



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE CÉLULAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/21/08)

Título del ensayo clínico

Estudio clínico CRSP-ONC-001: “Estudio de fase I de aumento gradual de la dosis y ampliación de cohortes sobre la seguridad y la eficacia de linfocitos T anti-CD19 alogénicos modificados genéticamente mediante CRISPR-Cas9 (CTX110), en pacientes con neoplasias malignas de linfocitos B recidivantes o resistentes al tratamiento”, del promotor CRISPR Therapeutics AG

Características del ensayo

El promotor propone un período para la liberación de marzo de 2020 a noviembre de 2026

Participarán en el ensayo clínico la Clínica Universidad de Navarra y el Hospital Universitario de Salamanca.

El OMG se administrará en una sola infusión intravenosa a una dosis de entre 1×10^7 y 6×10^8 linfocitos T CAR+.

Los pacientes estarán hospitalizados durante los primeros 7 días tras la infusión de CTX110. Tras el periodo de observación breve, los pacientes tendrán un seguimiento de hasta 5 años tras la infusión de CTX110 con exploraciones físicas, evaluaciones de la enfermedad y analíticas frecuentes y evaluaciones de acontecimiento adversos. Tras finalizar este estudio, los pacientes deberán participar en un estudio de seguimiento a largo plazo independiente durante otros 10 años para evaluar la seguridad y la supervivencia a largo plazo.

Organismo Genéticamente Modificado

El OMG (CTX110) es una inmunoterapia con linfocitos T dirigidos al antígeno CD19 de los linfocitos B.

El OMG consiste en linfocitos T alogénicos humanos modificados genéticamente *ex vivo* mediante edición genómica con CRISPR/Cas9 utilizando un vector vírico adenoasociado recombinante.

Se usa el sistema CRISPR/Cas9, junto con un molde de ADN aportado por el vector vírico, para crear tres ediciones en el genoma de los linfocitos T:

- interrupción de la región constante del receptor α de linfocitos T (TRAC),
- destrucción de la $\beta 2$ -microglobulina (B2M) e
- incorporación específica de una secuencia de ADN, que codifica un receptor CAR específico para CD19, en el locus de TRAC

La interrupción del locus del TRAC genera pérdida de expresión del receptor de linfocitos T (RLT) y está destinada a reducir la probabilidad de padecer enfermedad del injerto contra huésped (EICA), mientras que la interrupción del locus de la B2M genera falta de expresión de las proteínas de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y está destinada a mejorar la persistencia al reducir la probabilidad de rechazo por parte del huésped. Al añadir el CAR anti-CD19, los linfocitos T modificados se dirigen hacia las células tumorales que expresan el antígeno CD19.



Para la modificación de los linfocitos T se utiliza proteínas de las nucleasas Cas9 y 2 ARNug para la modificación del genoma:

- Un ARNug (TA-1) actúa sobre el locus TRAC (que codifica el TCR) y genera una ruptura bicatenaria, que interrumpe la expresión del TCR. Luego, el mecanismo de reparación homólogo provoca la inserción de un casete de expresión CAR anti-CD19 (mediante el vector VAA recombinante) en el locus TRAC.
- El otro ARNug (β 2M-1) actúa sobre el locus β 2M para provocar la ruptura mediante la unión de extremos no homólogos.

Tanto los ARNug como las proteínas de las nucleasas Cas9 se introducen mediante electroporación.

El genoma del vector viral transporta el fragmento de inserción CAR anti-CD19 flanqueado por 2 secuencias homólogas a las secuencias del locus de cadena α del TCR. A su vez, estas secuencias están flanqueadas por las repeticiones terminales invertidas (ITR) izquierdas y derechas del VAA.

La casete de expresión CAR consta de un activador, la secuencia de codificación de CAR y una secuencia de señal poli(A) sintética e incluye el dominio de unión scFv, que consta de la región variable de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo monoclonal de ratón humanizado específico frente al antígeno diana CD19. El scFv está ligado a una región transmembrana y a una región bisagra de CD8, que se fusiona con el dominio de señalización intracelular de CD28 y CD3 ζ . La región de CD3 ζ desencadena una señal primaria dentro del linfocito T y los elementos de CD28 generan una señal coestimuladora. Juntas, las señales de CD3 ζ y CD28 producen la activación de los linfocitos T, con proliferación, secreción de citocinas y lisis de linfocitos B normales y malignos que expresan CD19.

Identificación de riesgos potenciales

-Presencia de partículas virales libres

La presencia del vector viral en el producto final se determina mediante un análisis con qPCR con un límite de detección de 3,52 vg/linfocito. Los niveles de vector residual presentes en CTX110 son inferiores al límite de detección, lo que representa una reducción aproximada del vector de 7.000 veces en el producto final. Dado que el vector no tiene capacidad de replicación, se considera que el riesgo asociado a la presencia del vector en el producto final es insignificante.

-Riesgo mutaciones en secuencias no dianas.

Evaluación de modificaciones no deseadas y variación estructural

Para evaluar la posibilidad de introducción de cambios genómicos involuntarios durante la modificación de CRISPR/Cas9, se emplearon métodos computacionales y experimentales. En primer lugar, se identificaron las secuencias genómicas más propensas a sufrir modificaciones no deseadas utilizando métodos relacionados y no relacionados con el grado de semejanza de las secuencias nucleotídicas. Las secuencias identificadas se confirmaron con métodos de secuenciación de nueva generación (NGS —*next-generation sequencing*) y continuarán supervisándose mediante un ensayo de caracterización en todos los lotes clínicos de CTX110. En segundo lugar, se cuantificaron todas las traslocaciones previstas entre los *loci* TRAC y B2M con la reacción en cadena de la polimerasa digital en nanogotas (ddPCR —*droplet digital PCR, droplet digital polymerase chain reaction*). En tercer lugar, se completó la caracterización de las zonas diana para cuantificar las inserciones y eliminaciones en los *loci* TRAC y B2M, la integración molde donante de CAR guiándose por el grado de semejanza de las secuencias nucleotídicas y la expresión del transcrito de CAR completo. Se



desarrollaron ensayos para la detección de traslocaciones y secuencias no deseadas con el fin de aplicarlos a cada lote clínico de CTX110 antes de autorizar su distribución. Paralelamente, para autorizar la distribución del producto, se introducirá el criterio de ausencia de crecimiento independiente de citocinas.

-Manipulación, control y tratamiento de residuos (documento a paste al anexo de solicitud)

El producto se almacenará en una sala con acceso restringido, en la fase gaseosa de un tanque de nitrógeno líquido asignado a este tipo de producto.

Para el tratamiento de pacientes, el producto se transferirá del centro de almacenamiento, al área en la que se realizarán la descongelación y la administración. Para transportar el producto criopreservado, la criobolsa que lo contiene se extraerá de la fase gaseosa del tanque de nitrógeno. La criobolsa se transferirá dentro de un segundo embalaje seco cerrado y a prueba de derrames y roturas.

El personal encargado de preparar el producto para su administración será personal cualificado y descongelará las células siguiendo los procedimientos del centro y lo recogido en el «Manual de recepción, almacenamiento e infusión del producto CTX110». El personal manipulará las muestras con guantes desechables estériles. El material se preparará junto a la cama del paciente, sobre una superficie limpia y desinfectada. La criobolsa que contiene el producto se colocará dentro de una segunda bolsa de cierre hermético, que se cerrará para evitar posibles derrames y para evitar que las boquillas se contaminen. La criobolsa que va dentro de la bolsa hermética se descongelará a 37 ± 1 °C al baño María o con un método de descongelación en seco. Cuando la criobolsa se haya descongelado, se extraerá la bolsa hermética que la contiene del baño María. El producto se administrará mediante vía de infusión y catéter/aguja. Todo el material utilizado será desechable y estéril.

El personal encargado de recoger y manipular las muestras será personal debidamente cualificado y manipulará las muestras con guantes desechables estériles, máscara y ropa de protección.

El transporte de las muestras dentro de la clínica se llevará a cabo de acuerdo con los procedimientos del centro. Las muestras siempre estarán etiquetadas y se transportarán en recipientes cerrados colocados en bandejas o rejillas adecuadas dentro de recipientes precintados con material absorbente que retenga el líquido en caso de derrame. El recipiente exterior será hidrófugo y a prueba de derrames y tendrá una tapa que garantice su correcto cierre. El recipiente irá etiquetado con la señal que corresponda al transporte de sustancias infecciosas de categoría B para diagnóstico o investigación y el pictograma de riesgo biológico (también para OMG infecciosos).

Todos los desechos, incluido todo el material que entre en contacto con el OMG, se eliminarán como residuos de riesgo biológico. Se utilizará un desinfectante aprobado para hospitales para la desinfección regular de las superficies de trabajo y del material que pueda entrar en contacto con el OMG.

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 de los mismos al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG) y a la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB). 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 20 de marzo de 2021