



## EVALUACIÓN DEL RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE UN VIRUS ADENOSOCIADO MODIFICADO GENÉTICAMENTE

(Notificación B/ES/18/06)

### Título del ensayo

Estudio global de una única dosis y en una sola administración del virus adenoasociado (AAV) AVXZ-101 en lactantes con atrofia espinal presintomática diagnosticada genéticamente y con múltiples copias del gen SMN2 de la empresa AveXis Inc.

### Características del ensayo

El ensayo clínico se realizará en el Hospital Vall d'Hebron,

Los pacientes recibirán una dosis de AVXS-101 en una única administración mediante infusión intravenosa (i. v.). La dosis total en genomas del vector (gv) se calculará sobre la base del peso corporal del paciente. Los pacientes recibirán una dosis de AVXS-101 administrada una sola vez de  $1,1 \times 10^{14}$  gv/kg.

Se incluirá a un mínimo de 15 pacientes con 2 copias del gen *SMN2*, a un mínimo 12 pacientes con 3 copias del gen *SMN2* y a un mínimo de 17 pacientes con 4 copias del gen *SMN2*, que tengan una edad  $\leq 6$  semanas en el momento de administración de la terapia génica (día 1).

Los pacientes podrán recibir el alta hospitalaria 24 horas después de la infusión, a criterio del investigador.

No se realizarán pruebas de presencia de virus en muestras biológicas.

### Organismo receptor

AAV es un parvovirus con un genoma de ADN monocatenario de 4,7 kb; se trata de un virus pequeño que infecta a humanos y algunas otras especies de primates; sin embargo, actualmente no se tiene conocimiento de que cause enfermedades. Se emplea una cepa del AAV9 aislada del ser humano. El AAV9 es un serotipo único en la familia de los virus adenoasociados (AAV) que va dirigido específicamente a las neuronas motoras y que también tiene la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica.

Virus de ADN monocatenario con una cápside icosaédrica sin envoltura. El genoma del AAV consta de repeticiones terminales invertidas (IRT) en ambos extremos de la hebra de ADN, así como dos marcos de lectura abiertos, *rep* y *cap*. El ORF *rep* está compuesto por cuatro genes superpuestos, que codifican las proteínas Rep necesarias para la replicación del ADN, y el ORF *cap* contiene secuencias nucleotídicas superpuestas que codifican las proteínas de la cápside (VP1, VP2 y VP3), las cuales interactúan para formar una cápside de simetría icosaédrica. Las repeticiones terminales invertidas (IRT) flanquean los dos ORF y contienen todas las funciones en *cis* requeridas para la replicación del ADN, el empaquetamiento, la integración en el genoma del huésped y la posterior escisión y rescate.

Los virus AAV solo tienen capacidad de replicación en presencia de un virus auxiliar (por ejemplo, adenovirus o virus del herpes simple).



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

AVXS-101 está compuesto por una cápside del virus adenoasociado de serotipo 9 (AAV9) recombinante, autocomplementario y sin capacidad de replicación ni de integración, que contiene el ADNc del gen SMN humano bajo el control del híbrido formado por el potenciador de citomegalovirus (CMV) y el promotor de la  $\beta$ -actina de pollo (CB), así como dos repeticiones terminales invertidas (IRT) del ADN del AAV de serotipo 2 (AAV2), la secuencia de poliadenilación (poli A) de la somatotropina bovina (BGH) como señal de terminación. La IRT izquierda del AAV se ha modificado para promover la hibridación intramolecular del transgén, formando así un transgén bicatenario listo para la transcripción. Se ha demostrado que esta IRT modificada, denominada “autocomplementaria”, aumenta significativamente la velocidad a la que se transcribe el transgén y se sintetiza la proteína SMN humana resultante. El AAV autocomplementario recombinante se puede emplear para AVXS-101 debido al pequeño tamaño del gen SMN, que permite un empaquetamiento eficiente y una transferencia génica eficiente con menores títulos víricos, en comparación con los vectores de AAV prototípicos monocatenarios. Todo el ADN del AAV9 natural parental se ha eliminado y sustituido por los genes descritos anteriormente.

### **Modificación genética**

AVXS-101 se produce por cotransfección de células embrionarias de riñón humano (HEK) 293 con tres plásmidos:

- Plásmido que contiene el casete de expresión de ADNc del gen SMN, flanqueado por las secuencias de repetición terminal invertidas (IRT) del AAV2;
- plásmido codifica las 4 proteínas rep del AAV parental de serotipo 2 y las 3 proteínas VP de la cápside del AAV parental de serotipo 9;
- plásmido auxiliar de adenovirus, necesario para la replicación del AAV en las células HEK293.

Durante el proceso de fabricación el lisado de las células se somete a distintas filtraciones y ultracentrifugaciones. El producto final se analiza para que cumpla especificaciones respecto al título vírico e identidad del transgen, identidad y pureza de proteínas de la cápsida y porcentaje de cápsidas vacías, entre otras.

## **Identificación de riesgos potenciales**

### **Estabilidad genética**

Todos los análisis de identidad, pureza y calidad han confirmado la estabilidad de AVXS-101. Cuando se administra a las personas, AVXS-101 infecta las células diana pero no se forman nuevas partículas virales. En la célula, múltiples genomas de AVXS-101 se ensamblan para formar grandes concatémeros de ADN bicatenario. Estos concatémeros persisten en la célula en forma de estructuras episómicas estables que son activas desde el punto de vista de la transcripción. En ausencia de un mecanismo intrínseco de variación o inestabilidad genéticas y, sobre la base de la estabilidad genética conocida del AAV parental, se espera que los rasgos genéticos de AVXS-101 sean estables.

### **Patogenicidad**

Ni el AAV parental ni el vector experimental AVXS-101 son patógenos para los seres humanos.



AVXS-101 no contiene los genes virales necesarios para la replicación (*rep*, *cap*) y, por tanto, la replicación es defectuosa aun en presencia de un virus colaborador. Solo en el hipotético caso de que una célula estuviera coinfectada con AVXS-101, un AAV parental y un virus colaborador podría producirse la replicación de AVXS-101, siendo este riesgo insignificante. Por tanto, se espera que la patogenicidad de AVXS-101 sea incluso menor que la de sus virus parentales AAV2 o AAV9, que ya se consideran no patógenos.

### Genotoxicidad

Aunque no se prevé que AVXS-101 se integre en el genoma de la célula hospedadora, las consecuencias a largo plazo de la administración de vectores de AAV a los seres humanos aún no se conocen por completo. Por el contrario, el AAV parental, que tampoco es patógeno, tiene la capacidad de integrarse de forma estable en el genoma de la célula hospedadora, concretamente en un lugar específico (denominado AAVS1) del cromosoma 19 humano. Dado que en el producto AVXS-101 se han empleado AAV9 previa eliminación de todo el ADN natural de las cápsides, entre ellos los genes responsables de la integración en el genoma, salvo las repeticiones terminales invertidas, se cree que el posible riesgo de incorporación de AVXS-101 al ADN cromosómico del paciente es significativamente menor.

### Formación de virus adenoasociados recombinantes

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). En el caso de AVXS-101, dicha recombinación solo podría originar el intercambio del casete de expresión del SMNh 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. Por tanto, el único mecanismo por el que el transgén podría movilizarse es a través de una infección triple de la misma célula por AVXS-101, un AAV parental, que proporciona las funciones de los genes *rep* y *cap*, y un virus colaborador. Se espera que este caso sea un suceso raro y que solo dé como resultado la producción de más AAV parental y más partículas del vector AVXS-101, que seguiría careciendo de los genes *rep* y *cap* y, en consecuencia, no podría ser autónomo.

### Transferencia génica

Las modificaciones genéticas no afectan a la especificidad por su hospedador natural ni al tropismo tisular. Es posible que pueda interactuar con otros virus con los que el paciente entre en contacto, por ejemplo, rinovirus, adenovirus o herpesvirus. Si sucediera, el OMG podría formar un virus que causaría una infección si el paciente y las células para el rescate, la replicación y el empaquetamiento también estuvieran expuestos al AAV2 parental. Sin embargo, el rescate, la replicación y el empaquetamiento se detendrían a medida que el sistema inmunitario del paciente fuera eliminando los virus colaboradores, como rinovirus, adenovirus o herpesvirus. Esta situación improbable ha sido estudiada. En cultivo celular, el genoma del AAV recombinante puede ser rescatado y replicado a través de una superinfección por el AAV parental y un virus colaborador. Sin embargo, los experimentos de rescate *in vivo* no han podido mostrar el rescate y la replicación, excepto en un caso en el que se administraron dosis muy elevadas del AAV parental y de adenovirus en un entorno particular. Por tanto, la interacción del AAV9 con otros virus para causar una infección parece ser un riesgo mínimo con AVXS-101.



### Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación

AVXS-101 no es patógeno y la proteína humana SMN no tiene efectos tóxicos. No se han notificado efectos adversos para el medio ambiente ni para la salud humana después de la liberación de OMG similares (virus adenoasociados de los serotipos 2 y 9). La excreción del vector se puede detectar en la sangre, la orina, la saliva y las heces durante, como máximo, algunas semanas después de la inyección. En este momento se desconocen los riesgos asociados a la excreción del vector; sin embargo, es poco probable que los haya, ya que el vector no es infeccioso y no tiene capacidad de replicación. De todos modos, se deben proporcionar instrucciones a los familiares y cuidadores de los pacientes con respecto al uso de guantes de protección si van a estar en contacto directo con fluidos corporales o desechos del paciente, y a la importancia de mantener una buena higiene de las manos durante algunas semanas después de la inyección. Además, los pacientes tienen prohibido donar sangre durante los dos años posteriores a la inyección del vector. Las familias recibirán una carta para familiares con instrucciones detalladas.

Las modificaciones genéticas no afectan a su supervivencia fuera del hospedador ni al probable modo de diseminación. La incapacidad de replicación impide la multiplicación y, por ello, limita considerablemente su capacidad de diseminación.

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

Los efectos de la exposición involuntaria de seres humanos a AVXS-101 son los mismos que los de la exposición voluntaria (pacientes): efectos relacionados con la expresión de la proteína SMN, inducción de respuestas inmunitarias anti-AAV9. La probabilidad de que estos efectos ocurran o causen efectos nocivos es insignificante, ya que la exposición involuntaria de seres humanos a AVXS-101 (infeccioso) solo puede ser de varios órdenes de magnitud menor que la exposición del sujeto, debido a la incapacidad de replicación de AVXS-101 y la reducida cantidad y duración, si la hay, de las infecciones por la excreción de AVXS-101 por los sujetos.

La probabilidad de intercambio genético con otros organismos en el ecosistema de liberación es insignificante. AVXS-101 es un vector que no se replica y la administración de AVXS-101 a pacientes se asocia con una exposición limitada del medio ambiente a AVXS-101. Incluso si AVXS-101 se libera al medio ambiente mediante la excreción, debido al bajo número de copias de ADN del vector, la transferencia génica horizontal es muy improbable. Incluso si se produce la transferencia génica horizontal, las secuencias no conferirían una ventaja selectiva a otros organismos como bacterias, puesto que AVXS-101 no contiene ningún promotor procariota, ningún tipo de gen de resistencia a antibióticos o de otro tipo, lo que potenciaría o limitaría su crecimiento. Por tanto, es poco probable que AVXS-101 tenga efecto sobre la dinámica natural de poblaciones microbianas

### Manipulación, control y tratamiento de residuos

A los centros se les solicitará que preparen el lugar en el que se realizará el ensayo clínico de acuerdo con la información contenida en el documento “Información sobre las medidas de contención del riesgo durante la realización de un ensayo clínico”. Además de esto, los profesionales sanitarios implicados en la preparación del producto dispondrán de la información sobre manipulación del producto en el protocolo del ensayo clínico y en las instrucciones de manipulación y farmacia. El promotor capacitará al personal que participe en el ensayo clínico en los procedimientos de manipulación y de farmacia.



AVXS-101 será almacenado en la farmacia del centro bajo la responsabilidad del farmacéutico. El acceso a la farmacia estará restringido. Se utilizarán medidas de seguridad para agentes biológicos de nivel 1, aunque la preparación de la dosis se debe realizar en condiciones estériles y se recomienda el uso de una cabina de seguridad biológica (CSB) para trabajar en condiciones de esterilidad, aunque no es obligatorio. El personal deberá utilizar batas, gafas protectoras cuando se lleven a cabo procedimientos en los que puedan producirse salpicaduras de microorganismos u otros materiales peligrosos, y guantes.

El AVXS-101 será administrado al paciente en una dependencia con acceso restringido, mediante infusión intravenosa. AVXS-101 se administrará una sola vez a través de un catéter venoso introducido en una vena periférica de las extremidades (brazo o pierna) y se infundirá lentamente durante aproximadamente 30 minutos.

El transporte interno de las muestras dentro del centro de investigación debe realizarse en recipientes a prueba de derrames. El documento “Información sobre las medidas de contención del riesgo durante la realización de un ensayo clínico” recoge la actuación en caso de derrame accidental.

El personal del laboratorio local del centro de investigación recogerá y procesará las muestras.

Para la limpieza y desinfección de superficies, suelos y paredes se utilizarán derivados clorados (hipoclorito sódico al 1%). Para limpieza de superficies de dispositivos y material médico no invasivo se utilizará Tristel Duo.

Todos los viales vacíos y las jeringas utilizadas para la manipulación y la administración del vector se deben introducir en bolsas selladas con el símbolo de riesgo biológico y devolver a AveXis, a menos que no esté permitido conforme a los protocolos normalizados de trabajo del centro de investigación.

Todos los materiales utilizados para la inyección que hayan estado en contacto con el vector, como gases estériles, agujas y jeringas, se deben sellar en recipientes primarios y secundarios a prueba de fugas. Todos los residuos se deben colocar en bolsas dobles con el símbolo de riesgo biológico. A continuación, la bolsa se desechará en un contenedor para eliminación de residuos de riesgo biológico. Los desechos biológicos se tratarán conforme a los requisitos del centro y serán incinerados.

**En el caso de que se produzca cualquier incidencia o accidente se deberá informar de manera inmediata a la Autoridad Competente y a la Comisión Nacional de Bioseguridad.**

**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. 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 junio de 2018