



## **EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE UN VIRUS ADENOASOCIADO MODIFICADO GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/24/10)**

### **Título del ensayo**

Estudio randomizado, controlado, ciego y multicéntrico para evaluar la eficacia, seguridad y tolerabilidad de dos dosis de AGTC-501 en comparación con un grupo control sin tratamiento en participantes varones con retinitis pigmentaria ligada al cromosoma X, del promotor Beacon Therapeutics.

### **Organismo modificado genéticamente (OMG)**

El OMG, AGTC-501 (DCI: laruparetigén zovaparvovec), también llamado rAAV2tYF-GRK1-RPGR, es un producto de terapia génica derivado de un vector viral de virus recombinante adenoasociado (AAV) no replicativo que expresa ADNc del regulador de la guanosina trifosfatasa de la retinitis pigmentaria humano (RPGR) con codones optimizados. Consta de una estructura de cápside de AAV de serotipo 2tYF (cápside de AAV2 que contiene tres mutaciones de tirosina a fenilalanina [YF]) y una molécula de ADN monocatenario que contiene el casete de expresión del RPGR humano, con codones optimizados, flanqueado por repeticiones terminales invertidas flanqueantes de AAV2.

AGTC-501 está diseñado para administrar una copia normal del gen *RPGR* humano a las células de la retina en pacientes con mutaciones en este gen, lo que da lugar a la expresión de la proteína RPGR normal.

El vector clínico se produce utilizando un sistema de complementación del virus del herpes simple recombinante (rHSV) en células de riñón de hámster recién nacido en suspensión (sBHK) que han sido adaptadas a un medio libre de suero (SF-sBHK). El sistema emplea dos virus ayudantes del rHSV atenuados y defectuosos para la replicación que solo pueden ser propagados en una línea celular que complementa este defecto en la replicación.

Un virus ayudante rHSV contiene los genes *rep* y *cap* del AAV y el segundo contiene un casete de expresión de ADNc flanqueado por las repeticiones terminales invertidas del AAV necesarias para la replicación y empaquetamiento del ADN del rAAV. Cuando se utilizan para infectar células productoras, los dos virus ayudantes rHSV proporcionan todos los componentes AAV de acción cis y trans, así como las funciones ayudantes necesarias para la producción eficiente de rAAV.

### **Características del ensayo clínico**

El ensayo se realizará en el Institut de la Màcula i la Retina, S.L - Centro Médico Teknon y participarán varones adultos y pediátricos.

El medicamento en investigación se administrará mediante una única inyección subretiniana utilizando un procedimiento quirúrgico estándar en el ojo del estudio.

Después de que todos los participantes lleguen a la visita del mes 12, a los participantes aleatorizados al grupo 3 se les dará la oportunidad de recibir tratamiento con la dosis alta de AGTC-501 en su ojo contralateral (aproximadamente 1 año después de la finalización de todos los exámenes iniciales).



## **Evaluación del riesgo**

### **-Demostración de ausencia de formación de virus competentes para la replicación.**

#### **Evaluación del riesgo de presencia de rcHSV**

Durante la expansión de los virus ayudantes del rHSV, un subproducto indeseable es la posibilidad de generar HSV competentes para la replicación que pueden propagarse durante la producción de rAAV y pasar al producto a granel sin procesar.

A lo largo del desarrollo del AGTC501, el riesgo de replicación del VHS competente ha sido considerado y mitigado a través de (1) asegurar que el proceso de fabricación de la sustancia farmacéutica tuviera suficiente capacidad de eliminación viral y (2) pruebas de rcHSV en el producto a granel no procesado y pruebas de VHS infeccioso en el producto farmacéutico final como parte de la liberación.

-Los estudios de eliminación del virus se realizaron en una fase muy temprana del desarrollo. Se evaluó el aclaramiento en las fases de tratamiento con detergente y en la cromatografía y se demostró que era de al menos 13 unidades logarítmicas (13 log).

Se añadió un paso de filtración viral para proporcionar una capacidad adicional de eliminación viral. Se implementó como mejora en el proceso de fabricación y se llevó a cabo un estudio adicional de depuración viral que demostró una depuración de VHS wt de al menos > 22 log a través de los pasos de detergente y cromatografía.

Basándose en el LdD (límite de detección) del ensayo final de valoración cuantitativa de virus infecciosos en el producto farmacológico, el nivel de rcHSV más alto que se observó fue 10 veces inferior a la capacidad de eliminación viral disponible, lo que da un alto nivel de garantía de eliminación del rcHSV.

-Las pruebas analíticas del rcHSV se incluyen como parte de las especificaciones de liberación para garantizar que el medicamento fabricado final esté libre de rcHSV. Se realiza una prueba del rcHSV por método validado en el producto a granel sin procesar inmediatamente después del proceso de fabricación previo al proceso posterior que incluye pasos de eliminación viral. El método de prueba utiliza una línea celular permisiva a la propagación del rcHSV seguida de la cuantificación del efecto citopático.

Además, el producto farmacológico se somete a un ensayo de HSV infecciosos con capacidad de detección de cualquier HSV residual utilizando una estirpe celular que permite la propagación de rHSV y rcHSV con la ulterior cuantificación del efecto citopático.

La prueba del VHS infeccioso en la sustancia y en el producto farmacéutico final detecta cualquier VHS, incluido el VHS recombinante (incompetente para la replicación) y el VHS competente para la replicación, y un resultado «negativo» de la prueba demuestra claramente la ausencia total de VHS residual, lo que ofrece una garantía de que el VHS recombinante estará ausente en la sustancia y el producto farmacéutico.



### Riesgo de generación de rcAAV como resultado de acontecimientos de recombinación ocurridos durante el proceso de fabricación

La generación de rcAAV en el proceso de fabricación de la sustancia farmacológica presenta un riesgo insignificante.

La generación de rcAAV durante la producción de rAAV es teóricamente posible, pero requeriría el empaquetado conjunto de las ITR de AAV y el casete *rep/cap*, lo que se esperaría que ocurriera con una probabilidad extremadamente baja teniendo en cuenta:

- i la separación de estas características en moléculas de ADN separadas (es decir, los genomas de cada rHSV);
- ii la multiplicidad de infección relativamente baja de estas moléculas de ADN (es decir, 1 o 2 viriones por célula para cada vector de rHSV); y
- iii la falta de secuencia homóloga entre los casetes transgénicos de cada vector de rHSV.

La presencia de rcAAV se comprueba en cada lote de medicamento mediante un ensayo celular validado que utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa para la detección de *Rep2* de rcAAV.

#### **-Estabilidad**

La producción del vector en el proceso implica la replicación del genoma del vector por la ADN polimerasa del huésped, que presenta de forma natural una polimerización del ADN de alta fidelidad y una actividad adicional de exonucleasa correctora, lo que da lugar a una tasa de error muy baja en la replicación del ADN, de modo que las mutaciones espontáneas en el vector rAAV son extraordinariamente bajas.

Se comprueba la integridad genómica del genoma del vector clínico en la sustancia farmacológica.

La secuencia obtenida por NGS (secuenciación de nueva generación) de AGTC-501 se alineó con la secuencia de referencia no encontrándose ninguna discrepancia en todo el casete de expresión, incluido el promotor, el ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) de hRPGR con codones optimizados y la señal de poliadenilación. No hubo deleciones ni inserciones en las regiones de repetición terminal invertida (ITR).

El vector clínico es incapaz de replicarse de forma independiente, incluso en presencia de un virus cooperador como el adenovirus, ya que carece de los genes *rep* y *cap* necesarios para la replicación y el empaquetado, respectivamente. La replicación solo podría producirse en el caso extremadamente improbable de una triple infección de la misma célula huésped por el vector clínico, el AAV natural (que proporcionase las funciones *rep* y *cap*) y un virus cooperador. Un acontecimiento de triple infección podría dar lugar a la recombinación del casete de expresión del vector clínico con los genes *rep* y/o *cap* del virus natural. Sin embargo, debido a la limitada capacidad de empaquetado de los AAV, la recombinación solo podría dar lugar al intercambio del casete de expresión con los genes *rep* y *cap* del AAV natural, ya que no es posible que el genoma del AAV contenga tanto los genes *rep* y *cap* como el casete de expresión del transgén.

#### **-Biodistribución y excreción**

La biodistribución en los tejidos y la diseminación en la sangre tras una dosis única del vector clínico se han evaluado en estudios de toxicología y biodistribución conforme a las buenas prácticas de



laboratorio (BPL) de un vector clínico con la misma cápside que AGTC-501, en ratones y en primates no humanos (PNH).

Los resultados de las pruebas de biodistribución en ratones demostraron que, tras la inyección subretiniana, había altos niveles de ADN vectorial en el ojo inyectado, pero que el vector no se propagaba de forma amplia o consistente fuera del ojo inyectado. En los tejidos no oculares de los animales a los que se administró, se detectó una diseminación de bajo nivel del ADN del vector en el cerebro, el bazo, los ganglios linfáticos y los pulmones. No se detectó ADN vectorial en el corazón, el ovario, el riñón ni el ganglio linfático mandibular izquierdo en ningún intervalo ni nivel de dosis y en ninguna de las necropsias. El nivel de ADN en las muestras de sangre disminuyó a medida que transcurría el tiempo tras la inyección y tendió a ser proporcional a la dosis.

Del mismo modo, en monos *cynomolgus* normales, los resultados de biodistribución tras la inyección subretiniana demostraron altos niveles de ADN vectorial en los ojos en los que se había inyectado el vector y poco o ningún ADN vectorial en otros tejidos. Los niveles de vector en los tejidos oculares estaban relacionados con la proximidad al lugar de administración y la hora del sacrificio. Se detectaron niveles bajos de ADN vectorial en un número limitado de tejidos no oculares de animales a los que se había inyectado el vector, incluidos el bazo y los ganglios linfáticos cervicales (mandibulares o parótidos). No se encontró ADN vectorial en el corazón, el pulmón, el hígado, el riñón, los testículos ni los ovarios de ningún animal.

Dado que la biodistribución de un vector viene determinada por la cápside específica del AAV, los perfiles de biodistribución en ratones y PNH del vector clínico ensayado son representativos del perfil de biodistribución del vector AGTC-501.

La conclusión general de los estudios de biodistribución en ratones y PNH es que el vector AGTC-501 incompetente para la replicación no se propaga amplia o consistentemente fuera del ojo inyectado y no alcanza los tejidos reproductivos tras la inyección subretiniana. En base a estos datos, no se identificó ningún posible problema asociado a la diseminación.

Están en curso o previstos estudios en pacientes con XLRP (retinosis pigmentaria ligada al cromosoma X) en los que se han recogido y se recogerán datos sobre la diseminación en distintas muestras de los pacientes.

En general, dado que hasta la fecha no se ha observado ADN vectorial en sangre total procedente de todas las dosis administradas en los estudios en curso, y dado que los vectores AAV no se replican, el promotor considera que el riesgo de transmisión a individuos no tratados es bajo, con un impacto medioambiental insignificante.

### **Manipulación, control y tratamiento de residuos**

El promotor facilitará a todos los centros formación sobre el estudio, incluyendo la recepción, almacenamiento y manipulación de AGTC-501. El promotor también facilitará al centro un Manual de Farmacia. Se seguirán las prácticas habituales establecidas para el tratamiento de materiales con un posible riesgo biológico, como muestras/fluidos de pacientes y residuos médicos (autoclaves, contenedores de objetos punzantes, incineradores, desinfectantes y superficies adecuadas que se puedan limpiar).

AGTC-501 se almacenarán en un lugar seguro y separado de la zona de suministro de productos no farmacéuticos. El acceso a esta zona estará restringido al personal de investigación.



El medicamento en investigación podrá prepararse para su administración en la farmacia, el quirófano u otro lugar apropiado que haya sido aprobado por el promotor y cumpla los requisitos del centro. Si AGTC-501 debe prepararse fuera del quirófano, el lugar y la ruta de transporte deben aprobarse antes de la primera intervención quirúrgica por un representante del promotor. Una vez roto el precinto del vial, este no debe transportarse fuera del edificio.

El/los envase/s de cartón congelado/s y precintado/s de AGTC-501 debe/n transportarse en un contenedor de transporte congelado y precintado.

Todos los contenedores de transporte deben ir marcados con un símbolo de riesgo biológico.

El personal del centro debe aplicar las precauciones estándar durante la preparación y administración de AGTC-501 para mitigar el derrame y/o la exposición accidental de AGTC-501, lo que incluye, entre otros, que el personal del centro utilice los procedimientos de seguridad apropiados, use EPI (bata de laboratorio, gafas de seguridad y guantes) y siga las directrices locales y los procedimientos del centro.

Todos los viales usados y cualquier otro material consumible/instrumento desechable utilizado durante los procedimientos de manipulación, preparación y administración de dosis deben eliminarse de acuerdo con la práctica habitual del centro para los residuos con un riesgo biológico. En la instalación médica, esto implicará la contención en contenedores de objetos punzantes o bolsas claramente marcadas (por ejemplo, riesgo biológico, residuos médicos) antes de la esterilización en autoclave y/o la incineración dentro o fuera del centro.

Si el AGTC-501 sin abrir no puede devolverse al promotor (o a la persona designada), deberá destruirse *in situ*, conforme a los procedimientos del centro: contención temporal en contenedores de objetos punzantes o bolsas claramente marcadas (por ejemplo, riesgo biológico, residuos médicos) antes de la esterilización en autoclave y/o incineración, ya sea dentro o fuera del centro.

Los instrumentos no desechables, como las pipetas designadas para el estudio, las bandejas de plástico que se hayan utilizado durante los procedimientos de preparación y administración de dosis y que hayan podido entrar en contacto con el AGTC-501, deben rociarse con un desinfectante de acuerdo con los procedimientos del centro relativos a la gestión de sustancias con un riesgo biológico y utilizando un desinfectante eficaz contra el AAV (por ejemplo, hipoclorito de sodio al 10 % durante aproximadamente 20 minutos) y secarse con una toalla de papel. La toalla de papel u otros residuos sólidos, como las biocontenedores, deben eliminarse conforme a los procedimientos del centro para la gestión de residuos biopeligrosos.

Después de la cirugía, se cubrirá el ojo del paciente con una gasa ocular estéril y un escudo ocular rígido, que permanecerán puestos durante al menos un día o hasta la próxima visita. Además, a criterio del investigador/cirujano, se proporcionará a los pacientes instrucciones posoperatorias adicionales según el tratamiento habitual específico del centro. Se proporcionarán medidas de higiene a los pacientes, incluidas, entre otras, evitar tocarse los ojos, lavarse las manos después de ir al baño y antes de comer, etc.

**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 3 de julio de 2024