



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE UN ADENOVIRUS MODIFICADO GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/19/06)

Título del ensayo

Ensayo de fase I/II que evalúa la seguridad y la tolerabilidad de la administración intratumoral de ORCA-010 en pacientes con cáncer de próstata localizado que no han recibido tratamiento.

Características del ensayo

El período propuesto por el promotor del ensayo clínico para la liberación es del 01/09/2019 hasta el 31/12/2025.

En el ensayo clínico participarán la Start Madrid FJD Hospital Fundación Jiménez y el Hospital Parc Taulí en Sabadell.

El ensayo clínico tiene dos partes:

1. Parte A - Fase I, en la que participarán de 9 a 12 sujetos y se administrará una dosis única de ORCA-010 (3 dosis cohortes: 1×10^{11} - 5×10^{11} - 1.5×10^{12} partículas virales (VP)).
2. Parte B: Fase IIa, en la que participarán 12 sujetos: cohorte de dosis repetida a la dosis máxima tolerada (MTD).

La administración se realizará mediante tecnología guiada por ultrasonografía de alta resolución.

Se recogerá sangre y orina antes y después de la administración para determinar la presencia de ADN de ORCA-010 mediante PCR cuantitativa. La presencia de virus infeccioso se determina mediante un ensayo de formación de placa y/o un ensayo de título infeccioso.

La duración total del seguimiento será de 365 días. Las muestras se tomarán los días 1, 3, 7, 14, 28, 42, 91, 181 y 365. En el estudio de la fase 2 se tomarán muestras adicionales los días 15, 17 y 21.

Se prevé que el OMG infectará a las células cancerosas en los pacientes. Después de la infección, el OMG se replicará en estas células y las matará mediante lisis. El virus liberado durante la lisis celular puede infectar y matar a las células tumorales no infectadas. La presencia del adenovirus y la inducción de la lisis de las células tumorales también estimularán una respuesta inmunitaria en el tumor.

Características del OMG

ORCA-010 es un virus oncolítico con potencia mejorada capaz de destruir tumores de próstata y provocar una respuesta inmune antitumoral en pacientes.

ORCA-010, es un adenovirus serotipo 5 modificado genéticamente que contiene una inserción de 27 nucleótidos en el gen Fiber (RGD), una inserción de un solo nucleótido en el gen E3/19K (mutación E3/19K445A o T1) y una eliminación de 24 nucleótidos en el gen E1A ($\Delta 24$).



Delección de Delta24/Δ24 en E1A: la pérdida de esta función hace que la replicación de adenovirus sea incompetente en células normales con una ruta de pRb (retinoblastoma) funcional. Por lo tanto, los virus que contienen la eliminación de 24 nucleótidos en el gen E1A se replican preferentemente en las células tumorales y las destruyen.

Motivo RGD insertado en la proteína de fibra: la entrada normal de adenovirus está mediada por la unión inicial de la proteína de fibra de adenovirus con su receptor primario, el receptor de adenovirus Coxsackie (CAR). La inserción de este motivo RGD en el bucle HI de la proteína de fibra del adenovirus da como resultado un aumento de la infectividad en varias líneas celulares de cáncer diferentes.

Mutación T1 en el gen E3/19K: La mutación T1 estimula la liberación viral y mejora su potencia antitumoral. La proteína E3/19K juega un papel importante en el retraso de la respuesta CTL al suprimir el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I en el retículo endoplasmático, e impide su translocación a la superficie celular para completar la presentación de antígenos. Se ha descrito que E3/19K también participa en la evasión del reconocimiento de las células NK gracias a su capacidad de interactuar con las proteínas A y B relacionadas con la cadena MHC-I. Puesto que esta función está parcialmente alterada en la proteína E3/19K-445A, es posible que las propiedades evasivas inmunitarias de ORCA-010 se vean afectadas.

Identificación y evaluación de riesgos potenciales

-Estabilidad

Los adenovirus son genéticamente estables. Como las modificaciones en el OMG están limitadas, no se espera un impacto en la estabilidad.

El OMG utilizado para la producción fue secuenciado en su totalidad para confirmar la secuencia de ADN y la presencia de las modificaciones. Además, se hicieron numerosos pases en la línea de células productoras y se verificó su estabilidad genética mediante secuenciación y perfil de restricción. Por lo tanto, se ha demostrado que, luego de que se hicieran 20 pases de ORCA-010 en la línea de células productoras, el virus ORCA-010 había retenido los tres elementos genéticos únicos (E1AΔ24, T1 y RGD) y no se observó ningún cambio en el perfil de análisis de ADN y proteínas. El lote clínico se generará después de 1 pasaje del virus maestro.

Los estudios de seguimiento por q-PCR se realizarán en sangre y orina para determinar la presencia y estabilidad del OMG.

-Patogenicidad

El serotipo 5 del adenovirus no tiene reservorios animales naturales conocidos y se replica exclusivamente en células humanas. El adenovirus de tipo 5 causa una infección transitoria en el hombre. Se sabe que el serotipo 5 del adenovirus (Ad5) natural se replica solo en muy pocos animales que no sean de la especie humana cuando se infectan de manera experimental, básicamente el hámster dorado y, hasta cierto punto, en la rata algodónera.

Los adenovirus naturales se consideran endémicos en la mayor parte del mundo. La infección se produce generalmente durante la infancia. El Ad5 se asocia principalmente a infecciones respiratorias, digestivas, incluidas las hepáticas, y urinarias. Las infecciones en el recién nacido, aunque suelen ser pasajeras, pueden ser graves e incluso mortales; los niños pequeños



son particularmente sensibles a los tipos de adenovirus 1, 2, 3 y 5, que son la causa más común de faringoamigdalitis.

Las infecciones por adenovirus en los pacientes inmunodeprimidos pueden aumentar significativamente la morbilidad y la gravedad de la enfermedad.

La eliminación de 24 nucleótidos en el gen E1A inhabilita el ORCA-010 para replicarse en células normales con una vía de pRb intacta. Aunque ORCA-010 todavía puede infectar estas células, no dará lugar a la replicación, la lisis celular o la propagación del virus desde la célula infectada. Esto reduce la patogenicidad del virus en comparación con el adenovirus 5 de tipo salvaje.

Por otra parte la mutación T1 genera una forma truncada de la proteína E3/19K. Como la función está alterada, es posible que las propiedades evasivas inmunes de ORCA-010 estén dañadas, lo que resulta en una disminución de la patogenicidad del OMG.

-Riesgo de transferencia genética

En condiciones naturales no es posible la transferencia de material a otros organismos distintos del hombre. El adenovirus no se integra en las células que infecta y su permanencia se asocia únicamente a la eventualidad de una infección productiva, que únicamente se produce en humanos.

Hasta la fecha, no se ha observado ningún caso de transmisión germinal de material genético del adenovirus a la descendencia, incluso cuando se fuerzan las condiciones mediante la administración del virus por una ruta que permite su llegada a gónadas y donde es capaz de infectar células no germinales.

-Formación de virus recombinantes

En el caso improbable de que el OMG y el adenovirus de origen silvestre infecten la misma célula humana, en teoría, puede ocurrir una recombinación entre el OMG y éste. El recombinante derivado puede poseer propiedades de replicación del adenovirus de origen silvestre, un tropismo celular expandido o liberación viral mejorada.

La mayoría de las personas tienen anticuerpos neutralizantes preexistentes para los serotipos Ad5, que es uno de los serotipos más comunes. Es probable que los anticuerpos bloqueen la infectividad del virus recombinante y limiten la propagación dentro del sujeto infectado. Además, el producto se administra localmente (por vía intratumoral) y no se administra de forma sistémica y, en consecuencia, la dosis y el volumen general son pequeños. La dosis más baja y el sitio diana limitado también restringen la diseminación dentro del paciente. Como la vía más probable de infección de los adenovirus de origen silvestre es la inhalación, es poco probable que la inyección intratumoral produzca una coinfección suficiente de los pulmones, debido a que el tropismo del OMG se redirige hacia los tumores y no sigue la ruta natural de entrada. Además, la replicación viral está limitada en el tejido no tumoral, por lo que es probable que cualquier coinfección sea autolimitada, lo que reducirá el riesgo de recombinación. En todo caso, los pacientes se someterán a una evaluación previa para detectar posibles infecciones o signos relacionados antes de la administración.

En caso de producirse trans-complementación entre virus, el resultado sería una infección idéntica a la infección del virus parental Ad5, ya que ORCA-010 no presenta una patogenicidad incrementada respecto al virus Ad5.



-Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación

El OMG está atenuado y, como tal, la propagación y la persistencia están limitadas. La eliminación del OMG ocurrirá de forma natural, como en su hábitat natural y reservorio (humanos). Las infecciones por adenovirus se limitan a la infección de células epiteliales del tracto respiratorio superior. La propagación del adenovirus a partir de estos tejidos está muy limitada debido a la presencia de respuestas inmunes preexistentes en los seres humanos, ya que las infecciones por subgrupos C de adenovirus, como Ad5, son endémicas en la mayoría de las poblaciones humanas. Los anticuerpos preexistentes pueden neutralizar el vector y pueden bloquear la captación y la transducción del vector *in vivo*. Además, cuando se expone a la sangre, el adenovirus se inactiva al unirse a las plaquetas y eritrocitos.

ORCA-010 no tiene modificaciones que afecten a la inactivación del virus por el sistema inmune o la unión a plaquetas/eritrocitos y la inactivación posterior. Además, como está fuertemente atenuado en comparación con el adenovirus parental, la propagación se limita a la disponibilidad de células con un ciclo de células desregulado (células cancerosas). La administración de ORCA-010 ocurrirá por vía intratumoral y los virus que se liberan del tumor probablemente se inactivarán rápidamente.

Los estudios de biodistribución preclínica en hamsters dorados demuestran que el OMG permanece en la cavidad abdominal luego de la inyección en la próstata. El ADN de ORCA-010 fue detectado en la próstata, en la vejiga, en los riñones, en el hígado, en el bazo y en los ganglios linfáticos mesentéricos. La sangre, el cerebro, las gónadas, la médula ósea, el corazón y los pulmones arrojaron resultados negativos para la presencia de ADN.

Se prevé que el virus pueda propagarse a través de la orina, el semen, el tejido derivado del paciente y la sangre. Para limitar el riesgo de transmisión a terceros, se aplicarán procedimientos para trabajar con materiales infecciosos y precauciones que debe tomar el paciente. Los estudios de seguimiento por pCR cuantitativa que se realizarán en sangre y orina confirmarán la presencia o ausencia.

Manipulación, control y tratamiento de residuos

Todo el personal que maneja el OMG debe usar ropa protectora (guantes, máscara, gafas protectoras y bata) y cumplir con las normas aplicables a los trabajadores y/o los materiales contaminados con virus y al manejo de OMG, la recolección y el envío de muestras biológicas.

El manual de farmacia del ensayo clínico recoge las medidas de bioseguridad en la preparación del producto:

- Las diluciones deben prepararse en una campana de bioseguridad, BSL-2. El vial tiene un tapón de goma donde se pueden colocar dos jeringas y el OMG se puede mezclar con la solución salina fisiológica, lo que evitará que se derrame.
- El OMG diluido se transportará a la sala de examen en un recipiente que evite las fugas con elementos de refrigeración donde el paciente recibirá la inyección intratumoral.
- El producto parcialmente usado debe eliminarse como residuo biológico.

Durante la administración solo estará presente el personal sanitario implicado en el ensayo clínico que llevará una bata de quirófano estéril desechable, guantes, mascarilla quirúrgica, gorro de quirófano, gafas protectoras y zapatillas. Siempre que sea posible, se utilizarán materiales desechables.



Los residuos (por ejemplo, jeringas, guantes, tejidos, etc.) serán desechados en contenedores de residuos especiales, de los cuales la superficie exterior se desinfecta posteriormente con 1.000 ppm de solución de cloro y posteriormente autoclavado o incinerado. La habitación donde se tratará a los pacientes se limpiará con virkon o dilución 1/5 de la solución de lejía doméstica (que contiene 3-6% de hipocloritos).

El material no desechable (por ejemplo, instrumentos, equipos) se desinfecta con 1.000 ppm de una solución de cloro y, si es posible, se autoclavará.

En caso de derrames, el líquido se absorbe con pañuelos, se limpia con agua y jabón, y se desinfecta con 1.000 ppm de solución de cloro. Los materiales contaminados se desechan en contenedores de residuos biológicos.

Las muestras de los pacientes se deben transportar en contenedores sellados de doble capa a prueba de fugas.

Se dispone de instrucciones específicas para los pacientes para evitar que otras personas estén expuestas al OMG. Estas instrucciones han sido incorporadas en el “Plan de higiene”. Se indicará a los pacientes que sigan estas precauciones hasta que no se detecte el OMG en la orina.

Como precaución adicional, se recomienda evitar el contacto cercano (por ejemplo, el contacto físico cercano o el uso compartido de utensilios) con cualquier persona que pueda estar en alto riesgo de infecciones virales, hasta 30 días después de la última dosis del virus.

Estas recomendaciones se mantendrán durante todo el ensayo clínico. El paciente será informado tan pronto como estas medidas ya no sea necesarias.

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 2019