



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE LINFOCITOS AUTÓLOGOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/19/05)

Título del ensayo

Ensayo fase I-IIa para evaluar la seguridad y la actividad antitumoral de células T autólogas que expresan el receptor quimérico anti-CD44v6 en leucemia mieloide aguda y mieloma múltiple con expresión de CD44v6, de la empresa MolMed SpA.

Características del ensayo

En el ensayo clínico participará en el Hospital Santa Creu i Sant Pau. Aproximadamente a 68 sujetos se les perfundirá una única dosis del medicamento CAR anti-BCMA02, para alcanzar una dosis de 0,5 a 2×10^6 células/kg de peso corporal.

Organismo Modificado Genéticamente (OMG)

El OMG (linfocitos T MLM-CAR44.1) son linfocitos T autólogos congelados, modificados genéticamente *ex vivo* con un vector retroviral γ que expresa una forma mutada de los genes de la timidinquinasa del virus Herpes simple (HSV-TKmut2) y el CAR CD44v6 Δ NL.0

El vector retroviral γ utilizado para la transducción es un vector derivado del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV) y pseudotipado con una envoltura GaLV (virus de leucemia del simio gibón) y contiene las secuencias 5' y 3' LTR y la señal de empaquetamiento. La obtención de las partículas víricas se realiza mediante la transducción de células PG13 con el plásmido que contiene el inserto y dos plásmidos que codifican para los genes *gag* y *pol* y *env GaLV*.

El gen suicida HSV-TK Mut2 codifica una forma mutada de la enzima timidinquinasa del virus Herpes simplex I. Esta mutación elimina la presencia de un sitio responsable de la generación de variantes resistentes a ganciclovir. La proteína derivada es funcional y se puede usar *in vitro* e *in vivo* para eliminar selectivamente las células transducidas en presencia de ganciclovir.

La proteína de fusión recombinante CAR CD44v6 Δ NL está constituida por una región de unión extracelular específica para el antígeno CD44v6 derivado de un anticuerpo monoclonal humanizado, un espaciador que proporciona un enlace flexible entre la región de unión extracelular y el dominio transmembrana y además, permite la inmunoselección *in vitro* y el seguimiento *in vivo* de las células transducidas mediante los anticuerpos específicos, un dominio transmembrana intracelular de la molécula humana coestimuladora CD28, esencial para la producción de citoquinas y para la proliferación *in vivo* de las células T CAR así como para su supervivencia a largo plazo, y un dominio señalizador intracelular de la cadena CD3 ζ humana esencial para la activación de la célula T.

Evaluación del riesgo para la salud humana, animal y el medio ambiente

Teniendo en cuenta las características específicas del medicamento en investigación, el solicitante considera que la evaluación específica del riesgo ambiental prevista en las *Buenas Prácticas sobre la evaluación de aspectos relacionados con OMG en el contexto de ensayos clínicos con células humanas genéticamente modificadas por medio de vectores retrovirales/lentivirales*¹ es aplicable.

¹ https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/biotecnologia/organismos-modificados-geneticamente-omg-/notificaciones-y-autorizaciones/proc_autorizacion.aspx



Identificación de riesgos potenciales

Las células humanas no pueden proliferar en el medio ambiente ya que solo pueden sobrevivir dentro del cuerpo humano o en condiciones de cultivo *in vitro*. De ello se deduce que, cuando el medicamento en investigación consta de células humanas modificadas genéticamente mediante vectores retrovirales/lentivirales, los riesgos para el medio ambiente y la salud pública están relacionados principalmente con la posibilidad de formación de un virus competente para la replicación y la presencia de partículas víricas residuales infecciosas del vector viral en el producto final que podrían liberarse al medio ambiente.

-Presencia de partículas virales libres

El proceso de fabricación de los linfocitos T MLM-CAR44.1 incluye varias etapas de lavado de células y un proceso de selección, que se basa en la unión inmune de las células transducidas con microperlas portadoras de anti-LNGFR. Los primeros 222 aminoácidos del LNGFR (receptor de baja afinidad del factor de crecimiento nervioso) humano constituyen el espaciador que une la porción extracelular del CAR a la intracelular. Durante este paso, el medio se descarta completamente, de modo que se contribuye a eliminar las partículas virales libres residuales presentes en el medio de cultivo celular, incluido el vector retroviral CAR CD44v6ΔNL libre.

La tasa de reducción durante el proceso de producción ha sido calculado usando la fórmula adaptada del documento *Buenas Prácticas en la evaluación de aspectos relacionados con OMG en el contexto de ensayos clínicos con células humanas genéticamente modificadas por medio de vectores retro/lentivirales*, obteniéndose un resultado que indica que el riesgo de presencia de partículas víricas libres es insignificante.

-Capacidad de transferencia génica debido a la formación de virus competentes para la replicación (RCV)

Los lotes de vectores retrovirales CAR-CD44v6ΔNL se prueban mediante amplificación en la línea celular Mus dunni (que son permisivas a la infección por retrovirus competentes para la replicación, RCR) durante un mínimo de 5 pases, para amplificar cualquier posible RCR presente. Luego, el material amplificado se analiza para detectar la presencia de RCR utilizando el ensayo PG-4 S + L, para la formación de focos.

El control de calidad de los lotes finales de células T MLM-CAR44.1 se analiza para RCR con un ensayo de RT-PCR que detecta los genes de *GaLV* y *gag-pol* como indicación de recombinación.

Hasta ahora no se ha detectado RCR en ninguna de las muestras analizadas, incluido un lote del vector CAR-CD44v6ΔNL y los lotes de verificación de linfocitos T MLM-CAR44.1.

-Manipulación, control y tratamiento de residuos

El personal del hospital está entrenado en las mejores prácticas en el manejo del producto antes y durante la infusión, y en el manejo de los desechos.

El personal deberá usar bata, guantes, máscara y gafas de seguridad de laboratorio para la administración. Los linfocitos T MLM-CAR44.1 se administran al paciente mediante el uso de válvulas especiales conectadas a un catéter venoso, por lo que no se requiere el uso de agujas para perfusión. El material utilizado se eliminará de acuerdo con las normas que regulan la eliminación del material biológico (categoría III).



Los residuos y los restos del producto en investigación potencialmente contaminados y otros materiales se tratarán y eliminarán como residuos de categoría III.

El producto en investigación se almacenará en el lugar de acceso restringido. El producto no requiere preparación a parte de la descongelación y la conexión con el tubo de infusión, este paso se llevará a cabo en campana de bioseguridad de clase II.

El envío de muestras del paciente al laboratorio de análisis se llevará a cabo utilizando el servicio de mensajería cualificado escogido por el Promotor. Los materiales y las cajas para el transporte, tanto para muestras frescas como congeladas, así como los dispositivos de control de temperatura (caja, hielo seco, registrador de datos) necesarios para el envío, son proporcionados por el servicio de mensajería. El embalaje primario (tubos para las muestras frescas y viales en Cryoboxes para los materiales congelados) será proporcionado por los centros clínicos.

Las muestras para análisis interno y para estudios auxiliares², se etiquetarán y transportarán dentro de un contenedor cerrado a prueba de fugas e irrompible, con doble bolsa y control de temperatura.

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 7 de mayo de 2019

² **Los laboratorios en los que se analicen muestras clínicas de pacientes deben cumplir, como mínimo, con los requisitos del nivel de bioseguridad 2.**

Documento de apoyo:

- Manual de seguridad en el laboratorio de la OMS. 2005.
- Guía Técnica para la evaluación y la prevención de los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos. Instituto Nacional de Higiene y Seguridad en el Trabajo. 2014.
- Real Decreto 664/1997, de 12 de mayo.
- Real Decreto 178/2004, del 3 de enero.