



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE CÉLULAS CD34+ MODIFICADAS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/17/14)

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 CLINISTEM.

Características del ensayo

La administración del producto se llevará a cabo en las zonas habilitadas para trasplante hematopoyético estándar en la Unidad de Trasplantes del Hospital del Niño Jesús de Madrid, en habitaciones individuales y siguiendo los controles habituales de trasplante hematopoyéticos con hemoderivados previamente descongelados del Servicio. Se prevé la participación de 8 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, a partir de la tercera semana después de la infusión, para evaluarse parámetros hematológicos (porcentajes de progenitores hematopoyéticos y diversos linajes sanguíneos) y cuantificar la presencia de OMG. 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 adhesión leucocitaria de tipo I (LAD-I) transducidos con el vector lentiviral Chim.hCD18.wpre*. 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 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 con el vector lentiviral, la secuencia Chim.hCD18.wpre* se integra en el genoma de las células CD34+ de una forma estable

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 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 Chim.hCD18.wpre*, 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

El material genético introducido se integrará en los cromosomas nucleares de los progenitores hematopoyéticos; su localización no es predecible aunque muestran cierta preferencia por genes con actividad transcripcional. En el caso de inactivación, la expresión se puede suplir por el otro alelo. Debido a que las LTRs del lentivirus están inactivadas una vez integradas, la probabilidad de activación génica o aumento de expresión por la integración es menor que con otros vectores virales. Solo en casos aislados puede ocurrir silenciamiento del vector por metilaciones en regiones promotoras. Si además la integración ocurre en zonas del genoma con poca transcripción, podrían ocurrir fenómenos de silenciamiento o de expresión baja. Pero como se infundirán millones de células transducidas, la mayoría serán estables y el silenciamiento del vector será irrelevante.

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. Puesto que existe un modelo de ratón deficiente en CD18, se utiliza para la realización de los estudios de riesgos de mutagénesis insercional. Como resultado de los análisis, se concluye que no existe genotoxicidad debida al lugar de integración del lentivirus. Es más, no se ha observado que existiera ninguna tendencia de integración en genes implicados en cáncer, proliferación celular o apoptosis. Estos resultados confirman la neutralidad de la integración del vector y la seguridad del vector lentiviral Chim.hCD18.wpre*.

-Capacidad de supervivencia, establecimiento y diseminación

Tanto el vector lentiviral terapéutico como la célula CD34+ transducida tienen unas características biológicas que impiden su multiplicación y/o dispersión fuera del paciente trasplantado. No pueden sobrevivir fuera del individuo y la proliferación de la célula CD34+ transducida para reconstituir la hematopoyesis del paciente solo ocurrirá en el 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 agente biológico de tipo 2 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