



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE VIRUS ADENOASOCIADOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/24/27)

Título del ensayo

Estudio abierto en dos partes de REGV131, un tratamiento de inserción de genes del factor IX de la coagulación basado en CRISPR/Cas9 en participantes con hemofilia B.

Características del ensayo

El medicamento en investigación consta de dos componentes REGV131 y LNP1265 que se formulan de forma independiente y se administran al paciente de forma sistemática y secuencial en infusiones intravenosas (i.v.) consecutivas únicas para el tratamiento de la hemofilia B. El modo de acción se basa en la inserción génica del gen del factor IX de coagulación humano (F9) utilizando una plataforma de edición génica selectiva basada en CRISPR-Cas9. La inserción génica del F9 en el ADN genómico en las células hepáticas tiene como objetivo restaurar la actividad del FIX funcional en plasma a niveles normales o próximos a los normales.

El ensayo se realizará en el Hospital Universitario Vall d'Hebron, el Hospital Universitario La Paz, el Hospital Universitari i Politecnic La Fe de Valencia, el Hospital Universitario Miguel Servet, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, y el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca.

Características del organismo modificado genéticamente

El OMG, REGV131, es un vector derivado del virus adenoasociado del serotipo 8, no replicativo, que muestra tropismo hepático. REGV131 se empaqueta con un molde de ADN que comprende un casete génico que contiene el gen F9 sin promotor, entre las repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV2.

REGV131 es uno de los dos componentes del medicamento; el otro componente es LNP1265, que es una suspensión líquida de nanopartículas lipídicas (LNP1265) que contiene un ARN guía (gRNA) y un ARN mensajero (ARNm) que codifica la proteína Cas9. El gRNA monocatenario se sintetiza químicamente y el mRNA se sintetiza mediante transcripción *in vitro*. LNP1265 no es un OMG.

En general, el tropismo de AAV está mediado por proteínas de la cápside de AAV. Aunque el mecanismo molecular preciso responsable del tropismo hepático de AAV8 no se ha definido claramente, se ha descrito que la transducción celular de AAV8 en las células hepáticas está medida por el receptor de laminina.

LNP1265 también se absorbe preferencialmente en los hepatocitos y, una vez en el interior de las células hepáticas, el ARNm de Cas9 se traduce en la proteína Cas9 para formar una endonucleasa Cas9 guiada por gRNA.

Una vez en el interior del núcleo, este complejo puede crear un DSB diana, que posteriormente permite que la secuencia de F9 introducido por REGV131 se inserte en el intrón 1 del locus ALB, que permite la transcripción bajo el control del promotor endógeno.



REGV131 se fabrica mediante transfección transitoria de células HEK 293, que alberga el gen del adenovirus E1A, con tres plásmidos; uno de ellos contiene el ADN de *F9* y el resto los genes necesarios para la formación de las partículas víricas.

El banco de células maestras (*master cell bank, MCB*) 293-F y el banco de células de trabajo (*working cell bank, WCB*) utilizados para la fabricación de REGV131 se analizaron para detectar diversos virus de acuerdo con la directriz ICH sobre la evaluación de la seguridad vírica de productos biotecnológicos derivados de líneas celulares de origen humano o animal (ICH Q5A).

No hay virus, partículas similares a virus, ni componentes derivados de animales presentes en la línea celular ni en los materiales para la fabricación de REGV131 conocidos.

El proceso de fabricación incluye pasos de inactivación/eliminación de virus; además, no se detectó ningún virus en ninguna etapa de la fabricación. Por lo tanto, es muy poco probable que se produzca una contaminación de la línea celular productora con virus que puedan servir como virus auxiliares para REGV131 o que se introduzca cualquier virus durante la fabricación, que pueda recombinarse con el genoma del vector o complementar la función de los genes virales eliminados de REGV131.

REGV131 se fabrica utilizando una línea celular productora comercial derivada de la línea celular huésped 293-F, una variante de crecimiento rápido de la línea celular HEK 293, y su genoma alberga el gen del adenovirus E1A, que es necesario para la expresión del gen *rep* de AAV. Esta línea celular fue originalmente una línea celular adherente que se propagó en medio de crecimiento complementada con suero bovino fetal (fetal bovine serum, FBS) y luego se adaptó para crecer en suspensión, y se eliminó la necesidad de un medio de crecimiento que contuviera componentes de origen animal.

El banco de células maestras (*master cell bank, MCB*) 293-F y el banco de células de trabajo (*working cell bank, WCB*) utilizados para la fabricación de REGV131 se analizaron para detectar diversos virus de acuerdo con la directriz ICH sobre la evaluación de la seguridad vírica de productos biotecnológicos derivados de líneas celulares de origen humano o animal (ICH Q5A).

Se realiza el análisis de transgén para determinar la identidad molecular mediante secuenciación de nueva generación (NGS) en el producto farmacéutico REGV131, siendo la identidad, respecto a la secuencia de referencia, del 100%.

Evaluación y gestión del riesgo

-Integración

En los pacientes tratados, la integración de *F9* está concebida para ser específica del sitio. La frecuencia de la integración aleatoria de los vectores AAV se considera rara en humanos, y no se han descrito acontecimientos genotóxicos confirmados en humanos, hasta la fecha. Además, REGV131 carece de un promotor en los moldes de ADN de *F9*. Esto es una característica intencionada del inserto para reducir el posible riesgo de oncogénesis asociada con un evento de inserción aleatoria. Será menos probable que el molde de ADN sin promotor influya en la expresión génica local en la proximidad de un sitio de integración aleatoria en el improbable caso de que ésta ocurra. Por lo tanto, el riesgo de oncogénesis se considera insignificante.

-Demostración de ausencia de formación de virus competentes para la replicación (RCV).

El riesgo de generación de AAV recombinantes durante la fabricación de REGV131 es bajo, ya que la producción de REGV131 implica el uso de 3 plásmidos, en lugar de la coinfección con un virus auxiliar.



Además, cada lote de producción se analiza para detectar la presencia imprevista de AAV recombinantes y un resultado positivo confirmado impediría el uso del lote en estudios clínicos.

Se realizan ensayos de propagación de AAV basada en cultivos de células HEK293 junto con detección del gen *rep* de AAV2 mediante qPCR. No se detectaron en los lotes analizados.

-Biodistribución y excreción del vector clínico (*Shedding*).

Se evaluó la distribución y persistencia de REGV131 y LNP1265 en tejidos hepáticos y extrahepáticos en un estudio de biodistribución en macacos cangrejeros.

Los resultados mostraron que la distribución tanto de los genomas de REGV131 como de la edición de genes diana, que es necesaria para la integración en el locus específico, fue sistemáticamente mayor en el hígado, que es el órgano diana previsto, tras infusiones intravenosas secuenciales de REGV131 y LNP1265.

En la mayoría de los estudios clínicos en seres humanos que investigan serotipos de AAV administrados por vía intravenosa similares, aunque no idénticos a AAV8, la excreción es indetectable o alcanza un nivel próximo al límite inferior de detección del análisis en aproximadamente 24 semanas en orina, sangre, heces, saliva y semen.

Todos estos estudios se realizaron con dosis de AAV que estaban dentro del intervalo de dosis clínica previsto para REGV131 o superiores al intervalo de dosis previsto.

Cabe destacar que, a diferencia de REGV131, todos estos estudios de excreción se realizaron con un AAV que contiene un promotor y, por tanto, cualquier partícula eliminada puede ser de mayor riesgo para un individuo no diana que las partículas excretadas de REGV131, dado que REGV131 no tiene promotor y es incapaz de impulsar la expresión génica por sí mismo.

En un estudio en fase I/II de BAX-335, terapia con un AAV8 con un transgén del F9 hiperactivo e impulsado por un promotor, se analizó la excreción en sangre, saliva, semen, orina y heces en sujetos con hemofilia B tras la administración de una dosis única. Los genomas de BAX 335 se detectaron en algunos sujetos hasta 9 meses después en la sangre, aunque se identificaron a niveles más bajos en la saliva, el semen, las heces y la orina. Los valores máximos se alcanzaron entre 1 día y 2 semanas después y persistieron entre 1 y 5 semanas.

Teniendo en cuenta que el perfil de secreción/excreción de los serotipos de rAAV está bien establecido en estudios de excreción clínicos y preclínicos con otras terapias génicas basadas en AAV administradas por la misma vía de administración para la hemofilia y que, las propiedades biológicas de REGV131 confieren un riesgo insignificante por la excreción, el perfil de excreción no se ha medido mediante estudios preclínicos con REGV131-LNP1265. Esta circunstancia es aceptable conforme a las condiciones establecidas en las Directrices de la EMA sobre los aspectos de calidad, preclínicos y clínicos de los medicamentos de terapia génica (2018).

Sin embargo, la excreción se evaluará mediante la recogida de muestras seleccionadas.

Todas las evaluaciones de excreción de virus se realizarán de acuerdo con las “Consideraciones de la ICH: principios generales para abordar la excreción de virus y vectores (2009)”. Se utilizará un método de qPCR validado para detectar la presencia de ADN del vector AAV8 en muestras de sangre, saliva, secreciones nasales, semen, orina y heces recogidas de los participantes tratados en los puntos temporales inmediatamente posteriores a la administración del producto para capturar el pico de excreción, y en intervalos regulares para hacer un seguimiento de la disminución de la excreción. El análisis de la excreción continuará hasta que se obtengan tres resultados negativos consecutivos.



En la parte 2ª del estudio, el ADN del vector se medirá en matrices pertinentes en función de los resultados del análisis de los datos de confirmación de la dosis de la parte 1.

Como precaución, según los datos de excreción anteriores con otros serotipos de AAV recombinantes, los participantes sexualmente activos deben estar dispuestos a utilizar un método anticonceptivo de barrera fiable durante el periodo de tratamiento con el fármaco del estudio y hasta 12 meses después de la administración de REGV131-LNP1265, o, si procede, al menos hasta que 3 muestras de semen consecutivas sean negativas para las secuencias del vector, a fin de evitar la posibilidad de transferencia horizontal y potencialmente vertical del vector.

-Medidas de control

El transporte interno en el centro clínico tendrá lugar de acuerdo con las directrices de bioseguridad de cada centro hospitalario relativas a la manipulación de OMG. Se usará un recipiente de transporte resistente, irrompible y protegido de la luz solar.

La preparación de la dosis tendrá lugar en una cabina de bioseguridad o una campana de flujo laminar utilizando técnicas asépticas. Se utilizarán técnicas asépticas para la administración, y todos los viales se desinfectarán antes de su manipulación y uso.

Para reducir el riesgo de exposición involuntaria durante la manipulación, el personal del centro y todos los presentes durante la preparación y administración llevarán un equipo de protección individual (EPI) adecuado para manipular agentes en el nivel contención biológica o nivel de bioseguridad (BSL1). Todo el personal que manipule el producto en investigación llevará guantes de protección, ropa protectora, protección ocular y protección facial.

Las medidas de descontaminación/limpieza seguirán las políticas y procedimientos específicos del centro, utilizando un desinfectante con eficacia documentada contra el AAV. Los AAV se inactivan fácilmente con varios desinfectantes, como hipoclorito sódico al 0,5 %, peroximonosulfato de potasio al 0,45 %, ácido peracético al 0,5 %, lejía yodada al 10 % y yodo (1 %) (tiempo de contacto de 5 o 30 minutos).

Los materiales no desechables (herramientas, dispositivos) se limpiarán con un desinfectante con actividad viricida, p. ej., un desinfectante liberador de cloro como el hipoclorito que contiene cloro disponible al 0,1 % (1.000 ppm), después de su uso y luego se esterilizarán en autoclave, si fuera posible. Las superficies de contacto se desinfectarán con un desinfectante similar. Además, después de la administración, la sala de tratamiento se descontaminará con un desinfectante. Se utilizará una solución de cloro de 250 ppm para la desinfección regular de las superficies usadas.

En caso de derrame, el área afectada, revestida con material absorbente, se descontaminará utilizando desinfectantes adecuados con actividad viricida, es decir, material absorbente empapado en 1.000 ppm de solución de cloro (p. ej., hipocloruro sódico).

Si el centro clínico tiene la capacidad de eliminar REGV131 por incineración o de acuerdo con todos los requisitos locales vigentes en materia de bioseguridad, es posible que estén autorizados a proceder a la destrucción (con la aprobación previa del promotor) y entregar un certificado de destrucción o documentación equivalente; de lo contrario, se le indicará que devuelva todo el material utilizado y/o no utilizado a un centro de destrucción designado que eliminará REGV131 según los procedimientos correspondientes para los OMG y entregará un certificado de destrucción.



Los viales y los residuos sin usar y usados que contengan, o que hayan estado en contacto con REGV131 (residuos sólidos y líquidos), se desecharán de acuerdo con los requisitos y procedimientos de los centros como residuos de materiales biopeligrosos.

Todas las muestras del estudio clínico se manipularán, almacenarán y transportarán de acuerdo con los procedimientos descritos en el protocolo del estudio y el manual de laboratorio y las medidas higiénicas estándar del hospital. Se tratarán todas las muestras como potencialmente infecciosas. El transporte dentro del centro se realizará en un embalaje cerrado, fácil de descontaminar, a prueba de roturas y fugas. Las muestras se almacenarán en un recipiente cerrado en el centro bajo con acceso restringido.

En el caso de que se produzca cualquier incidencia o accidente se deberá informar de manera inmediata a la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB) y al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG).

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 del mismo al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG) y a la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB), siguiendo el modelo de informe de resultados elaborado por la CNB, que se encuentra disponible en la [web del MITECO](#). 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 5 de febrero de 2025.