



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE VIRUS ADENOASOCIADOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/21/17)

Título del ensayo

Estudio abierto de fase I/II para evaluar la seguridad, tolerabilidad y eficacia de FLT201 en pacientes adultos con enfermedad de Gaucher de tipo 1 (GALILEO-1), del promotor Freeline Therapeutics Limited.

Características del ensayo

La duración prevista de este estudio es de septiembre de 2021 a julio de 2023.

El ensayo clínico se realizará en el Hospital Universitario Vall D'Hebrón, el Hospital Universitario Ramon y Cajal, el Hospital Universitario de Bellvitge, el Hospital Universitario 12 de Octubre y el Hospital Quirón Salud de Zaragoza.

FLT201 se administrará en una dosis única, mediante infusión intravenosa lenta. Para un paciente típico que pese entre 65 y 100 kg, el intervalo estimado de dosis de FLT201 es de $9,75 \times 10^{12}$ a $1,5 \times 10^{15}$ genomas del vector.

La cuantificación por PCR del genoma del vector se determinará durante todo el ensayo clínico. La excreción del genoma del vector se evaluará en muestras biológicas (orina, plasma, saliva, heces, semen - en varones únicamente) obtenidas tres veces en los 7-10 días siguientes a la infusión de FLT201. Posteriormente, se obtendrán muestras para determinar la excreción del genoma del vector semanalmente hasta que tres muestras consecutivas sean negativas con una semana de diferencia. El análisis del genoma del vector solo continuará en las muestras biológicas en las que no se haya observado un resultado negativo.

Características del organismo modificado genéticamente

El OMG, FLT201, es un vector viral adenoasociado (AAV) recombinante sin capacidad de replicación, formado por un genoma del vector de ADN monocatenario que se encapsida en una cápside modificada genéticamente con proteínas derivada del AAV.

La casete de expresión consiste en un promotor específico del hígado (PEH) mínimo y un transgén con optimización codónica (GBA1 variante 85) con una secuencia de señales de poliadenilación (PolyA) flanqueada por las repeticiones terminales invertidas (ITR) del AAV2. El transgén con optimización codónica (GBA1 variante 85) expresa una variante modificada genéticamente de proteína (85) de la β -glucocerebrosidasa (GCasa).

FLT201 se fabrica mediante transfección transitoria de células HEK293T con plásmidos que contiene la casete de expresión y los genes necesarios para la obtención de las partículas víricas.



Evaluación del riesgo. Identificación de riesgos potenciales.

-Demostración de ausencia de formación de virus competentes para la replicación (rcAAV).

La replicación de FLT201 solo podría tener lugar en el caso poco probable de que se produjera una triple infección de la misma célula huésped por FLT201, un AAV parental (que proporciona las funciones *rep* y *cap*) y un virus auxiliar, como un adenovirus o el virus del herpes simple. El acontecimiento de infección triple podría dar lugar a la recombinación del casete de expresión de FLT201 con los genes *rep* y/o *cap* del virus parental. Sin embargo, dada la limitada capacidad de empaquetamiento de los AAV, la recombinación solo daría lugar a la formación de los siguientes productos:

- Deleción recombinante del transgén y transferencia de los genes *rep* y *cap*, lo que da lugar al AAV parental.
- Inserción del gen *rep*: el genoma de *rep* más transgén puede replicarse en presencia de un virus auxiliar y empaquetarse en la cápside parental, pero estos viriones no pueden propagarse debido a la falta del gen *cap*.
- Inserción del gen *cap*: el genoma de *cap* más transgén puede empaquetarse en la cápside del AAV parental, pero no puede propagarse, ni siquiera en presencia de un virus auxiliar, debido a la falta del gen *rep*.
- El casete del transgén empaquetado en la cápside del AAV parental suministrada por cualquier coinfección por el AAV parental y el virus auxiliar; sin embargo, estos viriones no pueden propagarse debido a la falta de los genes *rep* y *cap*.

Además, las regiones de homología entre FLT201 y un posible AAV parental coinfectante se limitarían a las ITR, ya que los genes *rep* y *cap* no están presentes en FLT201. Esto reduce aún más la posibilidad de que la recombinación origine rcAAV.

La probabilidad de que se produzca un acontecimiento de replicación durante la fabricación es baja, ya que FLT201 se fabrica utilizando un plásmido auxiliar y no mediante coinfección con un virus auxiliar, por lo que no hay transferencia del adenovirus parental en la fabricación del principio activo.

La generación de AAV con capacidad de replicación (rcAAV) como consecuencia de los acontecimientos de recombinación que se producen durante el proceso de fabricación está limitada además por el «sistema de empaquetamiento dividido», que permite producir el vector de AAV FLT201 mediante cotransfección de dos plásmidos con los genes *rep* y *cap* en plásmidos distintos.

Por otra parte, la presencia de rcAAV se analiza en cada lote de principio activo mediante PCR cuantitativa. Los lotes solo se liberarán si cumplen los criterios de aceptación.

-Estabilidad

Se espera que FLT201 sea muy estable desde el punto de vista genético. FLT201 se genera por transfección transitoria de células HEK293T utilizando plásmidos secuenciados y totalmente caracterizados. La producción del vector en el proceso de fabricación y la síntesis de la segunda cadena del genoma del vector dependen de la ADN polimerasa del huésped, caracterizada por una polimerización del ADN de alta fidelidad y actividad adicional de



exonucleasa de corrección de errores, lo que da lugar a una tasa muy baja de error en la replicación del ADN.

Dado que FLT201 es un AAV sin capacidad de replicación, la posibilidad de inestabilidad durante los ciclos de replicación es nula, ya que no se produce replicación.

Además, la identidad de la secuencia del genoma de FLT201 entre las ITR del AAV se confirma en cada lote de principio activo mediante secuenciación y mediante un conjunto de análisis que garantizan que los atributos de calidad críticos cumplen los criterios de aceptación, incluida la demostración de la potencia absoluta de la actividad de Gaucher.

Los datos preclínicos indican que, en la mayoría de los casos, el ADN liberado por vectores de AAV recombinantes persiste predominantemente en forma de elementos extracromosómicos (episomas) en lugar de integrarse en el genoma de las células huésped. La integración, cuando se produce, es aleatoria y relativamente rara, sin que ocurran acontecimientos en genes asociados a la oncogénesis o cerca de ellos. Se cree que el riesgo potencial de incorporación del genoma viral al ADN cromosómico del paciente se reduce aún más, ya que FLT201 carece de los genes *rep* necesarios para la integración específica del sitio en el genoma de las células huésped. Por tanto, el riesgo de mutagénesis por inserción se considera bajo o insignificante. Hasta la fecha, no se han notificado casos de mutagénesis por inserción en ningún ensayo clínico con AAV.

-Biodistribución y excreción del vector clínico (Shedding).

En un programa en curso sobre la hemofilia B se está administrando a seres humanos un OMG (FLT180a) compuesto por un AAV con la misma cápside que FLT201, que contiene un transgén que codifica el factor IX (FIX). Además, se está administrando a seres humanos un segundo OMG (FLT190) compuesto por un AAV, también con la misma cápside que FLT201, con un casete de expresión que contiene un transgén que codifica la α -galactosidasa (α -GLA), en un programa en curso sobre la enfermedad de Fabry.

La biodistribución tisular de FLT201 y la excreción del virus dependen de la cápside del vector en lugar del transgén. Por tanto, los datos de seguridad de la cápside y de biodistribución y excreción tisular comunicados con los medicamentos en investigación de terapia avanzada FLT180a y FLT190, son relevantes para FLT201, dado que la cápside tiene la capacidad de transducir preferentemente hepatocitos humanos con gran eficiencia y especificidad y que FLT180a, FLT190 y FLT201 utilizan promotores específicos del hígado.

Datos preclínicos

Los datos sobre la biodistribución revelaron que la mayor parte de los vectores FLT190 o FLT180a se detectaron en el hígado, mientras que se detectaron niveles elevados en los ganglios linfáticos o el bazo (tejidos implicados en la eliminación del vector) y niveles bajos en el pulmón, el corazón, el músculo esquelético y los ganglios de las raíces dorsales. Se detectaron niveles muy bajos (próximos al límite de cuantificación) en los ovarios y los testículos, lo que respalda un potencial limitado de mutagénesis por inserción y transmisión de la línea germinal. Los datos de excreción indicaron que la mayor parte del vector había desaparecido del plasma, la orina, las heces y la saliva el día 15 después de administrar la dosis. Este patrón de biodistribución y eliminación se consideró típico de un vector de terapia génica basado en AAV sin capacidad de replicación.



La evaluación de la biodistribución y la excreción del vector de FLT190 se incluyó como parte de un estudio de toxicología preclínico en primates no humanos (PNH) de ambos sexos y, al final del período de observación de 13 semanas, se analizaron los órganos o tejidos (encéfalo, cerebelo, cerebro, mesencéfalo, hígado, pulmón, testículos, ovarios, tronco encefálico, ganglio de la raíz dorsal torácica y músculo esquelético) mediante un análisis de PCR cuantitativa (qPCR) para comprobar la biodistribución tisular. Se obtuvieron muestras de saliva, orina, heces y plasma durante todo el estudio para controlar la excreción del vector.

Los datos de biodistribución demostraron que la mayor parte del ADN genómico de FLT190 se detectó en el hígado. También hubo niveles detectables de ADN de FLT190 en el pulmón, los ovarios y el músculo esquelético, y se detectaron niveles muy bajos en el ganglio de la raíz dorsal torácica, los testículos y el cerebro. Al final del período de evaluación (día 92), se detectó FLT190 en diversos niveles, dependiendo de la identidad del tipo de tejido.

El análisis de los niveles de excreción viral de FLT190 en saliva, heces, orina y plasma demostró que los niveles de FLT190 disminuían rápidamente durante la primera semana después de la administración y estaban por debajo del límite de cuantificación (LC) en la mayoría de las muestras el día 15. Todas las muestras estaban por debajo del nivel de detección (LD) al final del estudio (día 57).

Datos clínicos

Hasta el 1 de noviembre de 2020, 10 pacientes con hemofilia B han recibido FLT180a. Se evaluó la eliminación de genomas del vector en plasma, orina, saliva, heces y semen. Se detectaron concentraciones elevadas de ADN del AAV inicialmente el día 1 en todas las matrices. Las concentraciones disminuyeron y, por lo general, estaban por debajo del límite de cuantificación el día 30 después de la administración.

Hasta el 1 de noviembre de 2020, solo un sujeto ha recibido FLT190. La excreción de secuencias del genoma del vector se vigila en muestras de plasma, saliva, orina, heces y semen hasta que se demuestre que tres muestras consecutivas obtenidas en visitas distintas (con al menos 1 semana de diferencia) están libres de secuencias de genoma del vector.

Manipulación, control y tratamiento de residuos

El número necesario de viales de medicamento de FLT201 se envía desde el centro de fabricación a la farmacia designada de los centros clínicos de conformidad con las recomendaciones habituales para el transporte de materiales biológicos peligrosos. Los viales acondicionados secundarios etiquetados se introducen en gradillas cerradas a prueba de fugas y de riesgos biológicos antes de introducirlos en unidades de hielo seco para su transporte. La etiqueta del recipiente de transporte debe contener, como mínimo, la advertencia “Contiene organismos modificados genéticamente”.

Todo el personal implicado en el ensayo clínico recibirá instrucciones sobre las mejores prácticas de bioseguridad que se aplicarán durante la preparación en la farmacia, el transporte a la sala de administración, durante la administración y eliminación de cualquier residuo biológico. Todo el personal debe llevar las batas o guantes adecuados.

A fin de reducir el riesgo de exposición inadvertida durante la manipulación de FLT201, durante la preparación de la infusión de FLT201, el personal deberá llevar un equipo de protección personal (EPP) estándar conforme a las normas de seguridad biológica aplicables a organismos modificados genéticamente de clase 1 de seguridad biológica (Manual de



seguridad biológica del laboratorio de la OMS, 2004; anexo IV de la Directiva 2009/41/CE). Como mínimo, esto incluye guantes (considérese la utilización de guantes dobles), protección ocular (p. ej., gafas de seguridad) y una bata aislante desechable. Además, también debe considerarse el uso de EPP apropiado para los antebrazos, como protectores de mangas o guantes de sujeción sobre las mangas de un bata de laboratorio.

El medicamento en investigación será manejado en cabinas de bioseguridad de Clase II A2. Si después de la preparación de la jeringa de infusión de FLT201, tiene que conservarse la jeringa de infusión FLT201, deberá acondicionarse como OMG en un recipiente cerrado, a prueba de vertidos, opaco (es decir, protegido de la luz) y hermético. Por ejemplo, en una bolsa doble sellada, conservada en una zona segura con acceso restringido.

Las superficies se desinfectarán con un desinfectante adecuado, p. ej., Virkon al 1% (o un viricida equivalente aprobado localmente), Peridox o hipoclorito de sodio (lejía) según la normativa local.

Todos los materiales utilizados para la infusión, como las jeringas, las vías de infusión y los filtros en contacto con FLT201, deberán sellarse en recipientes primarios y secundarios a prueba de fugas. Todos los residuos deberán llevar una doble bolsa con el símbolo de riesgo biológico y sellarse con cinta adhesiva. La bolsa se desechará en un recipiente para residuos biológicos peligrosos y se destruirá conforme a las normas de la farmacia del centro e institucionales.

Los procedimientos normalizados de trabajo para la eliminación en el centro médico serán conformes con las directrices facilitadas en el Manual de seguridad biológica del laboratorio de la OMS, 3.^a edición (2004) para el nivel de seguridad biológica 1/2. En el centro médico, esto implicará la contención temporal en recipientes para objetos punzantes o en bolsas identificadas claramente (p. ej., riesgo biológico, residuos médicos) antes de la esterilización en autoclave y/o la incineración dentro o fuera del centro conforme a las normas del centro para la manipulación de materiales potencialmente infecciosos.

De acuerdo con el manual de farmacia, el vector no utilizado se diluirá con un volumen igual de solución de Virkon al 1% (o un viricida equivalente aprobado localmente), Peridox o hipoclorito de sodio (lejía) y se incubará durante 30 minutos a temperatura ambiente (o mediante un proceso local equivalente), se depositará en un recipiente y se eliminará con los residuos biopeligrosos con arreglo a los procedimientos del hospital.

Los objetos punzantes contaminados se eliminarán de acuerdo con los procedimientos locales de trabajo. Todos los demás residuos (guantes, etc.) se eliminarán depositándolos en bolsas de residuos clínicos de acuerdo con los procedimientos del hospital para tratar los residuos biopeligrosos.

El transporte y la manipulación de las muestras de los pacientes estarán a cargo de personal hospitalario debidamente entrenado. El personal aplicará las normas de buena práctica microbiológica y procedimientos para prevenir incidentes de contaminación cruzada y derrame accidental.

En el centro, el transporte dentro de un mismo edificio se llevará a cabo conforme a la práctica local del centro para el transporte de material biopeligroso y al manual de laboratorio del estudio. La transferencia de muestras de pacientes entre salas, departamentos o laboratorios dentro de un mismo edificio deberá planificarse, organizarse y realizarse de un modo que



reduzca al mínimo el tránsito a través de zonas comunes y accesos públicos. Los recipientes usados para la transferencia deberán estar adecuadamente etiquetados con identificación del contenido y las superficies deberán descontaminarse antes de salir de cada sala.

Para el transporte de muestras de pacientes entre edificios dentro del centro sanitario, podrán usarse bolsas sellables de plástico, tubos con tapón de rosca o recipientes de plástico con un sistema de cierre. Además, las muestras irán en un recipiente exterior rígido, opaco (es decir, protegido de la luz), a prueba de fugas, a prueba de derrames y cerrado. Se usarán materiales absorbentes entre las capas de acondicionamiento para absorber todas las sustancias infecciosas en caso de producirse una fuga. La bolsa para el transporte del recipiente se etiquetará con la mención “Contiene organismos modificados genéticamente” y se colocará una pegatina con el símbolo de riesgo biológico, y estará etiquetada de modo que el remitente, el destinatario y el contenido del embalaje sean claramente identificables.

El personal que intervenga en la transferencia recibirá una formación adecuada sobre los riesgos presentes durante el proceso de transferencia y cómo reducirlos de forma segura. Los destinatarios deberán ser notificados antes de que se lleve a cabo la transferencia. Deberá haber equipos contra derrames inmediatamente disponibles y personal adecuado con formación sobre su uso.

Para el transporte de muestras al laboratorio central fuera del hospital, las muestras de los pacientes se acondicionarán con un sistema de triple capa (como mínimo), con acondicionamiento primario, secundario y externo, suficientemente resistente para la sustancia a transportar. El triple acondicionamiento debe ser capaz de prevenir fugas de cualquier material líquido que contenga en su interior y para prevenir daños físicos durante el tránsito; estará claramente marcado con una pegatina de riesgo biológico en el exterior.

Información al paciente

El promotor informará a los pacientes que participan en el ensayo de las medidas que deben aplicar para evitar la diseminación del OMG.

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 del mismo 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 21 de julio de 2021