



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE UN VECTOR DE TERAPIA GÉNICA MODIFICADO GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/12/37)

Título del ensayo:

“Ensayo clínico Fase I/II para evaluar la seguridad y eficacia de la infusión de células CD34+ autólogas movilizadas con mozobil y filgrastim y transducidas con un vector lentiviral portador del gen FANCA (medicamento huérfano) para pacientes con Anemia de Fanconi del Subtipo A”.

Características del ensayo:

El Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) propone un ensayo clínico con un vector lentiviral modificado genéticamente para el tratamiento de la anemia de Fanconi del subtipo A.

La principal finalidad es el tratamiento de los problemas hematológicos de pacientes con anemia de Fanconi del subtipo A (AF-A). El vector lentiviral terapéutico facilitará la expresión de la proteína FANCA en las células CD34+ transducidas. Con ello las células transducidas que anteriormente eran defectivas en proliferación y diferenciación, se comportarán como células con potencial de división normalizado, debiendo restaurar la hematopoyesis del paciente.

El producto para la infusión se preparará en las instalaciones del CIEMAT (notificación A/ES/12/I-21). Es la primera vez que se lleva a cabo un ensayo clínico con este OMG.

El ensayo clínico se realizará en el Servicio de Onco-hematología y Transplante del Hospital Infantil Niño Jesús de Madrid. Los 5 pacientes propuestos para el ensayo serán tratados en un sistema de dos fases: los dos primeros pacientes serán trasplantados sin ningún acondicionamiento con objeto de minimizar los riesgos asociados al ensayo clínico. Solamente en el caso de que ninguno de los dos pacientes infundidos con el número adecuado de células CD34+ y con un buen nivel de transducción hubiera sido reconstituido con las células corregidas genéticamente, se tomaría la decisión de acondicionar con radio/quimioterapia a los pacientes restantes, con objeto de facilitar el injerto. En tal caso, previo a la realización del acondicionamiento se comunicará a la AEMPS tal decisión para obtener su autorización.

Todo el personal será informado de que las células CD34+ transducidas con el vector lentiviral se consideran un producto de nivel II de bioseguridad y estará formado para su manipulación siguiendo las normas adecuadas para dicho nivel de bioseguridad (manipulación del producto, equipos y materiales utilizados, correcta eliminación de residuos, etc.). Cualquier residuo generado durante la actividad de manipulación de las células CD34+ transducidas o que haya podido estar en contacto con el producto debe ser depositado en contenedores especiales de bioseguridad e incinerado.

No se permitirán visitas a los pacientes de personas inmunodeprimidas, trasplantados, en tratamiento con quimioterapia o corticoides, niños o embarazadas.



Tras la infusión el paciente permanecerá hospitalizado durante al menos 72 horas para descartar la aparición de cualquier efecto adverso. Durante estas 72 horas se recogerán constantes vitales cada 8 horas y se realizará control analítico de las funciones de órganos vitales cada 24 horas.

Tras la infusión se tomarán muestras de sangre semanalmente, durante las 8 primeras semanas, mensualmente hasta el 1er año, y al menos cada 12 meses posteriormente. Las muestras de médula ósea se tomarán a 1, 3, 6 y 12 meses post-infusión, y al menos anualmente posteriormente.

Se obtendrán muestras de los pacientes para su análisis a partir de las 3 semanas después de la infusión, donde podrá ser evaluada cuantitativamente la presencia de OMG mediante la técnica de PCR.

El periodo estimado para llevar a cabo el ensayo clínico será de tres años, comenzando en Junio de 2013 con la inclusión del primer paciente y terminando en Junio de 2016 con la inclusión del último paciente.

Características del OGM:

El OGM final serán las células CD34⁺ transducidas con el vector lentiviral LV hPGK-FANCA-Wpre*. Las células transducidas portarán en su genoma el gen FANCA en su versión corregida del gen defectuoso. Como el promotor interno utilizado es ubicuo todas las células expresarán los genes de interés.

El OGM ha sido obtenido utilizando como:

- Organismo receptor: Humano. Las células receptoras serán células hematopoyéticas humanas (CD34⁺). Estas células procederán de médula ósea, sangre periférica enriquecida en células hematopoyéticas o sangre del cordón umbilical del propio paciente.
- Organismo donante: Lentivirus HIV-1 (que es el esqueleto del vector retroviral utilizado) y humano para el gen terapéutico FANCA.
- Inserto: Utilizando un esqueleto lentiviral se utilizará el promotor de expresión de origen humano PGK, y el transgén terapéutico FANCA.
- Promotor PGK: Promotor interno que dirige la expresión ubicua de los genes de interés.
- Gen FANCA: Codifica la proteína del subtipo A de la anemia de Fanconi. Su función es corregir el defecto genético de las células.
- Vector: basado en el lentivirus HIV-1. Los vectores lentivirales utilizados en el laboratorio son de tercera generación (se han utilizado 4 plásmidos para su producción, lo que aumenta su seguridad), mejorados (contienen secuencias que mejoran su expresión como cPPT, tracto central de polipurina, y Wpre, elemento postregulador del virus de hepatitis de woodchuck) y autoinactivantes (deleciones en la LTR por lo que una vez integradas no son activas). Estos vectores están basados en el lentivirus HIV-1 al cual se le han eliminado los genes accesorios, alguno regulador y el gen de la envuelta esta mutado. Son virus defectivos en replicación, no se conoce la formación de virus salvajes, ni de virus replicantes. Debido a que el vector esta pseudotipado (la envuelta no corresponde a la del virus salvaje) y que el virus no es replicativo (no puede dar lugar a un proceso infeccioso estándar), no existe la posibilidad de generar anticuerpos frente al HIV.



La caracterización genética aportada por el notificador se considera completa y satisfactoria.

Identificación de riesgos potenciales:

1) Estabilidad genética:

El notificador señala que la estabilidad genética es muy alta. Una vez integrado el vector en el genoma de la célula CD34+, gracias al promotor interno hPGK se expresará la proteína FANCA y corregirá el defecto genético. Solo en casos aislados puede ocurrir silenciamiento del vector por metilaciones en regiones promotoras. Si además la integración ocurre en zonas del genoma con poca transcripción, podrían ocurrir fenómenos de silenciamiento o de expresión baja. Pero como se infundirán millones de células transducidas, la mayoría serán estables y el silenciamiento del vector será irrelevante.

2) Patogenicidad:

Según el RD 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, las células CD34+ transducidas no requieren clasificación ya que llevan integrado el vector lentiviral y no hay posibilidad de producción de retrovirus competentes en replicación. Únicamente en el momento de la transducción de las células CD34+ se requiere un nivel de contención 2 para su manipulación.

El esqueleto del virus lentiviral VIH-1 utilizado como organismo donante para obtener el vector no se considera infectivo ni hay riesgo de propagación del vector. Debido a la envuelta podría transducir múltiples tipos celulares pero en el ensayo clínico la transducción será *ex vivo* para posteriormente infundir las células transducidas en el paciente. Se descarta la transducción de otras células. La integración del vector en la célula diana no activaría virus latentes y no podría colonizar otros organismos.

En cuanto a las posibles interacciones del OMG, solo en el caso de que exista infección del VIH en el paciente podrían existir recombinaciones entre secuencias residuales del vector lentiviral con secuencias del virus salvaje. Por ello en la selección de los pacientes receptores del OMG, se debe asegurar que éstos estén libres de VIH para descartar cualquier interacción.

3) Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación:

No existen ecosistemas en lo que se puede diseminar el OMG y en el paciente no hay modificación genética de células germinales por lo que no se puede transmitir. El uso propuesto para el producto final solo contempla la administración endovenosa del mismo.

Se debe tener en cuenta el riesgo potencial tanto de las células CD34+ que se han extraído del paciente y se han transducido *ex vivo* con el vector lentiviral y que posteriormente se vuelven a reinfundir en el paciente, como el propio vector retroviral utilizado para transducir las células y que pueden quedar en su superficie como resultado del proceso de transducción.



En el primer caso, se considera que el riesgo medioambiental sería prácticamente nulo ya que aunque en algunas de estas células entrará el vector y quedará integrado en el material genético celular, la célula no sobreviviría fuera del paciente ni sería infectiva si llegara a otra persona. Sin embargo, en el segundo, podría quedar una pequeña cantidad de vector libre que podría ser finalmente inoculado en el paciente. Este último caso podría presentarse un riesgo medioambiental mayor que cuando se transfunden las células transducidas.

El notificador informa que, para reducir este riesgo, el producto celular sometido a proceso de transducción será objeto de un lavado con el medio de infusión en el paciente. En el proceso de lavado, cada 50 ml de suspensión celular se reducirá a 0,5 ml tras la centrifugación, y se resuspenderá en 50 ml con el medio de infusión. De esta manera se garantiza una dilución del 1/100 de los reactivos de partida (el notificador adjunta en el expediente una tabla con concentraciones finales de los reactivos a infundir en el paciente).

La Comisión Nacional de Bioseguridad considera necesario que se proceda, al menos, a un lavado adicional u otras medidas para minimizar la cantidad de virus libre que se administra al paciente.

En cuanto a los estudios de biodistribución, en otros ensayos con vectores lentivirales similares en ningún caso se ha informado de la presencia del vector o del lentivirus competentes en replicación en los fluidos de los pacientes. Las publicaciones científicas disponibles (que se han adjuntado en el expediente) no contienen ninguna reseña en relación con la biodistribución de los vectores en los pacientes, ya que éstos no se inoculan en el paciente, sino que tan sólo son las células CD34+ las que son expuestas ex vivo al vector. Como se ha mencionado, los restos del vector que potencialmente pudieran ser infundidos con las células serán muy limitados debido a los lavados realizados post-transducción, y en cualquier caso serán inactivados rápidamente por el complemento del receptor.

No obstante, si se realizan nuevos estudios de biodistribución durante el desarrollo de los ensayos clínicos, la CNB solicita que se aporten los resultados de estos estudios de excreción del vector en los fluidos corporales.

4) Efectos sobre la salud humana, otros organismos no diana y el medio ambiente:

Tanto el vector lentiviral terapéutico como la célula CD34+ transducida tienen unas características biológicas que impiden su multiplicación y/o dispersión fuera del paciente trasplantado. No pueden sobrevivir fuera del individuo y la proliferación de la célula CD34+ transducida para reconstituir la hematopoyesis del paciente solo ocurrirá en el paciente y no podrá multiplicarse fuera de este (células autólogas).

No existen ecosistemas en los que se puede diseminar el OMG y en el paciente no hay modificación genética de células germinales por lo que no se puede transmitir. El uso propuesto para el producto final solo contempla la administración endovenosa del mismo. Otros tipos de interacciones no implicarían la dispersión biológica del mismo.



Como se ha indicado en el apartado “patogenicidad”, solo en el caso de que exista infección del VIH en el paciente podrían existir recombinaciones entre secuencias residuales del vector lentiviral con secuencias del virus salvaje, debido a esto se descarta realizar la terapia en pacientes VIH positivos. Esta medida garantizará que no puedan existir interacciones del OMG con otros organismos ajenos.

5) Control y tratamiento de residuos.

Los residuos generados durante la manipulación de las células CD34+ transducidas serán clasificados y depositados en contenedores específicos de bioseguridad, según la clase, y debidamente etiquetados. Posteriormente serán gestionados por una empresa especializada.

El transporte de muestras se realizará siguiendo las directrices sobre embalaje y etiquetado descritas en la NTP 628: Riesgo biológico en el transporte de muestras y materiales Infecciosos, publicada por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Antes de su salida, el laboratorio receptor deberá ser informado de la llegada de las muestras.

En el caso de que se produzca cualquier incidencia o accidente se deberá informar de manera inmediata a la Comisión Nacional de Bioseguridad.

CONCLUSIÓN

Se considera que en el estado actual de conocimientos y con las medidas de uso propuestas, los ensayos propuestos no suponen un riesgo significativo para la salud humana, la salud animal y/o el medio ambiente.

No obstante, la CNB ha tenido conocimiento por parte de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) que el CIEMAT presentó la solicitud para estos ensayos para la evaluación de la eficacia y seguridad del producto en la AEMPS, y ésta les solicitó información adicional. Posteriormente el 29 de mayo de 2012 se retiró dicha solicitud por la imposibilidad de cumplir con los plazos requeridos por la Agencia para remitir la información solicitada. La AEMPS está pendiente de que se realice una nueva solicitud.

En este sentido, la CNB solicita que si se produce algún cambio en el protocolo del ensayo o se aporta alguna información relevante sobre el mismo, el notificador debe informar a la autoridad competente así como a la CNB, para que se proceda a la revisión oportuna.

Una vez concluidos estos ensayos se remitirá un **informe de resultados** de los mismos a la Comisión Nacional de Bioseguridad. En dicho 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 4 de diciembre de 2012