



## EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE CÉLULAS CD34+ MODIFICADAS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/17/17)

### **Título del ensayo**

Ensayo clínico en fase I/II para evaluar la seguridad de la infusión en pacientes deficientes en Piruvato Quinasa (*Pyruvate Kinase Deficiency*, PKD) de células CD34+ autólogas transducidas “*ex vivo*” con un vector lentiviral portador del gen de la Piruvato Quinasa Eritrocitaria (*Red-cell type Pyruvate Kinase*, RPK), de la empresa CLINISTEM.

### **Características del ensayo**

La administración del producto se llevará a cabo en el Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz y en el Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. La infusión se realizará en las zonas habilitadas para trasplante hematopoyético, en la Unidad de Trasplantes de los hospitales participantes, en habitaciones individuales y siguiendo los controles habituales de trasplante hematopoyéticos con hemoderivados previamente descongelados del Servicio de Transfusión del Hospital.

El producto será infundido por vía endovenosa en el paciente a una dosis de un mínimo de  $2 \times 10^6$  células/Kg. Las células se infundirán en una única dosis y el paciente permanecerá hospitalizado durante el tiempo necesario según los protocolos habituales del servicio hospitalario relacionados con los trasplantes hematopoyéticos con acondicionamiento. Se prevé la participación de 12 pacientes.

Se hará un seguimiento de los pacientes durante cinco años para evaluar la seguridad del tratamiento, obteniéndose diferentes muestras, tanto de sangre periférica como de médula ósea, a partir de la tercera semana después de la infusión para evaluar parámetros hematológicos (porcentajes de progenitores hematopoyéticos y diversos linajes sanguíneos) y cuantificar la presencia de OGM. Así mismo, se realizará estudios para analizar el sitio de integración del vector lentiviral en el genoma celular, con el objetivo de identificar dominancia clonar debido a la modificación genética. De igual forma se determinará en estas muestras la ausencia de lentivirus competentes en replicación (RCLs). Dadas las características de seguridad de los vectores empleados no se espera obtener positivos para RCLs en ninguno de los pasos del proceso.

### **Características del OMG**

El OMG está constituido por progenitores hematopoyéticos CD34+ de pacientes deficientes en Piruvato Quinasa transducidos con el vector lentiviral PGK-coRPK (CPcoRPKW-17). El vector contiene el ADNc de la isoforma eritrocitaria del gen PKLR en su versión optimizada en codones (coRPK).

El vector lentiviral utilizado es de tercera generación (se utilizan 4 plásmidos para su producción lo que aumenta su seguridad), mejorados (contienen secuencias que mejoran su expresión como cPPT, tracto central de polipurina, y Wpre, elemento post-regulador del virus de hepatitis de woodchuck), autoinactivantes (deleciones en la LTR por lo que una vez integradas no son activas) y pseudotipados (la proteína de la envuelta usada para empaquetar es la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular, VSV-G).



El vector se obtiene mediante cotransfección de 4 plásmidos en células 293T: plásmido transferente, portador del transgen, plásmidos empaquetadores (portadores de los genes *rev* y *gag-pol*) y el plásmido portador del gen que codifica para la envuelta VSV-G

Después de la transducción el vector terapéutico se integrará en el genoma celular y se expresará constitutivamente la proteína terapéutica RPK.

### **Identificación de riesgos potenciales**

#### **-Presencia de partículas virales libres**

Como en el resto de los protocolos de transducción *ex vivo* realizados sobre células CD34+, el producto celular sometido al proceso de transducción será objeto de lavados previo a su preparación en el medio de congelación. La concentración de vector lentiviral en el medio de transducción es de  $10^8$  UT/ml y el medio de infusión es de  $10^6$  UT/ml. Además de esta muy baja concentración lentiviral, estudios previos han demostrado que el complemento inactiva la envuelta VSV-G utilizada para el empaquetamiento del vector terapéutico, por lo que en presencia de complemento estos vectores infectan con una eficacia 95 veces inferior las células humanas. No se considera que la infusión de partículas lentivirales residuales presentes en el medio de infusión vaya a transducir células del paciente.

#### **-Capacidad de transferencia génica debido a la formación de lentivirus competentes para la replicación (LCR)**

El riesgo de que se generen lentivirus con capacidad replicativa, ya sea por recombinación de secuencias homólogas con virus endógenos o con otros virus presentes en el paciente, es poco probable. En primer lugar por la baja frecuencia de este proceso en células de mamífero. En segundo lugar, y dada la naturaleza del vector empleado, la única situación en la que es posible la recombinación homóloga que genere lentivirus replicativos es si esa recombinación se produce con otros lentivirus. Sin embargo, uno de los criterios de exclusión en el protocolo es la presencia de infección por VIH en los pacientes.

En cualquier caso desde el momento de la producción del sobrenadante lentiviral hasta la infusión en el paciente y seguimiento se llevan a cabo análisis de control de calidad para determinar la ausencia de partículas lentivirales competentes (RCLs) en los sobrenadante lentivirales, en las células transducidas con el vector lentiviral y en las muestras de sangre periférica y médula ósea de los pacientes trasplantados con las células transducidas durante el tiempo de seguimiento de éstos en el protocolo.

#### **-Riesgo de transferencia genética**

Una vez transducidas las células CD34+ con el vector lentiviral, el material genético de interés quedará integrado en el genoma de la célula, a la vez que las LTRs del lentivirus se inactivarán, perdiendo así su capacidad de replicación dentro de la célula. Las restantes células del cuerpo no se verán afectadas por las células terapéuticas puesto que no se prevé la transmisión de material genético de las células CD34+ transducidas a otras células u organismos de ecosistemas adyacentes.



### **-Patogenicidad**

La probabilidad de que ocurra la expresión de rasgos inesperados y/o indeseables es muy baja pero en el caso de los vectores integrativos existe la posibilidad de oncogénesis insercional, siendo en el caso de los vectores lentivirales una opción poco probable. Existe un modelo de ratón, deficiente en piruvato quinasa, que se ha utilizado para la realización de los estudios de riesgos de mutagénesis insercional. De los ensayos que han realizado concluyen que no existe genotoxicidad debida al lugar de integración del lentivirus. Además, no se observó que existiera ninguna tendencia de integración en genes implicados en cáncer, proliferación celular o apoptosis en ninguna de las muestras analizadas. Estos resultados confirman la neutralidad de la integración y la seguridad del vector lentiviral PGK-coRPK (CPcoRPKW-17).

### **-Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación**

Tanto el vector lentiviral terapéutico (PGK-coRPK [CPcoRPKW-17]) como las células CD34+ transducidas tienen unas características biológicas que impiden su multiplicación y/o dispersión fuera del paciente trasplantado.

El vector lentiviral es un vector auto-inactivante y en el que se han delecionado los genes endógenos necesarios para la replicación del virus. Hasta la fecha, no se ha descrito en ningún caso la posibilidad de infección o de propagación de este tipo de vectores una vez integrados en el genoma celular. Por otro lado, la modificación de las células se realiza *ex vivo* y después son infundidas en el paciente, por lo que, sumado a la modificación del vector y a su característica auto-inactivante, no existe la posibilidad de transducir otros tipos celulares.

Por último, tanto el vector lentiviral como las células transducidas no pueden sobrevivir fuera del individuo y la proliferación de la célula CD34+ transducida, al igual de lo que sucede con las propias CD34+ sin haber sido modificadas genéticamente, solo podrán proliferar para reconstituir la hematopoyesis del paciente y no podrá multiplicarse fuera de este.

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

Los posibles efectos sobre la salud humana son inexistentes ya que tanto el vector lentiviral como la célula CD34+ modificadas no pueden sobrevivir fuera del organismo receptor. Únicamente en el momento del trasplante de las células modificadas, el personal sanitario implicado debe seguir las normas estrictamente para evitar que un posible resto del vector lentiviral pudiese entrar en contacto con su sistema sanguíneo lo que es improbable ya que no se utilizarán agujas para la administración del producto. El contacto con la piel no implica riesgo alguno, además el personal sanitario portará guantes.

En un hipotético caso de que el personal que manipula la muestra pudiera llegar a inocularse con el producto, la cantidad que de manera accidental podría inocularse nunca sería la bolsa entera (aproximadamente 100 mL) y aquellas células que pudieran transferirse serían rápidamente eliminadas por el sistema inmune ya que corresponden a terceros y serían alogénicas.



### **-Manipulación, control y tratamiento de residuos**

Los pacientes trasplantados estarán hospitalizados en un área de acceso restringido debidamente señalizada y a la que únicamente tendrán acceso el personal sanitario a cargo del paciente y las visitas autorizadas.

No se permitirán visitas de personas inmunodeprimidas, trasplantados, en tratamiento con quimioterapia o corticoides, niños ni embarazadas. Sólo se admitirá un máximo de dos visitantes al mismo tiempo.

Todo el personal será advertido de que la célula CD34+ transducida se considera un producto de nivel II de bioseguridad y deben seguirse todas las normas adecuadas para ese nivel de riesgo.

El producto para la infusión una vez criopreservado no será manipulado por las personas encargadas de la infusión ya que se congelará directamente en bolsas que serán descongeladas y el producto será administrado al paciente vía intravenosa siguiendo los controles habituales del hospital para trasplantes hematopoyéticos. El personal debe utilizar ropa protectora adecuada.

El lugar donde se prepare el producto para la infusión se descontaminará, antes y después de la manipulación, con una solución basada en un desinfectante convencional.

Los residuos generados durante la manipulación de las células CD34+ transducidas serán depositados en contenedores específicos de bioseguridad debidamente etiquetados, que posteriormente serán gestionados por una empresa especializada.

En general, está previsto que los residuos sólidos (como batas, gafas, etc) se desactiven mediante autoclavado, y después se incineren convencionalmente. A los residuos líquidos y las superficies se les aplicará un desinfectante adecuado. Todos los demás residuos (vendas, torundas, etc.) se incinerarán en el centro hospitalario de la misma forma que los residuos clínicos habituales.

**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 18 de octubre de 2017