conformidad con la normativa sobre gestión de los residuos sanitarios). Estos materiales se recogerán en las estancias donde se administren las infusiones o en los laboratorios de preparación, y se eliminarán en contenedores aprobados para residuos biológicos (sanitarios / biosanitarios). El producto en investigación que no se haya utilizado y los viales, tapones y precintos se eliminarán en un contenedor de residuos biológicos aprobado, como material de riesgo biológico (residuos sanitarios o biosanitarios de clase III). Los materiales, equipos y superficies no desechables se descontaminarán pulverizando desinfectantes de amplio espectro y actividad probada contra virus sin envoltura. Se pueden utilizar soluciones tales como SPRINT H-100 (compuesto clorado) o Quacide Pq60 (amonio cuaternario).

Tras la administración del OMG, este puede estar presente en las excreciones del paciente durante un período de tiempo limitado. Por ello, los pacientes incluidos en el estudio recibirán formación sobre cómo tratar las excreciones que puedan contener el OMG, en particular la orina y las heces. Para este fin, el paciente verterá por las paredes del inodoro al menos media taza de hipoclorito sódico (lejía desinfectante) cada vez que orine o haga una deposición, antes de tirar de la cadena. El paciente se lavará las manos con jabón después de utilizar el baño. Este tratamiento continuará hasta que los controles de la presencia del vector así lo recomienden.

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 10 de diciembre de 2018