



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE VIRUS ADENOASOCIADOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/21/31)

Título del ensayo

Estudio de fase 3 de seguimiento de AAV5-hRKp.RPGR para el tratamiento de la retinitis pigmentosa ligada al cromosoma X asociada con variantes en el gen *RPGR*.

Es un estudio de seguimiento de seguridad a largo plazo de los participantes que participaron en el estudio B/ES/21/30. Asimismo, el estudio B/ES/21/31 también permite el tratamiento inicial de los participantes asignados aleatoriamente al tratamiento aplazado en el B/ES/21/30.

Características del organismo modificado genéticamente

El OMG, AAV5-hRKp.RPGR (INN: Botaretigene sparoparvovec), es un producto de terapia génica derivado de un vector viral adenoasociado (AAV) recombinante sin capacidad de replicación con una cápside de serotipo 5 (AAV5).

AAV5-hRKp.RPGR incorpora los siguientes elementos:

- Repeticiones terminales invertidas (ITR) del AAV serotipo 2 (AAV2) de tipo salvaje (WT) que proporcionan la señal de ensamblaje, empaquetada en una cápside de AAV5.
- Casete de expresión que contiene:
 - La secuencia codificante humana RPGR.ORF15. El cDNA de hRPGR.ORF15 comprende un cDNA que codifica una proteína reguladora de guanosina trifosfatasa de retinosis pigmentaria funcional (RPGR) con una delección en marco abierto de lectura.
 - Un promotor que impulsa la expresión génica específica en las células en fotorreceptores de cono y bastón.
 - Señal de poliadenilación que mejora la expresión.

AAV5-hRKp.RPGR se fabrica utilizando transfección transitoria de la línea celular HEK293 con una mezcla de tres plásmidos: el plásmido transgénico que contiene la casete de expresión, el plásmido auxiliar que contiene genes del adenovirus 5 y el plásmido de empaquetamiento que contiene los genes *rep* y *cap* de AAV2.

AAV5-hRIKp.RPGR se purifica utilizando un proceso *downstream* de varios pasos. La sustancia farmacéutica, el producto farmacológico y el proceso de fabricación se supervisan con un panel de pruebas de control de calidad y se han establecido métodos de prueba adecuados para la liberación de productos farmacológicos. Las pruebas clave incluyen la identidad transgénica, la identidad de la cápside, el título de genoma del vector total, el porcentaje de cápsides completas, la pureza y la identificación de proteínas, el título infeccioso, la potencia *in vivo*, así como el AAV con capacidad de replicación (rcAAV).



Características del ensayo

AAV5-hRKp.RPGR se está desarrollando actualmente como un producto de terapia génica para pacientes con retinitis pigmentosa ligada al cromosoma X (XLRP), causada por mutaciones en el gen regulador de la guanosina trifosfatasa humana de la retinitis pigmentosa (RPGR).

El ensayo se llevará a cabo en el Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz.

La terapia génica de AAV5-hRKp.RPGR se administrará mediante inyección subretiniana en una intervención quirúrgica estandarizada. Los participantes elegibles se asignarán aleatoriamente a tratamiento bilateral inmediato con la dosis de RPGR $2,0 \times 10^{11}$, tratamiento bilateral inmediato con la dosis de RPGR $4,0 \times 10^{11}$, o tratamiento bilateral diferido administrado aproximadamente 1 año después de la finalización de todos los exámenes iniciales. A todos los participantes se les ofrecerá tratamiento bilateral, con el segundo ojo tratado de 7 a 21 días después del primero.

Se recogerá líquido lacrimal de ambos ojos, saliva, sangre completa y muestras de suero después de la administración de AAV5-hRKp.RPGR para su análisis por qPCR para evaluar la biodistribución y la excreción del genoma de AAV5-hRKp.RPGR.

Evaluación del riesgo. Identificación de riesgos potenciales.

-Determinación de virus competentes para la replicación (rcAAV)

Los AAV competentes en replicación (rcAAV) se evaluaron mediante amplificación sucesiva del fármaco en células HEK293 en presencia de adenovirus 5 y detección de las secuencias *rep2* mediante PCR cuantitativa.

El criterio de aceptación "No detectado" se basa en el requisito de que la partícula AAV no contenga secuencias *rep* y *cap* que permitirían la replicación viral en el paciente. Esto está respaldado por los datos disponibles para este producto y la experiencia con productos similares. Para este ensayo, el límite de detección es de 20 unidades infecciosas (UI) en $5,0 \times 10^8$ vg, donde 1 unidad infecciosa equivale a 1 dosis infectiva 50% en cultivo tisular (DICT50). Por lo tanto, 20 UI corresponden a 20 rcAAV en $5,0 \times 10^8$ vg. Cualquier valor <20 TCID50 se informará como "No detectado".

Hasta la fecha, todos los lotes probados se han informado como "No detectados".

La generación de rcAAV en pacientes después de la administración de AAV5-hRKp.RPGR solo sería posible en el caso extremadamente improbable de triple infección de la misma célula huésped por AAV5-hRKp.RPGR, AAV de tipo silvestre y virus auxiliares como adenovirus o virus herpes simple. Sin embargo, tal evento de recombinación solo podría ocasionar el intercambio del casete de expresión transgénica con los genes *rep* y *cap* del AAV de tipo silvestre, ya que no es posible que el genoma del AAV contenga tanto los genes *rep* y *cap* como el casete de expresión transgénica debido a la limitada capacidad de empaquetamiento de los AAV. Además, las regiones de homología entre AAV5-hRKp.RPGR y un posible AAV de tipo silvestre coinfectante se limitarían a los ITR, ya que los genes *rep* y *cap* no están presentes en AAV5-hRKp.RPGR. Esto disminuye aún más la posibilidad de recombinación que conduce a rcAAV.

-Estabilidad

Plásmidos

Se han establecido especificaciones de liberación de plásmidos e incluyen pruebas de identidad por secuenciación de Sanger y digestión de restricción.



Controles en proceso de sustancias farmacológicas

Para garantizar que el proceso de fabricación dé como resultado un producto de pureza y potencia constantes, se incorporan controles en proceso con criterios de aceptación en el proceso de fabricación. Esto incluye integridad genómica/caracterización genética para confirmar la integridad estructural (secuencia de ADN) del casete de expresión mediante secuenciación de próxima generación (NGS).

La secuencia de la casete de expresión presenta una coincidencia de identidad de ~ 98% de la secuencia del vector viral con el genoma de referencia, así como ningún impacto en la funcionalidad de las inserciones, deleciones o sustituciones.

La sustancia farmacéutica a granel final se controla mediante un extenso panel de pruebas analíticas que proporciona una evaluación completa de los atributos críticos de calidad de la sustancia farmacéutica.

Producto final

El producto farmacéutico se controla mediante un panel de métodos analíticos que proporcionan una evaluación completa de los atributos críticos de calidad. Las pruebas que se consideran relevantes para la estabilidad genética del producto incluyen pruebas de identidad (identificación del transgén por PCR cuantitativa en tiempo real, identificación de la cápside por análisis de transferencia Western), cantidad (título del genoma del vector total por el método qPCR basado en la sonda Taq), pureza (% de cápsides llenas por ultracentrifuga analítica [AUC] prueba de velocidad de sedimentación, pureza e identificación de proteínas por SDS-PAGE) y potencia (título infeccioso por ensayo de dosis infecciosa de cultivo tisular al 50% [TCID50], expresión del producto de inserción genética en ratones WT subretinalmente administrado con una dosis predefinida del gen AAV5-hRKp.RPGR, ensayo de glutamilación de RPGR in vivo en un modelo de ratón deficiente en RPGR in vivo).

-Biodistribución y excreción del vector clínico (Shedding).

Biodistribución y excreción no clínica

La biodistribución de AAV5-hRKp.RPGR en tejidos y la excreción de AAV5-hRKp.RPGR en sangre después de una sola dosis de vector administrada por inyección subretiniana (bilateral) se han evaluado en ratones WT y conejos blancos de Nueva Zelanda a dos dosis diferentes y se han evaluado mediante PCR cuantitativa en tiempo real.

En ratones se detectó cierta diseminación del vector al hígado, riñón, cerebro, pulmones y glándulas suprarrenales con el mayor número de copias del genoma detectadas en el hígado.

En conejos se detectó principalmente una diseminación de nivel bajo del vector al tracto óptico, hígado y bazo.

Biodistribución y excreción clínica

Hasta la fecha, no se han realizado estudios clínicos completos de AAV5-hRKp.RPGR en humanos. En el estudio MGT009 (estudio clínico de fase I/II, abierto, con aumento escalonado de la dosis con tres niveles de dosis para investigar la seguridad y la eficacia potencial de AAV5-hRKp.RPGR administrado subretinalmente en participantes de 5 años o más con XLRP causados por mutaciones en RPGR), se están recopilando datos sobre la biodistribución y la excreción del virus.



En este estudio se recogerá líquido lagrimal (lágrima) de ambos ojos, saliva, sangre completa y muestras de suero hasta las 4 semanas posteriores a la administración de AAV5-hRKp.RPGR. Estas muestras serán analizadas por qPCR para evaluar la biodistribución y la excreción del genoma de AAV5-hRKp.RPGR.

Manipulación, control y tratamiento de residuos

El transporte desde el lugar de almacenamiento del producto en investigación hasta el sitio de administración se lleva a cabo en un recipiente cerrado que sea fácil de descontaminar y a prueba de roturas y fugas con protección de temperatura.

El manejo seguirá las directrices recogidas en los documentos “Investigational Product Preparation and Administration Instructions” (IPPI), “SIPPM” y “Biosafety instructions for handling AAV5-hRKp.RPGR for health care workers and staff, v1.2 December 2021”.

La preparación del producto en investigación debe realizarse utilizando técnicas asépticas; por lo tanto, se prefiere que la preparación se realice en una cabina de bioseguridad o dentro de un campo estéril.

Además, las medidas de primeros auxilios en caso de exposición al producto en investigación se detallan en el documento “Biosafety instructions for handling AAV5-hRKp.RPGR for health care workers and staff, v1.2 December 2021”.

Para la descontaminación y limpieza se utilizarán los detergentes y los métodos validados, adecuados para los AAV y de acuerdo con los procedimientos del centro hospitalario, al igual que en caso de vertido accidental. Todos los derrames deben tratarse con un agente viricida como hipoclorito de sodio al 1%.

Los restos del producto terminado se eliminarán como residuo biopeligroso, en contenedores resistentes a prueba de roturas y fugas para evitar derrames accidentales, y eliminados por incineración de acuerdo con los procedimientos del centro hospitalario.

Después de la operación, se colocará un vendaje ocular y un apósito en el ojo tratado. Este vendaje y apósito deben absorber cualquier vector viral excretado pasivamente a través de las lágrimas. En la visita posoperatoria del Día 1, un trabajador sanitario quitará los vendajes y apósitos oculares y los eliminará como residuo biopeligroso.

El promotor informará a los pacientes y/o cuidadores de las medidas de bioseguridad adecuadas para evitar la diseminación del OMG.

En el caso de que se produzca cualquier incidencia o accidente se deberá informar de manera inmediata a la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB) y al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG).

CONCLUSIÓN: Se considera que en el estado actual de conocimientos y con las medidas de uso propuestas, este ensayo clínico no supone un riesgo significativo para la salud humana, la salud animal y/o el medio ambiente.

Una vez concluido el ensayo, se remitirá un informe de resultados del mismo al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG) y a la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB), siguiendo el



modelo de informe de resultados elaborado por la CNB, que se encuentra disponible en la [web del MITECO](#). En este informe se deberá incluir información sobre las posibles incidencias, si las hubiera. La remisión de esta información será condición indispensable para la concesión de futuras autorizaciones de ensayos con organismos modificados genéticamente.

Madrid a 21 de marzo de 2022