



## EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE VIRUS DEL HERPES SIMPLE MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/20/25)

### **Título del ensayo**

Estudio de fase II, aleatorizado, controlado y de etiqueta abierta sobre Cemiplimab como agente en monoterapia y en combinación con RP1 en pacientes con carcinoma espinocelular avanzado, del promotor Replimune Inc

### **Características del ensayo**

El promotor propone un período para la liberación de enero de 2021 hasta enero de 2023.

RP1 se administrará intratumoralmente a una dosis inicial de  $1 \times 10^6$  UFP/ml (hasta 10 ml) seguida, 3 semanas después, de inyecciones a una dosis de  $1 \times 10^7$  UFP/ml (hasta 10 ml por dosis) cada 3 semanas (hasta un máximo de ocho dosis).

En el ensayo clínico participarán el Hospital Clínic de Barcelona, el Hospital Universitario La Princesa, el Hospital Universitario Vall d' Hebrón, el Hospital General Universitario de Valencia, el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, la Clínica Universidad de Navarra y la Fundación Jiménez Díaz.

### **Características del OMG**

El OMG, RP1, se generó modificando el genoma del virus del herpes simple VHS-1, cepa RH018A, para suprimir funcionalmente los genes ICP34.5 y ICP47 del esqueleto vírico y para insertar un casete de expresión que codifica el gen del GM-CSF humano (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos) y un casete de expresión que codifica GALV-GP-R- (proteína superficial del virus de la leucemia de gibones (GALV-GP) con delección de la secuencia R-), en el gen ICP34.5.

La proteína ICP34.5 del VHS-1 fomenta la neurovirulencia, ya que permite que el virus se replique en células no divisibles como las neuronas, por lo que la delección de ICP34.5 permite que el virus se replique selectivamente en tumores.

La función del ICP47 es bloquear la presentación de antígenos a las moléculas de clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad mediante el bloqueo del transportador asociado con el procesamiento I y II de los antígenos. Esta supresión permite también el aumento de la expresión del gen US11. Esto promueve el crecimiento del virus en las células cancerígenas sin disminuir la selectividad del tumor.

Se pretende que la activación de GM-CSF durante la respuesta inmune que sigue a la inyección intratumoral provoque una respuesta inmune al promover la entrada y activación de células dendríticas. El aumento de células dendríticas también puede contribuir a la presentación de antígenos asociados al tumor por parte de las células tumorales, y los linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos del tumor, para estimular así una respuesta antitumoral sistémica y específica.

La expresión de GALV-GP-R- provoca la formación de fusiones celulares (syncitio) en las células tumorales infectadas mediante la unión al receptor PiT-1, expresado de forma constitucional, a GALV. Esto provoca la muerte de las células por fusión de sus membranas. Como RP1 se replica selectivamente en las células tumorales, se minimiza la expresión de GALV-GP-R- en los tejidos normales. La destrucción oncolítica de las células tumorales provoca la liberación de antígenos



asociados al tumor que se prevé activen una respuesta inmune antitumoral, aumentada por la expresión local de GM-CSF. Se prevé que este efecto se vea aún más aumentado gracias a la muerte celular asociada a la fusión mediada por GALV-GP R- que también se espera que contribuya a este efecto inmunitario. La respuesta inmune generada podría entonces llevar a la destrucción inmune de tumores distantes que no han recibido inyección, y/o retraso en la progresión de tumores distantes, y/o como vacuna contra la recidiva.

### Organismo Receptor

Virus del herpes simple 1 (VHS-1), cepa RH018A.

El único hábitat natural conocido para el VHS-1 de tipo silvestre es el ser humano, pero los primates no humanos en cautividad se pueden infectar accidentalmente. Es posible infectar a conejos y roedores de forma experimental. No se tiene conocimiento de que el VHS-1 tenga capacidad zoonótica y las infecciones entre especies provocadas por herpesvirus son infrecuentes.

El VHS-1 se transmite principalmente por contacto boca-boca, provocando una infección herpética oral, a través del contacto con el VHS-1 que hay en las vesículas, la saliva y las superficies de dentro y alrededor de la boca. El VHS-1 se puede transmitir desde las superficies de la boca y la piel cuando hay excreción asintomática, pero el mayor riesgo de transmisión aparece cuando hay vesículas activas.

La infección con VHS-1 suele ocurrir en la mucosa orofaríngea. El virus entra las terminaciones nerviosas sensoriales adyacentes a las células infectadas y viaja mediante transporte axonal retrógrado a los ganglios radicales posteriores donde establece una infección latente vitalicia en los cuerpos de las células neuronales. Inmediatamente después de la infección, el virus se replica en estas neuronas, pero al cabo de unos días ya no es posible detectar el virus. La latencia se mantiene mediante la retención vitalicia del ADN del VHS-1 en estado silenciado con represión de todos los genes líticos del virus y la ausencia de producción de proteínas virales. No obstante, hay una región del genoma viral que se mantiene activa durante la latencia y codifica un ARN regulador conocido como transcritos asociados a la latencia (LAT).

El genoma mantiene su estado de latencia, que reactiva periódicamente para retomar la replicación y producir virus infecciosos, normalmente en el lugar de la infección inicial. La reactivación del virus conlleva el transporte anterógrado de las partículas y las proteínas del virus hasta la piel o la mucosa, lo que provoca la excreción asintomática o sintomática del virus.

La proteína ICP34.5 se ha identificado como un factor importante de la virulencia del VHS-1 debido a su capacidad para: (i) contrarrestar la respuesta inmune innata contra la infección, (ii) inhibir la autofagia celular; y (iii) participar en la salida y la liberación del virus.

### Modificación genética

La modificación genética de VHS-1 se realizó de forma secuencial utilizando distintos plásmidos para la delección de ICP47 y la inserción de las casetes de expresión de hGM-CSF y GALV-GP-R, mediante recombinación homóloga, para lo cual se llevó a cabo cotransfección de células BHK con el ADN viral y los plásmidos.

El virus RP1 se obtiene utilizando células Vero (células epiteliales renales de mono verde africano).



## **Evaluación del riesgo para el medio ambiente**

### **-Estabilidad genética**

Se han secuenciado las regiones modificadas del genoma de RP1, ICP34.5 y ICP47, y la secuencia de nucleótidos que las enmarcan. La secuencia de nucleótidos del inserto presente en la región ICP34.5 y de la delección de la región ICP47 son idénticas a las secuencias esperadas, salvo por la sustitución de un nucleótido en el promotor que regula la expresión de hGM-CSF. En la secuencia de nucleótidos que enmarca las modificaciones se observaron pequeñas diferencias con la secuencia esperada. Estas diferencias eran de esperar, dado que estas regiones se basaron en la secuencia de la cepa de VHS-1 17syn+, y RP1 se construyó a partir de un aislado nuevo de VHS-1.

Las secuencias de la delección ICP47 en MVSS (Master Virus Seed Stock, siembra de virus maestro) y WVSS (Working Virus Seed Stock, siembra de virus de trabajo) eran idénticas, salvo diferencias menores observadas en las regiones que enmarcan la región ICP47.

En resumen, las secuencias de nucleótidos para el inserto ICP34.5-/GALV-GP-R-/hGM-CSF y la delección ICP47 de MVSS y WVSS eran homólogas. El nivel de homología entre la secuencia MVSS y la WVSS fue del 99,8 %, lo que confirma el alto grado de similitud entre las secuencias genéticas en MVSS y WVSS.

### **-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 RP1 y VHS-1 de tipo silvestre, ya que eso implicaría que una misma célula se infectase simultáneamente con ambos. 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 RP1 no se administra en esos lugares, sino en tumores. RP1 no es capaz de replicarse y diseminarse de forma eficaz en el tejido normal, lo que significa que, además, es muy poco probable que RP1 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 RP1 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. Además, se ha demostrado experimentalmente que la recombinación no homóloga no ocurre a niveles detectables entre cepas de VHS.

El casete de expresión GM-CSF/GALV presente en RP1 está insertado en lugar del gen ICP34.5. Por lo tanto, la transferencia mediante recombinación de este casete a una cepa de tipo silvestre se haría en el locus de ICP34.5, lo que acarrearía la delección del gen. Esto significa que, en términos de competencia replicativa, los virus resultantes quedarían inhabilitados de forma similar a RP1 y por lo tanto tendrían una desventaja evolutiva 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.



## **-Patogenicidad**

Los genes de neurovirulencia ICP34.5 se eliminaron de RP1. La delección de ICP34.5 confiere un fenotipo no patógeno, al limitarse la replicación a células tumorales. Se espera que RP1 no sea patógeno en humanos.

## **-Excreción (Shedding)**

Se dispone de datos de biodistribución y excreción de 36 pacientes participantes en la parte de aumento progresivo de dosis/expansión del ensayo clínico de fase I RPL-001-16, en el que se administró a los pacientes RP1 por una de dos vías:

- 1) inyecciones de RP1 directamente en lesiones superficiales en la piel o justo por debajo de ella (N = 16).
- 2) inyecciones de RP1 asistidas mediante métodos de obtención de imágenes (TC o ecografía), en lesiones viscerales profundas (N = 20).

En la fase de aumento progresivo de dosis cada paciente recibió dosis de uno de los tres grupos de nivel de dosis, empezando en  $10^4 - 10^6$  UFP/ml,  $10^5 - 10^7$  UFP/ml o  $10^6 - 10^8$  UFP/ml. Para evaluar la excreción del virus, se midió la presencia de ADN de RP1 mediante qPCR en muestras de sangre, orina, lugar de la inyección, superficie del apósito y frotis de la mucosa. Las muestras positivas en la qPCR se sometieron a pruebas adicionales mediante TCID50.

Los tipos de cánceres de los pacientes de las cohortes superficiales (1a, 2a, 3a) fueron melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de mama no triple negativo, cáncer de cabeza y cuello y carcinoma espinocelular. Los tipos de cánceres de los pacientes de las cohortes profundas/viscerales (1b, 2b y 3b) fueron cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, melanoma, cáncer orofaríngeo, cáncer pancreático y adenocarcinoma del conducto biliar común.

Los datos mostraron que 15 días después de la administración, la presencia de ADN de RP1 es muy baja y no se detectó ningún virus vivo en ninguna de las muestras analizadas hasta la fecha.

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

El transporte interno de RP1 desde el lugar de preparación al lugar de administración debe realizarse en un recipiente sellado, desinfectable, hermético e irrompible con el contenido debidamente etiquetado.

Para la preparación de los viales (solo descongelación) se ha de llevar guantes, protección ocular y bata. Una vez descongelado se debe limpiar la parte superior del vial con alcohol.

Se recomienda llevar protección ocular o mascarilla por si acaso se producen salpicaduras durante la administración.

Las superficies de trabajo y los materiales que puedan estar en contacto con RP1 se descontaminarán con desinfectantes adecuados (como hipoclorito), de acuerdo con los procedimientos del hospital/centro. En caso de vertido accidental, el centro seguirá sus propios procedimientos de limpieza.

La infectividad del VHS-1 de tipo silvestre depende en parte de tener la envoltura intacta. Por lo tanto, cualquier agente químico (solventes lipídicos y detergentes suaves) o inactivación física (deshidratación, calor, pH bajo) que afecte a la envoltura reduce la infectividad. Al igual que el VHS-1 de tipo silvestre, el VHS-1 recombinante es extremadamente susceptible a la deshidratación, y se



inactiva rápidamente fuera de su huésped. RP1 se inactiva de la misma forma que el VHS-1 de tipo silvestre, ya que las modificaciones no influyen en la viabilidad del virus.

El producto que no se haya utilizado y los residuos se deben desechar en recipientes para residuos biológicos que se pueden inactivar mediante esterilización por vapor, desinfección química o incineración.

En caso de exposición accidental debida a salpicadura a los ojos o las membranas mucosas, se deberá lavar la zona con abundante agua limpia durante al menos 15 minutos. En caso de exposición en la piel abierta o por pinchazo con aguja, se deberá lavar exhaustivamente la zona con agua y jabón, o usar un desinfectante para piel. La persona deberá someterse a vigilancia médica para detectar cualquier signo de infección. Se podrá administrar aciclovir u otros fármacos antivirales similares de forma profiláctica ya que RP1 es sensible al tratamiento con aciclovir.

Durante el ensayo se analizarán muestras de sangre, orina, frotis bucal, frotis del lugar de inyección, frotis del exterior del apósito y biopsia tumoral. Todas las muestras de los pacientes se obtienen en el centro médico y se envían directamente al laboratorio central, PPD, para su procesamiento. PPD Laboratories proporcionará al centro todos los suministros del ensayo clínico, incluidos los kits para la obtención de muestras.

En el documento de información al paciente se recogen todas las indicaciones que se les proporcionará 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 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, 8 de febrero de 2021