

Buona pratica sulla valutazione degli aspetti relativi agli OGM nell'ambito di sperimentazioni cliniche con vettori clinici AAV¹

Nota 1: Questo documento è stato approvato da Austria, Belgio, Croazia, Repubblica Ceca, Danimarca, Finlandia, Francia, Germania, Ungheria, Irlanda, Italia, Lettonia, Lituania, Lussemburgo, Paesi Bassi, Portogallo, Romania, Slovenia e Spagna.

Iter del documento	Data di pubblicazione	Descrizione delle modifiche principali
Versione 1	Ottobre 2019	
Versione 2	Dicembre 2020	Approvazione da parte di ulteriori Stati Membri (LT, SI)

¹ Questo documento non è stato adottato dalla Commissione europea e, pertanto, non costituisce la sua posizione ufficiale.

1. INTRODUZIONE

I vettori virali adeno-associati possono essere utilizzati per produrre medicinali. Questi vettori derivano da virus adeno-associati (di seguito indicati “AAV”), virus a singolo filamento di DNA appartenenti alla famiglia *Parvoviridae*.

Gli AAV sono ampiamente distribuiti tra un gran numero di animali e di esseri umani; si stima che circa l'80% della popolazione adulta sia sieropositiva ad almeno un sierotipo AAV. Nonostante la distribuzione ubiquitaria degli AAV e l'alta frequenza dell'immunità AAV, gli AAV non sono stati associati a nessuna malattia patogenetica nell'uomo o negli animali.

I virus AAV non sono in grado di replicarsi a meno che la cellula non sia co-infettata con un virus *helper*. Adenovirus, virus dell'herpes simplex, virus della pseudorabbia e virus del papilloma umano sono noti per sostenere la replicazione AAV *wild-type*. In presenza di un virus *helper*, AAV subisce un'infezione produttiva caratterizzata da replicazione del genoma, espressione del gene virale e produzione di virioni. In assenza di un virus *helper* nella cellula infettata, il DNA virale può persistere nel nucleo della cellula ospite in forma episomiale o può integrarsi nel genoma della cellula ospite, dando luogo a un'infezione latente. Un'infezione AAV latente può essere riattivata dall'infezione della cellula da parte di un virus *helper*. L'integrazione di AAV nel DNA della cellula ospite in *loci* preferenziali, come l'integrazione nel sito AAVS1, è mediata dalla proteina AAV *Rep*.

Gli AAV possono infettare sia le cellule in divisione che quelle non in divisione e possono infettare una vasta gamma di tipi di cellule, sebbene sierotipi specifici possono essere associati a un tropismo tissutale più efficiente.

Le particelle virali adeno-associate sono prive di *envelope* e risultano altamente stabili nell'ambiente, anche se disseccate.

Nei vettori utilizzati nella pratica clinica viene rimosso quasi l'intero genoma del virus di tipo selvaggio, ad eccezione delle sequenze ripetute e invertite. Tale rimozione consente tipicamente di raggiungere una capacità di *packaging* di 4.4-4.7 kb sebbene, grazie a particolari strategie di produzione, la capacità di *packaging* del vettore può essere incrementata fino ad un massimo di 6 kb.

Sebbene esista un numero elevato di strategie di produzione potenzialmente utilizzabili per produrre vettori clinici AAV, gli elementi funzionali di base sono rappresentati da:

- la sequenza ITR dell'AAV che fiancheggia il ‘gene di interesse’ (questo costrutto contiene gli elementi in *cis* necessari per il *packaging* e la replicazione del genoma a singolo filamento di DNA).
- Le sequenze genetiche (*Rep* e *Cap*) necessarie per la replicazione dell'AAV e delle proteine capsidiche virali (generalmente fornite in *trans* all'interno di un plasmide, un vettore baculovirale o in una linea cellulare di *packaging*).
- Funzioni del virus *helper*: sono possibili approcci differenti, da quello meno recente della coinfezione con il virus *helper*, alla co-transfezione con un plasmide o alla co-trasduzione con vettori derivati da *baculovirus* che codificano per i geni *helper*.
- Una linea cellulare in grado di supportare il virus *helper* e la replicazione dell'AAV.

Relativamente a quanto esposto, nonché all'esperienza accumulata nella valutazione dei vettori clinici AAV, la valutazione delle domande per la conduzione di sperimentazioni cliniche con vettori AAV dovrebbe basarsi sugli elementi delineati nel *Modulo unico di domanda per medicinali sperimentali per uso umano contenenti o che sono costituiti da vettori AAV*.

Gli studi clinici con vettori clinici AAV in conformità con i requisiti dell'*ERA (Environmental Risk Assessment)* nella Sezione 2, possono essere condotti in BSL-1.

2. ERA SPECIFICO

Questo *ERA* è applicabile solo ai vettori clinici AAV, se il richiedente dimostra l'assenza di formazione di virus competente per la replicazione e che il transgene non è pericoloso.

2.1. Identificazione e caratterizzazione dei pericoli potenziali.

Pericoli potenziali per la salute umana

- *Pericoli potenziali associati con il rilascio degli AAV competenti per la replicazione:* esiste il pericolo potenziale che il vettore clinico acquisisca la competenza di replicazione, qualora si verifichi una ricombinazione del vettore clinico in soggetti contemporaneamente infettati con un AAV *wild-type* ed un virus *helper*, seguita dalla disseminazione nell'ambiente. Il prodotto di ricombinazione sarebbe un AAV. Considerato che non si conosce l'esistenza di una patologia associata agli AAV e che non è presente nessun inserto pericoloso nel vettore clinico, i pericoli potenziali associati con il rilascio di AAV competenti per la replicazione possono essere considerati molto bassi.
- *Pericoli potenziali associati con la persistenza a lungo termine del vettore clinico all'interno delle cellule trasdotte (infezione latente):* il vettore clinico viene somministrato ai pazienti con la finalità di trattare una condizione di base. La persistenza del vettore clinico nelle cellule del paziente trattato è una caratteristica attesa del vettore e non costituisce un pericolo per la salute dell'uomo. Tuttavia, il trasferimento non intenzionale del vettore clinico a soggetti diversi dai pazienti sottoposti alla sperimentazione clinica potrebbe dar luogo ad un processo di trasduzione con il vettore clinico AAV, nel qual caso è atteso che il DNA del vettore clinico rilasciato persista nelle cellule trasdotte del destinatario non bersaglio come episomi stabili o che il vettore clinico AAV possa - in rari casi integrarsi (vedi punto seguente).

Considerando che non esiste alcuna patologia nota associata agli AAV e che nessun inserto pericoloso è presente nel vettore clinico, i rischi associati con la persistenza a lungo termine del vettore clinico nelle cellule trasdotte possono essere considerati molto bassi.

- *Pericoli potenziali associati con la mutagenesi inserzionale:* alcuni AAV *wild-type* possono

integrarsi stabilmente in un *locus* specifico del genoma della cellula ospite (AAVS1, nel braccio lungo del cromosoma 19); in caso di integrazione, essi rimangono non patogeni. Al contrario, gli AAV ricombinanti hanno perso la capacità di integrarsi in siti specifici del genoma della cellula ospite.

L'integrazione non sito-specifica del vettore clinico nel genoma delle cellule infettate potrebbe dar luogo a fenomeni di mutagenesi inserzionale, in soggetti che sono esposti al prodotto per trasmissione accidentale o ambientale (disseminazione)². Qualora si dovesse concretizzare il rischio di integrazione non sito-specifica, le conseguenze per gli individui infettati possono essere considerate moderate.

- *Pericoli potenziali associati con la trasmissione verticale/germinale:* studi di biodistribuzione, condotti su animali, hanno dimostrato che il DNA dei vettori clinici AAV può essere rilevato nel DNA delle gonadi per un periodo di tempo variabile. Di conseguenza, non può essere esclusa la presenza di AAV ricombinanti nelle gonadi.

Nell'ambito del quadro normativo dell'UE, che disciplina la conduzione delle sperimentazioni cliniche con medicinali per uso umano, esistono restrizioni che impediscono il verificarsi di pericoli associati alla trasmissione verticale/germinale (divieto di modifica della linea germinale umana e restrizioni sulla conduzione di sperimentazioni cliniche con donne incinte e che allattano). Di conseguenza, questo scenario non è trattato ulteriormente in questo *ERA*.

Pericoli potenziali per gli animali e l'ambiente

- *Pericoli potenziali per gli animali:* gli animali possono costituire gli ospiti naturali di alcuni virus AAV. Pertanto, non possono essere esclusi pericoli potenziali per gli animali esposti al vettore clinico rilasciato da un soggetto in sperimentazione clinica. Considerando che non è nota alcuna patologia associata agli AAV e che nessun inserto pericoloso è presente nel vettore clinico, i rischi associati con il rilascio di AAV competenti per la replicazione possono essere considerati molto bassi.

2.2. Caratterizzazione dell'esposizione

Probabilità di effetti avversi legati a processi di ricombinazione/mobilizzazione

Le particelle ricombinate avrebbero i geni *Rep* e *Cap*, ma sarebbero ancora difettive per la replicazione (come il virus *wild-type*). Pertanto, l'unico meccanismo attraverso il quale potrebbe esserci una mobilizzazione è che la stessa cellula sia stata infettata simultaneamente con il vettore clinico, un virus AAV *wild-type* e un virus *helper* (tripla infezione). La probabilità di una tripla infezione simultanea può essere considerata molto bassa.

Probabilità di effetti avversi legati alla persistenza a lungo termine del vettore clinico all'interno delle cellule trasdotte (infezione latente)

² Il rischio di mutagenesi inserzionale per i pazienti deve essere bilanciato dai benefici attesi. La valutazione dei rischi dei pazienti è effettuata durante la sperimentazione clinica e non è specificata nell'*ERA*.

Scenari possibili:

- (1) Trasferimento accidentale a individui non bersaglio: un possibile scenario di trasferimento accidentale a terzi sarebbe in caso di un incidente di puntura d'ago durante la somministrazione o di esposizione accidentale durante la manipolazione del prodotto da parte degli operatori sanitari. Il medicinale sperimentale viene somministrato da professionisti addestrati, in un ambiente altamente controllato che riduce al minimo la probabilità che possa verificarsi un trasferimento accidentale durante la somministrazione/manipolazione del prodotto. Tenendo conto di questo, la probabilità che il pericolo potenziale si verifichi può essere considerata molto bassa.
- (2) Trasmissione tramite disseminazione: i contatti stretti del soggetto in sperimentazione clinica potrebbero essere contaminati con il vettore clinico AAV, attraverso, ad esempio la saliva, il sangue, le lacrime, lo sperma, l'urina o le feci del soggetto in sperimentazione clinica. A seconda delle caratteristiche del vettore clinico e della via di somministrazione, la probabilità di disseminazione può variare da bassa a moderata. Tuttavia, la loro esposizione quantitativa al vettore clinico sarebbe molto inferiore alla dose clinica. Pertanto, la probabilità complessiva che il rischio si verifichi può essere considerata bassa.
- (3) Donazione di sangue, cellule, tessuti o organi: i criteri di esclusione per le donazioni³, pongono delle limitazioni alla capacità dei soggetti di donare. Se un paziente trattato con un vettore clinico AAV diventasse donatore di sangue, cellule, tessuti o organi, il soggetto ricevente della donazione potrebbe essere esposto al vettore clinico AAV. Tuttavia, in tale scenario, l'esposizione quantitativa al vettore clinico sarebbe molto inferiore alla dose clinica. Pertanto la probabilità che il pericolo potenziale si verifichi può essere considerata molto bassa.

Probabilità di eventi avversi correlati a mutagenesi inserzionale

Un legame causale tra l'infezione da AAV ricombinanti e la mutagenesi inserzionale è una possibilità teorica che è stata indagata in studi preclinici, ma non è stato stabilito un legame causale fino ad oggi. Allo stesso modo, un nesso causale tra la somministrazione di medicinali basati su AAV e mutagenesi inserzionale non è stato stabilito in nessuna delle sperimentazioni

³ I criteri di elegibilità per i donatori di sangue intero ed emocomponenti sono stabiliti nell'Allegato III alla *direttiva della Commissione 2004/33/CE del 22 marzo 2004, che integra la direttiva 2002/98/CE del Parlamento e del Consiglio, in merito a determinati requisiti tecnici relativi al sangue ed emocomponenti* (GU L91, 30.3.2004, p. 25).

I criteri di selezione per i donatori di tessuti e cellule sono stabiliti nell'Allegato I alla *direttiva della Commissione 2006/17/CE dell'8 febbraio 2006, che integra la direttiva 2004/23/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, in merito a determinati requisiti tecnici relativi alla donazione, prelievo ed analisi di tessuti e cellule umane*. (GU L38, 9.2.2006, p. 40).

I criteri di caratterizzazione degli organi e dei donatori sono stabiliti nell'Allegato alla *direttiva 2010/45/UE del Parlamento europeo e del Consiglio del 7 luglio 2010 sulla base di standard di qualità e sicurezza di organi umani deputati ad essere trapiantati* (GU L207, 6.8.2010, p. 14)

cliniche condotte finora con vettori clinici AAV.

La probabilità che la mutagenesi inserzionale possa verificarsi nei tre scenari di trasferimento accidentale/esposizione involontaria al vettore clinico AAV di cui sopra può essere considerata trascurabile.

Probabilità di effetti avversi correlati con la trasmissione ad animali

Gli animali potrebbero essere esposti a particelle del vettore clinico rilasciate dal soggetto in sperimentazione clinica. Uno scenario possibile è un bambino trattato con il vettore clinico AAV che gioca con un animale domestico.

Tuttavia, l'esposizione quantitativa al vettore clinico sarebbe molto inferiore alla dose clinica. Di conseguenza, la probabilità di trasmissione involontaria di quantità significative di AAV ad animali attraverso la disseminazione è considerata molto bassa.

2.3. Caratterizzazione del rischio

Rischi associati alla ricombinazione/mobilizzazione

Nell'improbabile scenario che le cellule trasdotte dal vettore clinico vengano infettate simultaneamente dal virus AAV *wild-type* e da un virus *helper* adatto, il risultato atteso è la produzione di AAV *wild-type* e di più particelle di vettore, che non sarebbero in grado di replicarsi, poiché mancherebbero ancora dei geni *rep* e *cap*. Pertanto, i rischi per l'ambiente e la popolazione umana possono essere considerati trascurabili.

Rischi associati con la persistenza, a lungo termine, del vettore clinico nelle cellule trasdotte (infezione latente):

Soggetti non bersaglio potrebbero andare incontro ad un'infezione latente con AAV in questi scenari:

- (1) Trasferimento accidentale a soggetti non bersaglio: nonostante l'ampia prevalenza di AAV nella popolazione, essi non sono stati associati ad alcuna malattia nell'uomo. Nei soggetti con un'immunità di base (cellule T ed anticorpi) nei confronti degli AAV, le molecole di vettore clinico sarebbero eliminate dal sistema immunitario. Di conseguenza, non sono previsti effetti avversi o trascurabili legati alla somministrazione del vettore clinico a individui non bersaglio, poiché il transgene non è associato ad alcuna proprietà patogena.

Nel caso di soggetti immunocompromessi, è stato evidenziato che numerosi pazienti sottoposti a terapie con AAV erano stati pretrattati con steroidi per settimane/mesi, al fine di sopprimere eventuali risposte immuni dirette contro i vettori clinici AAV. In questo scenario di immunosoppressione indotta, non sono state evidenziate preoccupazioni per la sicurezza (per i pazienti) associate alla somministrazione del vettore clinico.

Alla luce delle considerazioni già descritte e della probabilità molto bassa di trasferimento accidentale a individui non bersaglio, il rischio associato all'infezione latente in caso di trasferimento accidentale del vettore clinico a individui non bersaglio può essere considerato trascurabile.

- (2) Trasmissione per disseminazione: dato il basso grado di infettività degli AAV ricombinanti, sarebbe necessario un titolo elevato per una trasduzione efficiente delle cellule. È quindi molto improbabile che le particelle rilasciate abbiano la capacità di causare infezioni significative negli esseri umani.

Pertanto, gli AAV non sono noti per causare malattie negli esseri umani. Inoltre, poiché non sono state identificate proprietà tossiche/nocive legate all'espressione del transgene, il rischio associato all'infezione latente in caso di esposizione a particelle di vettore clinico rilasciate dal soggetto in sperimentazione è considerato trascurabile. Anche se i contatti stretti, contaminati dal vettore clinico AAV rilasciato dal soggetto in sperimentazione clinica, fossero immuno-compromessi il rischio dovrebbe essere trascurabile, a causa della natura non patogena degli AAV e della limitata esposizione quantitativa.

- (3) Donazione di sangue, cellule, tessuti o organi: dato il basso tasso di infettività degli AAV ricombinanti, sarebbe necessario un titolo elevato per una trasduzione efficiente delle cellule. È quindi improbabile che la quantità di particelle che potrebbe essere trasferita in caso di una trasfusione o di un trapianto possa causare infezioni significative in coloro che ricevono la trasfusione/trapianto.

Pertanto, in considerazione della natura non patogenetica dell'AAV e del limitato grado di esposizione, il rischio associato con la possibilità di infezione latente in soggetti non bersaglio che ricevono sangue, cellule, tessuti o organi da un paziente trattato con il vettore clinico AAV è considerato trascurabile.

Rischio associato a mutagenesi inserzionale:

La mutagenesi inserzionale in soggetti diversi da quelli in sperimentazione clinica potrebbe scaturire dall'esposizione al vettore clinico AAV in questi tre scenari: trasferimento accidentale, disseminazione o donazione di sangue, cellule, tessuti o organi.

Considerando che:

- la formazione di tumori associati ai vettori clinici AAV non è stata riportata in pazienti trattati con vettori clinici AAV (compresi i pazienti che sono stati immuno-soppressi),
- l'esposizione quantitativa nei tre scenari di cui sopra non può essere superiore alla dose clinica,
- le molecole del vettore clinico dovrebbero essere eliminate dal sistema immunitario dell'individuo interessato,

il rischio dovuto a mutagenesi inserzionale in soggetti non bersaglio può essere considerato trascurabile.

Rischio associato con la trasmissione ad animali

Gli AAV non sono noti per essere patogeni per gli animali. Dato il basso tasso di infettività degli AAV ricombinanti, sarebbe necessario un titolo elevato per una trasduzione efficiente delle cellule. È quindi molto improbabile che le particelle rilasciate abbiano la capacità di causare infezioni significative negli animali. Inoltre, nel vettore clinico AAV non è presente nessun prodotto genico dannoso.

Il rischio associato alla trasmissione agli animali è, pertanto, considerato trascurabile.

2.4. Strategie di gestione del rischio

Il richiedente deve considerare se devono essere attuate strategie di gestione del rischio per ridurre al minimo la probabilità di esposizione accidentale degli operatori sanitari nel sito della sperimentazione clinica. Queste devono essere elencate nella Sezione 3.6 del modulo unico di domanda.

2.5. Determinazione del rischio complessivo e conclusioni

A condizione che siano attuate le misure di controllo descritte dal richiedente, i rischi complessivi per la salute umana e l'ambiente possono essere considerati trascurabili.