



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE LINFOCITOS T MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/17/08)

Título del ensayo

Estudio piloto de la infusión de linfocitos T diferenciados, autólogos, de sangre periférica, expandidos y transducidos con un lentivirus para expresar un receptor antigénico quimérico con especificidad anti-CD19 (A3B1) conjugado con las regiones coestimuladoras 4-1BB y CD3 ζ en pacientes con leucemia o linfoma CD19+ resistente o refractaria a tratamiento.

Características del ensayo

El objetivo de las células modificadas es la inmunoterapia adoptiva antitumoral para pacientes con leucemia o linfoma CD19+ resistente o refractario al tratamiento y con un pronóstico vital inferior a dos años.

-Administración

Se incluirán en el estudio un máximo de 10 pacientes. En total se calcula que se administraran un máximo de $0,5 \times 10^6$ - 10×10^6 células/kg del paciente (>20% de las células son CAR19+).

Participará en el ensayo clínico el Hospital Clínic y el Hospital San Joan de Déu.

La liberación del OMG se realizará entre los meses de abril 2017 y junio del 2018.

-Seguimiento

El seguimiento total del estudio se realizará hasta 260 semanas desde la administración de la infusión de cada paciente.

Características del OMG

Las células ARI-0001 o células CART19 son linfocitos T diferenciados adultos autólogos de sangre periférica, expandidos y transducidos con un lentivirus para expresar un receptor antigénico quimérico (CAR en inglés) con especificidad anti-CD19 conjugado con las regiones coestimuladoras 4-1BB y CD3 ζ .

El receptor quimera (CAR19) está constituido por una región extracelular, una región transmembrana y una región intracelular. La región extracelular tiene la capacidad de reconocer proteínas de membrana intactas CD19, comunes en las células cancerígenas, sin necesidad de que haya procesamiento antigénico por parte de células presentadoras de antígenos, de manera que son capaces de identificar la diana directamente en la membrana de la célula tumoral. Este reconocimiento, a su vez, activa al linfocito T gracias a las regiones coestimuladoras 4-1BB y CD3 ζ , de manera que es capaz de destruir la célula tumoral gracias a la región transmembrana e intracelular.

El inserto CAR19 se transduce a los linfocitos T humanos mediante un lentivirus de tercera generación, sin capacidad replicativa, que contiene en su genoma la secuencia CAR19. El lentivirus no contiene en su genoma las proteínas empaquetadoras Gag y Pol, VSV-G y Rev. Las partículas víricas se obtienen mediante la transfección de las células empaquetadoras HEK293 con cuatro plásmidos distintos que contienen los genes *gag* y *pol* en un plásmido, *rev* en un segundo plásmido, VSV-G en un tercer plásmido y el transgen CAR19 en un cuarto plásmido.

El genoma del vector lentiviral se integra como provirus en el genoma de la célula T. El número de integraciones del lentivirus por genoma se analizará mediante qPCR utilizando cebadores específicos.



para el gen CAR19. La ausencia de RCL (lentivirus competentes para la replicación) se analizará también mediante qPCR utilizando cebadores específicos para el gen VSV-G. La ausencia de virus contaminante (adventicios) se comprobará mediante PCR, utilizando cebadores específicos de secuencia. El riesgo de presencia de células HEK293T (utilizadas en la producción del lentivirus) en el producto final es nulo, ya que el sobrenadante viral es filtrado por una membrana con un poro de 0.45µm para evitar el paso de células.

Identificación de riesgos potenciales

-Presencia de partículas virales libres

La fabricación del producto se realiza en un sistema de procesamiento de células cerrado y estéril. Las células T se transducen dentro del sistema con el lentivirus, se lavan y expanden. Se realizan dos controles en el producto final para descartar la presencia de partículas víricas: i) cuantificación por qPCR a tiempo real de la presencia del gen VSV-G y ii) ensayo de infección del producto final sobre HEK293T basado en la detección de la presencia de CAR19 en las células HEK293T.

-Capacidad de transferencia génica debido a la formación de lentivirus competentes para la replicación (RCL)

Durante la fabricación del OMG o posteriormente, después de la introducción en el paciente de células transducidas con el vector, se puede generar lentivirus competentes para la replicación. No obstante:

-Como control de calidad previo, antes de la realización de la aféresis y previamente a introducir a los pacientes en el ensayo, todos los pacientes que reciban el tratamiento serán sometidos a análisis quedando excluidos aquellos individuos que presenten alguna serología positiva según RD 1301/2006. Así mismo, se le realizarán los controles microbiológicos necesarios para poder procesar las células obtenidas (VIH 1 y 2, B, VHC, CMV, Lues, HTLV, T. cruzi).

-Es muy poco probable la formación de RCL resultante de la fabricación por el propio diseño del vector y porque, previamente a la administración al paciente, se realizan ensayos para la detección de RCL.

-Riesgo de transferencia genética

La probabilidad de transferencia genética horizontal es insignificante, ya que (i) las células T no transfieren genes horizontalmente, (ii) los procedimientos de control de calidad evitan la presencia de contaminantes microbianos que podrían transmitirse a los pacientes y de ellos al medioambiente, (iii) el virus integrado en las células T, no será capaz de recombinarse con secuencias de vectores retrovirales endógenos humanos dada la ausencia de secuencias de homología.

Respecto a la posible presencia de partículas virales libres en el producto, estas se inactivarían por el complemento del suero humano del paciente. Incluso en el caso de que la partícula infecciosa sobreviviera el tiempo suficiente para infectar una célula, el vector es deficiente para la replicación y únicamente se podría integrar una vez y no podría haber diseminación posterior.

-Patogenicidad

El vector utilizado para la preparación de las células T genéticamente modificadas es un vector lentiviral deficiente para la replicación, basado en vectores retrovirales de tercera generación. La mayor parte de la secuencia nativa del VIH-1 (aproximadamente el 85%) se ha eliminado, salvo las LTRs y la señal de empaquetamiento.



Las células ARI-0001 no producen virus infecciosos ni patogénicos. Existe una clara evidencia de que las células T transducidas no pueden ser fuente para transducciones posteriores ya que el vector se integra en el cromosoma de las células T sin transferir secuencias codificantes derivadas del virus.

-Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación

La posibilidad de supervivencia, establecimiento y diseminación del vector es insignificante teniendo en cuenta que es un vector no replicativo y la práctica ausencia de partículas virales libres en el producto. Las células ARI-0001 persisten en el ser humano una vez inoculadas durante un limitado periodo de tiempo, y posteriormente son eliminadas mediante procesos fisiológicos como cualquier otro tipo celular.

En el caso improbable de que se expongan las células al medio ambiente perderían su viabilidad y, a su vez, las secuencia CAR19.

-Efecto sobre la salud humana, otros organismos no diana y el medio ambiente

La posibilidad de supervivencia, establecimiento y diseminación del vector es insignificante teniendo en cuenta que es un vector no replicativo y la poca probabilidad de la presencia de partículas virales libres en el producto final.

Por otra parte, fuera del huésped, las células ARI-0001 son sensibles y rápidamente eliminadas tanto por inactivación física, como por desinfectantes.

-Manipulación, control y tratamiento de residuos

El producto ARI-0001 se formula dentro de un sistema de procesamiento de células y se rellena directamente desde el aparato al material de acondicionamiento primario que son Bolsas de Criopreservación CryoMacs. El producto ARI-0001 se criopreserva y se almacena dentro de las criobolsas en vapor de nitrógeno líquido.

El transporte del OMG desde el lugar de almacenamiento se realizará en contenedores de porexpan con nieve carbónica y el producto se descongelará inmediatamente antes de su administración.

El personal implicado en el ensayo clínico portará gorros, guantes, mascarillas y batas desechables. La administración se realizará mediante un sistema cerrado de transferencia usando “precauciones universales” para la administración de inyectables.

Los lugares de administración del producto se limpiarán con los productos desinfectantes habituales después de la administración. El material utilizado se considera residuo sanitario Grupo III por contener OMG y se gestionará como tal. Concretamente, los guantes, mascarilla y bata se desecharán en contenedores negros para incineración y las agujas en contenedores amarillos específicos a tal efecto. El acondicionamiento primario del producto será destruido siguiendo los protocolos de cada centro.

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, 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 de los mismos al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG) y a la Comisión Nacional de Bioseguridad. 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 18 de junio de 2017