



## EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE VIRUS ADENOASOCIADOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/20/22)

### **Título del ensayo**

Estudio de fase 3 sin enmascaramiento y de un solo grupo para evaluar la eficacia y la seguridad de PF-07055480 (terapia génica con el VAA2/6 recombinante/factor VIII humano) en varones adultos con hemofilia A entre moderadamente grave y grave (FVIII: C  $\leq$  1 %), del promotor Pfizer, Inc.

### **Características del ensayo**

El promotor propone un período de liberación de marzo de 2021 hasta mayo de 2021.

PF-07055480 se administra en una sola infusión intravenosa en dosis de  $3.0E+13$  genomas de vector por kg de peso corporal (vg/kg). Están previstos aproximadamente 63 pacientes en total y 5 pacientes en España ( $\geq 18$  y  $< 65$  años). Antes de la administración se comprobará si los sujetos presentan o no anticuerpos neutralizantes contra AAV6 y anticuerpos contra el FVIII.

En el ensayo clínico participarán el Hospital Universitario Río Hortega, el Hospital Universitario La Paz, el Hospital Universitari i Politecnic La Fe de Valencia y el Hospital Universitario Vall d'Hebrón.

Se espera que cada sujeto permanezca en el estudio unos 5 años y que el estudio dure aproximadamente 6 años. El tratamiento se administrará una vez mediante infusión IV y el resto del estudio se utilizará para observar los efectos del tratamiento.

Cabe esperar que la carga vírica diseminada en los líquidos corporales sea baja en comparación con la dosis necesaria para lograr una expresión génica detectable en los seres humanos. La diseminación del vector se evaluará en plasma, CMSP (“células mononucleares de sangre periférica”), saliva, semen y orina. Se obtendrán muestras en el momento basal y todas las semanas después de la intervención del estudio hasta que 3 muestras consecutivas den negativo para el tipo de muestra.

### **Organismo Genéticamente Modificado**

PF-07055480 es un virus adenoasociado que deriva de AAV6 que codifica el ADN complementario (ADNc) del factor VIII humano (hFVIII) con delección del dominio B (DDB). El transgén de hFVIII está bajo el control de un promotor específico del hígado, inactivo en las células y tejidos extrahepáticos, lo que impide la expresión y la actividad del hFVIII en los tejidos no diana. El transgén de hFVIII consta de un la secuencia de hFVIII con codones optimizados, incluido el péptido señal del hFVIII natural, y está flanqueado por repeticiones terminales invertidas (ITR) del AAV del serotipo 2. El hFVIII secretado tiene la misma secuencia de aminoácidos que los factores antihemofílicos recombinantes aprobados (Refacto® y Xyntha®).

La eliminación de los genes *rep* y *cap* hace que PF-07055480 no sea competente para la replicación incluso en presencia de un virus colaborador (adenovirus o virus del herpes). La replicación de PF-07055480 requeriría la presencia de un AAV de tipo silvestre y la infección simultánea por un virus colaborador.



### Obtención del vector viral (OMG):

PF-07055480 se obtiene tras la coinfección de células de insecto Sf9 por dos baculovirus recombinantes portadores uno de la secuencia que codifica la proteína rep de AAV2 y la cápside de AAV6, y el otro del transgen. La recolección se realiza mediante lisis química y filtración en profundidad, seguida de una etapa de inactivación de virus encapsulados mediante detergente, dos etapas cromatográficas (cromatografía de afinidad y cromatografía de intercambio aniónico), una etapa de filtración con retención de virus y otra de ultrafiltración/diafiltración para conseguir la concentración y la composición del tampón deseadas para la formulación y el llenado.

### Evaluación del riesgo

#### - **Ausencia de formación de virus competentes para la replicación (RCV).**

La presencia de partículas víricas infecciosas competente para la replicación se analiza mediante la infección en células de riñón embrionario humano 293 (HEK 293) que se coinfectan por duplicado con el vector AAV solo o con AAV de tipo silvestre, en presencia de adenovirus de tipo 5 (Ad5). La infección se repite durante un total de tres ciclos y después de cada ciclo se extrae ADN y se analiza mediante PCR la presencia del gen *rep* de AAV2 (debe estar presente para la replicación).

El criterio de aceptación establecido es la no detección de RCV. No se han detectado RCV en los lotes clínicos fabricados hasta el momento.

#### - **Estabilidad.**

El virus adenoasociado es un virus de ADN monocatenario con una gran estabilidad genética, según pone de manifiesto la estrecha relación existente entre los genes *rep* y *cap* de distintos serotipos y genovares de AAV. Por lo general, el grado de conservación de la secuencia génica del gen *rep* es mayor que el de *cap*, si bien suele ser >90 % y >80 %, respectivamente.

Además, el AAV utiliza las ADN polimerasas del huésped para la replicación viral, que se caracterizan por una polimerización de ADN de alta fidelidad y una actividad de exonucleasa de corrección adicional que conduce a una tasa de error de replicación del ADN muy baja.

Se cree que se ha producido recombinación homóloga entre los serotipos AAV2 y AAV3, a tenor de un análisis filogenético del virus híbrido AAV2/3; sin embargo, esta no se ha observado en otros serotipos, lo cual respalda que únicamente en la circunstancia presumiblemente rara de que una célula sea infectada de manera simultánea por dos serotipos diferentes de AAV y un virus colaborador (infección triple) se darían las condiciones adecuadas para que se produjera tal recombinación.

Se espera también que PF-07055480 sea genéticamente estable. Además, cada lote del producto terminado destinado al ensayo clínico está sujeto las siguientes pruebas:

- Análisis de la pureza de la cápside del vector mediante electroforesis capilar en gel en condiciones reductoras (CGE).
- Identificación de la cápside del vector mediante ELISA.
- Titulación genómica del vector mediante PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR), amplificando y cuantificando simultáneamente la secuencia del hFVIII.
- Secuenciación de cada lote clínico.

En los lotes analizados hasta el momento no se han observado desviaciones de los criterios esperados.



#### - **Biodistribución y excreción del vector clínico (Shedding).**

Los estudios de biodistribución en animales confirmaron que PF-07055480 es preferentemente hepatotropo. Se observó una relación dosis-respuesta en la concentración del genoma del vector en el tejido hepático. La concentración del genoma del vector PF-07055480 fue baja en el bazo, el pulmón, el riñón y el corazón, e indetectable en el cerebelo, la corteza cerebral frontal y los testículos en todos o la mayoría de los animales tratados. Además, como reflejo del hepatotropismo y del módulo promotor específico del hígado, la expresión del ARNm del hFVIII se limitó al hígado y no se detectó en ningún otro tejido.

PF-07055480 se está investigando en un ensayo de fase 1/2 en curso (estudio SB-525-1603). En este estudio se ha evaluado la excreción del vector mediante qPCR de muestras de saliva, orina, semen, heces y plasma. Los datos preliminares indicaron que, en general, la excreción del vector fue máxima durante las dos semanas siguientes a la infusión del vector y disminuyó gradualmente en todos los tipos de muestras. La eliminación total se definió como la presencia de 3 muestras negativas consecutivas, determinadas mediante qPCR en pacientes con hemofilia A grave (actividad del factor VIII <1 %).

El último punto temporal con positividad considerando las muestras de plasma de todos los pacientes fue la semana 36, y la mayoría de los pacientes tuvieron la última muestra de plasma positiva en la semana 8 o antes.

No se dispone de datos que indiquen transmisión del vector AAV a la descendencia de un varón expuesto. De todas formas, como precaución para evitar la transmisión del vector viral a la pareja mediante excreción, los varones deberán usar preservativo durante las relaciones sexuales hasta que no se detecte el vector en el semen en 3 ocasiones consecutivas. Estas indicaciones, además de otras medidas para evitar la diseminación, se recogen en Consentimiento Informado para el paciente.

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

En el documento de “Instrucciones sobre seguridad para los investigadores principales y el personal” se recoge las instrucciones para almacenar el producto, la preparación de la dosis, los EPI que han de utilizarse, cómo realizar la desinfección, cómo eliminar los residuos y cómo actuar en caso de derrame accidental.

El producto se almacenará en cada centro hospitalario en una zona de acceso restringido. El producto se transportará de forma segura en una bolsa con cierre hermético que luego se coloca dentro de una segunda bolsa también con cierre hermético y de un recipiente resistente a derrames marcado con un símbolo de riesgo biológico, desde su lugar de conservación hasta el lugar en el que se preparará la dosis, que se llevará a cabo en cabina de seguridad biológica Clase II. El acceso en la zona de preparación estará restringido al personal autorizado.

Las muestras de los pacientes a los que se ha administrado el producto se guardarán en una bolsa sanitaria con cierre. Para su transporte, la bolsa se almacenará en un segundo contenedor de paredes rígidas y a prueba de fugas.

Todas las superficies se descontaminarán con un desinfectante adecuado, como hipoclorito de sodio al 10 %, Wescodyne o desinfectante a base de detergente.

Los consumibles usados en la preparación del producto que puedan haber estado en contacto con él se descontaminarán antes de su eliminación (mediante autoclave o mediante tratamiento con un



desinfectante químico adecuado eficaz contra el AAV) o se incinerarán. Los residuos líquidos se descontaminarán usando un desinfectante químico adecuado o mediante autoclave.

Los viales usados y empezados se destruirán una vez finalizada la administración de la dosis como residuos biopeligrosos.

Como mínimo, el personal sanitario deberá utilizar bata desechable de cierre posterior, gafas de seguridad, gafas o protector contra salpicaduras, guantes, gorro para el pelo y cubrezapatos.

Se informará a los pacientes y cuidadores, a través del consentimiento informado, de las medidas que deben aplicar para evitar la diseminación del OMG.

Se va a utilizar un servicio de enfermería a domicilio para la toma de muestras en los pacientes. Disponen de documentos informativos para el personal que participa en la toma de muestras a domicilio en los que se recoge como han de desinfectar, transportar las muestras, los equipos de protección que deben utilizar y la eliminación de residuos en contenedores homologados.

**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 9 de diciembre de 2020