



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE VIRUS ADENOASOCIADOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/17/16)

Título del ensayo

Estudio de fase I/II internacional, abierto y multicéntrico de seguridad y aumento de dosis de BAX888, un vector de virus adenoasociado de serotipo 8 (VAA8) que expresa un factor VIII con el dominio B eliminado (B-Domain Deleted Factor VIII, BDD-FVIII) en sujetos con hemofilia A grave administrado como infusión única por vía intravenosa de la empresa BAXALTA INNOVATIONS GmbH.

Características del ensayo

El ensayo se llevará a cabo en el Hospital Universitario La Paz, Hospital Universitario de Málaga y Hospital Regional Universitario de Málaga.

La duración del estudio es de aproximadamente 5 años, con una extensión de hasta 2 años.

La administración se realiza por vía intravenosa. A los sujetos se les administrará una cantidad máxima de $8,0 \times 10^{12}$ partículas de cápside (cp) por kg del peso corporal del paciente (cohorte 1: $2,0 \times 10^{12}$ cp/kg y cohorte 2: $8,0 \times 10^{12}$ cp/kg). En este estudio participarán 6 sujetos.

Se observará a los sujetos durante las primeras 8 horas después de la infusión de BAX 888 (y hasta 24 horas a criterio del investigador) y durante la visita del día 1 y posteriormente semanalmente desde la semana 1 a la 3, semanas 4 a 14 (dos veces por semana, con visita clínica y visita de laboratorio independientes cada semana), semana 15 y los meses 4, 5, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 28, 32 y 36. A largo plazo, se continuará con el seguimiento de los sujetos cada 4 meses durante los años 2 y 3. Posteriormente, se planea que los sujetos pasen a un estudio de extensión durante otros 2 años. Se analizará presencia de anticuerpos a la proteína FVIII (de longitud completa y derivada de transgenes), anticuerpos de unión y neutralización frente al VAA8 y VAA2, y la respuesta inmunitaria celular frente a los productos transgénicos del VAA8 y FVIII.

La diseminación de vectores de BAX 888 se evaluará en el ensayo clínico. Se obtendrán sangre y secreciones corporales para evaluar los genomas de BAX 888 hasta que 2 mediciones consecutivas sean negativas.

Se comprobará por primera vez en la visita de selección para conseguir el valor inicial. Tras recibir BAX 888, las muestras se recogerán en las siguientes visitas hasta que se produzcan 2 resultados negativos: día 1, luego cada semana en las visitas clínicas entre las semanas 1 y 15 y posteriormente en los meses 4, 5, 6, 9 y 12.

Características del OMG

BAX 888 (AAV8.BDD-FVIIIopt) está diseñado como un vector híbrido de los serotipos 2 y 8 del VAA. Contiene el ADNc del gen *FVIII* de coagulación humana con el dominio B eliminado (BDD) (BDD-FVIII). Las únicas secuencias genómicas del virus procedentes del VAA de tipo salvaje son las secuencias ITR que flanquean el genoma derivadas de VAA2 que constan de 145 bases cada una. BAX 888 tiene una cápside de VAA sin modificar compuesta de proteínas pertenecientes al VAA de serotipo 8 (VAA8).



BAX 888 se obtienen mediante transfección de tres plásmidos diferentes en células HEK293: i) el plásmido vector que codifica para el factor FVIII, ii) el plásmido auxiliar que lleva genes auxiliares adenovirales y iii) el plásmido de ensamblaje VAA 8, que suministra los genes *rep* y *cap*.

Identificación de riesgos potenciales

-Capacidad de transferencia génica debido a la formación de lentivirus competentes para la replicación (LCR)

BAX 888 es un virus basado en un virus VAA en el que el genoma vírico se sustituye por el casete de expresión del transgén. Los únicos elementos del virus que se mantienen son las secuencias de ITR que flanquean el transgén. El virión es incapaz de replicarse y proliferar.

El único material que podría ser capaz de replicarse son las partículas competentes para la replicación del VAA (VAAcr) que podrían estar presentes como una impureza en la formulación final de BAX 888. Las partículas del VAAcr se generan durante este proceso mediante episodios de recombinación no homóloga entre las ITR de VAA2 presentes en el plásmido vector y las secuencias de *rep* de VAA2 y *cap* de VAA8 presentes en el plásmido de ensamblaje. Aunque el método de producción se ha optimizado para reducir la contaminación con partículas del VAAcr, podrían formarse aún durante la fabricación del vector y no pueden eliminarse durante las etapas posteriores debido a la similitud de la estructura y tamaño con el vector.

En el procedimiento de fabricación de BAX 888 la frecuencia de episodios de recombinación accidental es muy baja porque el promotor p5, que normalmente dirige la expresión de *rep*, presente en el plásmido de ensamblaje, se ha traslocado desde el extremo 5' del gen *rep* al extremo 3' del gen *cap*. Esta disposición contribuye a una reducción de episodios de recombinación no homóloga. No obstante, pueden formarse todavía partículas del VAAcr durante el proceso de fabricación de BAX 888 a una frecuencia muy baja.

Dado que las partículas del VAAcr se parecen al VAA de tipo salvaje y las partículas del VAAcr son capaces de replicarse en presencia de un virus auxiliar, la contaminación de BAX 888 con virus VAAcr podría tener posibles efectos si un individuo expuesto está coinfectado con un virus auxiliar.

En la literatura no hay datos que describan efectos adversos derivados del restablecimiento de las funciones replicativas de las partículas de VAAcr contaminantes en pacientes tratados con productos de terapia génica mediada por VAA. Solo existen especulaciones sobre los posibles efectos adversos que pueden tener estas partículas víricas que podrían ser un aumento en la probabilidad de respuesta inmunitaria celular a las proteínas de la cápside del VAA, toxicidad para las células hepáticas y otras células para las que el vector tiene tropismo y un aumento de la integración inespecífica.

Debido a la similitud del VAAcr y el VAA de tipo salvaje, y dado que no se sabe que el VAA de tipo salvaje sea patógeno, no se prevén efectos adversos en caso de que se restablezcan las funciones replicativas, incluso si un sujeto expuesto se coinfectase con un virus auxiliar.

-Riesgo de transferencia genética

Teóricamente, las secuencias génicas modificadas podrían transferirse al medio ambiente mediante diseminación. Sin embargo, la diseminación de estas secuencias en el entorno está fuertemente dificultada porque las partículas del vector AAV8.BDD-FVIIIopt no son competentes para la replicación debido a la delección de las secuencias génicas estructurales del VAA. 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 AAV8.BDD-FVIIIopt no generan una ventaja selectiva, por lo que no tendrían un efecto adverso sobre la población o la diversidad genética del medio ambiente receptor.

-Patogenicidad

AAV8.BDD-FVIIIopt es un parvovirus de ADN de cadena sencilla, deficiente para la replicación, que se considera como un virus que no se integra, debido a la ausencia de proteínas *rep* que se requieren para la integración específica en el cromosoma 9. Sin embargo, varios estudios sugieren que cantidades residuales del VAA se integran en el genoma del huésped con una frecuencia de aproximadamente 0,1-1 % respecto a los episodios de infección. Se observa una frecuencia de inserción similar con los vectores derivados de VAA utilizados en la terapia génica. Mientras que la gran mayoría de los genomas del vector VAA se mantienen como episomas circulares, está claro que existe un pequeño porcentaje (<0,5 %) que se integra en el ADN del huésped. En un estudio de hepatectomía parcial, se determinó una tasa de integración comprendida entre 0,06 y 0,2 genomas del vector/célula.

Cualquier integración de ácidos nucleicos en el genoma conlleva cierto riesgo de mutagénesis por inserción. La mayoría de los datos experimentales demuestran que los vectores derivados de VAA son seguros a este respecto, ya que se integran predominantemente en lugares no homólogos. No hay ninguna evidencia en la literatura científica que relacione la administración de vectores derivados de VAA con el carcinoma hepatocelular o con puntos calientes de integración en un contexto clínico. Además, no se encontraron indicios de efectos secundarios potenciales de BAX 888 en ratones, incluidos el crecimiento clonal o integraciones preferentes en oncogenes implicados en el desarrollo del carcinoma hepatocelular.

-Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación

Teóricamente, es posible una recombinación no homóloga entre BAX 888 y VAA de tipo salvaje si ambas están presentes en la misma célula. Dicha recombinación solo podría dar lugar al intercambio del ADNc del FVIII presente en el vector BAX 888 con los genes *rep* y *cap* del virus de tipo salvaje, puesto que no es posible que el genoma del VAA contenga tanto los genes *rep/cap* como el transgén, ya que esto supera los límites de ensamblaje del virión. Además, no sería capaz de replicarse en ausencia de un virus auxiliar. Por lo tanto, se considera poco probable la formación de partículas del VAA competente para la replicación que contengan el transgén.

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

Las consecuencias de la transmisión de BAX 888 a un receptor no deseado no se consideran mayores que las que pueden preverse en pacientes que reciben el tratamiento, o por la infección con VAA de tipo salvaje.

Si un ser humano o no humano que recibe accidentalmente BAX 888, por ejemplo por un pinchazo con aguja, porta anticuerpos neutralizantes frente al VAA8 preexistentes, el sistema inmunitario probablemente eliminaría la mayor parte del vector. Una pequeña proporción del vector recibido podría aún ser capaz de transducirse a las células hepáticas. Dado que se espera que la eficiencia de la transducción sea menor que en una persona que no tiene anticuerpos detectables, se prevé que los efectos adversos sean menores.

En el caso de sujetos expuestos que no porten anticuerpos neutralizantes preexistentes, los posibles efectos adversos se espera que sean comparables a los efectos adversos en los pacientes, aunque hay



que tener en cuenta que la dosis recibida por un pinchazo es bastante menor a la que recibe el paciente.

La magnitud de estos posibles efectos adversos se considera baja, la probabilidad de que se produzcan estos efectos se considera despreciable.

-Manipulación, control y tratamiento de residuos

La estabilidad de los parvovirus frente al estrés físico-químico se considera alta. Los parvovirus son estables en presencia de disolventes de lípidos, tras la exposición a un pH de 3-9 o a incubación a 56 °C durante 60 minutos. En estado seco, la infectividad de las partículas de parvovirus se puede mantener durante varias semanas.

Los centros almacenarán el producto en el Servicio de Farmacia de cada hospital de acuerdo a lo establecido en el manual de farmacia del producto. Se asegurará que el acceso al producto se limite al personal autorizado del estudio.

El personal sanitario dará instrucciones (recogidas en el manual de farmacia) a los pacientes para que apliquen medidas higiénicas básicas como el lavado frecuente de manos durante el tiempo de diseminación para minimizar la liberación de BAX 888 en el medio ambiente y la exposición de los cuidadores, familiares y amigos. Además, a los pacientes también se les indica que utilicen métodos anticonceptivos físicos (advertencia recogida en el consentimiento informado), puesto que se espera que BAX 888 esté presente en el líquido seminal, y que eviten besar y utilizar los mismos vasos que otras personas, ya que se espera que BAX 888 esté también presente en saliva.

En cuanto a los residuos generados durante el ensayo, las jeringuillas y los sets de infusión usados se deben desechar tras el tratamiento para minimizar los riesgos de pinchazos accidentales con agujas y de infectar al personal que participa en el estudio.

La destrucción o la descontaminación del principio activo puede conseguirse en autoclave durante al menos 20 minutos a 121 °C o mediante inactivación química mediante el uso de hidróxido de sodio u otros desinfectantes altamente virucidas. Los procedimientos detallados de destrucción del principio activo se facilitan en el manual de farmacia de BAX 888.

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 18 de octubre de 2017