



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE CÉLULAS T MODIFICADAS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/15/13)

Título del ensayo

“Estudio en fase III, multicéntrico, abierto, de 2 grupos y aleatorizado con comparación de estrategia de apoyo con linfocitos T modificados genéticamente frente a la estrategia de referencia en pacientes con leucemia aguda de alto riesgo sometidos a trasplante de células hematopoyéticas haploidéntico”.

Características del ensayo

MolMed Spa. presenta una solicitud para realizar un estudio aleatorizado de fase III sobre el trasplante de células hematopoyéticas haploidéntico con o sin una estrategia de apoyo con linfocitos T donados modificados genéticamente (MM-TK), en pacientes con leucemia aguda de alto riesgo.

El ensayo se realizará en el Servicio de Hematología del Hospital de Navarra.

Características del OMG

El organismo modificado genéticamente se define como linfocitos T de un donante haploidéntico modificados genéticamente con el vector retroviral SFCMM-3 Mut2 #48 para expresar las proteínas HSV-TK y Δ LNGFR. Nombre comercial Zalmoxis. Se trata de un fármaco específico para cada paciente elaborado a partir de una linfocitoaféresis de un donante concreto.

SFCMM-3 Mut2 #48 es un vector retroviral que deriva del virus MLV (virus de la leucemia murina), es no replicativo e integrativo, y en el que se ha insertado los genes que codifican HSV-TK y Δ LNGFR:

- HSV-TK Mut2 gen que codifica para una forma mutada de la timidina kinasa del Virus Herpes Simplex I, responsable de que los linfocitos T modificados sean sensible a Ganciclovir. Cuando se administra ganciclovir es monofosforilado por la timidina kinasa y transformado en la forma trifosfato por otras enzimas. Esta forma trifosfato induce el bloqueo de la síntesis de nuevas hebras de ADN durante la mitosis provocando la muerte de las células en proliferación. Es un gen suicida.

HSV-TK Mut2 se obtuvo mediante una mutación silenciosa (T→C) en el splicing donor site (región 5' del intron) del gen HSV-TK para evitar la aparición de formas truncadas de HSV-TK asociadas con resistencia a ganciclovir y que se han detectado en linfocitos T transducidos con HSV-TK WT y en los pacientes que habían recibido estos linfocitos.

- Δ LNGFR: la expresión bajo el control del promotor SV40. Forma truncada de la proteína que no contiene la porción intracitoplásmica por lo que no tiene actividad farmacológica. Es un marcador de selección.

HSV-TK Mut 2 y Δ LNGFR son clonados en el plásmido LXXSN obteniéndose el plásmido SFCMM3 TKmut2.



El vector viral SFCMM-3 Mut2#48 se obtiene mediante la transfección de la línea celular empaquetadora, GP+env AM12, que deriva de la línea celular de ratón NIH3T3 transfectada con plásmidos que codifican los genes *gag*, *pol* (plásmido 3PO) y *env* (plásmido pL1). El gen *env* procede del clon anfotrófico 4070A de MoMuLV, que infecta células de varias especies de mamíferos incluidas células humanas. Los linfocitos T del donante haploideéntico se obtienen mediante linfocitoaféresis.

Para la obtención de los linfocitos T modificados genéticamente, las células congeladas se descongelan, estimulan, transducen en presencia del vector y se inmunoseleccionan mediante citometría de flujo (FACS) utilizando un anticuerpo monoclonal específico anti-LNGFR (AcM 20.4) unido a bolas magnéticas para obtener una población altamente purificada de células positivamente transducidas.

Administración

El producto se suministra en bolsa de congelación de EVA (etilen-vinil-acetato), en solución salina que contendrá HSA al 7% y DMSO al 10% a la concentración de 5-20x10⁶ células/ml. Las células son descongeladas en baño a 37°C previa a la administración. Durante el proceso es posible el contacto del producto con el personal sanitario por derrame por rotura de la bolsa en el contenedor de transporte, durante la descongelación (el producto se suministra en una doble bolsa adicional para prevenir rotura durante la descongelación), durante conexión de la vía a la bolsa de infusión o por pinchazo accidental al quitar la vía. En el documento de instrucciones que acompaña al producto se recoge toda la informa referente a las medidas a adoptar en caso de exposición accidental. En cualquier caso, si se produce exposición accidental de individuos sanos es de esperar que el sistema inmune elimine las células al no reconocerlas como propias. La posibilidad de que dos individuos tengan idéntico HLA es extremadamente baja. No se debe permitir la participación en la administración del producto del donante haploideéntico de los linfocitos T.

La células se administrarán por infusión intravenosa en su totalidad, 5-20x10⁶ células/ml, tras 2 o 3 lavados de la bolsa con solución fisiológica sin potasio. La pauta posológica será máximo 4 infusiones con un intervalo de 30 días entre cada infusión. La administración se debe realizar en condiciones asépticas por personal cualificado de acuerdo al las instrucciones suministradas con el producto.

Identificación de riesgos potenciales

-Estabilidad genética

En cada lote de producción del producto, se verifica la estabilidad mediante southern blot y secuenciación de la secuencia que codifica para HSV-TK.

El OMG es estable cuando está almacenado en vapor de nitrógeno líquido hasta 18 meses. Una vez deshelado, el OMG es estable durante dos horas a temperatura ambiente.



-Patogenicidad

Presencia de vector libre en el producto

Las células transducidas del donante no pueden sobrevivir fuera de los pacientes previstos, del donante haploidéntico o bajo condiciones de fabricación específicas.

La posibilidad de que las partículas virales libres estén asociadas con el producto para la administración a pacientes se aproxima a cero ya que se realizan varios pasos de lavado durante la fabricación y para cada uno de ellos se puede calcular una reducción específica.

Si además de los lavados durante el proceso de fabricación se tiene en cuenta la selección de las células modificadas que expresan Δ LNGFR mediante FACS, proceso en el cual el medio es totalmente eliminado, se podría considerar casi una completa eliminación de las partículas virales libres.

La transducción in vitro de células humanas con SFCMM-3 Mut2#48 puede llevarse a cabo únicamente en presencia de agentes facilitadores como protamina, retronectina o polibrene y además se inactiva en presencia de suero humano. Por lo tanto, si el producto estuviese contaminado con partículas libres de vector, la infección de células humanas sería bastante improbable lo que minimiza la integración en otras células del paciente.

No se ha detectado la presencia de partículas virales en sangre, saliva, orina o heces de pacientes.

Capacidad de transferencia génica debido a la formación de retrovirus competente para la replicación (RCR)

La fabricación del vector SFCMM-3 Mut2#48 se caracteriza por la segregación de las secuencias virales *gag*, *pol* y *env*, necesarias para generar partículas virales, en dos plásmidos diferentes. Estas secuencias no están presentes en SFCMM-3 Mut2#48. Este sistema de empaquetamiento reduce el riesgo de recombinación/complementación de SFCMM-3 Mut2#48 con la secuencias plasmídicas siendo necesario tres eventos de recombinaciones para generar un retrovirus replicativo.

Rutinariamente se realiza ensayos que permiten la detección de RCR en las células empaquetadoras, en todos los lotes de vector, en las células modificadas (se utiliza el Mus dunni cell assay, que se sabe contienen secuencias retrovirales endógenas) y durante el seguimiento de los pacientes (los resultados obtenidos a partir de 150 muestras obtenidas en distintos etapas fueron negativas). Teóricamente es también posible la generación del RCR por recombinación del vector con otros retrovirus durante el proceso de fabricación si los linfocitos (del donante) modificados están coinfectados con lentivirus que son retrovirus que infectan específicamente a humanos. Nunca se ha descrito en la literatura.

Por otra parte, no se ha detectado homología mediante alineamiento BLAST entre ninguna secuencia HERV y el vector. Además en los estudios realizados con vectores similares utilizando líneas celulares que expresan secuencias HERV no se ha detectado la movilización de dichos vectores lo que sugiere que no se produce la recombinación entre secuencias homólogas.



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

No se espera la liberación del OMG en el medio ambiente debida al vertido procedente de la postadministración de pacientes tratados. Incluso en el caso de una hemorragia accidental de los pacientes, un impacto medioambiental puede considerarse insignificante, porque los niveles de las células transducidas en la sangre de los pacientes tratados son extremadamente bajos y siguen una curva decreciente con el transcurso del tiempo. Además, la sangre se inactiva rápidamente en condiciones de secado. La sangre tomada de los pacientes para la realización de análisis se considera como potencialmente infecciosa, como toda la sangre humana, y se trata adecuadamente. No se requiere ningún tratamiento adicional específico debido a las células transducidas. Los pacientes tratados con Zalmoxis están excluidos de las donaciones de sangre.

Por otra parte, tanto las partículas del vector retroviral SFCMM-3 Mut2 #48 como las células transducidas son extremadamente sensibles a las condiciones ambientales y no son aptas para sobrevivir en entornos que no sean los entornos experimentales o fisiológicos.

-Control y tratamiento de residuos

El suministro del producto al hospital en el que se realiza el ensayo clínico va acompañado de instrucciones relativas a limpieza, desinfección y descontaminación y eliminación de residuos.

-Seguimiento

El estudio durará un año después del reclutamiento del último paciente. La detección de RCR se realizará mediante Q-PCR en la región del gene *env*, en cumplimiento con las directrices de la EMA, al inicio del estudio y a los tres, seis y doce meses después de la primera infusión y una vez al año durante 5 años.

En caso de que las muestras obtenidas durante el primer año dieran siempre resultados negativos, se obtendrán las muestras anuales siguientes pero no se analizarán. En caso de obtener una o más muestras positivas, se realizará un citocultivo con fines de confirmación. Se conservarán muestras de retención de cada momento durante 5 años.

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 4 de diciembre de 2015