



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE CÉLULAS CD34+ MODIFICADAS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/20/12)

Título del ensayo

Ensayo clínico Fase I/II para evaluar la seguridad y eficacia de la infusión en pacientes con deficiencia de adhesión leucocitaria tipo I (*Leukocyte Adhesion Deficiency Type I*, LAD-I) de células CD34⁺ autólogas transducidas “*ex vivo*” con un vector lentiviral portador del gen de la Integrin beta 2 (*Integrin beta 2*, ITGB2), de la empresa Rocket Pharmaceuticals Inc.

Se trata de la repetición de un ensayo clínico con el mismo OMG autorizado bajo el número de notificación B/ES/17/14 con fecha 31 de octubre de 2017, y cuya resolución de autorización se modificó con fecha 20 de julio de 2019.

El promotor indica que no ha modificado la forma farmacéutica del producto, la vía de administración, la dosis, la indicación para la deficiencia de adhesión leucocitaria (LAD-I) y el tipo de población en la que se va a utilizar respecto de dicho ensayo previamente autorizado con número de expediente B/ES/17/14. El promotor ha realizado una optimización del proceso de producción del producto celular y considera que las conclusiones globales de la evaluación de riesgos para la salud humana, animal y el medio ambiente respecto del ensayo inicial con número de expediente B/ES/17/14 no se han modificado.

Características del ensayo

El promotor propone un período de liberación de abril 2020 a octubre 2022.

La administración del producto se llevará a cabo en el Hospital del Niño Jesús de Madrid. Se prevé la participación de un máximo de 3 pacientes.

La infusión de las células al paciente se realizará por vía venosa central con un sistema de infusión con filtro para evitar agregados celulares. La dosis de células por Kg del paciente estará en el rango de 4×10^6 células/Kg y se realizará en una sola infusión.

Se hará un seguimiento de los pacientes, una vez infundidos con los progenitores hematopoyéticos modificados genéticamente, durante diez años para evaluar la seguridad del tratamiento, obteniéndose diferentes muestras de los pacientes, tanto de sangre periférica como de médula ósea.

Características del OMG

El OMG está constituido por progenitores hematopoyéticos CD34⁺ de pacientes deficientes en adhesión leucocitaria de tipo I (LAD-I) transducidos con un vector lentiviral. El vector contiene el ADNc del gen ITGB2 (subunidad beta de las integrinas beta 2 de membrana, proteína hCD18) de origen humano.

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 células 293T con 4 plásmidos: plásmido transferente, portador del transgén, 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 de los progenitores hematopoyéticos CD34+ de pacientes con el vector lentiviral, la secuencia se integra en el genoma de las células CD34+ de una forma estable.

Se ha sustituido la selección por antibióticos por la selección por sacarosa en el plásmido de transferencia. Se ha incorporado en el plásmido de transferencia una secuencia para la selección por sacarosa, denominada RNA-OUT, que cumple con la normativa de las agencias regulatorias (EMA/FDA). Esta secuencia está diseñada para mejorar la producción lentiviral, pero no forma parte del genoma del virus y, por tanto, no se integra en las células diana, por lo que las células transducidas nunca expresarán esta secuencia. Este sistema de selección se utiliza durante la amplificación del ADN plasmídico, de manera que sólo las bacterias que contengan el plásmido podrán crecer en presencia de sacarosa en el medio, de otra manera tóxica para ellas. Este sistema de producción del plásmido combina la selección sin antibióticos con un proceso de fermentación altamente productivo (rendimiento > 1 g/L de ADN plasmídico).

El promotor comunica también el cambio de la producción en condiciones GMP del producto en investigación de CliniStem a Lonza Netherlands B.V.

Identificación de riesgos potenciales

-Presencia de partículas virales libres

Los lavados sucesivos del producto celular durante la producción y la formulación del producto final en el medio de criopreservación, ya listo para su posterior descongelación e infusión en el paciente, permiten la eliminación de los reactivos y sustancias presentes durante la transducción, y una reducción de las partículas virales a niveles despreciables de modo que sería muy improbable que pudieran provocar la transducción de otros tipos celulares.

El protocolo de producción utilizado para la transducción *ex vivo* de células hematopoyéticas CD34+ utiliza una concentración inicial del vector de 5.0×10^7 UT/mL. Una vez completada la transducción, el producto celular se somete a varios lavados inactivantes de manera previa a la formulación del producto celular en el medio de infusión. Los lavados contienen 2% HSA (albúmina sérica humana).

Los lavados sucesivos del producto celular y su formulación final en el medio de infusión, permiten alcanzar una reducción de más de 4 unidades logarítmicas de la concentración inicial de partículas virales utilizada para la transducción hasta la concentración en el producto final que será infundido al paciente.

Además, estudios previos han demostrado que el complemento inactiva la envuelta VSV-G utilizada para el empaquetamiento del vector terapéutico, por lo que una vez infundido en el paciente y en presencia de complemento (el mecanismo de defensa de nuestro sistema inmune innato que responde a la presencia de patógenos) estos vectores infectan con una eficacia 95 veces inferior las células humanas.

Por lo tanto, las partículas lentivirales residuales presentes en el producto final de infusión para el paciente son consideradas insignificantes y representan un riesgo insignificante de transducción de células *in vivo*.

-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.

El promotor ha establecido la ausencia de formación de virus competentes para replicación en la fase de producción viral como criterio de especificación en la producción de todos los lotes del vector lentiviral.

-Manipulación, control y tratamiento de residuos

El medicamento en investigación (OMG) se almacenará en un contenedor de nitrógeno líquido con acceso restringido a personal autorizado. Como todos los productos celulares de trasplante, este OMG solo puede ser recibido, registrado, almacenado y manipulado para su administración en el paciente por el personal autorizado, y en este caso, solo por personal autorizado participante en el ensayo clínico.

El transporte desde el contenedor de nitrógeno hasta el equipo de descongelación, su descongelación y posterior transporte hasta la cama del paciente para la infusión se hará siguiendo los estándares y procedimientos de trabajo normalizados del hospital para productos celulares de trasplante. Las neveras-contenedores rígidas destinadas para el transporte intrahospitalario de los productos celulares congelados cumplen con las condiciones necesarias para proteger el producto en cuanto a mantenimiento de la temperatura adecuada en cada momento, impacto sobre el contenedor o cualquier otra adversidad que pudiese suceder. A continuación, la bolsa del producto se extraerá de la nevera-contenedor, del casete metálico y se introducirá en una doble bolsa estéril con cierre para su descongelación controlada en el baño. Finalizada la descongelación del producto se introducirá en una nueva bolsa exterior de plástico con cierre y en un contenedor rígido para realizar el transporte intrahospitalario hasta el lugar donde se procederá a la infusión.

La infusión solo podrá ser realizada por personal autorizado en una zona específica para la infusión con acceso restringido al personal autorizado. Ya que el paciente ha de recibir un acondicionamiento previo con quimioterapia para recibir el OMG, esta es una zona con acceso restringido únicamente al personal sanitario que participa en el ensayo clínico.

El producto será infundido en su totalidad en una única administración al paciente.

Todo el material que entre en contacto con el OMG se eliminará como residuos biopeligroso.

Las muestras serán analizadas en el laboratorio del centro hospitalario y en el CIEMAT (Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas de Madrid). El CIEMAT dispone de la autorización de instalación de uso confinado para realizar estas actividades con el OMG (Notificación instalación A/ES/12/I-21 y de la actividad A/ES/19/64).

El transporte de muestras de sangre y medula ósea se realizarán a temperatura ambiente. Las muestras serán recogidas en tubos estándar con EDTA o heparina que serán introducidos en una bolsa con cierre hermético de material biológico a prueba de derrame y, en cualquier caso, como segunda medida de seguridad, con material absorbente suficiente para absorber su contenido en caso de rotura o derrame. Esta bolsa será transportada en un contenedor homologado con suficiente material de amortiguación para proteger la integridad de la bolsa y sus tubos de contenido.



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 2 de julio de 2020