



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE ADENOVIRUS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/19/08)

Título del ensayo clínico

Estudio multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo en fase 3 para evaluar la eficacia de un régimen de vacuna heteróloga de Ad26.Mos4.HIV con la glucoproteína gp140 del subtipo C y el mosaico gp140 (diseñada *in silico*) como adyuvantes para prevenir la infección por VIH-1 entre hombres cisgénero y personas transgéneros que tienen sexo con hombres cisgénero y/o personas transgénero, de la empresa Janssen Vaccines and Prevention B.V.

Características del ensayo

El período propuesto por el promotor del ensayo clínico para la liberación es de septiembre 2019 a enero de 2023. En el ensayo participarán el Hospital Universitario Reina Sofía, el Hospital Clínico San Carlos en colaboración con la Clínica Sandoval, el Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, el Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, en colaboración con Barcelona Checkpoint, el Hospital Vall d'Hebron en colaboración con el Centro Drassanes y el Hospital General de Valencia.

El estudio propuesto es un estudio para demostrar la eficacia de un régimen de vacunas heterólogo profiláctico contra el VIH-1, que consta de Ad26.Mos4.HIV y una combinación de la glucoproteína gp140 del subtipo C y el mosaico gp140 coadyuvados con fosfato de aluminio.

Ad26.Mos4.HIV se suministrará en viales de dosis individuales a una concentración de 1×10^{11} pv/ml, para 0,5 ml de inyección intramuscular (IM). Las inyecciones deben administrarse en el deltoides.

Se estima que en España participarán aproximadamente 200 sujetos. El estudio durará aproximadamente 30 meses, incluido un periodo de seguimiento de, al menos, 18 meses después de la cuarta vacunación (hasta el mes 30) en los participantes que siguen siendo negativos para el VIH-1 o hasta 6 meses después del diagnóstico de infección por VIH-1 en los participantes que se infectan con el VIH-1. Los participantes que completen la visita del mes 30 recibirán un seguimiento de infección por VIH, acontecimientos adversos que requieren atención médica (MAAE) y acontecimientos adversos graves hasta el final del estudio (es decir, cuando el último participante complete la visita del mes 30 o si se retira antes) o, si corresponde, hasta que se transfieran a otro estudio realizado por el promotor.

Organismo modificado genéticamente

Ad26.Mos4.HIV es una combinación de cuatro OMG basados en adenovirus (adenovirus humano de tipo 26) no replicativos, que codifican antígenos específicos de VIH-1.

La base para la generación de la vacuna Ad26.Mos4.HIV son los genes que codifican las proteínas Gag, Pol y Env del VIH-1. Se construyó un conjunto de proteínas Gag-Pol mosaico y Env mosaico para aportar cobertura óptima de las secuencias del Grupo M del VIH-1 en la base de datos de la secuencia del VIH-1 de Los Álamos. Este conjunto de proteínas mosaico se



ensambló *in silico* a partir de fragmentos derivados de secuencias naturales mediante un método de optimización computacional.

Vectores

Para crear Ad26.Mos4.HIV se usaron un plásmido y un cósmido en el proceso de modificación, por separado, para cada uno de los cuatro componentes de la vacuna.

Las secuencias de ADN que codifican las proteínas Gag, Pol y Env del VIH-1 fueron optimizadas, sintetizadas y clonadas en los plásmidos adaptadores (pAdapt). El casete de expresión de cada transgén se coloca en la región E1 eliminada usando un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) humano y una señal de poliadenilación (PolyA) derivada de un virus del simio 40 (SV40) para obtener una expresión fuerte y generalizada de cada transgén.

Se utilizaron los plásmidos pAdapt que contienen los genes Mos1.Gag-Pol, Mos1.Env, Mos2.Gag-Pol o Mos2S.Env para generar los cuatro OMG en las células PER.C6®. Para lograrlo se contarnsfectaron los plásmidos pAdapt, cada uno de ellos por separado, junto con un cósmido portador de las secciones restantes del genoma Ad26, en el que el gen Ad26 E3 se ha eliminado parcialmente. En el cósmido el orf6 de E4 de Ad26 fue intercambiado por los de los adenovirus tipo 5 (Ad5) para favorecer la generación de los OMG no replicativos en las líneas celulares complementarias de la región 1 (E1) temprana Ad5 (PER.C6®).

Identificación de riesgos potenciales

-Estabilidad fenotípica y genotípica

El genoma ADNbc (bicatenario) de Ad26 es relativamente estable en comparación con otros virus. La frecuencia esperada de reversión o de pérdida de modificación genética es baja, sin embargo, la posibilidad de una mutación espontánea existe y se mitiga con el siguiente enfoque. Se utilizan las partículas víricas purificadas en placa para producir lotes de inóculos de virus. Los lotes de inóculos de virus se someten a pruebas exhaustivas y se clasifican, lo cual incluye análisis de secuencias y comparación con la secuencia teórica. Los lotes de inóculos de virus que contienen la secuencia correcta sirven como material de partida para la producción de cada lote de virus. Los lotes de virus están sujetos a los análisis de secuencias. Durante la producción de lotes de virus pueden producirse mutaciones. Por tanto, se evalúa la estabilidad genética, tanto genotípicamente como fenotípicamente, 5 pasos más allá del nivel usado para la producción de vacunas. La evaluación genotípica se realiza mediante secuenciación de Sanger de todo el genoma y PCR de estabilidad de transgenes (TGS-PCR, del inglés Transgene Stability Polymerase Chain Reaction). La evaluación de la expresión fenotípica de los transgenes, se analiza mediante Western blot para confirmar la estabilidad genética.

-Adenovirus competentes para la replicación (RCA)

Los OMG contenidos en Ad26.Mos4.HIV son no replicativos y no contienen RCA ($<1 \text{ RCA}/3 \times 10^{10} \text{ pv}$). La tecnología PER.C6®-AdVac que se utiliza para su obtención no permite la generación de RCA. La ausencia de cualquier solapamiento de secuencias entre el ADN adenoviral y la línea celular PER.C6® evita la formación de RCA. Además, se realizan pruebas de seguridad específicas para confirmar la ausencia de RCA con todos los lotes de cada una de las 4 sustancias farmacéuticas contenidas en Ad26.Mos4.HIV.



El ensayo de detección de RCA se realiza de acuerdo con la Farmacopea Europea 5.14 y la guía de la FDA de 2010. El criterio de aceptación de <1 RCA por 3×10^{10} pv se basa en la reunión nº 30 de la comisión BRMAC (Adenovirus Titer Measurements and RCA Levels del 5 de abril de 2001) y en las Directrices de la FDA para revisores y promotores de la FDA: Contenidos y revisión de información sobre química, fabricación y controles (QMC) para aplicaciones de nuevos fármacos en investigación de terapia génica humana, 2008. De acuerdo con la Farmacopea Europea 5.14, el adenovirus RCA se analizará en los lotes finales. Sin embargo, como la sustancia farmacéutica solo está disuelta hasta el medicamento, se considera aceptable estudiar los RCA a nivel de la sustancia farmacéutica.

Hasta el momento, se han realizado pruebas de seguridad en cuanto a la presencia de RCA en más de 90 lotes de OMG generados y todas cumplen los criterios de aceptación.

-Patogenicidad

En comparación con el adenovirus parental, los OMG en Ad26.Mos4.HIV están muy atenuados, ya que no pueden replicarse en células que no expresen la región E1 adenoviral y, por tanto, se considera que no son patógenos.

Las proteínas Gag, Pol, Env, no forman parte de la cápside de los OMG y, por tanto, no influyen en la capacidad de transducción de Ad26 y no cambian el espectro del huésped, el tropismo celular o la estabilidad ambiental. Las secuencias de VIH por sí solas o en combinación con el adenovirus no pueden producir partículas del virus donante. Del mismo modo, estas secuencias no sustituyen las deleciones del receptor Ad26 y, por tanto, no pueden dar lugar tampoco a adenovirus replicativos. Por tanto, la patogenicidad del virus donante no se mantiene en el OMG final.

-Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación

Los adenovirus son extremadamente resistentes cuando se depositan en superficies y después de más de 30 días todavía se puede recuperar de superficies de plástico y metal. La sensibilidad química varía significativamente entre distintos tipos de adenovirus, posiblemente debido a la composición de la cápside viral o a la resistencia de sus ácidos nucleicos. Los adenovirus son resistentes a los desinfectantes de lípidos, pero se inactivan con el uso de formaldehído o cloro. Se pueden inactivar por contacto durante 1 minuto con una dilución 1:5 de lejía, o por contacto durante 2 minutos con geles para manos a base de alcohol.

Los Ad26.Mos4.HIV son no replicativos y requieren de líneas celulares para complementar la E1 recombinante. Fuera de estos entornos celulares específicos, los Ad26.Mos4.HIV pueden transducir células, pero no pueden replicarse o reproducirse. Fuera del huésped, se espera que la capacidad de supervivencia sea la misma que la del Ad26 salvaje. No se espera que los transgenes ofrezcan ventaja alguna respecto a la supervivencia en el medioambiente.

Biodistribución

Se ha evaluado el perfil de biodistribución de Ad26 en conejo utilizando una vacuna frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus respiratorio sincitial (VRS) basada en Ad26. En conjunto, los datos de ambos estudios demuestran una biodistribución limitada e indican un aclaramiento significativo a lo largo del tiempo después de una inyección IM, lo que indica que no persiste y/o se replica en los tejidos después de la vacunación. Además, ambos OMG muestran un perfil de biodistribución comparable en gran medida, a pesar de llevar diferentes transgenes.



En este contexto, se observa que el esqueleto de Ad26 utilizado para la vacuna frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus respiratorio sincitial (VRS) es idéntico, por lo que la única diferencia entre ellos es el transgén. Los adenovirus son virus no envueltos cuya entrada y, por tanto, tropismo, está dictada por interacciones de proteínas de la cápside con receptores celulares específicos. El propio transgén no participa en la formación o la composición de la cápside del OMG por lo que los diferentes insertos de transgenes no afectarán a la estructura de las proteínas ni a la composición de la cápside del OMG. Por tanto, y con el respaldo de los datos descritos antes, la distribución se considera independiente del transgén y, por tanto, el perfil de biodistribución, tal como se observa en la vacuna frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus respiratorio sincitial (VRS), se considera predictivo para Ad26.Mos4.HIV cuando se administra mediante la misma vía (intramuscular) de administración.

En estudios clínicos previos utilizando vacunas para el virus del Ébola y VIH basadas en Ad26, no pudieron observarse signos de excreción del Ad26 de la vacuna o del adenovirus después de la administración mediante inyección IM.

Se dispondrá de datos adicionales de excreción de Ad26.Mos4.HIV del estudio en Estados Unidos y Kenia con aproximadamente 30 participantes y datos sobre la excreción de Ad26.RSV.preF (con transgén de VRS) del próximo estudio (24 participantes) en Bélgica. En ambos estudios, se estudiará la presencia de ADN de Ad26.Mos4.HIV mediante una PCR cuantitativa y se detectaría el adenovirus salvaje, replicativo y los OMG.

-Riesgo de transferencia genética

La transmisión de material genético desde Ad26.Mos4.HIV al genoma de los sujetos destinatarios del estudio es altamente improbable. Se considera a los adenovirus como virus no integrativos y se comportan como elementos extracromosómicos. La inserción del transgén y el proceso de fabricación no han cambiado el rango de huéspedes y el tropismo celular. Además, durante la construcción de Ad26.Mos4.HIV, no se han insertado genes que confieran ventajas selectivas tales como genes de resistencia bacteriana o fármacos antivirales. Ad26.Mos4.HIV tampoco contiene promotores procarióticos y no contiene secuencias que permitan moverse después de la transducción de las células diana. En el gen *Gag-Pol* que codifican para las proteínas responsables de la transcriptasa inversa y de la integrasa del VIH, se incorporaron mutaciones puntuales en 20 lugares enzimáticos cruciales, para destruir la función de dichas proteínas. Además, se eliminó el gen de la proteasa del gen de *Pol* como medida adicional para evitar que la poliproteína Gag-Pol se dividiera en sus proteínas de función. Por tanto, las probabilidades de transferencia genética a otras especies según las condiciones de liberación propuesta son bajas.

Un posible riesgo es que Ad26.Mos4.HIV transduzca una célula que haya sido infectada con un adenovirus para formar un nuevo OMG, con capacidad de recombinación, que podría propagarse en el entorno. Para que esto suceda, se necesitan secuencias homólogas entre los Ad26.Mos4.HIV y otros adenovirus salvajes. De acuerdo con los estudios de biodistribución no clínicos, después de la inyección intramuscular (que es la vía de administración clínica), el ADN del OMG adenoviral se encuentra en el lugar de administración, los ganglios linfáticos de drenaje y en el bazo, mientras que el ADN del adenovirus salvaje se encuentra en el tejido linfóide de las mucosas. Como no es probable que el ADN de Ad26.Mos4.HIV y el ADN del adenovirus salvaje se encuentren en los mismos compartimentos del cuerpo, esto reduce el riesgo de acontecimientos de recombinación. Además, solo se encuentran pequeñas cantidades de Ad26.Mos4.HIV y de adenovirus salvajes persistentes en los tejidos, lo que reduce extremadamente cualquier



posibilidad de recombinación. En el teórico caso de recombinación, el virus resultante sería menos apto que el virus de infección natural y, por tanto, no podría propagarse. Los acontecimientos de recombinación serían concebibles, pero no probables. Los recombinantes resultantes, sin embargo, no representarían un mayor nivel de riesgo que una infección natural ya presente. Tales recombinantes no podrían propagarse en el cuerpo humano o en el entorno.

Otro posible riesgo es la liberación en el entorno mediante la transcomplementación de las funciones eliminadas de E1 por proteínas virales alternativas de otros virus. En la bibliografía se describe que los OMG basados en Ad5 no replicativos pueden transcomplementarse mediante proteínas virales alternativas desde otros virus como el virus de Epstein-Barr (EBV) o el VPH. Mientras que el virus de Epstein-Barr se encuentra principalmente en las células B y en las células epiteliales, las infecciones por HPV se restringen a las superficies mucosas en el tracto genital y la orofaringe. En el caso de que Ad26.Mos4.HIV esté presente en el lugar de la infección por el VPH o EBV, solamente una infección por el VPH o EBV lítica podría, en teoría, dar lugar a la replicación de los OMG de la vacuna restringido a las células infectadas por el VPH o EBV.

Manipulación, control y tratamiento de residuos

Antes de iniciar el estudio, el centro médico donde se llevará a cabo se evaluará exhaustivamente para garantizar que las instalaciones sean suficientes para almacenar y administrar la vacuna, así como que tengan las instalaciones adecuadas para la recogida y almacenamiento de muestras humanas. Todo el personal del centro médico involucrado en el manejo o la administración de la vacuna del estudio recibirá formación de acuerdo con el protocolo del estudio y con toda la documentación de respaldo, incluidos los manuales de laboratorio específicos y los materiales de ensayos clínicos. La formación, entre otros temas, se centrará en el manejo seguro de Ad26.Mos4.HIV.

El producto se debe almacenarse en frío (2°C a 8°C) en un lugar seguro y controlado con un doble embalaje, cuyo embalaje exterior sea a prueba de pérdidas y roturas. Las vacunas congeladas del estudio solo podrán transportarse en cajas térmicas especiales anti-vertido accidental con nieve carbónica y con un dispositivo de control de temperatura. La preparación del producto se debe realizar empleando una técnica aséptica; por lo tanto, es preferible hacerlo en una campana de flujo laminar o una cabina de seguridad biológica. El producto puede manipularse fuera de la cabina de bioseguridad para lo cual se debe extraer directamente desde el vial a la jeringa para su administración (para evitar la exposición a aerosoles y proteger el producto). Como parte de las precauciones que se toman habitualmente, el personal sanitario deberá usar batas y guantes y lavarse las manos antes y después de manipular el producto. En la administración del producto se deberán evitar la formación de aerosoles y los derrames accidentales. Tras la administración se desinfectará la zona donde se aplicó la inyección y se colocará un parche. Este parche absorberá cualquier vector viral que pueda gotear del pinchazo. Después de que haya terminado el tiempo de observación de 30 minutos, el enfermero del estudio desinfectará el lugar de la inyección una vez más y cambiará el parche.

Todos los residuos se eliminarán como residuos infecciosos de categoría III.

No se considera que sean necesarias recomendaciones para los participantes en el ensayo clínico. Únicamente informaran a los pacientes que no debe donar sangre, productos sanguíneos, óvulos, semen ni tejidos.



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 a 4 de noviembre de 2019