



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE VIRUS ADENOSOCIADOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/22/24)

Título del ensayo

Ensayo en fase I/II, abierto y multicéntrico con una cohorte de dosis ascendente única con inyección intracocular unilateral seguida de una cohorte de ampliación con inyección bilateral para evaluar la seguridad, tolerabilidad y eficacia de DB-OTO en niños y lactantes con mutaciones bialélicas de hOTOF, del promotor Decibel Therapeutics, Inc.

Características del ensayo

DB-OTO es una terapia génica destinada a proporcionar capacidad auditiva a pacientes pediátricos con diagnóstico de neuropatía auditiva congénita secundaria a mutaciones bialélicas en el gen de la otoferlina (hOTOF).

DB-OTO se administra mediante una inyección intracocular una sola vez por oído a través de un catéter colocado a través de la membrana de la ventana redonda de la cóclea. Se inscribirán al menos 12 y hasta 18 niños pequeños y lactantes (24 meses de edad o menos).

La hipótesis terapéutica de DB-OTO es que los vectores dobles de AAV1, administrados con una única inyección intracocular por oído, pueden expresar niveles terapéuticos de proteína otoferlina en las células ciliadas internas de pacientes con mutaciones bialélicas diagnosticadas genéticamente de hOTOF y establecer la función auditiva.

En el ensayo participarán la Clínica Universidad de Navarra, la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Ramón y Cajal y el Hospital Universitario Materno Infantil en las Palmas de Gran Canaria.

Características del organismo modificado genéticamente

DB-OTO consiste en 2 vectores víricos adenosociados de serotipo 1 (AAV1) producidos de forma independiente, DB-OTO-5 (que codifica el componente 5' de la isoforma 5 del gen de la otoferlina humana [hOTOFv5]) y DB-OTO-3 (que codifica el componente 3' de hOTOFv5). Estos 2 vectores se diseñaron para recombinarse para formar un casete funcional del gen hOtof v5 y hOTOF cuando se transducen a la misma célula diana.

La proteína hOTOF funcional se expresa en las células ciliadas internas (responsables de la transducción del sonido) que utilizan otoferlina para una transmisión sináptica adecuada al sistema auditivo, lo que mejora la audición en los pacientes.

- DB-OTO-3 se fabrica utilizando un proceso de triple transfección en el que las células de producción se transfectan con 3 plásmidos, que contienen los genes *rep* y *cap*, los genes auxiliares para la replicación y la casete de expresión (ésta contiene una región homóloga derivada de la fosfatasa alcalina para que el vector 3' pueda someterse a recombinación homóloga con el vector 5', formando un casete funcional hOtof v5) para producir el vector AAV.
- DB-OTO-5 se fabrica utilizando un proceso de triple transfección en el que las células de producción se transfectan con 3 plásmidos, que contienen los genes *rep* y *cap*, los genes auxiliares para la replicación y la casete de expresión (ésta contiene una región homóloga derivada de la



fosfatasa alcalina (FA) para que el vector 3' pueda someterse a recombinación homóloga con el vector 5', formando un casete funcional hOtof5), para producir el vector AAV.

Evaluación del riesgo. Identificación de riesgos potenciales.

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

DB-OTO-5 y DB-OTO-3 son vectores AAV recombinantes en los que los genes *rep* y *cap* AAV de tipo silvestre se sustituyen por el casete de expresión de ADNc humano. Por lo tanto, DB-OTO-5 y DB-OTO-3 no pueden replicarse de forma independiente, ni siquiera en presencia de un virus auxiliar.

La probabilidad de un evento de replicación durante la fabricación es baja, ya que DB-OTO-5 y DB-OTO-3 se fabrican con todos los elementos genéticos necesarios para la replicación y el empaquetado proporcionados en la transmisión por otro plásmido, y no hay virus auxiliar de tipo silvestre en la fabricación del principio activo.

El principio activo se analiza para detectar la presencia de AAV con capacidad de replicación (rcAAV) utilizando un método de cultivo celular para amplificar cualquier presencia de rcVAA, seguido de una prueba cuantitativa de reacción en cadena de la polimerasa (qPCR, quantitative polymerase chain reaction) para detectar la secuencia *rep2*, que está presente en los AAV con capacidad de replicación.

Un resultado positivo para una muestra de rcAAV constituiría una señal positiva para el gen *rep2* de AAV. El ensayo tiene un límite de detección de 20 UI de rcAAV por 1×10^{11} vg.

El criterio de aceptación es "Ninguno detectado".

Se aportan datos de dos lotes con resultado de "ninguno detectado".

-Estabilidad genética

La integridad genómica de los genomas del vector DB-OTO-5 y DB-OTO-3 se analiza en el principio activo. Además, el principio activo y el medicamento se caracterizan por un panel completo de controles en el proceso y pruebas de liberación, que garantizan que los atributos de calidad esenciales cumplan los criterios de aceptación.

Las especificaciones de liberación con criterios de aceptación incluyen integridad genómica/caracterización genética para confirmar la integridad estructural (secuencia de ADN) del casete de expresión mediante secuenciación de Sanger. Aportan resultado de dos lotes en los que se obtienen un 100% de identidad.

-Biodistribución y excreción del vector clínico (Shedding).

La biodistribución de DB-OTO y la expresión de hOTO5 se evaluaron en 2 estudios en ratones y macaco cangrejero (6 meses de estudio con un punto temporal intermedio de 7 semanas). En estos estudios el genoma viral (vg) se cuantificó utilizando métodos validados de qPCR para la detección de los dos vectores AAV de DB-OTO, DB-OTO-5 y DB-OTO-3, en tejidos, plasma, LCR y matrices de diseminación (heces, exudados mucosos y orina) de ratón y macaco cangrejero.

Se midieron los genomas de vectores en los oídos de todos los animales a los que se administró DB-OTO en todos los puntos temporales. Se observó una variabilidad considerable en las mediciones de vg entre animales. El número medio de vg aumentó con el nivel de dosis en ambas especies. No hubo diferencias concluyentes relacionadas con el sexo en ninguna de las especies a ningún nivel de dosis. En ratones a los que se administró la dosis de forma unilateral, se detectó vg de DB-OTO en el oído opuesto que no había recibido dosis a un nivel aproximadamente 15 veces inferior al oído que sí había



recibido. Todos los oídos tratados con DB-OTO presentaron niveles detectables de ARNm de hOTOF en ratones y macacos que fueron persistentes a lo largo del tiempo. Los niveles de ARNm de hOTOF aumentaron con la dosis en ratones, pero no en macacos.

Se pudo medir el vg de DB-OTO en plasma después de la administración de la dosis, pero fue insignificante en la semana 7. En el líquido cefalorraquídeo (LCR) de macacos, se detectó vg de DB-OTO (DB-OTO-3 y DB-OTO-5) a niveles bajos a las 24 horas, pero estaban ausentes en la semana 7/8. Múltiples tejidos no óticos en macacos dieron resultado positivo con respecto a vg de DB-OTO en la semana 7 y la semana 27 a niveles medios inferiores en comparación con la cóclea, incluidos el nervio auditivo, el ganglio linfático parótido, el hígado y el ganglio de la raíz dorsal (GRD). El número de animales con vg medible y/o la magnitud de vg de DB-OTO medida en cada tejido generalmente disminuyó con el tiempo. De los tejidos no óticos de macaco con vg de DB-OTO medible, el ARNm de hOTOF solo fue medible en el GRD cervical y lumbar de un solo animal al nivel de dosis más alto 7 semanas después de la administración, sin muestras que tuvieran ARNm de hOTOF medible 27 semanas después de la administración.

En el estudio de 6 meses en macacos cangrejeros, se analizó la diseminación vírica de DB-OTO en muestras de mucosa bucal, muestras nasales, heces y orina en los puntos temporales del día 2 y la semana 7.

En los 4 tipos de matriz de diseminación analizados, se encontraron niveles medibles de ambos genomas virales de DB-OTO en una o más muestras en el punto temporal del día 2. Las muestras fecales tuvieron la mayor frecuencia de muestras con niveles medibles de DB-OTO. La mayoría de las muestras de orina tenían niveles medibles de ADN de DB-OTO en el punto temporal del día 2. En las muestras de mucosa bucal y nasal, se detectó ADN de DB-OTO a un nivel bajo en un pequeño porcentaje de animales el día 2. No se detectaron cantidades medibles de genoma viral de DB-OTO (DB-OTO-3 y DB-OTO-5) en ninguna muestra de diseminación recogida en el punto temporal de la semana 7.

Manipulación, control y tratamiento de residuos

DB-OTO se preparará en la farmacia o directamente dentro de la sala de operaciones aplicando medidas de bioseguridad para riesgo tipo 2.

Después de la preparación, la jeringa del medicamento en investigación se tapaná y colocará en una bolsa hermética a prueba de fugas, y se colocará en un recipiente de transporte.

El personal médico seguirá las medidas higiénicas estándar del hospital, se usará equipo de protección individual estándar del hospital, como batas y guantes.

En el caso de un derrame accidental de DB-OTO, cualquier superficie contaminada con DB-OTO se descontaminará de acuerdo con los procedimientos específicos del centro utilizando un desinfectante con eficacia validada contra AAV.

Todos los residuos generados (material en contacto con el OMG durante la preparación y administración de DB-OTO) se eliminarán de acuerdo con los procedimientos de los centros hospitalarios como residuos con riesgo biológico.

Para el análisis de muestras estarán en vigor las medidas higiénicas estándar del hospital durante la obtención y el manejo/análisis de las muestras. El transporte dentro del centro tiene lugar en un embalaje cerrado, fácil de descontaminar, a prueba de roturas y fugas. Las muestras se almacenarán en un recipiente cerrado en el centro.



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.

Sin embargo, la CNB recuerda al promotor que para el manejo de muestras se deben aplicar medidas de bioseguridad para nivel de riesgo tipo 2.

Así mismo, la CNB recomienda que se informe a los participantes en el ensayo y sus cuidadores que extremen las medidas higiénicas básica, como lavado de manos tras el uso del baño y antes de ingerir alimentos, durante la primera semana tras la administración del medicamento en investigación. También que durante esa semana recojan los pañales y toallitas en doble bolsa de plástico, que se añada medio vaso de lejía por pañal en zona ventilada, o un virucida autorizado, antes de eliminarlos como residuos urbanos.

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 11 de enero de 2023