



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE CÉLULAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/18/19)

Título del ensayo clínico

Estudio fase II, abierto, multicéntrico, de un brazo único, para determinar la seguridad y la eficacia de tisagenlecleucel en pacientes pediátricos diagnosticados de linfoma no Hodgkin (LNH) de células B maduras en recaída/refractario (r/r) (BIANCA), de la empresa Novartis Farmacéutica S.A.

Organismo Genéticamente Modificado

El CTL019 o tisagenlecleucel son células T CD4+ y CD8+ autólogas que contienen el transgen que expresa la proteína quimérica CAR integrado en el cromosoma. En comparación con el vector parental que contiene las secuencias LTR completas, el transgen integrado no se puede propagar a otras células una vez integrado en la célula huésped final, al eliminarse parcialmente la región 3'LTR del vector que lo porta.

Vector:

El sistema vector utilizado para la preparación de las células T genéticamente modificadas es un rdLVV (LVV deficiente para la replicación) basado en vectores retrovirales de tercera generación. Por razones de seguridad, el vector lentiviral (LVV) utilizado para la fabricación del OMG no contiene los genes requeridos para la replicación. La mayor parte de la secuencia nativa del VIH-1 se ha eliminado para producir un sistema vector lentiviral deficiente para la replicación utilizando cuatro plásmidos. Por otra parte, el vector contiene una cubierta pseudotipada del rdLVV derivado del virus de la estomatitis vesicular para poder transducir células de muchas especies, ya que interacciona con células que no se dividen, incluyendo la membrana de las células T.

El transgen está constituido por una secuencia líder CD8 α , un fragmento monocatenario de anticuerpo murino (anti- CD19scFv), una región bisagra y transmembrana CD8, y un dominio de señalización 4-1BB (CD137) y CD3 (TCR ζ) que media la activación de las células T de forma independiente al complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) (la expresión del transgen confiere a las células T transducidas especificidad para dirigirse contra las células que expresan el antígeno CD19 en su superficie celular).

Para producir el lentivirus, se transfecta con los plásmidos (de empaquetamiento, codificador de proteínas del virión, la cápside y la transcriptasa reversa) una línea de celular de empaquetamiento, HEK293T.

La producción de CTL019 en un proceso de fabricación continuo utilizando leucaféresis congelada como material fuente. El vector se añade al cultivo celular en dos pasos. En conjunto, después de la transducción, se realizan siete pasos de lavado durante el proceso, lo que lograría un elevado factor de dilución de eventuales contaminantes introducidos en el proceso.

Características del ensayo

En el ensayo participará el Hospital Univeristario La Paz y el Hospital Univeristari Vall D'Hebron.



Los pacientes recibirán una quimioterapia de linfodepleción previamente a la administración del producto.

CTL019 se administrará como una única infusión. La máxima dosis que un paciente puede recibir es de 2.5×10^8 células transducidas viables por dosis. Las células CTL019 se pueden administrar a través de infusión intravenosa (i.v) pinchando la bolsa *Origen cryobag* con la línea de infusión y luego colgando la bolsa del producto CTL019, o bien, transfiriendo las células a una jeringa e infundirlas posteriormente por vía intravenosa. La transferencia a la jeringa debe realizarse en cabina de bioseguridad de clase II.

Seguimiento

Los pacientes tratados con el producto CTL019 se someterán a evaluaciones de seguridad y eficacia durante un periodo de cinco años después de la infusión. Se llevará a cabo un estudio de seguimiento a largo plazo para determinar la seguridad del vector lentiviral bajo un protocolo independiente. Los pacientes se seguirán hasta 15 años tras la infusión. Bajo el protocolo de seguimiento a largo plazo, se realizarán evaluaciones bianuales o anuales en todos los pacientes que hayan recibido el producto CTL019 tal y como recomienda la FDA y la EMA de acuerdo a las guías relevantes. Todos los pacientes que completen el estudio o que lo abandonen prematuramente tras la administración de CTL019 pasarán, automáticamente, a este protocolo de seguimiento a largo plazo. En las revisiones se analizarán muestras de sangre para evaluar la persistencia del vector CTL019 y presencia de RCL.

Identificación y evaluación de riesgos potenciales

Capacidad de transferencia génica debido a la formación de lentivirus competentes para la replicación (RCL)

El vector se ha diseñado para evitar la aparición de 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. El propio plásmido portador del transgén contiene un promotor de citomegalovirus (CMV) en lugar de la región U3 de la repetición terminal larga (LTR) en 5' y se ha modificado a un tipo autoinactivante (SIN) mediante delección de la LTR en 3'.

El diseño de un sistema vectorial mínimo, unido al uso de un constructo con optimización de codones de los genes *gag/pol* y una glucoproteína en la envoltura heteróloga, logran reducir al mínimo la homología de la secuencia entre los componentes del vector. Esta estrategia permite reducir el riesgo de generación de RCL a través de recombinación homóloga, lo que aumenta la seguridad del sistema vectorial.

Presencia de partículas víricas libres en producto terminado

Cabe la posibilidad de que el vector lentiviral empleado para transducir las células T del paciente se hallen en el producto final. Habida cuenta de la cantidad incorporada al cultivo celular y los numerosos pasos de lavado del proceso de fabricación, que logran un factor de reducción de alrededor de 5.000, la presencia de partículas funcionales medibles del vector en tisagenlecleucel es sumamente improbable. Además, los estudios de estabilidad han demostrado que el vector no permanece estable mucho tiempo a 37 °C, sino que a esa temperatura disminuye en un 89% al cabo de 24 horas. Es probable que se observen unos resultados similares en el medio de cultivo utilizado durante el cultivo de las células T. Puesto que estas se expanden durante un mínimo de 9 días tras la adición del vector,



es de esperar que las partículas residuales del vector que hubieran podido quedar en el producto final se hayan inactivado y no sean funcionales.

Se analizaron tres lotes de células T de donantes sanos que se sometieron por separado al método de desarrollo del proceso a escala completa observándose presencia de CAR-19 por debajo del límite de detección (<2,8 copias por 0,2 µg de DNA) del método validado. Estos resultados confirman la ausencia de vector lentiviral funcional residual libre en el producto de células CTL019.

Además, se hizo un seguimiento de la proteína p24 de la cápside del HIV que compone el vector en cada paso del desarrollo del proceso observándose una cinética de reducción durante el periodo de producción, hasta alcanzarse unos niveles bajos e incluso indetectables después de la recolección (límite de cuantificación [LOQ] = 6,25 pg/mL).

Riesgo virus adventicios

La leucaféresis autóloga del paciente, que se utiliza como material de partida, se analiza para determinar la presencia de agentes adventicios. De acuerdo al protocolo del estudio, se debe realizar el análisis de VIH, HBV y HCV previamente a la donación de sangre, y los pacientes que presenten algún resultado positivo se excluirán del estudio.

Aun así, a las células T del paciente transducidas con el vector lentiviral, se les asignará un nivel de riesgo 2 y deberán ser manipuladas bajo las condiciones de BSL-2 (*Biosafety Level 2*), en base a que el *pre-screening* de patógenos que se transmiten por sangre no es exhaustivo y no se puede excluir, completamente, la presencia de estos agentes.

Riesgo de transferencia genética

Transferencia horizontal

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 o después de la administración de tisagenlecleucel a los pacientes. 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 bajos/no detectables en el producto

Transmisión a la línea germinal

Las células T no se consideran células germinales. Además, la transmisión de la secuencia transgénica desde las células T a las células germinales es muy improbable y solo sería posible si se generasen RCL.

Capacidad de transferencia genética como consecuencia de la formación de RCL a través de la coinfección accidental con HIV después de la administración

No es probable que los pacientes tratados contraigan una infección por el HIV después de la administración. No obstante, si esto sucediera, no cabe esperar cambios de la situación de la infección o de su gravedad aparte de la propia infección por el HIV. Y lo que es más importante, no es previsible la recombinación homóloga entre secuencias provirales de las células T transducidas y el



HIV, puesto que se ha reducido la homología de las secuencias mediante deleciones, sobre todo en las LTR.

Clonalidad y oncogénesis insercional

Se han realizado dos análisis del sitio de integración con las mismas muestras pero con métodos de análisis algo diferentes. Todas las muestras fueron muy policlonales y presentaron una gran variedad de sitios de integración. Las distribuciones de los sitios de integración fueron las previstas para la integración lentiviral en células T humanas; no hubo indicios de integración preferente cerca de genes de interés ni de sobrecrecimiento preferente de células portadoras de eventos de integración cerca de genes de interés en la expansión celular previa a la infusión. En general, las muestras se asemejan a patrones bien conocidos de integración lentiviral en unidades de transcripción con una serie de características asociadas a la densidad génica, como sitios hipersensibles a la DNAsa1, islas de CpG y regiones de alto contenido de GC. Con muy poca frecuencia (<1%) se puede ver integración cerca de genes asociados al cáncer o genes reguladores del ciclo celular, porque, en general, la integración se facilita en genes cercanos. En cambio, la integración se ve obstaculizada en regiones con grandes anchuras génicas o distancias intergénicas, puesto que son indicativas de zonas con pocos genes.

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.

El tisagenlecleucel 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, el tisagenlecleucel 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.

Además, se instruirán a los pacientes para que no donen sangre, órganos, tejidos y células para trasplante. La pérdida de sangre accidental o el análisis de sangre no conllevan riesgo de diseminación del producto CTL019 en el medio ambiente ya que las células se inactivarían rápidamente.

Manipulación, control y tratamiento de residuos

El producto CTL019 se transportará en la fase vapor de nitrógeno líquido, al hospital participante de acuerdo a las regulaciones internacionales de transporte. La bolsa con el producto CTL019 se coloca en un recipiente cerrado a prueba de fugas y rupturas (contenedor secundario), que a su vez se coloca en un transportador también cerrado y a prueba de fugas y rupturas (contenedor terciario). Tras la recepción del producto, se seguirán las medidas de seguridad establecidas para la manipulación de sangre o tejidos humanos. El CTL019 se debe almacenar en un lugar seguro en el que sólo pueda acceder el personal del estudio o el investigador.

En el caso del Hospital Universitario La Paz el productos se almacena en la Unidad de Terapia Celular y Medula Ósea, Servicio de Hematología. Edificio de Donantes.



Para el ensayo en el Hospital Univeristari Vall D'Hebron el almacenamiento del producto estará ubicado en el Banc de Sang i Teixits, Centre Frederic Duran i Jordà, y luego mediante mensajero adaptado se traslada criopreservado al Banc de Sang i Teixits del Universitari Vall D'Hebron, de acceso restringido, dónde se mantendrá almacenado en el CrioShipper en el que es transportado (tiempo de almacenaje de 7-10 días) hasta su descongelación y posterior infusión del producto al paciente.

Como medida para reducir riesgos, solo se suministrará tisagenlecleucel a hospitales y centros con la debida capacitación (es decir, formados por Novartis sobre la manipulación y eliminación del producto, así como sobre los procedimientos de seguridad y la leucaféresis) y únicamente si los profesionales sanitarios que intervengan en el tratamiento del paciente han concluido el programa de cualificación antes descrito.

El personal que manipule las bolsas del producto con tisagenlecleucel seguirá los procedimientos adecuados en cuanto a vestimenta para manipulación de material infeccioso, de acuerdo con los procedimientos establecidos por Novartis en el Product Handling Manual (guantes, batas, gafas y mascarillas).

Las superficies de trabajo se descontaminarán con un desinfectante químico.

Todo el material que haya estado en contacto con CTL019 debe manipularse y eliminarse como residuo potencialmente infeccioso de acuerdo con los procedimientos establecidos por Novartis y según los procedimientos locales del hospital.

Se utilizarán contenedores especiales para objetos punzantes. Los residuos se deberían recoger y destruir acorde a los procedimientos establecidos por Novartis y de acuerdo a los procedimientos locales del centro para materiales punzantes contaminados.

Los residuos líquidos con CTL019 pueden inactivarse con lejía 1/50 (concentración final: 2%) durante 2 minutos y, después, eliminarse por el fregadero

El producto sobrante se eliminará de acuerdo a lo recogido en el documento *Product Handling Manual* y el *Safety Summary Statement for Biological Entitis*, es decir como residuo infeccioso.

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 2018