



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE UN VIRUS ADENOASOCIADO Y EL VIRUS VACCINIA MODIFICADO DE ANKARA MODIFICADOS GENÉTICAMENTE

(Notificación B/ES/22/16)

Título del ensayo

Estudio fase 1 de VAC85135, un régimen de vacuna de neoantígeno, administrado simultáneamente con ipilimumab para el tratamiento de neoplasias mieloproliferativas, del promotor Janssen Research & Development, LLC.

Características del ensayo

El propósito de la administración de los OMG es provocar una respuesta de los linfocitos T específicos para las células malignas que expresan los antígenos CALR y JAK2 mutados como tratamiento para pacientes con neoplasias mieloproliferativas.

El medicamento en investigación tiene 2 componentes: un vector recombinante no replicativo derivado del adenovirus del gorila tipo 20 (GAd-CALR-JAK2) y un vector derivado del virus Vaccinia modificado de Ankara (MVA-CALR-JAK2). Ambos vectores víricos contienen el mismo inserto que codifica para los transgenes CALR y JAK2 mutados. Se inducirá una respuesta inmunitaria (respuestas humorales y celulares) hacia los transgenes expresados, pero no modificarán las características de los receptores humanos. La respuesta inmunitaria inducida eliminará posteriormente las células tumorales, ahora reconocidas específicamente por el sistema inmunitario.

En el ensayo participarán el Hospital Clínico Universitario de Salamanca, el Hospital Clínico Universitario de Valencia y la Clínica Universidad de Navarra.

Los OMG se administrarán consecutivamente por vía intramuscular. GAd20-CALR-JAK2 se administrará a una dosis objetivo de 1×10^{11} partículas de virus y MVA-CALR-JAK2 se administrará a una dosis objetivo de 1×10^8 unidades infecciosas. GAd20-CALR-JAK2 y MVA-CALR-JAK2 nunca se administran simultáneamente.

Características del organismo modificado genéticamente GAd-CALR-JAK2

El OMG contiene el genoma de un adenovirus de gorila GAd20 en el que se ha deleción la región temprana 1 ($\Delta E1$) completa, se ha eliminado una gran porción de la región que contiene genes inmunomoduladores que promueven la persistencia dentro de la célula huésped, se ha insertado el *orf* necesario para permitir la producción de GAd20-CALR-JAK2 no replicativo en estirpes celulares complementarias de la E1 del Ad5 y se ha colocado un casete de expresión del transgén en la deleción de E1. El transgén CALR-JAK2 (calreticulina (CALR) y la quinasa Janus 2 (JAK2), impulsores predominantes de la evolución de la enfermedad en las neoplasias mieloproliferativas clásicas), es una proteína de fusión que consta de múltiples componentes, oligopéptidos, diseñados para ser expresados intracelularmente.



Evaluación del riesgo. Identificación de riesgos potenciales GAd-CALR-JAK2

-Estabilidad fenotípica y genotípica

La estabilidad genética del GAd20-CALR-JAK2 se analizó mediante secuenciación de nueva generación (NGS) de una muestra aislada después de 10 pases consecutivos en células M9.S. Las secuencias de ADN de la muestra se alinearon con la secuencia de referencia y se analizaron para determinar la presencia de mutaciones con una frecuencia superior al uno por ciento o superior a dos lecturas mutadas. Utilizando este umbral mínimo de detección, no se detectaron mutaciones de variantes de nucleótido único, pequeñas inserciones o deleciones, lo que indica la estabilidad genética de GAd20-CALR-JAK2.

-Adenovirus competentes para la replicación (RCA)

La recombinación es frecuente entre los adenovirus de tipo salvaje que circulan en la naturaleza. La recombinación de los adenovirus de tipo salvaje se produce principalmente entre adenovirus de la misma especie. Sin embargo, se considera que el riesgo de recombinación del vector viral con el virus GAd parental es bajo, ya que no se espera que el virus GAd20 parental se encuentre en los seres humanos; el gorila es su único huésped natural. Además, hay una probabilidad mínima de contacto (físico) entre gorilas y humanos que permita la transmisión de un GAd de tipo salvaje a un ser humano.

Por otra parte, aunque se han notificado episodios de recombinación interespecífica, la recombinación espontánea entre diferentes adenovirus se ha descrito, sin embargo, predominantemente en regiones de mayor homología. Teniendo en cuenta el menor porcentaje de identidad compartido, es poco probable que se produzca una recombinación entre los adenovirus del gorila y del hombre.

Se realizan pruebas específicas para confirmar la ausencia de RCA en el banco de virus maestro (MVB) así como en los lotes de la sustancia farmacéutica (SF).

El ensayo de adenovirus competente para la replicación es un ensayo *in vitro* para la detección basado en adenovirus humano tipo 5 (Ad5) o vectores relacionados. Los resultados de la prueba indican que «no se detectado RCA» si la prueba cumple el criterio de aceptación de $<1 \text{ RCA}/3 \times 10^{10} \text{ PV}$. Tanto para el MVB como para la SF «no se detectó RCA».

-Biodistribución

Perfil de biodistribución de GAd20-CALR-JAK2, estudio preclínico

El perfil de biodistribución del GAd20-CALR-JAK2 se ha evaluado en un estudio no clínico utilizando conejos blancos de Nueva Zelanda. Los animales recibieron una única administración intramuscular del vector a una dosis de $1,235 \times 10^{11}$ pv por animal. Posteriormente, los conejos fueron eutanasiados en los días 2, 8, 31, 90 y 180 después de la inyección. Se recogieron tejidos (cerebro, timo, hígado, pulmón, sangre, médula ósea, corazón, riñón, ovario, testículos, ganglios linfáticos [poplíteos, mesentéricos], músculo del lugar de la inyección y piel) para analizar el ADN del vector mediante la PCR cuantitativa (qPCR).

Se observó una distribución local y sistémica inicial del vector clínico, y el ADN se detectó principalmente en el lugar de la inyección y en los ganglios linfáticos de drenaje, aunque se observó una señal baja en varios otros tejidos. Las copias del vector ya no eran detectables en la mayoría de los tejidos sistémicos después de una semana, lo que indica una eliminación rápida. El ADN permaneció detectable en los ganglios linfáticos de drenaje (ilíacos/poplíteos) y en el lugar de la inyección (piel/músculo) hasta el día 180, pero en un número reducido de animales y en un número



reducido de copias, lo que sugiere la eliminación del vector con el tiempo. Estos datos confirman que el vector GAd20-CALR-JAK2, como otros vectores adenovirales, no persiste y/o se replica en los tejidos después de la administración.

Biodistribución, estudios clínicos

Hasta la fecha, no se dispone de datos de diseminación en estudios clínicos con el vector. Sin embargo, en consonancia con otros vectores adenovirales incompetentes para la replicación, incluidos los procedentes de grandes simios (la vacuna Vaxzevria de Astra Zeneca, recientemente aprobada), la probabilidad de que el GAd20-CALR-JAK2 se libere al medio ambiente en cantidades relevantes tras su administración, más allá de su posible presencia inicial en el lugar de la inyección, es insignificante.

En el caso de otros vectores adenovirales, el ADN del vector se detecta con poca frecuencia y, a niveles muy bajos, no hay partículas de virus infecciosas. Se considera que la posibilidad de excreción es independiente del transgén, ya que no afecta a la partícula del vector y, por lo tanto, no cambia el tropismo celular.

Características del organismo modificado genéticamente MVA-CALR-JAK2

El MVA se creó mediante más de 500 pases en serie del virus Chorioallantois-Vaccinia Ankara (CVA) en células de fibroblastos de embrión de pollo (CEF). El MVA es incompetente para la replicación en células de origen mamífero y no produce muchos de los factores de virulencia codificados por el virus de la variolovacuna (vaccinia) convencional. El MVA carece de aproximadamente un 15 % (o 31 kb) del genoma en comparación con el virus CVA parental. Esto es el resultado de seis sitios principales de delección y otras delecciones menores, inserciones y sustituciones de bases. Las delecciones afectan a genes de virulencia y específicos del huésped, así como al gen de los cuerpos de inclusión de tipo A.

El OMG, MVA-CALR-JAK2, contiene el genoma del virus vaccinia modificado de Ankara (MVA) en el que se ha insertado el mismo transgén que en el OMG GAd-CALR-JAK2.

Evaluación del riesgo. Identificación de riesgos potenciales MVA-CALR-JAK2

-Estabilidad fenotípica y genotípica

Para determinar la estabilidad genética del vector clínico se aislaron muestras después de 10 pases consecutivos en células AGE1.CR.pIX, se analizaron mediante NGS y se compararon con muestras del lote de investigación MVA. Estos 10 pases superan el número de pases del proceso de fabricación.

Los datos de NGS se alinearon y analizaron para determinar la presencia de mutaciones con una frecuencia superior al uno por ciento. Utilizando este umbral mínimo de detección, no se detectaron mutaciones (variantes de nucleótido único o pequeñas inserciones o delecciones) en ninguna de las muestras analizadas, lo que indica estabilidad genética.

-Virus competentes para la replicación.

El vector MVA no es capaz de replicarse en los mamíferos debido a una delección de unos 30 kb, perdida durante el proceso de atenuación. Se considera extremadamente improbable que el MVA pueda readquirir esta secuencia suprimida tan grande de un virus relacionado.



-Biodistribución

Biodistribución en modelos animales:

El perfil de biodistribución del MVA-CALR-JAK2 se ha evaluado en un estudio no clínico utilizando conejos blancos de Nueva Zelanda. Los animales recibieron una única administración intramuscular del vector a una dosis de 2×10^8 IFU por animal. Posteriormente, los conejos fueron eutanasiados en los días 2, 8, 31 y 120 después de la inyección. Se recogieron tejidos (médula ósea, prosencéfalo, corteza visual, corazón, iliaco, ganglios linfáticos poplíteos y mesentéricos, riñón, hígado, pulmones, músculo del lugar de la inyección y piel, gónadas, bazo, timo, sangre) para analizar el ADN del vector mediante PCR cuantitativa (qPCR).

No se encontraron cantidades cuantificables o detectables de ADN de MVA-CALR-JAK2 en la médula ósea, el prosencéfalo, el corazón, los ganglios linfáticos, el riñón, el hígado, los pulmones, la piel, el bazo, las gónadas, el timo, la corteza visual o la sangre. En los días 2, 8 y 31, las muestras del músculo y de la piel del lugar de la inyección fueron positivas en la mayoría de los animales, y el número de copias más alto se midió en el músculo el día 2.

Los datos demuestran que el vector no permanece ni se replica en los tejidos después de la administración. Se detecta principalmente en el lugar de la inyección (muestras de músculo y piel) y se observó una disminución de las cantidades de ADN del vector a lo largo del tiempo.

-Propiedades de excreción en seres humanos:

Los vectores clínicos derivados de MVA son incapaces de causar una infección productiva en las células humanas y, por lo tanto, no se espera que se produzcan diseminaciones. Esto se ilustra en un estudio en el que tras la administración de un vector derivado de MVA que codifica la MUC1 humana se recogieron muestras de orina en varios puntos temporales tras la inyección, siendo todas ellas negativas para la presencia de partículas virales analizadas mediante PCR y por cultivo viral. Aunque en el estudio descrito anteriormente se utilizó una cepa de MVA diferente, es probable que los datos sean similares para el MVA-CALR-JAK2 según las características de ambos vectores MVA. Independientemente de lo anterior, pueden producirse fugas en el lugar de la inyección.

En conclusión, la probabilidad de que el vector clínico derivado de MVA se excrete al medio ambiente en cantidades relevantes después de la administración, más allá de su posible presencia inicial en el lugar de la inyección, es insignificante.

Manipulación, control y tratamiento de residuos

En la reconstitución, manipulación y administración del OMG se aplicarán las medidas higiénicas hospitalarias estándar. El personal médico debe utilizar bata y guantes.

Para la aplicación de las medidas de descontaminación y desinfección tras la administración de la vacuna o en caso de derrame accidental se utilizarán detergentes y métodos validados aptos para los vectores adenovirales. Los adenovirus se inactivan fácilmente con distintos desinfectantes como, por ejemplo, Virkon S al 0,9 % (> 5 minutos de contacto), cloro al 0,2 %, ortoformaldehído al 0,55 % y glutaraldehído al 2,4 %. Además, los adenovirus se pueden inactivar con calor (p. ej., 56 °C durante 30 minutos, 60 °C durante 2 minutos) o esterilización por autoclave.

Al igual que todos los virus de la viruela, el MVA muestra una gran estabilidad ambiental con una alta resistencia a la desecación hasta 39 semanas al 6,7 % de humedad a 4 °C y una mayor tolerancia a la temperatura en comparación con otros virus. Además, el virus de la variolovacuna y, por tanto, también el MVA, pueden sobrevivir fuera del huésped, por ejemplo, en superficies, hasta 24 horas. El



MVA es un virus con envoltura y susceptible a varios desinfectantes activos contra los virus. Por ejemplo, se inactiva mediante el tratamiento con etanol del 50 al 60 % durante 1 minuto, isopropanol del 40 al 60 % durante 1 minuto y ácido peracético del 0,005 al 0,1 % durante 1 minuto.

Los residuos generados a partir de materiales que entren en contacto con los OMG, así como los restos del medicamento en investigación, deberán ser gestionados como residuos biopeligrosos de acuerdo con los procedimientos de cada centro.

No se consideran necesario recomendaciones a los pacientes para evitar la diseminación, pero de acuerdo con la evaluación del riesgo que presentan, se recomienda aplicar un apósito adhesivo en el lugar de la inyección para evitar la diseminación.

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 11 de enero de 2023