

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

MODELO DE RESUMO DE NOTIFICAÇÃO DA LIBERTAÇÃO DE ORGANISMOS
GENETICAMENTE MODIFICADOS, COM EXCEÇÃO DAS PLANTAS SUPERIORES EM
CONFORMIDADE COM O ARTIGO 11º DA DIRETIVA 2001/18/CE

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

A. Informação geral

1. Dados relativos à notificação

- | | |
|------------------------------------|------------|
| (a) Estado-Membro da notificação | Portugal |
| (b) Número da notificação | B/PT/22/01 |
| (c) Data de receção da notificação | 05/01/2022 |
| (d) Título do projeto | ... |

Estudo de fase 1b aberto, multicêntrico, de escalonamento de dose, para avaliar a segurança, a tolerabilidade e os efeitos farmacodinâmicos de uma dose única de PBFT02 administrado na cisterna magna (ICM) de participantes adultos com demência frontotemporal (DFT) e mutações no gene da progranulina (*GRN*)

- (e) Período de libertação proposto De 12/31/2021 a 12/31/2028

2. Notificador

Denominação da instituição ou empresa: Passage Bio Inc.

3. Caracterização do OGM

(a) Indicar se o OGM é um(a):

- | | |
|----------------|-----|
| Vírus | (.) |
| Vírus de ARN | (.) |
| Vírus de ADN | (X) |
| Bactéria | (.) |
| Fungo | (.) |
| Animal | |
| - Mamífero | (.) |
| - Inseto | (.) |
| - Peixe | (.) |
| - Outro animal | (.) |

Especificar o filo, a classe ...

(b) Identidade do OGM (género e espécie)

Género: Dependoparvovírus
Espécie: Vírus adeno-associado / serotipo 1 (AAV1)

(c) Estabilidade genética, em conformidade com o ponto II.A.10 do Anexo IIIa

O OGM, PBFT02 (AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG), é um vetor de vírus adeno-associado (rAAV) recombinante não replicante. PBFT02 é um serotipo do vetor AAV1 que é composto por uma cápside viral contendo o gene precursor da granulina humana (*GRN*) que codifica a PGRN.

O vírus adeno-associado do tipo selvagem (wtAAV) é um vírus de ADN de cadeia única que tem um elevado grau de estabilidade genética. O wtAAV utiliza uma polimerase de ADN do hospedeiro para replicação viral que não é suscetível de erro quando comparada com as polimerases de ARN utilizadas pelos vírus de ARN e, em geral, os vírus de ADN têm uma maior estabilidade genética do que os vírus de ARN. PBFT02 também contém um genoma de ADN de cadeia única que se espera ter uma estabilidade genética semelhante à do wtAAV. A estabilidade genética do PBFT02 é suportada pela produção em condições de cGMP, e verificação da qualidade através de testes de pureza, potência e composição.

O ADN de wtAAV e de vetores recombinantes baseados em AAV persiste em células transduzidas como concatâmeros epissomais circulares em tecidos humanos. No entanto, o rAAV foi concebido para anular todos os genes virais, com exceção das regiões terminais invertidas (ITR) e da incorporação de uma cassette de expressão genética através da tecnologia do ADN recombinante. Devido à falta de genoma viral, o PBFT02 não tem capacidade de replicação e é, portanto, geneticamente estável por defeito, uma vez que não apresenta qualquer mecanismo interno de variação/alteração no genoma.

Espera-se que o genoma transduzido do PBFT02 permaneça nas células como epissomas ($\geq 99,5\%$) e, devido à falta do genoma wtAAV, o rAAV não se irá replicar e produzir partículas virais.

Em resumo, o PBFT02 é altamente estável geneticamente. O OGM não é capaz de replicar o seu genoma, e não são esperadas alterações no genoma.

4. Prevê-se a libertação desse mesmo OGM noutra local da Comunidade (em conformidade com o n° 1 do artigo 6º), pelo mesmo notificador?

Sim (x) Não ()

Em caso afirmativo, indicar o(s) código(s) do(s) país(es)
IT

5. A libertação desse OGM já foi objeto de notificação noutra local da Comunidade pelo mesmo notificador?

Sim (.) Não (x)

Em caso afirmativo:

- Estado-Membro da notificação ...
- Número da notificação B/././...

Utilizar os seguintes códigos de país:

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

6. Esse OGM já foi objeto de notificação para libertação ou colocação no mercado fora da Comunidade, pelo mesmo ou por outro notificador?

Sim (.) Não (x)

Em caso afirmativo:

- Estado-Membro da notificação
- Número da notificação B/././...

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

O PBFT02 é um OGM não replicante que é manuseado e administrado em condições controladas, seguindo os procedimentos hospitalares aplicáveis, por pessoal hospitalar formado, pelo que o risco de libertação no ambiente é considerado mínimo.

Existe um risco potencial de libertação no ambiente devido a extrusão de vetores. Um estudo de extrusão vetorial do PBFT02 realizado em primatas não humanos (NHP) que mostrou que o ADN do vetor PBFT02 era detetável na urina e nas fezes após 5 dias e era indetetável tanto na urina como nas fezes após 28 dias e 60 dias, respetivamente. Considerando os níveis baixos a indetetáveis de ADN vetorial medidos no estudo de extrusão, existe uma probabilidade mínima de o PBFT02 ser transferido para outros seres humanos, animais ou ambiente. A exposição mínima ao PBFT02, tal como a exposição ambiental, a outras pessoas que não os indivíduos que recebem o PBFT02 como parte do estudo, não seria em quantidade suficiente para apresentar um risco para a saúde ou segurança humana.

A replicação do PBFT02 só poderia ocorrer no caso extremamente improvável de uma célula hospedeira ser infetada por três vírus separados: AAV1.CB7.Cl.hPGRN.rBG recombinante, AAV do tipo selvagem e um vírus *helper* como o adenovírus humano ou o vírus do herpes simplex. Este cenário resultaria apenas na produção de mais AAV de tipo selvagem e de mais partículas do vetor PBFT02 (que ainda careceriam de genes *rep* e *cap* e, consequentemente, não poderiam ser auto-sustentáveis). Por conseguinte, considerando tanto o padrão de extrusão viral após a injeção do PBFT02 como as características não replicantes e não infecciosas do vetor, a libertação do PBFT02 no ambiente é considerada insignificante.

Um derrame acidental do medicamento experimental nos locais de dosagem poderia levar a uma contaminação ambiental que, teoricamente, resultaria numa transferência não intencional para os seres humanos. Há uma baixa probabilidade de que a transferência genética possa ser feita para outros humanos; contudo, dado que a quantidade seria tão pequena e o OGM não tem capacidade de replicação (mesmo na presença do vírus *helper*) o resultado seria negligenciável.

B. Informações relativas aos organismos recetores ou parentais de onde o OGM é derivado

1. Caracterização do organismo recetor ou parental

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

(selecionar apenas um)

- Vírus (.)
- Vírus de ARN (.)

Vírus de ADN (X)
 Bactéria (.)
 Fungo (.)
 Animal
 - Mamífero (.)
 - Inseto (.)
 - Peixe (.)
 - Outro animal (.)
 Especificar o filo, a classe ...

Outro, especificar ...

2. Nome

(i) Ordem e/ou taxon superior (no caso dos animais) ...
 (ii) Género Dependoparvovírus
 (iii) Espécie Vírus adeno-associado
 (iv) Subespécie serotipo 1 (AAV1)
 (v) Estirpe ...
 (vi) Patovar (biótipo, ecotipo, raça, etc.): ...
 (vii) Designação comum Vírus adeno-associado

3. Distribuição geográfica do organismo

(a) Nativo ou estabelecido no país onde é apresentada a notificação:
 Sim (X) Não (.) Não sabe (.)

(b) Nativo ou estabelecido noutros países comunitários:

(i) Sim (.)

Em caso afirmativo, indicar o tipo de ecossistema onde pode ser encontrado:

Atlântico X
 Mediterrâneo X
 Ártico X
 Alpino X.
 Continental X
 Macaronésico X

(ii) Não (.)

(iii) Não sabe (.)

(c) O OGM é frequentemente utilizado no país em que é objeto de notificação?
 Sim (.) Não (X)

(d) O OGM é frequentemente conservado no país em que é objeto de notificação?
 Sim (.) Não (X)

4. Habitat natural do organismo

(a) No caso dos microrganismos

Água (.)

Solo, de forma autónoma (.)

Solo, associado a sistemas radiculares de plantas (.)

Associado a sistemas foliares/caulinares de plantas (.)

Outros, especificar O ADN viral recombinante persistirá no núcleo da célula hospedeira em forma epissomal ou poderá integrar-se no genoma da célula hospedeira a uma baixa frequência.

(b) Se o organismo for um animal, qual o habitat natural ou ecossistema agrícola habitual:

Não aplicável

5. (a) Técnicas de deteção

Reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR)

Reação em cadeia da polimerase digital em gotículas (ddPCR)

(b) Técnicas de identificação

Consultar 5a

6. O organismo recetor está classificado de acordo com as normas comunitárias em vigor relativas à proteção da saúde humana e/ou do ambiente?

Sim (X) Não (.)

Em caso afirmativo, especificar

O AAV cumpre a definição de agente biológico do Grupo de Risco 1 de acordo com a Diretiva 2000/54/CE (agente biológico com baixa probabilidade de causar doenças no ser humano) e está classificado como nível de biossegurança (BSL) 1.

7. O organismo recetor é significativamente patogénico ou de qualquer outra forma nocivo (incluindo no que respeita aos seus produtos extracelulares), vivo ou morto?

Sim (.) Não (X) Não sabe (.)

Em caso afirmativo:

(a) Em relação a que organismos:

Seres humanos (.)

Animais (.)

Plantas (.)

Outros (.)

(b) Prestar as informações relevantes nos termos do ponto II.A.11.d) do Anexo III A da Diretiva 2001/18/CE

...

8. Informações relativas à reprodução

(a) Tempo de geração nos ecossistemas naturais:

Um tempo de geração do wtAAV1 após a infecção de uma célula hospedeira deverá ser muito curto, dentro de horas. Contudo, o vírus só pode reproduzir-se com a coinfeção de um vírus *helper*, como o adenovírus humano ou o vírus do herpes simplex.

(b) Tempo de geração no ecossistema onde o organismo vai ser libertado:

O genoma vetorial do PBFT02 não tem sequências de codificação dos genes *rep* e *cap* e, portanto, não se pode replicar mesmo na presença de um vírus *helper*, como um adenovírus.

(c) Forma de reprodução: N/A Sexuada .. Assexuada ..

(c) Fatores que afetam a reprodução:

A replicação do PBFT02 só pode ocorrer no caso extremamente improvável de uma célula hospedeira ser infetada por três vírus separados: AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG recombinante, AAV do tipo selvagem e um vírus *helper* como o adenovírus humano ou o vírus do herpes simplex. O risco de ocorrência desta tripla infecção é negligenciável.

9. Capacidade de sobrevivência

(a) Capacidade para formar estruturas de sobrevivência ou dormência:

- | | | |
|--------|-----------------------------|-----|
| (i) | Endoesporos | (.) |
| (ii) | Cistos | (.) |
| (iii) | Esclerócios | (.) |
| (iv) | Esporos assexuados (fungos) | (.) |
| (v) | Esporos sexuados (fungos) | (.) |
| (vi) | Ovos | (.) |
| (vii) | Pupas | (.) |
| (viii) | Larvas | (.) |
| (ix) | Outras, especificar | |

O PBFT02 não forma estruturas de sobrevivência, contudo, como acontece com todos os vírus, a replicação do AAV não pode ocorrer fora de uma célula hospedeira. Os AAV são capazes de entrar nas células de muitas espécies animais. Os AAV são vírus de ADN sem envelope que são relativamente estáveis e resistentes à desidratação. Poderiam potencialmente sobreviver durante períodos prolongados no ambiente e permanecer infecciosos, o que se pensa ser na ordem de várias semanas. O AAV, sendo um vírus sem envelope, pode tolerar uma vasta gama de pH (3-9) e temperaturas elevadas (55 °C durante 1 hora). No entanto, não possuem essa capacidade por natureza e não poderão reproduzir-se na ausência de vírus *helper* ou outras funções *helper*.

(b) Fatores que afetam a capacidade de sobrevivência:

A replicação do PBFT02 depende da coinfeção com vírus *helper* como o adenovírus humano ou o vírus do herpes simplex.

O PBFT02, como qualquer AAV de tipo selvagem, é suscetível a desinfetantes virucidas apropriados, tais como lixívia a 10%, ácido peracético a >0,25% ou hipoclorito de sódio/lixívia a 10% (durante pelo menos 30 minutos).

10. (a) Formas de disseminação

As formas de disseminação do AAV são pouco conhecidas, mas são suscetíveis de ocorrer através da inalação de gotículas aerossolizadas, contacto com a mucosa, injeção parenteral, ou ingestão.

A dispersão do PBFT02 não é possível em circunstâncias normais. Não se sabe se a zoonose ocorre na natureza, ou se outras espécies podem atuar como portadoras ou vetores em condições naturais. No entanto, dada a incapacidade de replicação e o local de administração, a possibilidade de exposição do PBFT02 a não-humanos é considerada negligenciável.

Estudos não clínicos em primatas não humanos (NHP) onde o PBFT02 é administrado via ICM mostraram um nível indetetável de ADN vetorial (ver Secção 7) indicando baixo risco de dispersão devido ao extrusão de vetores.

(b) Fatores que afetam a disseminação

A disseminação do OGM pode potencialmente ocorrer entre humanos, particularmente de doentes tratados através da extrusão de vetores. Ao genoma vetorial recombinante falta o genoma viral, para além das ITR, pelo que o OGM não é capaz de se replicar. Não se espera que o transgene confira qualquer vantagem ao OGM em termos de sobrevivência e de pressão seletiva. Espera-se que o risco para os seres humanos e para o ambiente associado à extrusão do AAV1 seja baixo a negligenciável. A extensão e a duração da extrusão do PBFT02 em seres humanos será monitorizada como parte do ensaio clínico proposto.

11. Modificações genéticas anteriores do organismo recetor ou parental que já tenham sido notificadas no país onde é apresentada a notificação (indicar números de notificação) ..., B/././...

Não aplicável.

C. **Informações relativas à modificação genética**

1. Tipo de modificação genética

- (i) Inserção de material genético (X)
- (ii) Deleção de material genético (X)
- (iii) Substituição de bases (.)
- (iv) Fusão celular (.)
- (v) Outra, especificar ...

2. Resultado esperado da modificação genética

A modificação genética do organismo destina-se à inserção da cassette de expressão hPGRN que conduz à expressão de uma cópia funcional da proteína PGRN para as células do sistema nervoso central (SNC). A cápside do AAV1 é responsável por visar as células do SNC e por mediar a interação inicial com os neurónios para a entrada do vetor e para a entrega do genoma vetorial ao núcleo. Uma vez dentro do núcleo, o genoma perde o revestimento e persiste como um epissoma para mediar a expressão a longo prazo do transgene GRN. É também feita uma modificação para remover as sequências de codificação dos genes *rep* e *cap* na cassette de expressão, levando à perda da capacidade de replicação.

3. (a) Foi usado um vetor no processo de modificação?

Sim (X) Não ()

Em caso negativo, passar diretamente para a pergunta 5.

(b) Em caso afirmativo, o vetor está parcial ou integralmente presente no organismo modificado?

Sim (X) Não ()

Em caso negativo, passar diretamente para a pergunta 5.

4. No caso de a resposta à pergunta 3.b) ser afirmativa, complementar com as informações seguintes

(a) Tipo de vetor

Plasmídeo	(X)
Bacteriófago	(.)
Vírus	(.)
Cosmídeo	(.)
Elemento transponível	(.)
Outro, especificar	...

(b) Identificar o vetor

O PBFT02 é fabricado através da transfeção de células HEK-293 com os três plasmídeos seguintes:

- o plasmídeo *cis* do AAV (pENN.AAV.CB7.CI.hPRGN.rBG.KanR) codificando a cassette de expressão transgénica flanqueada entre duas ITR
- o plasmídeo *trans* do AAV (designado pAAV2/1.KanR) que codifica os genes AAV2 *rep* e AAV1 *cap*
- o plasmídeo do adenovírus *helper* (designado pAdDeltaF6(Kan)).

O vetor no medicamento experimental consiste na cápside viral contendo o genoma vetorial AAV1.CB7.CI.hPGRN.rBG de ~4.1 Kbp flanqueado por sequências ITR.

(c) Variedade de hospedeiros do vetor

Os plasmídeos foram construídos utilizando técnicas biológicas moleculares padrão para a excisão e ligação precisas dos elementos componentes utilizando enzimas de restrição específicas seguidas de transdução e amplificação em células bacterianas em cada fase.

(d) Presença no vetor de sequências capazes de apresentar fenótipos suscetíveis de seleção ou identificação

Sim (X) Não ()

Resistência aos antibióticos (X)

Outras, especificar: Sequências de adenovírus

Indicar o gene resistente aos antibióticos inserido

O gene de resistência à ampicilina foi substituído pelo gene de resistência à canamicina para criar o pDeltaF6(KanR).

(e) Fragmentos constitutivos do vetor

O ADN do plasmídeo vetor presente no PBFT02 limita-se apenas à cassette de expressão transgênica hPGRN pretendida (promotor ubíquo CB7, intrão quimérico, sequência de codificação do precursor de granulina humana com otimização de codão (*GRN*) e um sinal de poliA de β -globina de coelho) e as duas repetições terminais virais invertidas. O promotor CB7 é um híbrido de um potenciador IE de CMV e de um promotor de BA de galinha. Ver secção 6 para mais detalhes.

(f) Método de introdução do vetor no organismo recetor:

- (i) Transformação (.)
- (ii) Eletroporação (.)
- (iii) Macroinjeção (.)
- (iv) Microinjeção (.)
- (v) Infeção (.)
- (vi) Outro, especificar ...Transdução

5. No caso de ter respondido negativamente a pergunta B.3.a) e b), qual o método utilizado no processo de modificação?

- (i) Transformação (.)
- (ii) Microinjeção (.)
- (iii) Microencapsulação (.)
- (iv) Macroinjeção (.)
- (v) Outro, especificar ...

6. Informações relativas à inserção

(a) Composição da sequência inserida

5' ITR
Promotor de BA
Potenciador IE de CMV
Intrão quimérico
Gene da GRN humano
Sinal de poliadenilação da β -globina
3' ITR

(b) Origem das partes constituintes da sequência inserida

5' ITR: AAV-2 (GenBank: NC_001401)
Promotor: galinha
Potenciador: ser humano
Intrão: coelho e galinha
Gene GRN: ser humano
Sinal de poliadenilação: coelho
3' ITR: AAV-2 (GenBank: NC_001401)

(c) Função prevista de cada parte constituinte da sequência inserida no OGM

5' ITR: replicação do genoma e empacotamento da cápside
Promotor: expressão do transgene
Potenciador: expressão transgene
Intrão: estabilização do ARNm
Gene *GRN*: expressão da proteína terapêutica (GRN) nas células do doente para tratar/prevenir a doença no recetor
Sinal de poliadenilação: tradução do transgene
3' ITR: replicação do genoma e empacotamento da cápside

(d) Localização da sequência inserida no organismo hospedeiro

- Num plasmídeo, na sua forma livre (.)
- Integrado no cromossoma (.)
- Outra, especificar ... como concatâmeros epissomais nas células

hospedeiras

(e) A sequência inserida contém partes cujo produto ou função sejam desconhecidos?

Sim (.) Não (X)
Em caso afirmativo, especificar ...

D. Informações relativas ao(s) organismo(s) de onde a inserção é derivada

1. Indicar se se trata de um(a):

Vírus (.)
Vírus de ARN (.)
Vírus de ADN (.)
Bactéria (.)
Fungo (.)
Animal

- Mamífero (X)
 - Inseto (.)
 - Peixe (.)
 - Outro animal (.)
- Especificar o filo, a classe ...
- Outro, especificar ...

2. Nome completo

- (i) Ordem e/ou taxon superior (no caso dos animais): Primatas
- (ii) Família (no caso das plantas) N/A
- (iii) Género Homo
- (iv) Espécie *sapiens*
- (v) Subespécie *sapiens*
- (vi) Estirpe N/A
- (vii) Cultivar/linhagem N/A
- (viii) Patovar N/A
- (ix) Designação comum Humano

3. O organismo é significativamente patogénico ou de qualquer outra forma nocivo (incluindo no que respeita aos seus produtos extracelulares), vivo ou morto?

- Sim (.) Não (X) Não sabe (.)
- Em caso afirmativo, especificar

(b) Em relação a que organismos:

- Seres humanos (.)
- Animais (.)
- Plantas (.)
- Outros ..

(b) As sequências doadas estão de alguma forma envolvidas com as propriedades patogénicas ou nocivas do organismo

- Sim (.) Não (.) Não sabe (.)

Em caso afirmativo, prestar as informações relevantes nos termos do ponto II.A.11.d) do Anexo III A:

...

4. O organismo dador está classificado de acordo com as normas comunitárias em vigor relativas à proteção da saúde humana e do ambiente, por exemplo, 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)
- Em caso afirmativo, especificar ...

5. O intercâmbio de material genético entre os organismos dador e hospedeiro processa-se naturalmente?

- Sim (.) Não (X) Não sabe (.)

E. Informações relativas ao organismo geneticamente modificado

1. Traços genéticos ou características fenotípicas do organismo recetor ou parental que foram alterados com a modificação genética

(a) O OGM difere do recetor no que respeita à capacidade de sobrevivência?

Sim (X) Não (.) Não sabe (.)

Especificar O PBFT02 é incapaz de se replicar independentemente, mesmo na presença de um vírus *helper*, uma vez que lhe faltam os genes *rep* e *cap* necessários para o resgate/empacotamento.

(b) O OGM difere de alguma forma do recetor no que se refere ao modo e/ou taxa de reprodução?

Sim (X) Não (.) Não sabe (.)

Especificar O genoma rAAV carece de sequências de genes *rep* e *cap* e não tem, portanto, capacidade de replicação mesmo na presença de um vírus *helper*.

(c) O OGM difere de alguma forma do recetor no que se refere à disseminação?

Sim (X) Não (.) Não sabe (.)

Especificar O PBFT02 é incapaz de se replicar independentemente, mesmo na presença de um vírus *helper*, uma vez que lhe faltam os genes *rep* e *cap* necessários para o resgate/empacotamento. Portanto, embora tenha a capacidade de infetar células, a falta de capacidade de replicação irá restringir severamente a disseminação.

(d) O OGM difere de alguma forma do recetor no que se refere à patogenicidade?

Sim (.) Não (X) Não sabe (.)

Especificar Nem o wtAAV nem o vetor experimental PBFT02 é conhecido por ser patogénico para os seres humanos ou para o ambiente.

2. Estabilidade genética do organismo geneticamente modificado

A estabilidade genética é avaliada como parte da estabilidade do medicamento PBFT02.

Atualmente, os dados disponíveis relativamente um período máximo de 12 meses mostram

que o OGM é estável na condição de conservação recomendada de ≤ -60 °C. Além disso, o

PBFT02 não tem capacidade de replicação independente, uma vez que o seu transgene

empacotado carece dos genes *rep* e *cap* necessários para o resgate/empacotamento. Com base

no facto de a atividade terapêutica a longo prazo do medicamento experimental não depender

da replicação do AAV recombinante, e da conhecida estabilidade genética do wtAAV

parental, espera-se que os traços genéticos do organismo sejam estáveis.

Ver também a secção A.3c

3. O OGM é significativamente patogénico ou de alguma forma nocivo (incluindo no que respeita aos seus produtos extracelulares), vivo ou morto?

Sim (.) Não (X) Não sabe (.)

(a) Em relação a que organismos:

Seres humanos (.)
Animais (.)
Plantas (.)
Outros ...

(b) Prestar as informações relevantes nos termos dos pontos II.A.11.d) e II.C.2.i) do Anexo III A:

Nem o wtAAV, nem o vetor experimental PBFT02 é conhecido por ser patogénico para os humanos.

4. Descrição dos métodos de identificação e deteção

(a) Técnicas de deteção do OGM no ambiente

Os métodos baseados na reação em cadeia de polimerase digital em gotículas (ddPCR), utilizando *primers* específicos do genoma vetorial, podem ser utilizados para detetar elementos genéticos do OGM.

(b) Técnicas de identificação do OGM

Os métodos baseados em ddPCR, utilizando *primers* específicos do genoma vetorial, podem ser utilizados para detetar elementos genéticos do OGM.

F. Informações relativas à libertação

1. Objetivo da libertação (incluindo potenciais benefícios esperados no domínio ambiental)

A libertação do OGM será feita no contexto do ensaio clínico com o número de protocolo PBFT02-001. O estudo é um estudo de fase 1b aberto, multicêntrico, de escalonamento de dose, para avaliar a segurança, a tolerabilidade e os efeitos farmacodinâmicos de uma dose única de PBFT02.

2. O local de libertação é diferente do habitat natural ou do ecossistema em que o organismo recetor ou parental é habitualmente utilizado, conservado ou encontrado?

Sim (X) Não ()

Em caso afirmativo, especificar O OGM sem capacidade de replicação é administrado por via ICM e, embora sejam de esperar níveis transitórios de extrusão de ADN vetorial, espera-se que o vetor baseado em AAV extrusado não seja infeccioso.

3. Informações relativas à libertação e à zona circundante

(a) Localização geográfica (região administrativa e, quando aplicável, coordenadas):
Coimbra, Portugal

(b) Dimensão do local (m²): ... m²
(i) Local exato da libertação (m²): Não aplicável
(ii) Zona de libertação mais alargada (m²): Não aplicável

- (c) Proximidade de biótipos internacionalmente reconhecidos ou de zonas protegidas (incluindo reservatórios de água potável) suscetíveis de serem afetados

Não aplicável tendo em conta que o material de extrusão, caso exista, não é infeccioso.

- (d) Flora e fauna, incluindo culturas, animais de criação e espécies migratórias suscetíveis de interagir com o OGM

Não aplicável.

4. Método de libertação e quantidade libertada

- (a) Quantidade de OGM a libertar:

Os participantes receberão uma única administração de uma dose de $3,3 \times 10^{10}$ cópias do genoma (GC)/g de peso cerebral ou $1,1 \times 10^{11}$ GC/g de peso cerebral ou $2,2 \times 10^{11}$ GC/g de peso cerebral.

- (b) Duração da operação:

Espera-se que o procedimento completo de administração demore 1-2 horas. Espera-se que a dose preparada seja administrada dentro de 8 horas após a preparação da dose.

- (c) Métodos e processos para prevenir e/ou minimizar a disseminação dos OGM fora do local de libertação

O PBFT02 será fornecido à farmácia do centro em frascos para injetáveis (recipiente primário), cada frasco para injetáveis embalado numa embalagem individual do doente com selos invioláveis. Cada dose do doente será preparada na farmácia do centro por pessoal com formação. Após a preparação da dose final, a seringa selada será devidamente rotulada (indicando material OGM) e transportada para o bloco operatório numa caixa de transporte apropriada à temperatura ambiente (TA), seguindo os procedimentos de transporte institucional. A seringa será aberta, e a administração de OGM ocorrerá no bloco operatório durante um procedimento cirúrgico que envolve procedimentos de esterilidade e médicos padrão. A libertação de OGM será limitada à administração na ICM do participante. Todos os materiais contaminados utilizados durante a preparação e administração da dose serão eliminados corretamente, seguindo as orientações locais e os procedimentos institucionais.

Todo o pessoal médico terá sido previamente informado sobre a presença de um OGM em todas as amostras biológicas e instruído sobre o seu manuseamento adequado. O pessoal médico seguirá os procedimentos do equipamento de proteção individual (EPI) institucionais, incluindo o uso de máscaras e luvas.

O centro de investigação utilizará equipamento e materiais descartáveis para o processo de administração do medicamento em estudo. Em caso de derrame, será seguido o SOP para caso de derrame do centro de investigação para a limpeza e desinfeção das superfícies de contacto.

Todos os resíduos serão eliminados de acordo com os regulamentos locais e procedimentos específicos do centro. As agulhas serão recolhidas num recipiente para objetos perfurocortantes para evitar picadas acidentais.

5. Breve descrição das condições ambientais médias (condições meteorológicas, temperatura, etc.)
O ensaio clínico do PBFT02 será conduzido em salas de tratamento com condições ambientais internas.

6. Dados relevantes relativos a libertações anteriores do mesmo OGM, quando aplicável, designadamente relacionados com os potenciais impactos ambientais e na saúde humana decorrentes dessa libertação.

Nenhum.

G. Interações do OGM com o ambiente e impacto ambiental potencial, quando significativamente diferente do impacto do organismo recetor ou parental

1. Designação dos organismos-alvo (quando aplicável)
- | | |
|--|----------------|
| (i) Ordem e/ou taxon superior (no caso dos animais): | Primatas |
| (ii) Família (no caso das plantas) | N/A |
| (iii) Género | Homo |
| (iv) Espécie | <i>sapiens</i> |
| (v) Subespécie | <i>sapiens</i> |
| (vi) Estirpe | N/A |
| (vii) Cultivar/linhagem | N/A |
| (viii) Patovar | N/A |
| (ix) Designação comum | Humano |

2. Mecanismo previsto e resultado da interação entre os OGM libertados e o organismo-alvo (quando aplicável)

O transgene GRN será entregue com a administração de uma única dose de PBFT02 na ICM. Foi concebido para alcançar uma expressão estável e potencialmente vitalícia da proteína ativa PGRN nas células do sistema nervoso central (SNC).

3. Outras interações potencialmente significativas com outros organismos presentes no ambiente

Há potencial para que a transferência genética possa ser feita para outros seres humanos. Como a quantidade seria tão pequena e o OGM não tem capacidade de replicação (mesmo na presença do vírus *helper*), o risco de interações com outros organismos no ambiente seria negligenciável.

4. Prevê-se uma seleção pós-libertação do OGM, por exemplo, maior competitividade, maior capacidade invasiva, etc.?

Sim (.) Não (X) Não sabe (.)

Prestar detalhes

...

5. Tipo de ecossistemas em que o OGM poderá ser disseminado a partir do local de libertação e em que poderá implantar-se

Como o vetor recombinante não é capaz de se reproduzir, a consequência de uma infecção pelo OGM disseminado nos ecossistemas seria negligenciável.

6. Nome completo dos organismos não-alvo suscetíveis de serem afetados, de forma acidental e significativa, pela libertação dos OGM (tendo em conta a natureza do ambiente recetor)

Não aplicável

- | | |
|---|-----|
| (i) Ordem e/ou taxon superior (no caso dos animais) | ... |
| (ii) Família (no caso das plantas) | ... |
| (iii) Género | ... |
| (iv) Espécie | ... |
| (v) Subespécie | ... |
| (vi) Estirpe | ... |
| (vii) Cultivar/linhagem | ... |
| (viii) Patovar | ... |
| (ix) Designação comum | ... |

7. Capacidade de transferência de material genético *in vivo*

- (a) Do OGM para outros organismos presentes nos ecossistemas de libertação:

O PBFT02 não tem capacidade de replicação, uma vez que o transgene não contém o gene *rep* e *cap*. As modificações genéticas do PBFT02 não afetam o seu hospedeiro natural e o tropismo de tecidos. Não se prevê qualquer transferência de material genético entre o OGM e outros organismos.

A transferência de material genético está portanto limitada ao intercâmbio genético teórico de ADN por recombinação homóloga com wtAAV que só poderia ocorrer se as células humanas fossem simultaneamente infetadas com wtAAV e PBFT02 na presença de um vírus *helper*. No caso do PBFT02, tal recombinação altamente improvável, só poderia resultar na troca da cassette de expressão de PGRN com os genes *rep* e *cap* do wtAAV. Além disso, não é possível que o genoma do AAV contenha tanto os genes *rep/cap* como o transgene, uma vez que isto ultrapassa o limite de empacotamento do virião (aproximadamente 4,7 Kbp). Portanto, o único mecanismo pelo qual o transgene poderia ser mobilizado é através de uma tripla infecção da mesma célula pelo PBFT02 (contendo o transgene), pelo wtAAV (fornecendo as funções de *rep* e *cap*) e por um vírus *helper*. Espera-se que este cenário seja um acontecimento raro e apenas resultaria na produção de mais wtAAV e mais partículas do vetor PBFT02 (que ainda careceriam de genes *rep* e *cap* e, consequentemente, não poderiam ser auto-sustentáveis).

- (b) De outros organismos para o OGM:

Tal como acima.

- (c) Eventuais consequências da transferência de genes:

Como descrito acima, através de uma infecção tripla, pode ocorrer a transferência de genes. Num acontecimento extremamente raro como este, a consequência provável pode dar ao organismo modificado a capacidade de se auto-replicar. No entanto, a limitação da capacidade de empacotamento da cápside tornará impossível o encapsulamento dos genes *rep/cap* e do transgene.

8. Mencionar os resultados pertinentes (quando disponíveis) dos estudos do comportamento e das características do OGM e do seu impacto ecológico, realizados em ambiente natural simulado (por exemplo, microcosmos, etc.):

Não foram realizados estudos específicos sobre a transmissão do PBFT02 entre seres humanos ou animais.

9. Eventuais interações significativas no plano ambiental com os processos biogeoquímicos (caso se verifiquem diferenças relativamente ao organismo recetor ou parental)

Nenhuma é conhecida ou prevista. Não se sabe que o AAV esteja envolvido em qualquer processo biogeoquímico. Não respira e não contribui para a produção primária ou processos de decomposição. Na sua forma virião, não exhibe qualquer atividade metabólica.

H. Informações relativas à monitorização

1. Métodos de monitorização dos OGM

A monitorização dos efeitos diretos e indiretos do PBFT02 nos participantes será obtida através das avaliações clínicas definidas no protocolo do ensaio clínico. Os investigadores do estudo monitorizarão os participantes durante todo o tratamento e comunicarão os efeitos adversos de acordo com os requisitos estipulados no protocolo.

A extrusão do vetor para cada participante será monitorizada em vários pontos temporais após a administração, tal como descrito no protocolo do ensaio clínico.

2. Métodos de monitorização dos efeitos no ecossistema

Não está prevista ou considerada necessária qualquer monitorização do ambiente ou de recetores involuntários.

3. Métodos de deteção da transferência de material genético doado para outros organismos

Não aplicável, a transferência de material genético doado do doente para outros organismos não está prevista.

4. Dimensão do local (m²) de monitorização

Não aplicável.

5. Duração da monitorização

A monitorização ocorrerá durante toda a participação de um participante no estudo, incluindo um período de seguimento de segurança, conforme definido no protocolo de estudo.

6. Frequência da monitorização

A monitorização será feita de acordo com o calendário pré-definido detalhado no protocolo de estudo.

I. Informações relativas ao período pós-libertação e ao tratamento de resíduos

1. Tratamento pós-libertação do centro

Todos os materiais descartáveis que entrem em contacto com o PBFT02 e fluidos biológicos dos participantes serão eliminados de acordo com práticas e políticas institucionais individuais para a eliminação e descontaminação de resíduos com perigo biológico. Em geral, os materiais descartáveis serão eliminados em recipientes para objetos perfurocortantes ou sacos de perigo biológico e descontaminados por autoclavagem ou incineração ou ambos. Os materiais não descartáveis serão descontaminados de acordo com práticas e procedimentos institucionais, por exemplo, através de tratamento com um desinfetante e/ou autoclavagem adequados.

Os frascos para injetáveis usados e não usados do PBFT02 serão mantidos no centro de investigação até que a pessoa designada para o estudo tenha contabilizado os medicamentos. Todos os frascos para injetáveis não utilizados serão mantidos nas condições de conservação necessárias (≤ -60 °C). Os frascos para injetáveis não utilizados/parcialmente utilizados só podem ser eliminados no centro, seguindo os requisitos locais, apenas após a conclusão da contabilização. Serão fornecidas instruções para expedição ou destruição dos frascos para injetáveis não utilizados.

2. Tratamento pós-libertação dos OGM

Todos os resíduos gerados (material em contacto com o OGM durante a preparação e administração do ME) e outros itens que possam ter entrado em contacto com o OGM serão eliminados de acordo com os regulamentos e procedimentos institucionais locais, em conformidade com as normas ou leis em matéria de perigo biológico.

3. (a) Tipo e quantidade de resíduos produzidos

O PBFT02 será administrado como uma única injeção na ICM. Os resíduos gerados pela preparação e injeção de PBFT02 podem consistir em frascos para injetáveis, tubos, seringas, agulhas, luvas, batas, recipientes pós-preparação de dose, e material pós-administração.

3. (b) Tratamento dos resíduos

Todos os materiais descartáveis (incluindo mas não limitado a luvas, máscaras, seringas, agulhas e tubos) que entrem em contacto com o PBFT02 durante os procedimentos de preparação e administração da dose ou a colheita de amostras biológicas serão eliminados de acordo com as práticas e políticas institucionais individuais. Por exemplo, os materiais são eliminados em recipientes para objetos perfurocortantes ou sacos de perigo biológico e descontaminados por autoclavagem

ou incineração, ou ambos. Os resíduos líquidos serão descontaminados e eliminados de acordo com a prática institucional.

Todo o equipamento cirúrgico não descartável será limpo utilizando um desinfetante químico com atividade virucida comprovada (por exemplo, solução de hipoclorito de sódio a 10%) e depois esterilizado por autoclavagem de acordo com a prática padrão da instituição.

J. Informações relativas aos planos de resposta de emergência

1. Métodos e procedimentos para controlo da disseminação dos OGM em caso de propagação acidental

O PBFT02 é administrado aos participantes elegíveis numa instalação médica por profissionais médicos com formação. Será assegurado o acesso restrito ao bloco operatório e ao participante apenas pelo pessoal médico necessário responsável pelo doente. Todo o pessoal médico terá sido previamente informado sobre a presença de um OGM em todas as amostras biológicas e instruído sobre o seu manuseamento adequado. Qualquer propagação do PBFT02 para recetores humanos não intencionais é altamente improvável, uma vez que o OGM não tem capacidade de replicação. Mesmo na improvável eventualidade de propagação, tal seria limitada a casos isolados em locais geográficos discretos. O risco de infeção generalizada é considerado negligenciável.

Os dois cenários potenciais para a transmissão PBFT02 podem ser libertação acidental durante o transporte ou transferência através de exposição involuntária (por exemplo, picadas com seringas).

Em caso de injeção acidental de material contendo o OGM, a área será bem lavada com sabão e água, depois será enxaguada abundantemente com água. O incidente será gerido de acordo com as políticas hospitalares existentes para emergências agudas. Se ocorrer uma lesão por picada num profissional de saúde, o incidente será comunicado à saúde ocupacional e à gestão, de acordo com os procedimentos institucionais existentes para terapia genética e celular.

2. Métodos de eliminação dos OGM das zonas eventualmente afetadas

A descontaminação de superfícies expostas deve ser realizada de acordo com os procedimentos locais de biossegurança para derrames de materiais potencialmente infecciosos. Em caso de disseminação inesperada do conteúdo dos frascos para injetáveis do PBFT02 ou do vetor diluído e da libertação acidental nas superfícies da farmácia/hospital, o derrame será descontaminado e removido de acordo com a prática institucional local. A ficha de segurança (SDS) do PBFT02 deve ser consultada, conforme necessário, para uma limpeza adequada. Os desinfetantes eficazes contra o AAV incluem solução de lixívia a 10% ou equivalente, que são validados para contenção do derrame.

O PBFT02 é transferido para e de e diluído em frascos para injetáveis de vidro dentro de recintos confinados (por exemplo, sala de biossegurança). O pessoal será informado de que se deve ter cuidado e seguir os procedimentos institucionais aplicáveis na etapa de preparação da dose e durante o transporte.

Em caso de lesão, o pessoal seguirá os procedimentos institucionais locais. Em caso de contacto accidental do PBFT02 com a pele, os olhos ou o vestuário, a área afetada será lavada com água abundante e o pessoal seguirá procedimentos institucionais para a gestão de material com perigo biológico.

3. Métodos de eliminação ou saneamento de plantas, animais, solos, etc., suscetíveis de terem sido expostos durante ou após a propagação

A administração do PBFT02 irá ocorrer dentro de um ambiente controlado de um hospital. Os métodos de eliminação de qualquer material contaminado serão realizados de acordo com diretrizes locais e procedimentos institucionais. Não se prevê que o OGM venha a entrar em contacto com plantas, animais ou solo. Além disso, o PBFT02 não é capaz de transduzir células vegetais.

4. Planos de proteção da saúde humana e do ambiente em caso de efeitos indesejáveis

Os participantes no ensaio clínico serão monitorizados durante 5 anos após a administração de acordo com o protocolo do ensaio clínico. Os acontecimentos adversos serão registados e avaliados por investigadores de ensaios clínicos e serão notificados às autoridades competentes quando forem relevantes.

Todas as áreas e instalações que serão utilizadas para a administração do organismo notificado serão limpas e descontaminadas utilizando desinfetantes virucidas (descritos acima). O pessoal do centro seguirá diretrizes locais e procedimentos institucionais para o manuseamento e a eliminação de organismos geneticamente modificados.

Não existem planos específicos para o ambiente. Espera-se um nível muito baixo de libertação de organismos através de extrusão viral e o organismo notificado não tem capacidade de replicação.