



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE LINFOCITOS T MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (CTX120) (Notificación B/ES/19/26)

Título del ensayo clínico

Estudio de fase I de aumento gradual de la dosis y ampliación de cohortes sobre la seguridad y la eficacia de linfocitos T anti-BCMA alogénicos genomodificados mediante CRISPR-Cas9 (CTX120) en pacientes con mieloma múltiple recidivante o resistente al tratamiento, de la empresa CRISPR Therapeutics AG.

Características del ensayo

El período propuesto para la liberación es de marzo de 2020 a noviembre de 2026.

En el ensayo clínico participará la Clínica Universidad de Navarra.

Los OMG se administran en una única infusión intravenosa a una dosis de entre $2,5 \times 10^7$ y $4,5 \times 10^8$ linfocitos T CAR+.

Los sujetos serán hospitalizados durante un mínimo de 7 días después de la infusión de CTX120. De acuerdo con el protocolo, las visitas están programadas para los días 8, 10, 14, 21, 28, así como para los meses 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54 y 60. Los sujetos serán incluidos después en un protocolo de seguimiento a largo plazo con visitas anuales durante 10 años. En general, los pacientes se supervisarán durante un total de 15 años después del tratamiento.

Organismo Genéticamente Modificado

El OMG (CTX120) es una inmunoterapia con linfocitos T dirigidos al antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA).

El OMG consiste en linfocitos T alogénicos humanos genéticamente modificados *ex vivo* mediante edición genómica con CRISPR/Cas9 y un vector vírico adeno-asociado 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:

- destrucción 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 BCMA, en el locus de TRAC.

Con la modificación del genoma se pretende reducir la probabilidad de que se presente la enfermedad del injerto contra el hospedador (EICH), mejorar la persistencia reduciendo la probabilidad de que se produzca un rechazo por parte del hospedador y dirigir los linfocitos T modificados hacia las células tumorales que expresan BCMA.

Para la modificación de los linfocitos T se utiliza la proteína de la nucleasa 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 antiBCMA (mediante un 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 y como las proteínas de las nucleasas Cas9 se introducen mediante electroporación.

El genoma del vector viral transporta la casete de expresión antiBCMA 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.

El receptor CAR está formado por el dominio de unión scFv, de un anticuerpo monoclonal humanizado específico para el antígeno, unido a una región transmembrana y una región bisagra de CD8 fusionada con el dominio de señalización intracelular para CD137 (4-1BB) y CD3 ζ . La señalización a través de CD3 ζ y CD137 (4-1BB) posterior a la interacción con CAR potencia la supervivencia, persistencia y actividad antitumoral de los linfocitos T. Juntas, las señales producen la activación de los linfocitos T con proliferación, secreción de citoquinas y lisis de los linfocitos B normales y malignos que expresan BCMA.

Identificación de riesgos potenciales

-Presencia de partículas virales libres.

La presencia del vector viral VAA en el producto final se determina mediante un ensayo de qPCR. Los niveles del vector residual detectados en CTX120 se encuentran por debajo del límite de detección del ensayo, lo que representa, teniendo en cuenta la cantidad de vector que se añade a las células, una disminución de unas 10.000 veces del vector en el producto terminado. Puesto que el vector no tiene capacidad replicativa, 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 con 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 CTX120. En segundo lugar, se cuantificaron todas las traslocaciones previstas entre los *loci* TRAC y B2M con un ensayo de PCR 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 del molde donante de CAR guiándose por el grado de semejanza de las secuencias nucleotídicas y la expresión del transcrito de CAR completo. Se ha desarrollado ensayos para la detección de traslocaciones y secuencias no deseadas con el fin de aplicarlos a cada lote clínico de CTX120 antes de autorizar su distribución. Paralelamente, para autorizar la distribución del producto, se introducirá el criterio de ausencia de crecimiento independiente de citoquinas.

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

El OMG se conservará en una sala con acceso restringido, en un tanque de nitrógeno líquido asignado a este tipo de producto, en fase de vapor, y quedará debidamente registrado conforme a los protocolos del centro hospitalario.

Para la administración, las células se transferirán desde el lugar de almacenamiento al de administración donde se procederá a descongelar el vial. Para ello, el vial que contiene el OMG se extraerá del tanque de nitrógeno en estado de vapor y se introducirá el vial en un tanque portátil de nitrógeno líquido, en fase de vapor.

Las personas encargadas de preparar la muestra para inyección serán personal cualificado. Utilizarán guantes desechables estériles para manipular las muestras. El material necesario para la descongelación se preparará en un campo estéril situado cerca del paciente. El vial que contiene el producto se descongelará, se utilizará un adaptador estéril sin aguja para infusión aplicando las precauciones universales y utilizando guantes estériles. Las posibilidades de contacto del manipulador con el OMG durante la preparación son mínimas, ya que se trata de un sistema cerrado en el que no existe contacto entre el producto y el manipulador o el medio ambiente.

Las muestras de los pacientes se transportarán en bandejas o gradillas adecuadas, en envases o contenedores sellados, con material absorbente para retener el líquido en caso de derrame. El envase exterior debe ser impermeable y hermético, con una tapa que garantice el cierre correcto.

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 no desechable que pueda entrar en contacto con el OMG.

En el caso de que el OMG no sea utilizado y sea devuelto al solicitante de la autorización, el transporte se realizará de acuerdo a las normas pertinentes para el transporte de bienes peligrosos por carretera, tren o avión. Los OMG que no se ajusten a la definición de sustancias tóxicas o infecciosas se asignarán a la clase 9 (sustancias y objetos peligrosos, incluidas las sustancias peligrosas para el medio ambiente). Se les asignará el n.º UN 3245 “Microorganismos modificados genéticamente u organismos modificados genéticamente” y se seguirán las instrucciones de embalaje/envasado P904. Se transportarán en envases triples.

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 21 de febrero de 2020.