



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE VIRUS ADENOASOCIADOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/25/20)

Título del ensayo

Ensayo clínico de terapia génica con microdistrofina (GNT0004) en la Distrofia Muscular de Duchenne: estudio de fase I/II/III con una parte de determinación de la dosis seguida de una evaluación de la eficacia y la seguridad, una parte con enmascaramiento cuádruple controlada con placebo y luego una parte de seguimiento de la seguridad a largo plazo, en niños ambulantes, del promotor Genethon.

Características del ensayo

GNT0004 se administrará como una única infusión intravenosa periférica a los participantes del estudio (niños varones de 6 a 10 años) con Distrofia Muscular de Duchenne (DMD).

El ensayo se realizará en el Hospital Universitari I Politecnic La Fe de Valencia y Hospital Sant Joan de Deu de Barcelona.

Organismo modificado genéticamente

El OMG, GNT0004, es un vector de AAV recombinante en el que los genes AAV *rep* y *cap* naturales se sustituyen por el casete de expresión que contienen la microdistrofina humana (hMD1). La cápside procede del serotipo 8 y las ITR del serotipo 2.

El OMG se obtiene mediante la transfección transitoria de la línea celular HEK293T (contiene la secuencia E1 (genes E1A y E1B) del Adenovirus 5) con 3 plásmidos (un plásmido que porta el genoma AAV recombinante, otro que porta los genes *rep* y *cap* del AAV y otro que porta los genes auxiliares E2, E4 y la secuencia no codificante VA RNA del adenovirus 5).

Evaluación del riesgo

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

Se ha analizado la presencia de AAV competentes para la replicación en lotes clínicos de GNT0004. Se utilizaron los vectores analizados para transducir células HEK293 en presencia o ausencia de Adenovirus tipo 5 naturales. Se llevaron a cabo tres rondas sucesivas de amplificación celular y se extrajo ADN genómico total en cada paso de amplificación.

Se detectaron los rcAAV mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Se amplificaron tres secuencias a partir del ADN aislado con qPCR: las dos primeras son específicas de los genes *Rep2* y *Cap8* del AAV y la tercera es específica de un gen endógeno de las células HEK293 (albúmina humana; hAlb).

Se ha establecido el límite de detección del ensayo validado y el criterio de aceptación para la liberación de los lotes.



-Biodistribución

En estudios preclínicos en los que se administró el vector terapéutico por vía transvenosa locorregional (en una extremidad anterior) a perros machos, los genomas del rAAV pudieron cuantificarse desde el día 1 hasta el día 7 en la orina, y se observó una disminución con el tiempo hasta que ya no fueron detectables a las 4 semanas p.i.

En estudios preclínicos en los que se administraban dos dosis a perros, los genomas de rAAV ya no eran detectables en la orina después de 3 semanas en los perros a los que se les injectó la dosis más baja y se detectaron hasta 8 semanas después de la administración en los animales a los que se les injectó la dosis más alta

En estudios en los que se administraron por vía intravenosa dos dosis a ratas sanas, la evaluación de la excreción en la orina mostró que los niveles del genoma del vector podían cuantificarse en todos los animales tratados desde el día 4 hasta el día 8. Se observó una disminución con el tiempo en los grupos que recibieron dosis más alta y más baja. No se observó ningún nivel cuantificable en ninguno de los animales del ensayo en el día 93.

Se está llevando a cabo un ensayo clínico integral de fase I/II/III con GNT0004, habiéndose completado la parte 1. En esta primera administración en humanos y parte 1 de escalado de dosis se midió la diseminación del vector en sangre, orina, heces y saliva, antes y después de la administración de GNT0004. La frecuencia de muestreo posterior a la administración fue semanal hasta la semana 8, luego mensual y posteriormente cada 3 meses hasta completar 1 año. El seguimiento de la diseminación del vector tras la administración duró hasta la depuración del vector (definida como la obtención de resultados indetectables en dos puntos de muestreo consecutivos) en cada tipo de fluido/excreción biológica para cada paciente.

El método de cuantificación del vector se basa en la extracción de ADN de la muestra y en la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) dirigida a hMD1 transportado por el vector GNT0004. Se establecieron los límites de detección y cuantificación para cada tipo de muestra.

De acuerdo con los datos disponibles para la dosis más alta, dosis seleccionada para la siguiente fase fundamental del estudio, los vectores pueden estar presentes hasta la semana 39 (9 meses), la semana 26 (6 meses) y la semana 39 (9 meses) después de la infusión de GNT0004, en la saliva, las heces y la orina, respectivamente. La presencia del vector puede durar más de 1 año en plasma. La presencia de vectores en estas secreciones/excreciones biológicas se tendrá en cuenta al actualizar las recomendaciones para los cuidadores y las familias de los pacientes para que se laven bien las manos cuando entren en contacto directo con los desechos corporales del paciente durante el tiempo pertinente después de la administración de GNT0004.

Medidas de control

El almacenamiento de los viales que contienen rAAV8-hMD1 se realizará en un contenedor secundario a prueba de fugas que sólo se abrirá en una cabina de seguridad biológica de clase II. La bolsa de infusión cerrada preparada se transportará a la sala en un recipiente hermético cerrado que haya sido descontaminado por fuera.

Será obligatorio el uso de ropa protectora para el personal de Farmacia y de la sala de hospitalización: guantes, bata de laboratorio, gafas de seguridad. Cuando se esté fuera de la cabina de seguridad biológica de Clase II, se deberá utilizar también una mascarilla FFP2.



Los residuos sólidos (viales usados, viales descongelados no usados, jeringas y otros objetos que potencialmente puedan entrar en contacto con el PEI) deben eliminarse como residuos clínicos infecciosos en contenedores específicos.

Los centros del estudio proporcionarán directrices a los pacientes, cuidadores y padres y familiares de los pacientes para que sigan unas buenas prácticas de higiene regulares.

Todas las muestras se manejarán como material infeccioso, al igual que todas las muestras de pacientes en el hospital.

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 20 de noviembre de 2025