



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE VIRUS ADENO-ASOCIADOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (BMN 307) (Notificación B/ES/20/05)

Título del ensayo

Un estudio de fase 1/2 abierto, de escalada de dosis para determinar la seguridad y eficacia de BMN 307, una transferencia génica mediada por vectores de virus adenoasociados de fenilalanina hidroxilasa humana en pacientes con niveles de fenilcetonuria y Phe en plasma $> 600 \mu\text{mol/L}$, de la empresa BioMarin Pharmaceutical Inc

Se trata de un estudio abierto, de dos partes, cuyo objetivo es determinar la dosis (Parte A) y la eficacia, la seguridad y la tolerabilidad (Parte B) de BMN 307. El objetivo es demostrar una reducción clínicamente significativa de la fenilalanina (Phe) plasmática en sujetos con fenilcetonuria (PKU) con Phe plasmática basal $> 600 \mu\text{mol/l}$, después de una sola administración intravenosa (IV), segura y tolerada de BMN 307.

El objetivo principal de la parte A consiste en determinar una dosis segura, eficaz y tolerable de BMN 307 en sujetos con PKU ≥ 18 años de edad y Phe plasmática basal $> 600 \mu\text{mol/l}$, para la administración ampliada en la parte B.

El objetivo principal de la parte B (aproximadamente 30 sujetos con la dosis seleccionada) es determinar la eficacia de una sola administración de BMN 307 sobre la Phe plasmática en sujetos con PKU ≥ 15 años de edad con una Phe plasmática basal $> 600 \mu\text{mol/l}$.

Características del ensayo

Se propone un período de liberación de marzo de 2020 hasta marzo de 2025.

En el ensayo participarán el Hospital Universitario Virgen del Rocío, el Hospital Universitario Cruces y el Hospital Clínico Universitario de Santiago.

Se incluirá a un máximo de 100 sujetos que participarán en el estudio en todo el mundo, con aproximadamente 20 sujetos previstos en España. Por tanto, la cantidad máxima de OMG que se puede liberar es de $3,2 \times 10^{17}$ genomas virales (vg), suponiendo un peso medio de los pacientes de 80 kg.

Se hará un seguimiento mediante PCR de la excreción del vector en sangre, saliva, orina, heces y semen en varios momentos después de la administración.

Los análisis de cada muestra se repetirán hasta que se obtengan al menos tres resultados negativos consecutivos. La presencia del genoma del vector en sangre, saliva, orina, heces y semen se comprobará antes de la infusión, semanalmente hasta la semana 2, quincenalmente desde la semana 2 hasta la semana 4, mensualmente desde la semana 4 hasta la semana 48 y cada tres meses desde la semana 48 hasta la semana 240, después de la administración de BMN 307.

El análisis de semen continuará al menos hasta la semana 12, aunque se hayan registrado tres resultados negativos consecutivos antes de ese momento. En el caso de los sujetos que no hayan tenido tres muestras de semen negativas consecutivas antes de la semana 48, tras haber obtenido una primera muestra negativa, deberá obtenerse otras dos muestras de semen para



confirmar la negatividad (con una separación aproximada de 1-2 semanas). El análisis continuará hasta que se documenten tres muestras negativas consecutivas (o tras el acuerdo del investigador y el monitor médico de BioMarin).

Características del OMG

BMN 307, es un virus adenoasociado serotipo 5 modificado genéticamente, que contiene una casete de expresión de la proteína fenilalanina hidroxilasa humana hPAH bajo el control de un promotor que dirige la expresión específica en el hígado, flanqueado por las secuencias ITR de AAV2 y la cápside de AAV5. Las secuencias génicas *rep* y *cap* de AAV no están presentes en el genoma de BMN 307 y, por tanto, el vector no puede replicarse ni siquiera en presencia de un virus colaborador, como un adenovirus (a diferencia de su organismo parental, AAV5).

BMN 307 se fabrica en un sistema de expresión de vectores de baculovirus, mediante la coinfección de células huésped de insectos con dos baculovirus recombinantes (rBV) que contienen las secuencias codificantes de hPAH y de *rep/cap*. Estos baculovirus se obtienen a partir de bécmidos.

Identificación de riesgos potenciales

-Estabilidad genética

En general, los virus ADN presentan mayor estabilidad genética que los virus ARN. El ADN es más estable termodinámicamente que el ARN y la replicación del ADN es un proceso menos propenso a los errores que la replicación del ARN.

Se espera que la estabilidad genética de BMN 307 sea similar a la del AAV de tipo silvestre.

La estabilidad genética de BMN 307 está respaldada por su producción conforme a las normas actuales de Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) y se verifica mediante ensayos de pureza, potencia y composición. La estabilidad genética se ha demostrado a través de: (1) estabilidad de la secuencia genómica del vector, (2) estabilidad indicada por la producción de proteínas *in vitro* y (3) estabilidad indicada por la producción de proteínas funcionales *in vivo*.

-Patogenicidad

Los AAV, incluido el AAV5, está muy extendido en la comunidad; sin embargo, el consenso actual es que ninguno de los serotipos conocidos de AAV causa enfermedad en los seres humanos. Hasta la fecha se han caracterizado 13 serotipos naturales de AAV humanos o de primates no humanos. El AAV no es exclusivo de los primates; se han aislado AAV aviares, bovinos, ovinos, caprinos y de serpientes a partir de reservas de adenovirus (AdV) animales. Por tanto, el número total de serotipos de AAV conocidos hasta ahora es de cientos.

Se cree que el AAV se disemina en la naturaleza por inhalación de gotitas aerosolizadas, contacto con las mucosas o ingestión.

No se ha demostrado que los serotipos de AAV que infectan a primates (incluidos los seres humanos) transfieran activamente material genético a organismos distintos de los primates en condiciones naturales.

Los AAV requieren la coinfección de un virus colaborador.

-Genotoxicidad



Determinados AAV de tipo silvestres pueden integrarse de manera estable en un locus específico del genoma de la célula hospedadora (AAVS1 en el brazo largo del cromosoma 19 humano); en caso de integración, siguen siendo no patógenos. El mecanismo de esta integración específica requiere la proteína Rep del AAV, que está ausente de BMN 307. En consecuencia, BMN 307, al igual que todos los AAV recombinantes (rAAV), es incapaz de integrarse de manera específica. Se ha demostrado la integración aleatoria de secuencias del vector en líneas celulares establecidas, pero solo en algunos casos y con baja frecuencia, en cultivos primarios e *in vivo*.

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

BMN 307 carece de capacidad de replicación y cada lote de BMN 307 se somete a análisis de pureza para demostrar que no presenta AAV con capacidad de replicación detectables. Solo podría producirse recombinación homóloga si una célula hospedadora está coinfectada por un AAV de tipo silvestre más un virus colaborador y BMN 307, por lo que sería necesaria una triple infección. Sin embargo, esta recombinación solo podría dar lugar al intercambio del casete de expresión de hPAH con los genes *rep* y *cap* del virus silvestre. No es posible que el genoma del AAV contenga tanto los genes *rep* y *cap* como el transgén, ya que el tamaño de dicho genoma superaría considerablemente el límite de encapsidación del virión.

-Transferencia génica en la línea germinal.

En un ensayo de transferencia de AAV2-FIX (vector basado en AAV2 que expresa el gen FIX bajo un promotor específico de hígado) se detectaron secuencias del genoma del vector clínico en el semen; las muestras de semen de los ocho sujetos se eliminaron en dieciséis semanas. Se realizó una serie de estudios no clínicos para demostrar: 1) la naturaleza transitoria de este hallazgo tanto en humanos como en animales; y 2) que no se detectaron secuencias del vector clínico en los espermatozoides. Se realizaron una serie de estudios con conejos, un modelo valioso para evaluar el riesgo de transmisión a la línea germinal en seres humanos. Se determinó que, tras la inyección intravenosa de AAV2, la duración de la detección de genomas en el semen es proporcional a la dosis y dependiente del tiempo, con disminución de los genomas con el tiempo hasta que son totalmente indetectables. También se realizaron estudios en conejos con vectores clínicos basados en AAV8. En estos estudios se compararon vectores AAV2 y AAV8 y demostraron que la cinética de eliminación del vector del semen fue dependiente de la dosis y del tiempo, pero independiente del serotipo. Además, se detectaron secuencias de AAV2 o AAV8 en el semen de animales vasectomizados que carecen de células germinativas, lo que llevó a la conclusión de que el aparato genitourinario, así como los testículos, contribuyen significativamente a la diseminación del vector en el semen. Estos estudios están respaldados por hallazgos en seres humanos en los que se detectaron genomas del vector clínico en el semen solo brevemente después de la administración sistémica de AAV8-LP1-hFIXco; la eliminación se detectó 15 días después de la administración. Estos resultados indican que el riesgo de transmisión inadvertida a la línea germinal en los varones por vectores clínicos basados en AAV es bajo.

No se detectó ADN de BMN 307 en ovocitos, espermatogonias, espermatozoides ni espermatozoides de ratones ENU2 y macacos de Java, lo que indica un riesgo bajo de transmisión en la línea germinal. En el estudio clínico de fase 1/2 con BMN 270 (un vector clínico basado en AAV5 para tratar la hemofilia A), todos los sujetos mostraron ausencia del



vector en el semen. No se detectó ADN del vector en los espermatozoides purificados de los participantes que tenían ADN del vector por debajo del límite de cuantificación en el semen después de 52 semanas.

En todo caso, se recomienda a los pacientes la utilización de métodos anticonceptivos de doble barrera.

-Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación. Efecto sobre la salud humana, otros organismos no diana y el medio ambiente

La vía más probable de exposición de los profesionales sanitarios sería por aerosoles durante la preparación del producto terminado para su administración, si bien en concentraciones previsiblemente muy bajas. El riesgo de transferencia accidental del AAV en aerosol se ha examinado directamente y se ha comprobado que es insignificante debido a la dosis extremadamente baja de la posible exposición (0,0006% de la dosis administrada). En el caso de familiares/cuidadores inmediatos y población en general, la vía más probable de exposición sería la fecal-oral por contacto con los fluidos corporales. La probabilidad de que esto ocurra es baja, y en cualquier caso expondría a estos grupos a concentraciones mucho menores de BMN 307 que la dosis clínica efectiva.

En ambos casos probablemente se eliminaría el vector por el sistema inmunitario innato por lo que el riesgo es insignificante.

Una solución de lejía al 10% nueva es un desinfectante eficaz contra los AAV de tipo silvestre. Dado que la cápside de BMN 307 es la misma que la de AAV5 de tipo silvestre, cabe esperar que la lejía sea igual de eficaz en BMN 307 que en el AAV de tipo silvestre.

Manipulación, control y tratamiento de residuos

Los profesionales sanitarios de todos los centros recibirán formación en servicio y realizarán una prueba sin medicamento con la bomba de jeringa para administrar BMN 307.

Utilizarán procedimientos del nivel de bioseguridad 1 (BSL-1) y para la preparación de la dosis se puede utilizar cabina de bioseguridad.

Se utilizará una solución recién hecha de lejía doméstica al 10 % (5000 ppm de hipoclorito sódico) para la desinfección de materiales, equipos y superficies no desechables.

Todos los materiales que hayan estado en contacto con el OMG se eliminarán como residuos biopeligrosos.

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 12 de junio de 2020