



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE UN VIRUS ADENOSOCIADO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/19/13)

Título del ensayo

Estudio en fase I/II abierto y multinacional de la seguridad y del aumento gradual de dosis de SHP648, un vector de virus adenoasociado de serotipo 8 (AAV8) que expresa el FIX Padua en sujetos con hemofilia B.

Características del ensayo

El período propuesto para la liberación es desde el 15/05/2019 hasta el 06/03/2023.

En el ensayo participarán el Hospital Universitario la Paz, el Hospital Virgen de la Arrixaca y el Hospital Universitari Vall d'Hebron.

La dosis máxima propuesta que se espera evaluar en el estudio propuesto de SHP648-101 de fase I/II es de $3,6 \times 10^{12}$ genomas del vector por kilogramo (gv/kg) de peso corporal del paciente en la cohorte 3.

El objetivo del estudio clínico en fase I/II es evaluar la seguridad de una única dosis i.v. de SHP648 en sujetos varones adultos con hemofilia B de entre 18 y 75 años. Se evaluará la seguridad y el aumento gradual de la dosis de una única infusión intravenosa de SHP648 en hasta 21 sujetos.

La presencia del OMG en sangre, saliva, orina, heces y semen se comprobará en la primera visita para conseguir el valor inicial. Tras recibir SHP648, las muestras se recogerán en las siguientes visitas hasta que se produzcan 2 resultados negativos en las pruebas.

Los sujetos tratados con SHP648 se someterán a un seguimiento durante 1 año en el estudio principal de fase I/II, y a continuación, durante un periodo adicional máximo de 4 años en un estudio de extensión.

Características del OMG

El OMG, AAV8.ss-3xCRM8-TTR-FIX_R338Lopt (SHP648), es un vector recombinante, incapaz de replicarse, derivado del virus adenoasociado de serotipo 8, que contiene la secuencia génica, con optimización de codones, que codifica el factor de coagulación FIX humano portador de la variante de Padua, bajo un promotor híbrido específico de hígado y una señal de poliadenilación sintética, flanqueado por las ITR de AAV2. Aunque AAV8 es especialmente eficiente al infectar y dirigir la expresión génica al hígado humano, con una expresión génica mínima “fuera de la diana” en otros tejidos (por ejemplo, en las células que presenten antígenos), en SHP648 se incorpora un promotor específico de hepatocitos para dirigir aún más la expresión del FIX en el tejido hepático.

Durante el proceso de fabricación de AAV8.ss-3xCRM8-TTR-FIX_R338Lopt (SHP648) se introdujeron mediante transfección tres plásmidos diferentes en células HEK293: i) el plásmido que codifica la correspondiente proteína FIX, ii) el plásmido portador de genes ayudantes adenovíricos y iii) el plásmido que envuelve el AAV8, que proporciona los genes *rep* y *cap*.



Identificación de riesgos potenciales

-Estabilidad genética

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.

Los AAV utilizan 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 de tipo salvaje, también cabe esperar que SHP648 sea genéticamente muy estable.

La estabilidad general de estas modificaciones se considera alta pues, al menos en el contexto de células murinas y de monos *Macaca mulatta*, la expresión del factor FIX puede mantenerse durante un periodo de tiempo más largo. Los estudios *in vivo* demostraron una expresión estable del factor FIX humano en ratones y monos *Macaca mulatta*.

-Patogenicidad

Las infecciones humanas con AAV son frecuentes pero nunca se ha comunicado como agente etiológico para enfermedades ni en humanos ni en animales. Los estudios de serología en seres humanos sanos mostraron que hasta un 70 % de la población mundial se ha infectado por AAV sin correlación con ninguna enfermedad clínica.

-Genotoxicidad

A una multiplicidad de infección alta, el AAV de tipo salvaje 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 de sitio se precisan las proteínas Rep del AAV, que no se incluyen en SHP648.

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 rAAV se mantiene en forma episomal. También se ha demostrado que, tras la transducción hepática el rAAV se estabiliza predominantemente en una forma no integrada; sin embargo, se observa un grado bajo de integración.

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

SHP648 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 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.



-Transferencia génica

El SHP648 es un virus derivado del virus VAA8, 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 AAV de tipo salvaje, lo que solo podría producirse si las células humanas se infectaran simultáneamente con el AAV de tipo salvaje y SHP648, en presencia de un virus cooperador.

Se espera que esta situación se dé en raras ocasiones y, de producirse, únicamente provocaría la producción de AAV de tipo salvaje y partículas SHP648 (que tampoco presentarían los genes *rep* y *cap* y, por lo tanto, no serían replicativas).

-Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación

Los AAV pertenecen al género Dependovirus dentro de la familia Parvoviridae. La estabilidad de los parvovirus frente al estrés fisicoquímico se considera alta. Los parvovirus son estables en presencia de disolventes lipídicos, tras la exposición a un pH de 3-9 o la incubación a +56 °C durante 60 minutos. En estado seco, la infectividad de las partículas de parvovirus se puede mantener durante varias semanas.

La modificación del vector SPH648 no altera la estabilidad física de las partículas del virus en comparación con el AAV de tipo salvaje, puesto que la estructura de la cápside de las partículas recombinantes es idéntica a la del virus AAV de tipo salvaje.

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

Dado que SHP648 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 SHP648 como parte del ensayo, no sería una dosis suficiente para representar una expresión génica significativa ni problemas de seguridad para los seres humanos. La duración de la presencia del genoma de SHP648 en sangre, saliva, orina, heces y semen se supervisará hasta que el genoma vírico sea indetectable en dos muestras consecutivas.

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 producto se almacenará y se preparará en las farmacias de los hospitales que participan en el ensayo. Se recomienda el uso de batas de laboratorio o uniformes protectores y gafas de protección cuando se llevan a cabo procedimientos con productos que pueden salpicar.

Las superficies de trabajo deben desinfectarse después de terminar el trabajo y de cualquier derrame o salpicadura del producto con un desinfectante apropiado. La zona se



descontaminará utilizando un desinfectante virucida completo como Klercide esporicida con cloro activo (Shield Medicare) o lejía de cloro (10 % f.c.) o hidróxido de sodio 0,1 M durante 10 minutos.

Los materiales que hayan entrado en contacto con el OMG se eliminarán como residuos biopeligrosos.

En el formulario de consentimiento informado del estudio, se informa al paciente sobre los métodos anticonceptivos adecuados y sobre la donación de esperma, ya que la transmisión vertical a través del esperma se considera un riesgo.

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 de los mismos al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG) y a la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB). 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 16 de enero de 2020