



## EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE UN VIRUS ADENO-ASOCIADOS MODIFICADO GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/18/04)

### **Título del ensayo**

Estudio de la eficacia y seguridad de la inyección bilateral por vía intravítrea de GS010: Ensayo aleatorizado, con doble enmascaramiento y controlado con placebo en sujetos afectados con neuropatía óptica hereditaria de Leber G11778A ND4 desde hace un año, de la empresa GenSight Biologics.

### **Organismo receptor**

Los virus adeno-asociados (AAV) de serotipo 2 son parvovirus con un genoma de ADN monocatenario de 4,7 kb, con cápside icosaédrica y sin envoltura; 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.

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

Los AAV no son patógenos. Desde hace tiempo se sabe que los AAV se integran en cultivo celular en el contexto de una infección natural, aunque requiere la proteína Rep para su integración de forma dirigida. Sin embargo, existen pocos datos *in vivo* que avalen una integración eficiente (dirigida o aleatoria) tras la infección natural por AAV en el huésped primate. Tras la infección natural, es probable que el ADN del AAV persista predominantemente en forma de episoma circular extracromosómico y se integre con mucha menos frecuencia en el genoma del huésped.

### **Organismo Modificado Genéticamente**

El OMG, VAA2r, VAA2r/2-ND4 o GS010, consiste en un virus adeno-asociado al que se le han eliminado los genes víricos y solo contiene las secuencias ITR, y que expresa el gen mitocondrial de la NADH deshidrogenasa tipo 4 humana. Las secuencias ITR actúan como origen de replicación y como señal de acondicionamiento del genoma del vector, cuando las funciones colaboradoras de AAV y adenovirus se proporcionan en *trans*.



## **Características del ensayo**

El OMG se administrará por inyección intravítrea en un ojo de los pacientes de  $9 \times 10^{10}$  vg. El ensayo clínico se realizará en el Hospital Universitario Ramón y Cajal, en el Servicio de Oftalmología.

Se controlará la presencia de GS010 en muestras de sangre hasta 4 semanas después del tratamiento en la visita de selección (visita 1), semana 2 (visita 5) y semana 4 (visita 6). En estudios previos se ha establecido la diseminación a través de sangre y orina pero en cantidades insignificantes.

## **Identificación de riesgos potenciales**

### **Estabilidad genética**

En la célula, múltiples genomas de GS010 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 GS010 sean estables.

Además, para la liberación del producto se realiza, entre otros, el análisis de la secuenciación del ADN vírico.

### **Patogenicidad**

En condiciones naturales, los VAA2 de tipo silvestre en presencia de un virus auxiliar (adenovirus) se transmiten solo a humanos o a primates no humanos y no se sabe que colonice otras especies.

Loa AAV no parece causar ninguna enfermedad en humanos y ninguno de sus parientes zootrópicos cercanos causa ninguna enfermedad conocida en animales.

No se espera que GS010 sea patógeno, además, no contiene los genes virales necesarios para la replicación y, por tanto, no puede replicarse aun en presencia de un virus colaborador. Por otra parte no se espera que la proteína ND4 pueda producir alergenicidad o toxicidad a los no pacientes (personal sanitario, familiares, cuidadores, etc.).

### **Genotoxicidad**

La mayoría de los estudios *in vivo* de la transferencia génica mediada por AAV recombinantes han permitido concluir que el vector se mantiene en las células transducidas esencialmente como episomas extracromosómicos. Sin embargo, dependiendo del tipo de célula, el mantenimiento del genoma de los AAV se produce bajo múltiples formas. En músculo, las formas episomales parecen ser casi el modo exclusivo de persistencia, mientras que en células hepáticas, se han documentado hasta un 5 % de formas de ADN integrado.

La mutagénesis por inserción accidental y los efectos adversos subsiguientes, tales como la alteración de genes o la activación de oncogenes, relacionada con el uso de vectores de AAV, se considera actualmente una posibilidad muy poco frecuente. Cabe destacar que hasta la fecha no se ha documentado en la bibliografía ningún efecto adverso real e inequívoco atribuible a AAV recombinantes, concretamente en animales a los que se ha sometido a seguimiento durante un período prolongado.



Dado que en el producto se han eliminado los genes responsables de la integración en el genoma, cabe prever que la inmensa mayoría de los genomas de GS010 presentes en el interior de las células de los sujetos sean episómicos, en lugar de quedar integrados en el ADN de las células huésped.

### **Formación de virus adeno-asociados 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 GS010, dicha recombinación solo podría originar el intercambio de la casete de expresión 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 GS010, 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 GS010 (que seguiría careciendo de los genes *rep* y *cap* y, en consecuencia, no podría ser autónomo).

La ausencia de AAV competentes para la replicación (rcAAV) se analiza en los lotes de OMG antes de la liberación para su uso clínico en el principio activo.

### **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, por lo que el riesgo sería insignificante.

Además se ha eliminado la mayoría del material genético vírico, reduciendo la capacidad de recombinación y/o la capacidad de proporcionar secuencias a otros organismos.

### **Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación**

La excreción del OMG se ha podido detectar en la sangre y lágrimas algunos días después de la inyección. En este momento se desconocen los riesgos asociados a la excreción del OMG, sin embargo, es poco probable que los haya, ya que el OMG no es infeccioso y no tiene capacidad de replicación.

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.

Se evaluará la presencia de ADN de GS010 en las muestras de sangre para determinar el número de copias de ADN.



Por otra parte se detecta presencia del OMG en las lágrimas de pacientes durante la primera semana tras la administración. El promotor recomienda varias medidas a los pacientes para prevenir la diseminación de los OMG en el medio ambiente, como se indica a continuación:

- Siempre que sea posible, cubra el ojo del paciente con un parche oclusivo o unarotección equivalente durante al menos 72 horas.
- Aconseje al paciente que use gasas para limpiarse el ojo, si es necesario, si el ojo no está tapado o cuando se quite el parche.
- Retire el parche oclusivo, si se usa, introduzca las gasas en una bolsa de plástico y añada media taza de hipoclorito de sodio (desinfectante de lejía) antes de desecharlas como residuo urbano.
- Advierta a los pacientes que eviten tocarse el ojo en el que se administre el producto y pídale que se laven las manos frecuentemente con jabón.

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

Dado que GS010 carece de capacidad de replicación, las partículas virales diseminadas no pueden multiplicarse y, por consiguiente, su dispersión se encuentra limitada de manera inherente. Además, una exposición mínima, como la exposición ambiental, de personas distintas de los sujetos que reciban GS010 como parte del ensayo no sería una dosis suficiente para representar una expresión génica significativa ni problemas de seguridad para los seres humanos.

La probabilidad de intercambio genético con otros organismos en el ecosistema de liberación es insignificante. Incluso si GS010 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 GS010 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 GS010 tenga efecto sobre la dinámica natural de poblaciones microbianas.

#### Manipulación, control y tratamiento de residuos

Los centros que participan en el ensayo clínico almacenarán el producto a  $\leq -70$  °C en un congelador de acceso restringido del servicio de farmacia. La reconstitución de GS010 se realiza en la farmacia del centro según el protocolo de reconstitución de GS010 suministrado por el promotor. La reconstitución debe realizarse por personal cualificado en condiciones asépticas en una cabina de seguridad biológica de clase II o en un aislador o sistema equivalente.

Todos los materiales, incluidos los viales usados y otros elementos potencialmente contaminados con GS010 se recogerán en contenedores específicos para la eliminación y se destruirán mediante autoclavado e incineración.

El personal que manipule el producto deberá utilizar bata, guantes, mascarilla y gafas protectoras.

Tras la liberación del OMG, la sala se controla por completo siguiendo el procedimiento de limpieza y descontaminación utilizando, por ejemplo lejía.



Los viales sin usar se destruirán en el centro, de acuerdo con los procedimientos de eliminación de desechos de OMG (autoclavado e incineración).

**En el caso de que se produzca cualquier incidencia o accidente se deberá informar de manera inmediata 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 10 de diciembre de 2018