

PARTE 1 (DECISÃO DO CONSELHO 2002/813/EC)

**MODELO DE RESUMO DE NOTIFICAÇÃO DA LIBERTAÇÃO DE ORGANISMOS
GENETICAMENTE MODIFICADOS QUE NÃO PLANTAS SUPERIORES EM
CONFORMIDADE COM O ARTIGO 11 DA DIRETIVA 2001/18/CE**

Para assinalar uma ou várias possibilidades, utilize cruces (ou seja, x ou X) no espaço fornecido como (.)

A. Informações gerais

1. Detalhes da Notificação

- (a) Estado-Membro de notificação
(b) Número da notificação
(c) Data de confirmação da notificação
(d) Título do projeto

Portugal

B/PT/21/02

23/07/2021

Estudo randomizado, de fase 3, duplo-cego, controlado por placebo sobre transferência genética de glicose-6-fosfatase mediada pelo sorotipo 8 do vírus adeno-associado em participantes com doença de armazenamento de glicogénio tipo Ia

- (e) Período proposto de libertação junho de 2021 a julho de 2022

2. Notificador

Nome da instituição ou empresa: Ultragenyx Pharmaceutical, Inc.
60 Leveroni Court
Novato, CA 94949
EUA

3. Caracterização do OGM

- (a) Indicar se o OGM é um:

viroide (.)
ARN de vírus (.)
ADN de vírus (X)
bactéria (.)
fungo (.)
animal

- mamíferos (.)
- inseto (.)
- peixe (.)
- outro animal (.) especificar filo, classe

outro, especificar (tópico, filo e classe)

(b) Identidade do OGM (género e espécie)

Género: Dependoparvovírus

Espécie: Vírus adeno-associado, serotipo 8 (AAV8)

(c) Estabilidade genética – de acordo com os Anexos IIIa, II, A(10)

O VAA é um vírus de ADN de cadeia única que demonstra um elevado grau de estabilidade genética, conforme evidenciado pela relação próxima dos genes rep e cap de múltiplos serótipos e genótipos de VAA. Tipicamente, o gene rep mostra uma maior conservação da sequência do que as sequências do gene cap, mas as homologies da sequência são frequentemente >90% e >80% para os genes rep e cap, respetivamente. Em apoio a esta sequência, os dados de homologia são o facto de que o VAA utiliza uma polimerase de ADN hospedeira para replicação viral que não é propensa ao erro quando comparada com as ARN polimerases usadas pelos vírus de ARN. Em apoio da estabilidade genética, observa-se que os episómos de ADN proviral AAV isolados de múltiplas amostras de tecido humano têm consistentemente a sequência de rep e cap AAV2 canónico esperada.

Pensa-se que a recombinação homóloga ocorreu entre os serótipos AAV2 e AAV3, com base na análise filogénica do vírus híbrido AAV2/3, mas não foi observada em outros serótipos, apoiando a tese de que apenas na presumível circunstância rara em que uma célula é infetada simultaneamente por dois serótipos diferentes de AAV e um vírus auxiliar (infecção tripla) as condições seriam apropriadas para que ocorresse essa recombinação.

4. Está planeada a libertação do mesmo OGM noutros locais da Comunidade (em conformidade com o Artigo 6 (1)) pelo mesmo notificador?

Sim (X) Não (.)

Em caso afirmativo, insira o código(s) DK, FR, DE, ES, IT, NL, PT.

5. O mesmo OGM foi notificado para libertação noutros locais da Comunidade pelo mesmo notificador?

Sim (X) Não (.)

Se sim:

- Estado-membro da notificação: ES, NL

- Número da notificação: B/ES/18/02 (ES), B/NL/18/003 (NL)

Utilize os seguintes códigos de país:

Áustria AT; Bélgica BE; Alemanha DE; Dinamarca DK; Espanha ES; Finlândia FI; França FR; Reino Unido GB; Grécia GR; Irlanda IE; Islândia IS; Itália IT; Luxemburgo LU; Países Baixos; Noruega NO; Portugal PT; Suécia SE

6. O mesmo OGM foi notificado para libertação ou colocação no mercado fora da Comunidade pelo mesmo notificador, ou por outro?

Sim (X) Não (.)

Se sim:

- Estado-Membro da notificação Canadá, Estados Unidos da América (EUA)

- Número da notificação: NSN N.º 19426 (Canadá), Protocolo NIH N.º 1706-1617 (EUA)

7. Resumo do potencial impacto ambiental da libertação dos OGM.

O DTX401 consiste num vetor do serotipo 8 do vírus adeno-associado (adeno-associated virus serotype 8, AAV8) recombinante, não replicável, que codifica o gene humano da glicose-6-fosfatase (glucose-6-phosphatase, G6PC) para o tratamento de doentes com GSDIa.

Não se espera que a libertação do DTX401 conforme descrito nesta aplicação resulte em impacto ambiental adverso, pelas seguintes razões:

- Falta de patogenicidade do vírus parental: Apesar de uma seroprevalência estimada de até 90% para alguns serotipos humanos comuns, não foram identificados efeitos patogénicos do AAV. As modificações que levaram à criação do OGM não aumentaram a patogenicidade (ver ponto “Expressão do transgene específica do tecido”).
- OGM incompetente em replicação: O DTX401 é um vetor AAV recombinante não infeccioso que não tem todos os genes virais AAV e não consegue replicar-se sem funções auxiliares específicas do AAV e atividades do vírus auxiliares. A replicação do DTX401 só poderia ocorrer no evento extremamente improvável de uma célula hospedeira *transduzida* ser co-infetada por três vírus separados (DTX401, AAV do tipo selvagem e um vírus auxiliar, como o adenovírus humano ou vírus do herpes simplex). Se a replicação tivesse ocorrido, os únicos produtos esperados seriam o DTX401 e o AAV do tipo selvagem, ambos vírus intrinsecamente não patogénicos. Este risco de ocorrência é insignificante.
- Risco mínimo de transmissão por disseminação viral: Foi demonstrado que o ADN do vetor AAV é espalhado na saliva, urina e fezes de primatas não humanos após administração sistémica. No entanto, como o DTX401 não é replicativo, as partículas virais espalhadas não conseguem multiplicar-se e a sua disseminação é, assim, inerentemente limitada. Além disso, os potenciais riscos de exposição a DTX401 em humanos são predicados com a administração sistémica de DTX401. A exposição mínima, como a exposição ambiental, a pessoas que não os participantes que recebem DTX401 como parte do estudo não seria de dose suficiente para representar expressão genética significativa nem níveis de segurança em humanos. Espera-se que a carga viral na urina e nas fezes seja baixa. Além dos potenciais hospedeiros humanos, não se espera que a exposição ao DTX401 afete quaisquer organismos não-alvo, direta ou indiretamente. O risco para os humanos e para o ambiente associado à disseminação viral do DTX401 é, portanto, baixo a insignificante.

O DTX401 está a ser administrado numa dose de $1,0 \times 10^{13}$ GC/kg através de injeção intravenosa única no ensaio clínico 401GSDIA01. O contágio de vetores após a perfusão com DTX401 está a ser investigado em vários pontos temporais durante este estudo. São colhidas amostras de saliva, urina e fezes na Situação Basal e nos Dias 4, 12, 20, 28, 36, 42, 48, 56, 64, 72, 80 e Semanas 12, 24, 36 e 52 após a perfusão. Foram avaliadas amostras de 9 doentes neste estudo em curso para determinar o perfil de contágio do vetor. O ADN do vetor foi espalhado na saliva, urina e fezes após a perfusão de DTX401, com concentrações muito mais elevadas de ADN do vetor encontradas nas fezes do que

na saliva ou urina, em geral. A concentração de ADN do vetor na saliva atingiu um pico entre os Dias 3 e 8 após a perfusão e diminuiu para níveis indetetáveis ao Dia 34. A concentração de ADN do vetor na urina atingiu um pico entre os Dias 3 e 8 após a perfusão e diminuiu para níveis indetetáveis ao Dia 70. A concentração de ADN do vetor nas fezes atingiu um pico entre os Dias 4 e 13 após a perfusão e diminuiu para níveis indetetáveis aos 3 meses após a perfusão. Além disso, em Espanha, a disseminação de vetores está a ser medida no sémen de participantes do sexo masculino na Semana 12 e Semana 24 após a administração de DTX401. Se os resultados da Semana 24 indicarem a presença contínua de contágio de vetor, as amostras serão colhidas na Semana 36 e Semana 52, ou até ser obtido pelo menos 1 resultado negativo.

- Risco mínimo de mutagénese insercional: Os riscos da mutagénese insercional são considerados baixos a negligenciáveis, uma vez que a grande maioria do vetor de ADN rAAV persiste como epissómica ($\geq 99,5\%$) em vez de como ADN integrado.
- Expressão do transgene específica do fígado: O serotipo 8 do vírus adeno-associado, como AAV clade E, tem tropismo forte para o fígado, e transduz o fígado de forma altamente eficiente quando administrado por via intravenosa. O DTX401 é um vetor AAV8 que encapsida o gene G6PC com expressão direcionada pelo promotor/intensificador de G6Pase humano nativo (GPE), que tem atividade quase exclusiva no fígado. A expressão do transgene em células que não os hepatócitos humanos é, assim, considerada improvável.
- Expressão do transgene específico do tecido: O DTX401 mostra um forte tropismo para o fígado após a administração IV. A expressão do transgene DTX401 é direcionada por um promotor específico do fígado. Conforme observado no estudo de toxicidade de BPL do rato, a transdução de células não hepáticas resulta em nenhuma expressão ou em níveis baixos de expressão que diminuem ao longo do tempo.
- Risco mínimo associado ao transgene: O gene G6PC codifica para G6Pase humana (glicose-6-fosfatase). Não foram inseridos genes para toxinas, oncogenes potenciais, fatores de crescimento ou outros genes que poderiam ser potencialmente prejudiciais no OGM.
- Resposta das células T: A resposta mediada por células T e o aumento transitório na aminotransferase hepática, o AA relacionado com o produto mais frequente observado em estudos clínicos com transferência genética mediada por AAV foi um aumento assintomático transitório nas transaminases hepáticas e declínio concomitante na expressão transgénica aproximadamente 7 a 10 semanas após a administração do vetor (Manno 2006, Nathwani 2011a, Nathwani 2014). Em todos os casos, o aumento transitório das transaminases hepáticas resolveu-se sem sequelas clínicas. Foi hipotético que esta hepatite viral induzida por vetores se deve à ativação de linfócitos T citotóxicos específicos da cápside (CTL) e destruição de células hepáticas transduzidas (Mingozzi 2007). No entanto, em ratos, as células T ativadas contra a cápside do AAV não conseguiram ter como alvo e eliminar hepatócitos transduzidos (Wang 2007, Li 2007, Siders 2009), a menos que o genoma do AAV do tipo selvagem estivesse presente (Li 2007). Para garantir que as elevações potenciais das transaminases hepáticas são monitorizadas atentamente, foram incorporadas medidas de segurança adequadas no estudo. Os testes à função hepática serão avaliados como parte da química clínica, permitindo a rápida deteção de quaisquer elevações após a administração de DTX401;

estará disponível no centro um plano de tratamento para minimizar esta potencial resposta imunitária, caso ocorra.

B. Informação relativa aos organismos recetores ou parentais dos quais o OGM é derivado

1. Caracterização do organismo recetor ou parental:

(a) Indicar se o organismo recetor ou parental é um:

(selecione apenas uma opção)

- viroide (.)
 - ARN de vírus (.)
 - ADN de vírus (X)
 - bactéria (.)
 - fungo (.)
 - animal
 - mamíferos (.)
 - inseto (.)
 - peixe (.)
 - outro animal (.)
- (especificar filo, classe)

outro, especificar

2. Nome

- (i) ordem e/ou categoria taxonómica superior (para os animais) ssDNA vírus
- (ii) género Dependoparvovirus
- (iii) espécie Vírus adeno-associado
- (iv) subespécie N/A
- (v) estirpe serotipo 8
- (vi) patovar (biotipo, ecotipo, raça, etc.) N/A
- (vii) nome comum N/A

3. Distribuição geográfica do organismo

(a) Nativo, ou estabelecido de outra forma no país onde a notificação é feita:

Sim (X) Não (.) Desconhecido (.)

(b) Nativo, ou estabelecido de outra forma noutros países da CE:

(i) Sim (X)

Se sim, indicar o tipo de ecossistema em que se encontra:

- Atlântico (X)
- Mediterrânico (X)
- Boreal (X)
- Alpino (X)
- Continental (X)

Macaronesiano (X)

(ii) Não (.)

(iii) Desconhecido (.)

(c) É utilizado frequentemente no país onde a notificação é feita?

Sim (.) Não (X)

(d) É armazenado frequentemente no país onde a notificação é feita?

Sim (.) Não (X)

4. Habitat natural do organismo

(a) Se o organismo é um microrganismo

água (.)

solo, vive livremente (.)

solo em associação com sistemas vegetais-raiz (.)

solo em associação com sistemas vegetais-raiz (.)

outro, especificar Em associação com animais (hospedeiros primários)

(b) Se o organismo for um animal: habitat natural ou agro-ecossistema habitual: Não aplicável.

5. (a) Técnicas de deteção

O VAA pode ser detetado pela reação de cadeia de polimerase quantitativa (qPCR) utilizando iniciadores específicos para o genoma viral e PCR digital de gotículas específica do gene (ddPCR).

(b) Técnicas de identificação

O VAA pode ser identificado por reação de cadeia de polimerase quantitativa (qPCR) usando iniciadores específicos para o genoma viral e PCR digital de gotículas específica do gene (ddPCR).

6. O organismo recetor está classificado ao abrigo das regras Comunitárias existentes como estando relacionado com a proteção da saúde humana e/ou do meio ambiente?

Sim (.) Não (X)

Se sim, especificar

Informações adicionais: O AAV de tipo selvagem é não patogénico e não foi classificado ao abrigo da Diretiva 2000/54/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 18 de setembro de 2000, sobre a proteção de trabalhadores contra riscos associados a exposição a agentes biológicos durante o trabalho. O AAV não tem efeitos patogénicos conhecidos, embora a seroprevalência estimada de alguns serótipos humanos frequentes seja de 90%. Consequentemente, o AAV cumpre a definição de agente biológico do grupo 1 de acordo com a Diretiva 2000/54/CE (um agente biológico com baixa probabilidade de causar doença humana).

7. O organismo recetor é patogénico ou nocivo de alguma outra forma (incluindo os respetivos produtos extracelulares), seja vivo ou morto?
Sim (.) Não (X) Desconhecido (.)

Se sim:

- (a) para quais dos organismos seguintes:

seres humanos (.)
animais (.)
plantas (.)
outra (.)

- (b) facultar a informação relevante especificada no Anexo III A. ponto II. (A)(11)(d) da Diretiva 2001/18/CE

O AAV de tipo selvagem é não patogénico e não foi classificado ao abrigo da Diretiva 2000/54/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 18 de setembro de 2000, sobre a proteção de trabalhadores contra riscos associados a exposição a agentes biológicos durante o trabalho. O AAV não tem efeitos patogénicos conhecidos, embora a seroprevalência estimada de alguns serótipos humanos frequentes seja de até 80% (Parlamento Europeu e do Conselho 2000). Consequentemente, o AAV cumpre a definição de agente biológico do grupo 1 de acordo com a Diretiva 2000/54/CE (um agente biológico com baixa probabilidade de causar doença humana).

8. Informação relativa à reprodução

- (a) Tempo de geração em ecossistemas naturais:

O VAA é a replicação com defeito, pelo que o tempo de geração é variável, dependendo da presença ou ausência de um vírus auxiliar.

- (b) Tempo de geração nos ecossistemas em que a libertação terá lugar

O VAA é a replicação com defeito, pelo que o tempo de geração é variável, dependendo da presença ou ausência de um vírus auxiliar.

- (c) Modo de reprodução: Sexual N/A Assexuada N/A

- (d) Fatores que afetam a reprodução:

A presença de um vírus auxiliar, como o adenovírus ou o vírus herpes simplex, promove a expressão genética do VAA, a replicação do genoma e a produção de viriões. Na ausência de um vírus auxiliar, o AAV do tipo selvagem é incompetente na replicação. Note que o OGM final, DTX401, é incompetente para replicação mesmo na presença de um vírus auxiliar devido à remoção dos genes rep e cap virais.

9. Capacidade de sobrevivência

(a) capacidade de formar estruturas que melhoram a sobrevivência ou a dormência:

- (i) endosporos (.)
- (ii) quistos (.)
- (iii) esclerotia (.)
- (iv) esporos assexuados (fungos) (.)
- (v) esporos sexuais (fungos) (.)
- (vi) ovos (.)
- (vii) pupas (.)
- (viii) larvas (.)
- (ix) outro, especificar O VAA não forma estruturas de sobrevivência.

(b) fatores relevantes que afetam a capacidade de sobrevivência:

Os parvovírus como o VAA são vírus estáveis que podem persistir no ambiente durante períodos de tempo prolongados (embora sejam da ordem de várias semanas). As partículas de VAA são resistentes a uma ampla gama de pH (pH 3-9) e podem resistir a temperaturas elevadas (55 °C durante 1 hora). O VAA não forma estruturas de sobrevivência. No entanto, tal como com todos os vírus, a replicação do VAA não pode ocorrer fora de uma célula hospedeira.

10. (a) Formas de disseminação

O VAA poderá ser transmitido através de contacto direto ou indireto. O VAA pode ser transmitido por inalação, ingestão e, possivelmente, transmissão sexual.

(b) Fatores que afetam a disseminação

A replicação do vírus só é possível em células hospedeiras que tenham sido co-infectadas com um vírus auxiliar (por exemplo, adenovírus, vírus do herpes simplex). Note que o OGM final, DTX401, é incompetente para replicação mesmo na presença de um vírus auxiliar devido à remoção dos genes rep e cap virais.

11. Modificações genéticas anteriores do organismo recetor ou parental já notificadas para libertação no país onde é feita a notificação (apresentar os números de notificação).

O promotor, a Ultragenyx Pharmaceutical Inc., não notificou quaisquer modificações genéticas anteriores do vírus parental (AAV8) para a libertação em Portugal.

C. Informação relativa à modificação genética

1. Tipo de modificação genética

- (i) inserção de material genético (X)
- (ii) deleção de material genético (X)
- (iii) substituição de base (.)

- (iv) fusão celular (.)
- (v) outro, especificar

2. Resultado pretendido da modificação genética

O resultado pretendido da modificação genética foi gerar um vetor AAV recombinante contendo uma cassete de expressão G6PC humana para o tratamento de doentes com doença de armazenamento de Glicogénio Tipo Ia (GSDIa). O DTX401 é um vetor AAV8 que se encadeia no gene G6PC com expressão conduzida pela GPE. O AAV8, como AAV clade E, tem tropismo forte para o fígado, e transduz o fígado de forma altamente eficiente quando administrado por via intravenosa. Espera-se assim que a administração de DTX401 resulte na expressão do gene G6PC no fígado dos participantes do estudo.

3. (a) Utilizou-se algum vetor no processo de modificação?
Sim (X) Não (.)

Em caso negativo, avance diretamente para a pergunta 5.

- (b) Se sim, o vetor encontra-se total ou parcialmente presente no organismo modificado?
Sim (X) Não (.)

Em caso negativo, avance diretamente para a pergunta 5.

4. Se a resposta a 3(b) for sim, fornecer a informação seguinte

- (a) Tipo de vetor

plasmídeo (X)
bacteriófago (.)
vírus (.)
cosmídeo (.)
elemento transposível (.)
outro, especificar

- (b) Identidade do vetor
pDTX.hG6PCco.401

- (c) Faixa anfitrião do vetor
Bactérias, células de mamíferos.

- (d) Presença no vetor de sequências que resultem num fenótipo selecionável ou identificável
Sim (X) Não (.)

resistência a antibióticos (X)
outro, especificar

Indicação do gene de resistência a antibióticos que é inserido
Canamicina

(e) Fragmentos constituintes do vetor

pDTX.hG6PCco.401 contém a cassette de expressão G6PC. A cassette de expressão consiste num promotor e potenciador específico do fígado, um transgene G6PC otimizado por codão e um sinal de poliadenilação, ladeados por repetições terminais invertidas (ITR) de AAV. Apenas a cassette de expressão G6PC está presente no OGM final. Além disso, o vetor contém uma origem bacteriana de replicação e o gene para resistência à kanamicina para permitir a propagação do plasmídeo no *E.coli*.

(f) Método para a introdução do vetor no organismo recetor

- (i) transformação(.)
- (ii) eletroporação (.)
- (iii) macroinjeção (.)
- (iv) microinjeção (.)
- (v) infeção (.)
- (vi) outro, especificar

Transfecção tripla de células embaladas com pDTX.hG6PCco.401 e dois plasmídeos auxiliares, resultando na produção de partículas de VAA recombinante.

5. Se a resposta à pergunta B.3(a) e (b) for não, qual foi o método utilizado no processo de modificação?

- (i) transformação (.)
- (ii) microinjeção (.)
- (iii) microencapsulação (.)
- (iv) macroinjeção (.)
- (v) outro, especificar (.)

6. Composição da inserção

(a) Composição da inserção

A inserção consiste num promotor e potenciador específico do fígado, um transgene G6PC otimizado por codão e um sinal de poliadenilação, ladeados por repetições terminais invertidas (ITR) de AAV.

(c) Origem de cada parte constituinte da inserção

- Promotor e potenciador específico do fígado: *homo-sapiens*.
- Gene G6PC: *homo sapiens*.
- Sinal de poliadenilação: SV40.
- RTI: AAV.

(d) Função pretendida de cada parte constituinte da inserção no OGM

- Promotor e potenciador específico do fígado: Destina-se a direcionar a expressão genética específica do fígado G6PC.
- Gene G6PC: Espera-se que a expressão de G6Pase seja eficaz para o tratamento da GSDIa, dado que a doença é causada por mutações neste gene que afetam a expressão ou a atividade da enzima G6Pase.
- Sinal de poliadenilação: Destina-se a fornecer sequências cis para poliadenilação eficiente do ARNm de G6PC. Este elemento funciona como um sinal para um evento de clivagem específico na extremidade 3' da transcrição nascente e adição de uma cauda longa de poliadenil.
- RTI: Necessário para replicação do genoma do vetor e embalagem.

(e) Localização da inserção no organismo hospedeiro

- num plasmídeo livre (.)
- integrada no cromossoma (.)
- outro, especificar o genoma viral de ssADN

(f) A inserção contém partes cujos produtos ou funções não sejam conhecidos?

Sim (.) Não (X)

Se sim, especificar

D. Informação sobre o organismo a partir do qual a inserção é derivada

1. Indicar se é um/a:

- viroide (.)
 - ARN de vírus (.)
 - ARN de vírus (.)
 - bactéria (.)
 - fungo (.)
 - animal
 - mamíferos (X)
 - inseto (.)
 - peixe (.)
 - outro animal (.)
- (especificar filo, classe)

outro, especificar

2. Nome completo

- (i) Ordem e/ou categoria taxonómica superior (para os animais) Primates
- (ii) nome da família para fábricas N/A
- (iii) género *Homo*
- (iv) espécie *Homo Sapiens*
- (v) subespécies N/A
- (vi) estirpe N/A
- (vii) cultivar/linha de reprodução N/A
- (viii) patovar N/A
- (ix) nome comum Humano

3. O organismo é patogénico ou nocivo de alguma outra forma (incluindo os respetivos produtos extracelulares), seja vivo ou morto?

Sim (.) Não (X) Desconhecido (.)

Se sim, especificar o seguinte:

- (b) para quais dos organismos seguintes:

seres humanos (.)

animais (.)

plantas (.)

outro

- b) as sequências doadas estão de alguma forma envolvidas nas propriedades patogénicas ou nocivas do organismo?

Sim (.) Não (.) Desconhecido (.)

Se sim, facultar a informação relevante ao abrigo do Anexo III A, ponto II(A)(11)(d):

Não aplicável.

4. O organismo dador encontra-se classificado ao abrigo das regras Comunitárias existentes relacionadas com a proteção da saúde humana e do meio ambiente, como a Diretiva 90/679/CEE relativa à proteção dos trabalhadores contra os riscos ligados à exposição a agentes biológicos durante o trabalho?

Sim (.) Não (X)

Se sim, especificar

5. Os organismos dador e recetor fazem naturalmente trocas de material genético?

Sim (X) Não (.) Desconhecido (.)

E. Informação relativa ao organismo geneticamente modificado

1. Traços genéticos e características fenotípicas do organismo recetor ou parental que tenham sido alterados em resultado da modificação genética

- (a) O OGM é diferente do recetor no que respeita à capacidade de sobrevivência?

Sim (.) Não (X) Desconhecido (.)

Especificar

- (b) O OGM é de alguma forma diferente do recetor no que respeita ao modo e/ou à taxa de reprodução?

Sim (X) Não (.) Desconhecido (.)

Especificar

O genoma viral do DTX401 foi significativamente modificado em comparação com o vírus parental para o tornar incompetente para replicação. Os genes rep e cap do AAV foram substituídos por uma cassette de expressão eucariótica, e apenas as sequências virais de ITR, que são sequências de ADN não codificantes (< 300 bp), foram retidas. Assim, o DTX401 não contém genes virais nativos.

O AAV do tipo selvagem requer a presença de um vírus auxiliar, como o adenovírus humano ou o vírus do herpes simplex para replicar. A replicação do DTX401 exigiria a presença de AAV do tipo selvagem, além da presença de um vírus auxiliar. A probabilidade de tal ocorrência é extremamente baixa.

- (c) O OGM é de alguma forma diferente do recetor no que respeita à disseminação?
Sim (X) Não (.) Desconhecido (.)
Especificar

Como a replicação do DTX401 só poderia ocorrer no evento extremamente improvável de uma célula hospedeira ser infetada por três vírus separados, a probabilidade de disseminação é inferior à do AAV do tipo selvagem.

- (d) O OGM é de alguma forma diferente do recetor no que respeita à patogenicidade?
Sim (.) Não (X) Desconhecido (.)
Especificar

Não são conhecidos efeitos patogénicos de AAV do tipo selvagem em humanos. Não se espera que a introdução da cassette de expressão do G6PC resulte no desenvolvimento de patogenicidade. Assim, não se tem conhecimento nem se espera que nem o AAV do tipo selvagem nem o DTX401 sejam patogénicos

2. Estabilidade genética do organismo geneticamente modificado

O VAA é um vírus de ADN de cadeia única que demonstra um elevado grau de estabilidade genética; com base nisto, espera-se que o DTX401 seja geneticamente estável. A integridade da cassette de expressão G6PC será confirmada por sequenciação direta.

3. O OGM é patogénico ou nocivo de alguma outra forma (incluindo os respetivos produtos extracelulares), seja vivo ou morto?

- Sim (.) Não (X) Desconhecido (.)

a) Para quais dos organismos seguintes?

seres humanos(.)
animais (.)
plantas (.)
outra (.)

- (c) facultar a informação relevante especificada no Anexo III A, ponto II(A)(11)(d) e II(C)(2)(i)

O AAV de tipo selvagem é não patogénico e não foi classificado ao abrigo da Diretiva 2000/54/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 18 de setembro de 2000, sobre a proteção de trabalhadores contra riscos associados a exposição a agentes biológicos durante o trabalho. O AAV não tem efeitos patogénicos conhecidos, embora a seroprevalência estimada de alguns serótipos humanos frequentes seja de até 80% (Parlamento Europeu e do Conselho 2000). Consequentemente, o AAV cumpre a definição de agente biológico do grupo 1 de

acordo com a Diretiva 2000/54/CE (um agente biológico com baixa probabilidade de causar doença humana).

Um grande corpo de dados gerados ao longo dos últimos ~20 anos em mais de 2000 doentes (ensaiosclínicos.gov) sugere que os riscos de segurança associados à transferência genética de AAV são negligenciáveis.

4. Descrição dos métodos de identificação e deteção

(a) Técnicas utilizadas para detetar o OGM no meio ambiente

O DTX401 pode ser detetado por qPCR e ddPCR.

(b) Técnicas utilizadas para identificar o OGM

O DTX401 pode ser detetado por qPCR e ddPCR.

F. Informação relativa à libertação

1. Finalidade da libertação (incluindo quaisquer potenciais benefícios ambientais significativos que possam ser esperados)

O estudo DTX401-CL301 é um estudo de Fase 3, aleatorizado, em dupla ocultação, controlado por placebo para determinar a eficácia e confirmar a segurança do DTX401 em doentes com 8 anos ou mais com GSDIa. Os objetivos primários do estudo são reduzir ou eliminar a dependência da terapêutica de substituição exógena para manter a euglicemia e a manter ou melhorar a qualidade do controlo da glicose.

2. O local de libertação é diferente do habitat natural, ou do ecossistema, no qual o organismo recetor é regularmente utilizado, armazenado ou encontrado?

Sim (.) Não (X)

Se sim, especificar

O habitat natural do tipo selvagem AAV8 é células hospedeiras primatas. O DTX401 será administrado em humanos no contexto do estudo clínico DTX401-CL301.

3. Informação relativa à libertação e à área envolvente

(a) Localização geográfica (região administrativa e, quando adequado, referência em grelha):

Centro de Ensaio 1:

Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte, EPE - Hospital de Santa Maria, Av. Professor Egas Moniz 1649-035 Lisboa, Portugal

(b) Dimensão do centro de ensaio (m²):

- (i) local de libertação real (m²):

Não aplicável. Um tamanho específico para o local de libertação não pode ser definido como DTX401 que será administrado aos doentes como parte de um ensaio clínico.

- (ii) local de libertação mais amplo (m²):

Não aplicável. Um tamanho específico para o local de libertação não pode ser definido como DTX401 que será administrado aos doentes como parte de um ensaio clínico.

- (e) Proximidade de biótipos ou áreas protegidas internacionalmente reconhecidos (incluindo reservatórios de água potável), que possam ser afetados.

Não aplicável. O DTX401 será administrado por perfusão IV num contexto hospitalar. Por conseguinte, não se prevê que entre em contacto com quaisquer biótipos reconhecidos ou áreas protegidas.

- (f) Flora e fauna, incluindo culturas agrícolas, animais de criação e espécies migratórias, que possam potencialmente interagir com o OGM.

A administração de DTX401 irá ocorrer apenas num contexto hospitalar controlado; por conseguinte, não se prevê que entre em contacto com plantas, animais ou solo.

4. Método e quantidade da libertação

- (a) Quantidades de OGM a libertar:

A dosagem baseia-se no peso corporal do doente. Calcula-se que uma quantidade total de aproximadamente $1,0 \times 10^{13}$ cópias do genoma (GC)/kg de DTX401 possa ser administrada a doentes em Portugal.

- (b) Duração da operação.

A duração planeada do estudo para cada participante é de, aproximadamente, 104 semanas, incluindo um Período de Seleção de até 8 semanas, um Período Primário de Análise de Eficácia (Principal Efficacy Analysis Period, PEAP) de 48 semanas e um Período de Seguimento de 48 semanas.

Após a conclusão deste estudo (Semana 96 ou Retirada antecipada), espera-se que todos os participantes que recebam DTX401 sejam incluídos num estudo de seguimento a longo prazo para avaliar a segurança e eficácia a longo prazo do DTX401 através do Programa de Monitorização do Doente (PMD) durante pelo menos 10 anos após a administração do DTX401.

- (c) Métodos e procedimentos para evitar e/ou minimizar a propagação dos OGM para além do local de libertação

O DTX401 será enviado para os centros do estudo de acordo com as recomendações padrão para o transporte de materiais com risco biológico. O DTX401 vai ser armazenado, preparado e administrado por profissionais qualificados, em ambiente hospitalar e administrado apenas a doentes que cumpram os critérios de inclusão no estudo clínico DTX401-CL301. O pessoal seguirá as políticas de resíduos e eliminação de acordo com os requisitos locais do local para eliminar os consumíveis utilizados na preparação e administração do OGM. Quando permitidos, os frascos usados e não usados de DTX401 serão retidos no centro do estudo até que a contabilização do medicamento do estudo tenha sido realizada pelo monitor. Se a destruição no centro não for permitida, os frascos não utilizados serão devolvidos à unidade de fabrico que libertou o produto de acordo com os requisitos padrão para o ME e conforme especificado no Manual de Farmácia.

O DTX401 é um medicamento experimental (ME) fabricado e lançado por uma Pessoa Qualificada (PQ) num Estado-Membro da União Europeia para utilização em ensaios clínicos após cumprir as especificações definidas em termos de qualidade e segurança do medicamento para administração a participantes humanos de acordo com o protocolo do estudo clínico. Além disso, é utilizado e aprovado de acordo com o protocolo do estudo clínico por agências reguladoras e Comissões de Ética no país onde o estudo será realizado. Por este motivo, a cadeia de fornecimento do ME e a sua gestão no centro são regidas no contexto dos regulamentos do ensaio clínico, lei local e diretrizes relevantes para receção, armazenamento, manuseamento, dispensa, contabilidade e devolução do ME. O Manual de Farmácia do Estudo e o material de formação localizados nos centros fornecem instruções ao pessoal da farmácia e à equipa médica clínica sobre a utilização, armazenamento e destruição do ME. Também inclui instruções para documentar o controlo do ME desde o momento do recebimento no centro do ensaio até à responsabilidade final e destruição ou devolução. Além disso, descreve os processos necessários para a gestão e documentação de quaisquer problemas, tais como variações de temperatura de envio ou armazenamento e comunicação de reclamações de produtos técnicos.

Os riscos relacionados com a libertação para o ambiente do OGM ou riscos para o pessoal no caso de haver uma violação na integridade do recipiente e/ou armazenamento ou derrame acidental no centro ou durante o envio/armazenamento, são considerados insignificantes. O OGM só será tratado por pessoal delegado e com formação e, no caso de ocorrer um derrame, o produto não é patogénico e não replicativo, limitando a disseminação e os riscos para o ambiente ou para o pessoal.

Os vetores AAV recombinantes são não replicativos e não se espera que representem um risco de transmissão. Além disso, o risco de transmissão vertical do vetor AAV é baixo e um estudo não-clínico recente demonstrou a ausência de qualquer transmissão germinal com um produto de terapia genética da Ultragenyx com um vetor AAV8 semelhante ao DTX401. No entanto, as mulheres com potencial para engravidar e os participantes do sexo masculino que sejam sexualmente ativos com parceiras com potencial para engravidar no estudo clínico DTX401-CL301 terão de utilizar um método de contraceção eficaz ao longo do estudo de 96 semanas e, em caso de retirada antecipada, durante pelo menos 48 semanas após a última dose de DTX401.

Os doentes irão receber DTX401 como perfusão IV periférica num contexto clínico e irão receber alta após a administração, ao critério do investigador, assim que todas as

avaliações do protocolo pós-perfusão IP estiverem concluídas e o Investigador determinar que o participante está clinicamente estável e seguro para receber alta, limitando assim a probabilidade de exposição dos familiares.

5. Descrição breve das condições ambientais médias (clima, temperatura, etc.)

Não aplicável. A administração de DTX401 irá ocorrer apenas num contexto hospitalar controlado.

6. Dados relevantes relativos a libertações anteriores realizadas com o mesmo OGM, se as houver, sobretudo relacionadas com os potenciais impactos ambientais e para a saúde humana devido à libertação.

G. Interações do OGM com o ambiente e potencial impacto no ambiente, se significativamente diferente do organismo recetor ou progenitor

1. Nome do organismo alvo (se aplicável)

(i)	Ordem e/ou categoria taxonómica superior (para os animais)	Primatas
(ii)	nome da família para plantas	N/A
(iii)	género	<i>Homo</i>
(iv)	espécie	<i>Homo Sapiens</i>
(v)	subespécie	N/A
(vi)	estirpe	N/A
(vii)	cultivar/linha de reprodução	N/A
(viii)	patovar	N/A
(ix)	nome comum	Humano

2. Mecanismo e resultado previstos da interação entre os OGM libertados e o organismo-alvo.

O DTX401 codifica o gene G6PC com expressão direcionada pela GPE específica do fígado, encapsidada dentro de um vetor AAV8. O AAV8, como um AAV clade E, tem tropismo forte para o fígado, e transduz o fígado de forma altamente eficiente quando administrado por via intravenosa. Portanto, espera-se que a administração de DTX401 resulte na expressão do G6PCgene no fígado dos participantes do estudo. Espera-se que a expressão de G6PC seja eficaz para o tratamento da GSDIa, dado que a doença é causada por mutações neste gene que afetam a expressão ou a atividade da enzima G6Pase.

3. Quaisquer outras interações potencialmente significativas com outros organismos no meio ambiente.

Pessoas além dos participantes humanos que recebem o medicamento não serão expostas a níveis de DTX401 que possam representar um perigo potencial. Os potenciais riscos de exposição ao DTX401 são predicados com a administração sistémica de DTX401. A exposição mínima, como a exposição ambiental, a pessoas que não os participantes que recebem DTX401 como parte do estudo não seria de dose suficiente para representar expressão genética significativa nem níveis de segurança em humanos. Como o DTX401 também é incompetente para replicação, espera-se que o vetor seja rapidamente limpo de quaisquer organismos não alvo sem causar quaisquer efeitos nocivos. Além disso, a expressão do transgene é desenhada para ocorrer apenas em hepatócitos. Além dos potenciais

hospedeiros humanos, não se espera que a exposição ao DTX401 afete quaisquer organismos não-alvo, direta ou indiretamente.

4. É provável que ocorra seleção pós-libertação, como por exemplo aumento da competitividade ou da inatividade do OGM?

Sim (.) Não (X) Desconhecido (.)

Dar detalhes

Como o DTX401 não consegue replicar, não pode ocorrer a seleção pós-libertação.

5. Tipo de ecossistemas nos quais o OGM poderia disseminar-se a partir do local de libertação e nos quais poderia estabelecer-se

Como o DTX401 não consegue replicar, não se espera que se espalhe para o ambiente de forma significativa e não se espera que se estabeleça em nenhum ecossistema.

6. Nome completo de organismos não alvo que (tendo em conta a natureza do ambiente recetor) podem ser significativamente prejudicados involuntariamente pela libertação do OGM

(i)	Ordem e/ou categoria taxonómica superior (para os animais)	N/A
(ii)	nome da família para plantas	N/A
(iii)	género	N/A
(iv)	espécie	N/A
(v)	subespécie	N/A
(vi)	estirpe	N/A
(vii)	cultivar/linha de reprodução	N/A
(viii)	patovar	N/A
(ix)	nome comum	N/A

7. Probabilidade de trocas genéticas in vivo

- (a) Do OGM para outros organismos no ecossistema de libertação:

Espera-se que o genoma viral DTX401 seja transferido para hepatócitos no fígado de doentes incluídos no estudo 401GSDIA01. Espera-se que a grande maioria dos genomas do vetor DTX401 nas células do indivíduo seja epissómica, em vez de integrada no ADN da célula hospedeira. Uma vez que o DTX401 não é replicativo e só se espera que se espalhe nos fluidos corporais dos participantes do estudo em medida limitada, a transmissão e transferência genética para organismos que não os participantes do estudo é considerada improvável.

- (b) De outros organismos para o OGM:

A eliminação de 94% do ADN viral reduz a probabilidade de recombinação homóloga com vírus relacionados que podem levar a variantes do OGM.

- (c) Consequências prováveis da transferência genética:

Embora a recombinação entre o DTX401 e um AAV do tipo selvagem para gerar um genoma de vetor híbrido que contém a cassette de expressão G6PC e os genes rep e

cap do AAV permaneça uma possibilidade teórica, tal molécula, mesmo se gerada numa célula, não seria replicada, a menos que também estivesse presente um vírus de adenovírus/herpes auxiliar. Além disso, esse genoma híbrido seria demasiado grande para embalar o ADN híbrido numa partícula de VAA. Sabe-se que o VAA possui um limite de embalagem de aproximadamente 5 kb (Wu 2010) e prevê-se que uma molécula híbrida de genes rep-cap mais a cassette de expressão G6PC exceda este limite. Os riscos associados à transferência genética de AAV do tipo selvagem para DTX401 são, portanto, considerados insignificantes.

8. Indicar referências de resultados relevantes de estudos de comportamento e de características do OGM e do respetivo impacto ecológico, realizados em ambientes naturais simulados (por ex., microcosmos, etc.):

Estes estudos não foram realizados com DTX401.

9. Possíveis interações ambientalmente significativas com processos biogeoquímicos (se diferentes do organismo recetor ou parental)

O DTX401 não é conhecido nem previsto ter impacto nos processos biogeoquímicos.

H. Informação relativa à monitorização

1. Métodos para a monitorização dos OGM.

Os métodos para monitorizar os efeitos do DTX401 incluem avaliações de segurança e eficácia.

2. Métodos para a monitorização dos efeitos no ecossistema

A presença de DTX401 em fluidos corporais após a administração de DTX401 será determinada por qPCR.

3. Métodos para a deteção da transferência do material genético doado do OGM para outros organismos

A transferência da cassette de expressão G6PC para os participantes do estudo será detetada através da avaliação da atividade G6Pase utilizando leituras clínicas adequadas.

4. Tamanho da área de monitorização (m²)

Não aplicável.

5. Duração da monitorização

Serão realizadas avaliações de segurança e eficácia ao longo de toda a duração do estudo, conforme descrito no protocolo do estudo.

6. Frequência da monitorização

Serão realizadas avaliações de segurança e eficácia ao longo de toda a duração do estudo, conforme descrito no protocolo do estudo.

I. Informação sobre a pós-libertação e o tratamento de resíduos

1. Tratamento pós-libertação do centro de ensaio

Quaisquer superfícies contaminadas com DTX401 serão desinfetadas de acordo com as leis locais e procedimentos institucionais relacionados com a gestão de substâncias biológicas e utilizando um desinfetante eficaz contra o VAA (por exemplo, hipoclorito de sódio a 1%, glutaraldeído a 2%, dodecil sulfato de sódio a 0,25%).

2. Tratamento do OGM pós-libertação

Todos os materiais descartáveis que entrem em contacto com o medicamento experimental devem ser eliminados de acordo com as políticas e práticas institucionais individuais para a eliminação e descontaminação de resíduos de risco biológico. Por exemplo, os materiais serão eliminados em recipientes para objetos perfurocortantes ou sacos de risco biológico e descontaminados por autoclave ou incineração, ou ambos. Os materiais não descartáveis serão descontaminados de acordo com as práticas e procedimentos institucionais, por exemplo, por tratamento com um desinfetante apropriado e/ou autoclave.

Quando permitidos, os frascos usados e não usados de DTX401 serão retidos no centro do estudo até que a contabilização do medicamento do estudo tenha sido realizada pelo monitor. Se a destruição no centro não for permitida, os frascos não utilizados serão devolvidos à unidade de fabrico que libertou o produto de acordo com os requisitos padrão para o ME e conforme especificado no Manual de Farmácia.

3. (a) Tipo e quantidade de resíduos gerados

Prevêm-se os seguintes tipos de resíduos:

- Frascos para injetáveis de vidro contendo DTX401. O número de frascos para injetáveis de DTX401 necessários por doente depende da coorte de dose e do peso corporal do doente.
- Materiais utilizados para a preparação e administração do medicamento do estudo, por exemplo, saco de solução salina, conjunto de administração IV, seringas, agulhas.
- Equipamento de proteção individual, por exemplo, luvas.

3. (b) Tratamento de resíduos

Todos os materiais descartáveis que entrem em contacto com o medicamento experimental devem ser eliminados de acordo com as políticas e práticas institucionais individuais. Por exemplo, os materiais são eliminados em recipientes para objetos perfurocortantes ou sacos de risco biológico e descontaminados por autoclave ou incineração, ou ambos. Os resíduos líquidos serão descontaminados e eliminados de acordo com a prática institucional

J. Informação sobre planos de resposta de emergência

1. Métodos e procedimentos para o controlo dos OGM em caso de propagação inesperada

Na eventualidade de o conteúdo do frasco/s DTX401 ou de o medicamento diluído para perfusão ser acidentalmente libertado e entrar em contacto com materiais de envio, farmácia/superfícies hospitalares, o derramamento deve ser descontaminado e removido de acordo com a prática institucional.

O DTX401 é armazenado em frascos de vidro. A equipa será alertada de que é necessário ter cuidado ao manipular os frascos para injetáveis e que o uso de agulhas deve ser mantido ao mínimo. Em caso de lesão, o pessoal seguirá os procedimentos institucionais locais.

Em caso de contacto acidental do DTX401 com a pele, olhos ou vestuário, a equipa seguirá os procedimentos institucionais para a gestão de material com risco biológico.

2. Métodos para remoção do(s) OGM(s) das áreas potencialmente afetadas

Qualquer área de superfície exposta ao OGM será desinfetada utilizando desinfetante apropriado, de acordo com as leis locais e as políticas e procedimentos institucionais.

3. Métodos para a eliminação ou higienização de plantas, animais, solos, etc., que tenham sido expostos durante ou após a propagação

A administração de DTX401 irá ocorrer apenas num contexto hospitalar controlado; por conseguinte, não se prevê que entre em contacto com plantas, animais ou solo. Além disso, o DTX401 não é capaz de infetar plantas ou micróbios.

4. Planos para a proteção da saúde humana e do meio ambiente em caso de ocorrência de um efeito indesejável

O pessoal seguirá a lei local e os procedimentos institucionais para o manuseamento e eliminação de organismos geneticamente modificados. Além disso, as recomendações de segurança e orientações sobre a gestão de incidentes relacionados com o DTX401 são fornecidas nas instruções de segurança para investigadores e equipas incluídas nesta submissão. Todos os doentes serão cuidadosamente monitorizados para deteção de quaisquer reações adversas durante este estudo. Uma comissão de monitorização de dados (DMC, data monitoring committee) independente será responsável por monitorizar os dados de segurança do estudo. A DMC pode, a qualquer momento, recomendar a modificação ou interrupção antecipada do estudo devido a preocupações de segurança com base na revisão dos dados.