



## **EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE HERPES SIMPLEX DE TIPO SILVESTRE (VHS-1) MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/22/07)**

### **Título del ensayo**

Estudio de fase 1 abierto, multicéntrico, de RP3 como monoterapia y en combinación con el bloqueo de PD1 en pacientes con tumores sólidos [RP3-301], del promotor Replimune Inc.

### **Características del ensayo**

El promotor propone un período para la liberación de junio de 2022 hasta junio de 2025.

El diseño del estudio consta de dos partes:

- La parte 1 del estudio es una fase de aumento progresivo de la dosis para evaluar la seguridad y la tolerabilidad de RP3 en monoterapia y para determinar la dosis recomendada en la fase 2.
- La parte 2 es el estudio de ampliación de la dosis diseñado para evaluar la seguridad y la actividad biológica de RP3 en combinación con nivolumab.

El medicamento en investigación se inyectará directamente dentro del tumor del paciente y el lugar de inyección se cubre con un apósito oclusivo para mitigar el riesgo de diseminación de RP3 a terceros.

En el ensayo participará el Hospital Universitario HM Sanchinarro.

### **Características del organismo modificado genéticamente (OMG)**

El virus modificado genéticamente, rHSV-1/ahCTLA-4/GALV-GP-R/hCD40L/h4-1BBL (RP3), es una cepa viva atenuada del virus herpes simplex (VHS-1) diseñada para replicarse selectivamente en tumores y activar una respuesta inmune. El virus se modificó eliminando ciertos genes virales específicos que participan en la neurovirulencia y en el bloqueo de la presentación de los antígenos virales, e introduciendo genes que codifican proteínas humanas que estimulan a ciertos tipos de células del sistema inmune.

- Delección de la secuencia codificadora ICP34.5 (ambas copias).
- Delección de la secuencia codificadora ICP47.
- Inserción de una secuencia con codones optimizados para proteína 4 humana asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y una versión truncada ‘R-’ de GALV-GP-R en lugar de la secuencia ICP34.5 eliminada, para una mayor activación de los linfocitos T.
- Inserción de la secuencia para hCD40L y h4-1BBL en la región UL50/51.

Los virus se produjeron mediante cotransfección de ADN vírico y ADN plasmídico en células de hámster recién nacido (BHK). Los plásmidos contienen secuencias de ADN que codifican las regiones a uno u otro lado del sitio de inserción del casete de expresión en el genoma del VHS-1 junto con el correspondiente casete de expresión. Para la producción se utilizan células Vero.



## **Evaluación del riesgo**

### **-Patogenicidad**

La atenuación de la patogenicidad en animales y humanos de VHS-1 por la delección de ICP34.5 se ha demostrado en numerosos estudios. VHS-1 no se integra en el ADN celular, no se tiene conocimiento de que sea tumorigénico o cancerígeno. No se han realizado modificaciones en RP3 que puedan afectar a estos rasgos.

La zoonosis ocurre de forma natural con mayor frecuencia entre especies huésped estrechamente relacionadas, pero también se puede encontrar transmisión de agentes infecciosos allí donde las barreras a la transmisión son inherentemente pequeñas o se han reducido de forma artificial. No se tiene conocimiento de que el VHS-1 tenga capacidad zoonótica y es raro que los herpesvirus provoquen infecciones en otras especies.

Se han eliminado permanentemente del RP3 los genes que codifican el factor de neurovirulencia (ICP34.5) y el gen que codifica la proteína ICP47. Esto implica que RP3 tiene una desventaja significativa en comparación con el VHS-1 de tipo silvestre.

RP3 no contiene ningún inserto que se sepa sea nocivo. RP3 expresa la proteína superficial del virus de la leucemia de gibones (GALV-GP) con la secuencia R (R-) eliminada. GALV-GP-R- provoca fusión celular, lo que conlleva muerte celular. No obstante, los estudios preclínicos y toxicológicos no han demostrado que la expresión de GALV R- en tejidos normales tenga ningún efecto (en comparación con los tumores, donde aumenta el efecto antitumoral), probablemente debido a que la replicación de RP3, y por lo tanto la expresión de GALV-R-, está enormemente restringida en el tejido normal.

### **-Estabilidad genética**

Se llevó a cabo una secuenciación del genoma completo (SGC) con material de RP3 derivado del preinóculo maestro del virus y el inóculo maestro del virus y se comparó con la secuencia para todas las regiones modificadas, confirmándose que las secuencias codificadoras de los genes de GALV-GP-R-, ahCTLA-4, hCD40L y h4-1BBL eran correctas. No se observaron reordenamientos genómicos a gran escala y se confirmó la delección ICP47.

### **-Potencial de recombinación con el virus parental *in vivo***

La recombinación homóloga puede ocurrir de forma espontánea entre los genomas de cepas diferentes de VHS-1 si ambas cepas se están replicando en la misma célula. No obstante, es muy poco probable que pueda haber recombinación entre RP3 y VHS-1 de tipo silvestre, ya que eso implicaría que una misma célula se ha infectado simultáneamente con RP3 y con VHS-1 de tipo silvestre. Es de esperar que el VHS-1 de tipo silvestre se encuentre solamente en las calenturas o en otros lugares con infección activa de VHS, y RP3 no se administra en esos lugares, sino en tumores. RP3 no es capaz de replicarse y diseminarse de forma eficaz en el tejido normal, lo que significa que, además, es muy poco probable que RP3 esté presente y replicándose en el mismo tejido que el VHS-1 de tipo silvestre. El VHS-1 puede entrar en latencia en los ganglios neuronales. No obstante, la latencia no está asociada a replicación viral y, por lo tanto, incluso si RP3 y VHS-1 de tipo silvestre llegaran a estar ambos presentes en los ganglios espinales, lo que es poco probable, no habría recombinación, ya que para el proceso de recombinación es necesario que haya replicación.

Se ha demostrado experimentalmente que la recombinación no homóloga (recombinación entre regiones diferentes de los dos genomas del VHS-1) no ocurre a niveles detectables entre cepas de



VHS. Por lo tanto, incluso si RP3 y el VHS-1 de tipo silvestre estuvieran presentes y replicándose en una misma célula y hubiera recombinación, ésta sería homóloga, lo que significa que cualquier transferencia de ADN entre RP3 y el VHS-1 de tipo silvestre se daría desde o hasta la misma ubicación genética. El casete de expresión ahCTLA-4/GALV que hay en RP3 está insertado en lugar del gen ICP34.5. Por lo tanto, la transferencia recombinante de este casete a una cepa de tipo silvestre se haría en el locus de ICP34.5, lo que acarrearía la delección del gen ICP34.5. Esto significa que, en términos de competencia replicativa, los virus resultantes quedarían afectados de forma similar a RP3 y por lo tanto tendrían una desventaja en relación con la población de VHS-1 de tipo silvestre. El rango de huéspedes, la susceptibilidad a los agentes antivirales y a los métodos de inactivación física o química serían también iguales a los de las cepas parentales. Por lo tanto, cualquier variante genética que pudiera, teóricamente, crearse en eventos de recombinación no conllevaría ningún cambio en el riesgo medioambiental. La recombinación, homóloga o no homóloga, solo puede ocurrir dentro de las células del huésped. No es posible que haya recombinación entre virus en el entorno, tal y como puede suceder con las bacterias.

### **-Excreción (Shedding)**

El primer producto de Replimune (RP1) se construyó utilizando un nuevo aislado del VHS-1 (cepa RH018) que se modificó mediante la delección del virus de los genes que codifican las proteínas ICP34.5 y ICP47. ICP34.5 es el «factor de neurovirulencia» e ICP47 inhibe la presentación antigénica en células infectadas por el VHS. RP1 contiene un casete de expresión que contiene un gen que codifica el GM-CSF humano y un gen que codifica GALV-GP-R-.

El segundo producto de Replimune (RP2) es similar a RP1 salvo en que incluye adicionalmente un gen que codifica una molécula similar a anticuerpo anti-hCTLA-4-.

RP3 incluye modificaciones adicionales con respecto a RP2, habiéndose eliminado el gen del GM-CSF e incorporado adicionalmente los transgenes que codifican hCD40L y h4-1BBL, que conjuntamente se espera que den lugar a una mejor inmunidad antitumoral y formación de memoria inmunológica.

El primer y segundo producto de Replimune (RP1 y RP2) ha sido asimismo bien tolerado por los pacientes tratados hasta la fecha dentro del estudio clínico en fase temprana en pacientes con tumores sólidos avanzados. No ha habido ningún indicio de transmisión de RP1 o RP2 a trabajadores sanitarios ni contactos estrechos de los pacientes tratados. Incluso si tal transmisión se produjera, no sería de esperar que provocara signos ni síntomas clínicos teniendo en cuenta que RP1 o RP2 está desactivado y no son capaz de replicarse de forma productiva salvo en los tumores. No se espera que los patrones de biodistribución y excreción de RP3 sufran cambios por la eliminación del gen del GM-CSF y la presencia adicional de los transgenes de hCD40L y h4-1BBL.

Se han evaluado la biodistribución y la excreción de RP3 dentro de un programa no clínico. Los resultados de un estudio de administración de dosis repetidas de RP3 por vía intratumoral en dosis de hasta  $2,5 \times 10^6$  UFP/ratón ( $12,5 \times 10^7$  UFP/kg) indican que es bien tolerado en este modelo de tumor, sin que se observaran mortalidad ni efectos adversos significativos. El análisis de los datos indica que, tras su administración IT, el virus mRP3 queda retenido en el tumor y la piel circundante. No se observó una distribución significativa a otros tejidos, viéndose únicamente un número bajo de copias del virus a la dosis más alta administrada en un pequeño número de tejidos (glándulas suprarrenales, hígado, ganglios linfáticos inguinales, médula espinal cervical y nervio mediano) en puntos temporales tempranos (24 horas y una semana después de la última dosis). Se obtuvieron otros resultados positivos con un número bajo de copias en muestras de orina a las 24 horas y 1 semana



después de la última dosis; no obstante, todas las muestras renales fueron negativas. Los resultados para epidídimo, testículos, ovarios y cerebro fueron todos negativos en todos los puntos temporales estudiados (hasta 12 semanas después de la última dosis). Se observó un patrón de distribución del virus similar tras la administración subcutánea.

Se ensayaron muestras obtenidas mediante hisopo para evaluar la excreción del virus hasta 1 semana después de la última dosis. Las muestras fueron todas negativas a excepción del hisopo del lugar de inyección a las 24 horas de la última dosis, que fue negativo 1 semana después de la última dosis.

En conjunto, RP3 se detectó principalmente en el tumor, en el lugar de inyección y en piel distal al lugar de inyección. Los niveles detectados en muestras tumorales son indicativos de replicación del virus.

Se dispone de datos de biodistribución y excreción para RP1 en la parte de (1) aumento progresivo de dosis/ (2) expansión del ensayo clínico de fase I en el que se administró a los pacientes RP1 por una de dos vías:

- inyecciones de RP1 directamente en lesiones superficiales en la piel o justo por debajo de ella.
- inyecciones de RP1 asistidas mediante métodos de obtención de imágenes (TC o ecografía), en lesiones viscerales profundas.

En conclusión, se detectó ADN de RP1 en el lugar de inyección y la incidencia de detección fue mayor para las muestras del lugar de inyección en la cohorte de inyección superficial, y se observó que la incidencia de detección en sangre era mayor en pacientes con inyecciones profundas. Hasta la fecha no ha habido positivos confirmados mediante TCID50 en muestras de sangre.

### **Manipulación, control y tratamiento de residuos**

El medicamento en investigación se conserva en una zona con acceso limitado.

Cualquier transporte interno de RP3 desde el lugar de preparación al lugar de administración debe realizarse en un recipiente sellado, desinfectable, hermético e irrompible con el contenido debidamente etiquetado.

La administración del OMG correrá a cargo de profesionales sanitarios experimentados y familiarizados con los productos de terapia génica, y con formación adecuada en los procedimientos de higiene y normas relativas a la seguridad y manejo de materiales infecciosos. El equipo de protección individual (EPI) incluirá bata de laboratorio y guantes, que se llevarán siempre que haya posibilidad de contacto directo de la piel con el virus. Se recomienda llevar protección ocular o mascarilla por si acaso se producen salpicaduras.

Todas las muestras de los pacientes se obtienen en el centro médico y se envían directamente al laboratorio central fuera de España para su procesamiento.

Las superficies de trabajo y los materiales que puedan estar en contacto con RP3 se descontaminarán con desinfectantes adecuados (como hipoclorito sódico), de acuerdo con los procedimientos de higiene del hospital/centro. En caso de vertido accidental, el centro seguirá sus propios procedimientos de limpieza. RP3 es sensible a los métodos comunes de inactivación, tal como cualquier agente químico (solventes lipídicos y detergentes suaves) o inactivación física (deshidratación, calor, pH bajo) que afecte a la envoltura, lo que reduce su infectividad. RP3 es muy susceptible a la deshidratación y se inactiva rápidamente fuera de su huésped, y es susceptible a medicamentos antivíricos, tal como aciclovir.



Después de la administración, el producto que no se haya utilizado, los materiales de contacto, tal como agujas, jeringas y equipo de protección individual (EPI) se desecharán en recipientes para residuos biológicos, que se pueden inactivar mediante esterilización por vapor, desinfección química o incineración.

Se informará a los pacientes y familiares o acompañantes de las medidas que deben adoptar para evitar la diseminación del OMG.

**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 4 de abril de 2022