



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE CÉLULAS T ALOGÉNICAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/18/24)

Título del ensayo clínico

Estudio abierto, no comparativo, de fase 1 para evaluar la seguridad y la capacidad de UCART19, administrado por vía intravenosa, de inducir una remisión molecular en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda de células B recurrente /refractaria, de la empresa Laboratorios Servier S.L.

Organismo modificado genéticamente

UCART19, son células T humanas (alogénicas) genéticamente modificadas.

Se utiliza un vector lentiviral, para añadir 2 genes al genoma de la célula T. Las proteínas producidas a partir de estos genes que se expresarán en la célula T son las siguientes:

- CARCD19, receptor antigénico quimérico (CAR) con capacidad para reconocer específicamente cualquier célula humana que exprese CD19 en su superficie (incluyendo células malignas que expresen CD19). El receptor consiste en la fracción scFv derivada del hibridoma anti-CD19 4g7, la bisagra y el dominio transmembrana del CD8, el dominio co-estimulador 4-1BB y el dominio de señalización CD3 ζ .
- RQR8, que funciona como un mecanismo de seguridad dado que lleva a la expresión del mimotopo CD20 en la superficie celular haciendo así al UCART19 susceptible a la destrucción por rituximab (anticuerpo antiCD20) si fuera necesario.

Además, se utiliza un sistema TALEN® para inactivar dos genes consiguiendo así la ausencia de dos proteínas en la superficie de las células. TALEN® son enzimas de restricción creadas artificialmente que pueden escindir secuencias de ADN con gran precisión. Los dos genes inactivados por las TALEN son el gen TRAC del receptor de células T (TCR) y el gen CD52.

La eliminación del TCR $\alpha\beta$ de la superficie celular tiene el objetivo de prevenir el reconocimiento mediado por el TCR de los antígenos HLA del huésped, que puede llevar a la aparición de una enfermedad injerto contra huésped. Mientras que la eliminando el gen CD52 permitirá la administración de las mismas a pacientes previamente tratados con alemtuzumab (anticuerpo molecular que se une a CD52).

UCART19 se prepara a partir de células T congeladas obtenidas de donantes voluntarios sanos que han sido sometidos a un cribado extenso en busca de patógenos que se transmiten por la sangre.

El vector CD19CAR/RQR8 deriva del virus VIH. Es un vector pseudotipado y no replicativo. La información está dividida en 4 plásmidos que contienen las secuencias para las proteínas Gag/Pol Rev, la glicoproteína de cubierta del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) y las casetes de expresión para CD19 y RQR8. El vector lentiviral es auto-inactivante (SIN), dado que contiene una delección de elementos intensificadores/promotores en el extremo 3'LTR del genoma viral, que se transfiere al extremo 5'LTR tras una vuelta de transcripción inversa.

Las células T alogénicas que son primeramente transducidas, con el vector lentiviral y posteriormente modificadas por el sistema TALEN®.



Características del ensayo

En el ensayo clínico participará el Hospital Sant Joan de Déu. Biobanco.

La dosis dependerá del peso del paciente.

Se evaluará en sangre la ausencia de lentivirus competente para la replicación durante los dos años que siguen a la administración de las UCART19 y después de forma anual hasta completar los 15 años de seguimiento.

Identificación y evaluación de riesgos potenciales

Estabilidad

Las secuencias transgénicas de CD19CAR/RQR8 son integradas en las células T de forma estable. Además se han llevado a cabo estudios *in vitro* para testar la estabilidad genética de la supresión de los genes de TRAC y CD52 mediante el sistema TALEN®.

Para la liberación del producto se analiza:

-Para la modificación con el vector lentiviral:

- Que el número de copias del vector sea menor de 5 copias/célula (valor establecido en base a la literatura y en aplicaciones de ensayos clínicos previos), mediante qPCR.

-Para las TALEN:

- Se verifica la escisión fuera de la diana mediante secuenciación “Next generation sequencing” (NGS) de alto rendimiento.
- Se realiza una evaluación de translocación por análisis citogenético e hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) que determina el riesgo de inestabilidad genómica relacionada con el proceso de eliminación simultánea de los genes TRAC/CD52. En cuanto al análisis del citogenético; no se aceptarán cariotipos clonales anormales (definidos por las guías ISCN), con el fin de minimizar el riesgo de inyectar un producto que puede proliferar de forma anómala. Sin embargo se espera que puedan ocurrir relocalizaciones/translocaciones de la región de TRAC con la región CD52. La evaluación de los datos relacionados con estas regiones específicas se hará caso a caso y justificada en los criterios de liberación si están por encima de los niveles definidos. En los experimentos llevados a cabo se midieron los niveles de translocaciones en las células transfectadas por los TALEN y se hizo seguimiento de estos niveles durante un periodo de cultivo prolongado. Estos resultados mostraron que, tras una expansión celular de unas 4.000 veces los niveles de aumento de translocación de TRAC/CD52 fueron insignificantes, lo que sugiere que no se confieren ventajas proliferativas a las células T.
- El OMG tiene que demostrar que no posee rasgos adquiridos de proliferación independiente de IL-2 antes de su liberación. Esta evaluación tiene como objetivo demostrar la ausencia de transformaciones aberrantes de las células modificadas que pudieran desencadenar expansión clonal y riesgo de tumorigenicidad.



Capacidad de transferencia génica debido a la formación de RCL

El vector se ha diseñado para evitar la aparición de lentivirus competentes para a replicación (RCL) mediante distribución del transgén y de las proteínas virales necesarias para el empaquetamiento, la retrotranscripción y la integración en el DNA del huésped en cuatro plásmidos diferentes. Esta estrategia permite reducir el riesgo de generación RCL a través de recombinación homóloga, lo que aumenta la seguridad del sistema vectorial.

Se analizará la formación de RCL en el vector, las células UCART19 liberadas y los pacientes.

Hay que tener en cuenta que a 37°C la vida media de los vectores lentivirales basados en VIH-1 es de 10 horas y el vector se desestabiliza rápidamente a pH 6 o pH 8. Además los vectores lentivirales pseudotipados con la glicoproteína del VSV-G producidos en células humanas son inactivados por el complemento sérico humano.

Presencia de partículas víricas libres en producto terminado

La cantidad teórica de vector residual en las células UCART19 (OMG) se sobre-estima sea $1.98E-11$ unidades por mL.

Se considera que esta concentración de vector libre en el producto final tiene una capacidad insignificante de transferir material genético al medio ambiente, considerando que las células T son transducidas con $3.60E+8$ unidades/mL en condiciones óptimas de laboratorio (concentración $1E+19$ más alta que la teórica sobre-estimada del vector residual).

Riesgo virus adventicios

Las células T obtenidas de donantes voluntarios sanos se someten a un cribado extenso en busca de patógenos transmitidos por la sangre.

Riesgo de transferencia genética

La transferencia génica horizontal de secuencias del vector lentiviral de CTL019 solo podría suceder tras la generación de RCL o en caso de liberación de partículas virales residuales en un número considerable al medio ambiente.

En cuanto a la generación de RCL, se precisaría la coinfección de células T CAR+ junto con retrovirus con homologías de secuencias suficientes para que tenga lugar la recombinación, lo que es muy improbable porque el riesgo de formación de RCL se ha reducido al mínimo. En cuanto a la presencia de vector lentiviral residual, se ha investigado la eliminación del vector lentiviral residual durante el proceso de fabricación y se han confirmado unos niveles que hacen improbable el riesgo de transferencia génica.

Clonalidad y oncogénesis insercional

El riesgo de transformación celular maligna tras la mutagénesis insercional mediada por vectores se reduce en el caso de vectores lentivirales a través de la utilización de vectores auto-inactivantes (SIN). Los vectores SIN contienen una delección del intensificador/promotor en el extremo 3'LTR del genoma viral que se transfiere al extremo 5'LTR. Esta modificación minimiza la posibilidad de movilización del vector y de la activación de un proto-oncogén por la inserción de un promotor en las células diana. A día de hoy no se han observado acontecimientos adversos graves con los vectores SIN lentivirales incluso cuando se emplean para controlar la expresión genética en células madre hematopoyéticas.



Se analizará el número de integraciones del vector por célula, mediante qPCR siendo los criterios de liberación de UCART19 la presencia de menos de 5 copias por célula.

Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación

El producto consta de linfocitos T transducidos que solo pueden sobrevivir en condiciones muy controladas *in vitro* o en el interior del cuerpo humano.

UCART19 no es patógeno y se dirige de forma selectiva a las células B que expresan CD19. Las células T transducidas no sobreviven ni pueden colonizar otras especies, ni tampoco se conocen otras especies que actúen como portadores o vectores suyos en condiciones naturales.

Fuera del huésped, UCART19 es sensible a la inactivación física (deshidratación y calor), los desinfectantes (disolventes lipídicos y detergentes suaves) y la falta de nutrientes, que lo destruyen rápidamente. Las modificaciones genéticas efectuadas en las células T no afectan a su capacidad supervivencia en un medio ambiente fuera del organismo huésped. En consecuencia, las células T CAR+ carecen de una ventaja competitiva. No pueden replicarse en ausencia de una estimulación antigénica concreta o de determinadas citocinas.

La pérdida de sangre accidental o el análisis de sangre no conllevan riesgo de diseminación del producto en el medio ambiente ya que las células se inactivarían rápidamente.

En el caso de exposición del personal sanitario por inyección accidental UCART19 se eliminará a través de su propio sistema inmune y no tendrá reacciones adversas aparte de la reacción inmune normal.

Manipulación, control y tratamiento de residuos

Las células UCART19 llegarán al centro clínico en crioviales sellados.

No se realizará ninguna modificación posterior en el centro clínico.

Los crioviales son almacenados en el centro clínico en la fase vapor de un tanque de nitrógeno líquido (que solo puede abrir el personal autorizado), en el banco de sangre y células (BST) del hospital, que dispone de acceso restringido. Antes de su administración a los pacientes, los viales son descongelados en el BST, tras lo cual personal experimentado los trasladará a la habitación del paciente. Allí, personal experimentado aspirará la suspensión de células de los viales en una jeringa desechable para inyección intravenosa a pie de cama del paciente. Las células serán entonces infundidas directamente al paciente por vía intravenosa.

El personal sanitario llevará ropa de protección (batas de laboratorio desechables y guantes).

Los residuos sólidos, guantes desechables, viales, jeringas, material de inyección, aguja y catéter del paciente, apósitos y empapadores, etc.) serán recogidos en un contenedor de residuos clínicos de grado III. Los contenedores son recogidos por una compañía externa, responsable de la destrucción de los residuos del hospital.

Además, disponen de un manual de instrucciones detallando como recuperar, limpiar y eliminar los residuos en caso de derrame.

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 21 de noviembre de 2018