



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Lúcia Machado Lourenço

Aspetos de Qualidade críticos para
Farmacovigilância de Medicamentos de Terapia
Génica - Células Geneticamente Modificadas

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica orientada pelo Professor Doutor Sérgio Paulo de Magalhães Simões e pela Doutora Maria Margarida de Lemos de Menezes Ferreira e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2019

Lúcia Machado Lourenço

**Aspetos de Qualidade críticos para Farmacovigilância de
Medicamentos de Terapia Génica - Células Geneticamente
Modificadas**

**Dissertação no âmbito do mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pelo Professor
Doutor Sérgio Paulo de Magalhães Simões e pela Doutora Maria Margarida de Lemos de Menezes
Ferreira apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra**

Setembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é o culminar de todo o esforço e dedicação ao longo deste último ano. Deste modo, quero deixar o meu profundo agradecimento a todos os intervenientes que permitiram elaborar esta dissertação.

Ao Professor Doutor Sérgio Simões, por todos os ensinamentos tanto no mestrado como na licenciatura. Quero agradecer-lhe acima de tudo, por ter aceitado sem hesitação ser meu orientador, pela sua sensatez e por me ter mostrado, sempre, que com esforço e dedicação, todos os objetivos são alcançáveis na vida.

A Doutora Margarida Menezes Ferreira, por ter aceitado ser minha coorientadora com base exclusivamente no meu interesse pelas terapias avançadas. Obrigada pela sua confiança, trabalho e dedicação. Quero agradecer também pela enorme paciência, por toda a sabedoria transmitida, por estar sempre disposta a rever o meu trabalho e a ouvir as minhas ideias.

A toda a equipa da DGRM do Infarmed, um muito obrigada por me terem recebido! Obrigada a todos pelos ensinamentos transmitidos, por todas as correções e explicações, pelo bom humor e simpatia com que me acolheram 6 meses. A vossa contribuição na minha vida profissional foi muito significativa, tendo sido este estágio uma experiência que irei recordar sempre com carinho.

Quero dedicar um agradecimento especial à Doutora Márcia Silva, por me ter ajudado incansavelmente na parte da Farmacovigilância. Um muito obrigada Márcia, sem ti não teria sido possível!

Aos meus pais e irmã, que me apoiaram incondicionalmente em todo o meu percurso académico. Um especial obrigada à minha mãe, que sempre me apoio e nunca duvidou do meu potencial. Obrigada por todas as oportunidades que me proporcionaste e por nunca me deixares desanimar.

A todos os meus restantes familiares, colegas de trabalho, colegas de faculdade e amigos que me apoiaram nesta fase desafiante da minha vida, o meu sincero obrigada! Nem sempre foi fácil, mas todos vós tornaram este percurso menos penoso. Obrigada pelos conselhos, pelos sorrisos e pelas palavras amigas!

INDÍCE GERAL

Resumo	1
Abstract	3
Objetivos	5
Contexto regulamentar	7
Medicamento- Definição.....	7
Medicamento Biológico- Definição.....	7
a) Definição e Uso da clonagem de DNA Recombinante	8
Medicamento de Terapia Avançada	10
Cancro	13
Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL)	13
Linfoma Difuso de Grandes Células B (DLBCL).....	14
Abordagens Terapêuticas – Evolução.....	16
a) Tisagenlecleucel vs Axicabtagene ciloleucel	22
b) Tisagenlecleucel (Kymriah)	22
Desenvolvimento e Fabrico de Vetores Lentivirais.....	26
Vetores utilizados em Medicamentos de Terapia Avançada	26
Fabrico de vetores Lentivirais	26
a) <i>Design</i> de Vetores Lentivirais.....	27
b) Estratégias de Produção de Vetores Lentivirais	28
c) Caracterização e testes de controlo aplicados aos Vetores Lentivirais	28
Produção de Vetores Lentivirais do Tisagenleucel	30
a) <i>Design</i> do Vetor	31
b) Perfil de Inserção.....	31
c) Produção.....	32
d) Dosagem do Vetor.....	32
Análise de risco de Transdução com vetor lentiviral.....	33
a) Transgene	33
b) Células e Órgãos Alvo.....	33
c) Tradução.....	33
Recolha e Preparação dos Linfócitos T	35
Leucoforese.....	35
Método de Produção da substância ativa do Tisagenleucel	36

a) Produção	36
b) Distribuição.....	38
c) Potenciais Riscos associados ao fabrico e distribuição	39
d) Cadeia de Rastreabilidade	42
Impacto Ambiental	44
Mutagénese de Inserção	49
Importância da Ligação entre a Qualidade do Medicamento e a Farmacovigilância	51
Farmacovigilância – Sistema de Gestão de Risco	53
Definição	53
Notificação Espontânea	54
a) Notificação Espontânea – Tisagenleucel	56
Plano de Gestão de Risco.....	56
Estrutura de um Plano de Gestão do Risco	62
a) Plano de Gestão do Risco do Tisagenleucel	65
▪ Parte II - Especificações de segurança.....	65
▪ Parte III - Plano de Farmacovigilância	67
▪ Parte IV - Planos para estudos de eficácia Pós-Autorização.....	68
▪ Parte V - Medidas de Minimização do Risco	70
a) Medidas de Minimização do risco: Rotina	76
b) Medidas de Minimização do risco: Adicionais.....	83
Efetividade das Medidas de Minimização do Risco	87
a) Efetividade das Medidas de Minimização do Risco do Tisagenleucel.....	88
Conclusões	91
Bibliografia	93

INDÍCE DE TABELAS

TABELA 1: Principais diferenças de um medicamento químico vs medicamento biológico	8
TABELA 2: Os diferentes grupos de medicamentos de terapia avançada.....	11
TABELA 3: Descrição de todas as reações adversas. (Retirado de [44])	24
TABELA 4: Preocupações de segurança “ <i>Safety concerns</i> ”	58
TABELA 5: Atividades adicionais de Farmacovigilância. (Retirado de [28])	64
TABELA 6: Algoritmo de Gestão da síndrome de libertação de citocinas	73

INDÍCE DE FIGURAS

FIGURA 1: Evolução do Recetor quimérico de antigénio expresso em Células T	22
FIGURA 2: Esquema de distribuição de Tisagenlecleucel	39
FIGURA 3: Representação esquemática de algumas ferramentas utilizadas pela Farmacovigilância	55
FIGURA 4: Evolução do n.º de notificações de RAM (Casuística de 2018), retirado de [63].....	57
FIGURA 5: Evolução e organização do Plano de Gestão de Risco. (Retirado de [50])	58
FIGURA 6: Atividades de Farmacovigilância. (Retirado de [57]).....	61
FIGURA 7: Medidas de Minimização do Risco. (Retirado de [57]).....	62
FIGURA 8: Constituição de um Plano de Gestão de Risco - As 2 partes principais e os respetivos módulos	66
FIGURA 9: Especificações de Segurança. (Retirado do Plano de Gestão do Risco).....	67
FIGURA 10: Estudo PASS acordado em AIM. (Retirado de [44]).....	68
FIGURA 11: Estudo PAES acordado em AIM. (Retirado de [44])	70

ABREVIATURAS

ABC – *Activated B-cell*

AIM – *Autorização de Introdução no Mercado*

ALL – *Acute Lymphoblastic Leukemia*

ATMP – *Advanced Therapeutic Medicine Product*

B/R – *Benefício/Risco*

BLS – *Biosafety Level*

B-NHL – *B non Hodgkin's Lymphoma*

CAR – *Chimeric antigen receptor*

CE – *Comissão Europeia*

CHOP – *Cyclophosphamide, Hydroxydaunorubicin, Oncovin, Prednisone*

CNS – *Central Nervous System*

CRS – *Cytokine Release Syndrome*

DHPC – *Direct Healthcare Professional Communication*

DIN – *Donation Identification Number*

DLBCL – *Diffuse Large B-Cell Lymphoma*

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

DRM – *Doença Residual Mínima*

EBV – *Epstein-Barr virus*

EM – *Estado Membro*

EMA – *European Medicines Agency*

EPAR – *European Public Assessment Report*

ERA – *Environmental Risk Assessment*

EUA – *Estados Unidos da América*

FDA – *Food and Drug Administration*

FH IZI – *Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie*

FI – *Folheto Informativo*

FIV – *Feline immunodeficiency virus*

GCB – *Germinal Center B-Cell*

GMP – *Good Manufacturing Practice*

GVHD – *Graft Versus Host Disease*

GVP – *Good Pharmacovigilance Practices*

HBV – *Hepatitis B virus*

HCV – *Hepatitis C virus*

HIV – *Human Immunodeficiency viruses*
ICH – *International Conference on Harmonisation*
ID – *Identification*
LISA – *Lentivirus Insertion Site Analysis*
LM-PCR – *Ligation-Mediated Polymerase Chain Reaction*
LTR – *Long Terminal Repeat*
MP – *Morris Plains*
NAT – *Nucleic Acid Test*
NHL – *Non-Hodgkin lymphoma*
NK – *Natural Killers*
OGM – *Organismo Geneticamente Modificados*
OMS – *Organização Mundial de Saúde*
ONU – *Organização das Nações Unidas*
PAES – *Post- Authorization Efficacy Studies*
PASS – *Post- Authorisation Safety Studies*
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
PGR – *Plano de Gestão de Risco*
PMBC – *Peripheral blood mononuclear cell*
RA – *Reação Adversa*
RCM – *Resumo de Características do Medicamento*
RCV – *Replication-Competent Virus*
RPS – *Relatórios Periódicos de Segurança*
SGR – *Sistema de Gestão do Risco*
SIN – *Self Inactivating*
SIV – *Simian immunodeficiency virus*
SLT – *Síndrome de Lise Tumoral*
SNC – *Sistema Nervoso Central*
SOC – *System Organ Classification*
TCR – *T-cell receptor*
TIL – *Tumor Infiltrating Lymphocytes*
UE – *União Europeia*
VSV-G – *Vesicular Stomatitis Virus G*

RESUMO

Os medicamentos de terapia avançada são um tema de grande destaque da atualidade no setor da Indústria Farmacêutica. O seu caráter inovador tem sido relacionado com novas abordagens terapêuticas e patologias limitantes ou fatais, para as quais, não existia no mercado nenhum tratamento eficiente.

Um exemplo são as células CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T Cells*). Estas surgem como uma abordagem disruptiva no tratamento de patologias com altas taxas de recidivas. Deste tipo foram já aprovados o Yescarta (Axicabtagene ciloleucel) e o Kymriah (Tisagenlecleucel). O Tisagenlecleucel foi o primeiro medicamento com células CAR-T a receber aprovação, em 2017, da U.S. Food & Drug Administration para o tratamento de Leucemia Linfoblástica Aguda percussora de células B refratária ou com mais do que duas recidivas em crianças e jovens adultos até aos 25 anos. Em 2018, este medicamento recebeu a segunda indicação, ao ter sido indicado para adultos com linfoma de grandes células B, refratário ou com recidiva após duas ou mais linhas de terapia sistémica. De igual forma, o Tisagenlecleucel também se encontra aprovado pela Agência Europeia do Medicamento (EMA), tendo obtido aprovação em 2018 para as mesmas duas indicações acima indicadas.

Os medicamentos de terapia avançada consistem em medicamentos biológicos com base em células retiradas do doente e de seguida, estas são devidamente modificadas em laboratório, sendo posteriormente difundidas no mesmo doente, de modo a potenciar a resposta imune. Devido a sua complexidade, tanto no mecanismo de ação como no método de produção, é necessário existirem, a nível regulamentar, meios que permitam a sua correta produção e utilização assim como, metodologias que assegurem a segurança após Autorização de Introdução no Mercado (AIM).

Recorrendo à informação existente, regulamentar e científica, no presente trabalho são apresentados orientações e requisitos de qualidade para a produção e controlo de medicamentos de terapia avançada com base em células T geneticamente modificadas. É dado especial relevo ao medicamento Kymriah embora quase em simultâneo tenha sido também autorizado o Yescarta. São abordados requisitos de qualidade, desde a adequada recolha de células do doente, a utilização de vetores virais recombinantes para a inserção de genes nas células T obtidas e o processo de apara a sua modificação. Inclui também a avaliação de risco ambiental no contexto específico da libertação deliberada de organismos geneticamente modificados (OGM).

Inclui toda a informação relevante na caracterização dos riscos, nomeadamente na enumeração e análise de medidas de gestão e mitigação de risco que devem ser aplicadas com o objetivo de alcançar a qualidade, a segurança e eficácia de longo prazo. Os riscos identificados devem ser devidamente caracterizados e controlados devido à curta duração da sua Autorização de Introdução no Mercado e ao facto de ser um medicamento biológico, com características e propriedades específicas.

Palavras-Chave: Medicamentos de Terapia Avançada, Farmacovigilância, Abordagem baseada em Risco, Tisagenleucel, Células CAR-T.

ABSTRACT

Advanced therapy medicinal products (ATMP) are an important topic today for the Pharmaceutical Industry sector. Its innovative character has been related to new therapeutic approaches and limiting or fatal pathologies, for which no efficient treatment existed on the market.

One ATMP example are those composed of CAR-T cells (Chimeric Antigen Receptor T Cells). These emerge as a disruptive approach in the treatment of pathologies with high relapse rates. Two CAR-T Cell ATMP, Yescarta (Axicabtagene ciloleucel) and Kymriah (Tisagenleucel), have already been approved. Tisagenleucel was the first CAR-T cell medicinal product to receive approval in 2017 from US Food & Drug Administration for the treatment of refractory B-cell precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) with more than two relapses in children and young adults to 25 years. In 2018, this product received the second indication as it was extended to adults with refractory or relapsed B-cell Lymphoma after two or more lines of systemic therapy. Similarly, Tisagenleucel is also approved by the European Medicines Agency (EMA) in 2018 and was approved for the same indications as above.

Advanced therapy medicinal products consist of biological products where T cells are taken from the patient and then appropriately modified in the laboratory and then diffuse into the same patient to enhance the immune response against the selected epitope. Due to their complexity, both in the mechanism of action and in the production method, it is necessary, at a regulatory level, to establish methodologies for its correct production and use, as well to ensure their continuous safety after marketing authorization (AIM).

Using existing regulatory and scientific information, this master's thesis presents guidelines and quality requirements for the production and control of advanced therapy medicinal products based on genetically modified autologous T-cells. Special emphasis is given to the drug Kymriah although almost simultaneously Yescarta has also been authorized. Quality requirements are addressed, from adequate collection of patient cells, their genetic modification, use of viral vectors for the transduction of the gene of interest. It also addresses the environmental risk assessment in the specific context of deliberate release of genetically modified organisms (GMOs). It covers all the relevant information on risk characterization, namely enumeration and analysis of risk management and mitigation measures that should be applied to achieve long-term quality, safety and efficacy. The identified risks must be properly characterized and controlled because of the limited experience of their post marketing surveillance and the fact that is a biological medicinal product with specific characteristics and properties.

Keywords: Advanced therapy medicinal products, Pharmacovigilance, Risk based approach, Tisagenleucel, CAR-T cells.

Objetivos

O primeiro objetivo deste trabalho é reunir todos os requisitos e parâmetros de qualidade identificados anteriormente e posteriormente à AIM concedida aos medicamentos de terapia génica com indicação para certos cancros linfáticos e para melhor equacionar uma utilização e supervisão eficiente destes fármacos.

Deste modo, pretende-se melhor compreender o perfil de segurança deste tipo de medicamentos de terapia génica, de forma a apoiar o plano de gestão do risco no controlo dos riscos existentes, assim como, na aplicação de medidas adicionais para eventuais riscos adicionais desconhecidos, permitindo deste modo que seja reconhecido o seu valor terapêutico adicional.

A Farmacovigilância é abordada neste trabalho como um pilar para a segurança destas terapias inovadoras com AIMS relativamente recentes sem conhecimento de efeitos a longo prazo. O segundo objetivo apresentado neste trabalho consiste em mostrar a importância da ligação entre a Qualidade do medicamento produzido com a Farmacovigilância, evidenciando o contributo da Farmacovigilância como uma ciência com um impacto significativo na abordagem baseada no risco.

A abordagem baseada em risco é definida como uma estratégia que visa determinar a extensão dos dados clínicos, não clínicos e de qualidade a serem incluídos no pedido de Autorização de Introdução no Mercado, de acordo com as diretrizes científicas relacionadas com a qualidade, a segurança e eficácia de modo a justificar qualquer desvio dos requisitos técnicos definidos na parte IV do anexo I da Diretiva 2001/83 / CE (*Guideline on the risk based approach according to Annex I, part IV of Directive 2001/83/EC applied to Advanced Therapy Medicinal Products*).

Esta metodologia permite abordar todos os riscos associados ao uso do medicamento individualmente e não abordar o risco do medicamento como um todo. Permite obter um conhecimento mais aprofundado do perfil de segurança do fármaco e de forma mais precoce, uma vez que deve ser aplicada antes da obtenção da AIM.

A Farmacovigilância beneficia de forma muito significativa com esta abordagem, uma vez que a definição do perfil de segurança é feita ao longo do desenvolvimento do medicamento recorrendo a todos os dados de qualidade, não clínicos e clínicos. Permite, através do plano de gestão de risco, melhor orientar metodologias para uma aferição realista dos riscos, concluir sobre possíveis fatores associados à ocorrência dos riscos estabelecendo relações

de causalidade e por fim, evitar a sua ocorrência através da aplicação de medidas de minimização do risco – em rotina e adicionais.

Neste trabalho, é feito um levantamento de todos os riscos identificados durante todo o desenvolvimento do Tiagencleucel, de todas as medidas propostas no Plano de Gestão do Risco (PGR) no momento de aprovação deste e como estas aumentam a qualidade e a segurança no uso clínico deste medicamento

Deste modo, relevam-se aspetos de qualidade relativos ao medicamento com células CAR-T como contributo na definição do perfil de segurança e enquadramento da sua utilização em pós-comercialização.

Contexto regulamentar

MEDICAMENTO

Definição

O conceito de medicamento é um conceito dinâmico, várias definições têm sido atribuídas ao conceito de medicamento. Contudo, segundo a legislação portuguesa que transpõe as diretivas europeias, nomeadamente o Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de Agosto, na sua mais recente revisão podemos encontrar a definição de medicamento como “toda a substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas”.

Deste modo, podemos estipular medicamento como qualquer substância com a capacidade para aliviar ou terminar os sintomas de determinada patologia, ou até mesmo, recuperar ou transformar funções fisiológicas através da toma e recorrendo ao seu mecanismo de ação.

Por conseguinte, os medicamentos estão em constante evolução, o que permite chegar a abordagens cada vez mais inovadoras e eficazes.

MEDICAMENTO BIOLÓGICO

Definição

A ciência e o desenvolvimento de novas abordagens tecnológicas reverteram em inúmeros avanços científicos, nomeadamente no diagnóstico e tratamento de uma grande variedade de doenças específicas com características singulares.

Se por um lado, os medicamentos foram durante vários anos resposta para as diferentes patologias identificadas, por outro, foi-se verificando que estes nem sempre eram eficazes na sua resposta, fosse ela curativa acabando por eliminar de toda a doença e os seus sintomas, fosse ela preventiva evitando o aparecimento da mesma. Sendo assim, novas abordagens foram necessárias, à medida que foi surgindo novo conhecimento acerca das várias patologias.

Podemos definir Biotecnologia como uma ciência que criou uma ponte e aproximou a tecnologia da biologia. O termo foi exposto pela primeira vez pelo húngaro Károly Ereky em 1919 e pode ser definido como um conjunto de processos que recorre a agentes biológicos, organismos vivos ou parte deles com o objetivo de criar ou modificar produtos para satisfazer as necessidades de um problema específico com valor para a humanidade. Uma definição

diferente é proposta pela ONU, na Convenção sobre Diversidade, onde afirma que "Biotecnologia define-se pelo uso de conhecimentos sobre os processos biológicos e sobre as propriedades dos seres vivos, com o fim de resolver problemas e criar produtos de utilidade." (ONU, 1992).

É de referir que a Biotecnologia não é uma ciência isolada, pelo contrário, esta apresenta um conceito bastante multidisciplinar, pois abrange várias áreas da ciência, como é o caso da Química, Microbiologia, Bioquímica, Biologia, Informática e ainda conceitos de Engenharia. Posteriormente, com o conhecimento crescente e aplicação de conceitos de Biologia Molecular e de engenharia genética, é de destacar a introdução nos anos 80' do Sec. XX da tecnologia de "DNA recombinante" que foi um passo determinante no processo de obtenção em grande escala de proteínas com interesse económico.

Como o próprio nome indica, biofármacos ou medicamentos biológicos são originados através de processos biológicos, ou seja, de forma distinta em relação aos fármacos convencionais obtidos por síntese química. Os medicamentos químicos por sua vez são maioritariamente apoiados por reações e princípios químicos, o que faz com que tenham, de forma obrigatória, características díspares dos medicamentos biológicos. A prova desta desigualdade é quando observamos os dois fármacos, os químicos e os biológicos, e avaliamos de forma paralela as suas propriedades. Se considerarmos propriedades como o tamanho, a estrutura, a estabilidade, a caracterização, o método de produção e a forma de administração, podemos claramente ver diferenças significativas.

Tabela I: Principais diferenças de um medicamento químico vs medicamento biológico

	Medicamento Químico	Medicamento biológico
Tamanho	Pequeno (molécula única)	Grande (mistura de moléculas)
Peso	Baixo	Alto
Estrutura	Simples	Complexa
Estabilidade	Estável	Instável
Caracterização	Fácil	Difícil
Método de produção	Método Químico	A partir de seres vivos
Forma de administração	Oral (mais comum)	Intravenosa (única viável)

Medicamento biológico pode ser definido como um medicamento, no qual a substância ativa é extraída através de um organismo vivo (levedura, bactéria). Devido à sua complexidade, é um medicamento que exige requisitos de qualidade específicos, o seu armazenamento e manuseamento são aspetos de grande importância para a manutenção da sua qualidade e deve ser administrado sobre condições adequadas com a devida monitorização. Os medicamentos biológicos podem ser para diagnosticar, prevenir, tratar ou curar.

Nomeadamente, o Decreto- Lei n.º 176/2006 define medicamento biológico como sendo “Um medicamento cuja substância ativa é uma substância biológica. Entende-se por substância biológica uma substância extraída ou produzida a partir de uma fonte biológica e cuja caracterização e definição de qualidade requerem a combinação de ensaios físicos, químicos e biológicos, em conjunto com o processo de fabrico e o respetivo controlo. Devem considerar-se como medicamentos biológicos os seguintes medicamentos: medicamentos imunológicos e medicamentos derivados do sangue e plasma humanos, tal como definidos no presente diploma, os medicamentos abrangidos pelos nos 1 e 2 do anexo ao Regulamento (CE) n.º 726/2004 e os medicamentos de terapia avançada definidos na parte IV do presente Anexo”. Por conseguinte, os medicamentos biológicos permitiram a criação de abordagens direcionadas para interações multifuncionais e complexas, como por exemplo interação com o sistema imunitário ou com células tumorais, contribuindo de forma eficaz no combate ao cancro.

a) Definição e Uso da clonagem de DNA Recombinante

Como referido anteriormente, a tecnologia de DNA recombinante é a ferramenta de base em biotecnologia na produção de proteínas com valor terapêutico. Produtos de tecnologia de DNA recombinante são produzidos por modificação genética de células ou organismos de produção em cultura ou fermentação, na qual a sequência de DNA contendo o gene que codifica o produto desejado e os respetivos reguladores da transcrição é introduzida. A tecnologia recorre geralmente a um plasmídeo ou um vetor viral para introduzir a cassette de expressão contendo os genes de interesse e respetivos controladores em microrganismos adequados como no caso de bactérias, leveduras ou alternativamente, em linhas celulares de mamíferos, insetos ou plantas. O DNA produzido pode, conseqüentemente, produzir a proteína desejada (*Farmacopeia EU, 04/209:0784*).

O procedimento baseia-se na construção da cassette de expressão contida no plasmídeo com recurso a enzimas de restrição que permitem clonar o gene alvo. De seguida, o plasmídeo

resultante é colocado num hospedeiro com capacidade de expressar o gene inserido de forma controlada e produzir grandes quantidades da proteína resultante da expressão.

Em terapia génica a tecnologia é utilizada para produzir grandes quantidades de vetor viral utilizado diretamente no doente para que a expressão do gene em proteína ocorra onde a proteína e respetiva atividade é necessária. A proteína terapêutica obtida resulta de um sistema de construção génica, no qual devem estar presentes diferentes elementos:

- a) Sequência de nucleótidos que codifica a proteína. A origem deve ser descrita, assim como a identificação e a fonte de células a partir das quais a sequência de nucleótidos foi obtida;
- b) Sistema de banco de células. A produção de proteínas ou de vetores virais recombinantes é feita em bancos de células qualificados (*master cell banks e working cell banks, ICH- Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological /Biological Products Q5D*). Deve estar descrito em detalhe a produção das linhas celulares utilizadas, as condições de produção, os reagentes utilizados e as condições de armazenamento;
- c) Limite para a idade celular em produção *in vitro*, este limite deve ser baseado em linhas celulares produzidas em escala piloto de modo a definir a idade celular das linhas produzidas *in vitro* (*ICH-Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological /Biological Products Q5D*).

A construção génica deve ser devidamente caracterizada como parâmetro de avaliação geral da qualidade. O objetivo de analisar a construção génica é verificar se a sequência de codificação correta foi inserida na célula hospedeira e é mantida durante nas linhas celulares produzidas até ao final da produção (*ICH- Quality of Biotechnology Products: Analysis of the expression construct in cells used for production of r-DNA derived protein products Q5B*).

MEDICAMENTOS DE TERAPIAS AVANÇADA

Definição

Os medicamentos de terapia avançada surgiram como uma consequência da evolução do conhecimento científico nas últimas décadas que teve impacto profundo em muitas abordagens terapêuticas. Podemos definir os medicamentos de terapia avançada como medicamentos inovadores, tanto no método de produção, como no mecanismo de ação, na substância ativa

ou mesmo formulação que apresentam. Segundo a Diretiva 2009/120/CE¹, “Os medicamentos de terapia avançada baseiam-se em processos de fabrico que se centram em várias moléculas biológicas produzidas por transferência genética e/ou células terapêuticas modificadas, biologicamente avançadas, como substâncias ativas ou parte de substâncias ativas.”

Estas abordagens terapêuticas apresentam uma grande heterogeneidade entre si e englobam genes, tecidos ou células. De acordo com a legislação, os medicamentos de terapia avançada classificam-se em três grandes grupos (Tabela 2).

Tabela 2: Definição dos diferentes tipos de medicamentos de terapia avançada

<p>Terapia Génica <i>Diretiva 2009/120/EC</i></p>	<p>Entende-se por medicamento de terapia génica um medicamento biológico com as seguintes características:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) Contém uma substância ativa que inclui ou consiste num ácido nucleico recombinante usado ou administrado no ser humano tendo em vista a regulação, a reparação, a substituição, a adição ou a supressão de uma sequência genética; b) Os seus efeitos terapêuticos, profiláticos ou de diagnóstico estão diretamente relacionados com a sequência do ácido nucleico recombinante que contém, ou com o produto da expressão genética desta sequência. Nos medicamentos de terapia genética não se incluem as vacinas contra doenças infecciosas.
<p>Terapia Celular Somática <i>Diretiva 2009/120/EC</i></p>	<p>Entende-se por medicamento de terapia celular somática um medicamento biológico com as seguintes características:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) Contém ou consiste em células ou tecidos que foram sujeitos a manipulação substancial que alterou características biológicas, funções fisiológicas ou propriedades estruturais relevantes para a utilização clínica a que se destina, ou células ou tecidos que não se destinam a ser utilizados para a mesma função ou funções essenciais no beneficiário e no dador; b) É apresentado como tendo propriedades que permitem o tratamento, a prevenção ou o diagnóstico de uma doença, ou é usado ou administrado no ser humano tendo em vista esse fim, através da ação farmacológica, imunológica ou metabólica das suas células ou dos seus tecidos. <p>Para efeitos da alínea a), não são consideradas como manipulações substanciais as manipulações constantes do Anexo I do Regulamento (CE) n.º 1394/2007.</p>

¹ Diretiva 2009/120/CE, substitui o Anexo I parte IV da Diretiva 2001/83/CE onde se definem e estabelecem requisitos específicos para os medicamentos de terapia avançada. Diretiva foi transposta para Portugal no DL 64/2010 – 9 de Junho de 2010

<p>Engenharia de tecidos <i>Regulamento 1394/2007</i></p>	<p>Entende-se por medicamento de engenharia de tecidos um medicamento biológico com as seguintes características:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) Contém ou consiste em células ou tecidos que foram manipulados; b) Apresenta propriedades para, ou é usado ou administrado a seres humanos com vista a regeneração, reparação ou substituição de um tecido humano. <p>Um medicamento de engenharia de tecidos pode conter células ou tecidos de origem humana ou animal, ou de ambos. As células ou tecidos podem ser viáveis ou inviáveis. Também pode conter substâncias adicionais, como produtos celulares, biomoléculas, biomateriais, substâncias químicas, suportes ou matrizes.</p>
---	---

Adicionalmente, a estes medicamentos de terapia avançada poderão ser classificados como medicamentos de terapia avançada combinados. Estes encontram-se definidos no Regulamento (CE) n.º 1394/2007 como medicamentos que incorporam um ou mais dispositivos médicos e simultaneamente contém células ou tecidos viáveis. Estes medicamentos resultam da combinação entre a substância ativa ou produto final e um ou mais dispositivos médicos. Também pode ocorrer, que as células ou os tecidos estejam integrados numa matriz, no momento em que são administrados no doente, sendo estes igualmente considerados medicamentos de terapia avançada combinados.

De igual forma às restantes categorias de medicamentos de terapia avançada, os dispositivos médicos presentes nestes medicamentos combinados devem estar devidamente certificados e avaliados de acordo com o Regulamento (EU) n.º 2017/745 do Parlamento Europeu do conselho de 5 de abril de 2017 relativo aos dispositivos médicos. Os dispositivos médicos devem contribuir por si para uma relação benefício-risco segura, que não põe em causa, nem a saúde do doente, nem a atividade da substância que está combinada.

CANCRO

O domínio terapêutico onde maiores avanços se fazem sentir é na área oncológica de tumores líquidos, nomeadamente do sistema linfático. Apesar da inovação nesta área terapêutica, atualmente existem ainda taxas de sobrevivência reduzidas para algumas indicações. O número elevado de recidivas que estes doentes apresentam advém do facto de os doentes continuarem a apresentar DRM (doença residual mínima) após várias linhas de tratamento. DRM é o indicador de prognóstico mais significativo na doença em crianças e adultos, mesmo em doentes com uma probabilidade baixa de incidência de sintomas (*Inaba H, et al., 2013*).

A abordagem para tratar estas patologias baseia-se na combinação de diferentes fármacos (como será discutido mais a frente), sendo que a última terapia aprovada foi as células CAR-T. O Tisagenlecleucel (Kymriah) e o Axicabtagene ciloleucel (Yescarta) são fármacos em que o mecanismo de ação consiste nestas células. Atualmente, ambos estão aprovados para o linfoma difuso de grandes células B (DLBCL); o Kymriah está indicado para a leucemia linfoblástica aguda (ALL) e o Yescarta para o linfoma de grandes células B primário do mediastino (LGCBPM). Ambos indicados apenas após 2 ou mais linhas de terapêutica sistémica. De seguida serão caracterizadas as indicações terapêuticas para as quais Kymriah se encontra aprovado.

LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA (ALL)

Esta patologia é consequência de mutações genéticas, que provocam a proliferação desregulada de linfócitos imaturos. Ocorre simultaneamente em crianças e adultos sendo o pico de incidência engloba crianças entre os 2 e os 5 anos de idade (*Inaba H, et al., 2013*). De seguida, as células disfuncionais dirigem-se para diferentes locais no organismo através da corrente sanguínea, nomeadamente gânglios linfáticos, baço, fígado, sistema nervoso central e testículos. A produção desregulada destas células imaturas impede a produção normal de linfócitos. Consequentemente, o doente apresenta sintomas e sinais como fraqueza e fadiga generalizada devido aos baixos níveis de leucócitos, febre como resultado do desenvolvimento de infeções, hemorragias, perda de peso inesperada, entre outros (*Paul S et al., 2016*).

Historicamente, o diagnóstico de ALL foi baseado nos critérios morfológicos franceses/americanos/britânicos que consideravam a existência de três subtipos (L1, L2 e L3) apresentando diferenças relacionadas com o tamanho celular, citoplasma e vacuolização de nucléolos e basofilia (*Paul S et al., 2016*).

A Sociedade Americana do cancro estima que em 2019 tenham surgido cerca de 5,930 casos deste linfoma incluindo crianças e adultos (*American Cancer Society, 2018*). Apresenta causa idiopática, existindo apenas uma pequena percentagem (cerca de 5%) que se encontra relacionada com possíveis síndromes herdadas geneticamente, como é o caso da síndrome de Down, a síndrome de Bloom, Ataxia Telangiectasia ou a síndrome de breakdown Nijmegen (*Paul S et al., 2016*).

Atualmente existem várias opções terapêuticas consistindo em diferentes combinações de quimioterapia.

O tratamento da ALL divide-se em três fases diferentes:

- Fase da Indução, onde o objetivo é a remissão da doença, controlando-a;
- Segue-se a fase da Consolidação na tentativa de manter os resultados anteriormente alcançados;
- Por fim, segue-se a fase da Manutenção, onde o objetivo é a erradicação da doença residual mínima.

Em certas condições e quando ocorrem recidivas, pode ser necessário proceder ao transplante de medula óssea através de um dador compatível.

A taxa de sobrevivência na ALL pediátrica ascende para cerca de 90% em ensaios com estratificação de risco com base nas características biológicas das células cancerígenas e resposta ao tratamento, alterações adaptadas com base na farmacodinamia e farmacogenómica dos doentes e cuidados de suporte especializados (*Inaba H et al., 2013*). Contudo são necessárias novas abordagens inovadoras para aumentar a sobrevivência destes doentes reduzindo os efeitos adversos. O prognóstico continua a ser bastante reduzido nestes doentes (*Inaba H et al., 2013*).

A ALL continua a ser umas das principais causas de morte em oncologia pediátrica, não existindo opções terapêuticas eficazes. Deste modo, o Tisagenlecleucel surge como resposta a uma lacuna médica, com valor terapêutico expectável.

LINFOMA DIFUSO DE GRANDES CÉLULAS B (DLBCL)

O linfoma difuso de grandes células B é a variante com maior prevalência nos países ocidentais, representando cerca de um terço da ocorrência destes (*Colomo L. et al., 2003*). A evolução é

rápida, disseminando-se facilmente por todo o organismo, razão pela qual, o doente necessita de uma intervenção terapêutica rápida após diagnóstico.

De igual forma aos outros tumores, caracteriza-se por um crescimento anormal celular dos linfócitos B. Este crescimento pode ocorrer em diferentes órgãos do sistema linfático, nomeadamente os nódulos linfáticos, o baço ou o timo.

DLBCL é uma doença bastante heterogênea que pode ser avaliada ao nível clínico, morfológico, genético e através dos diferentes fenótipos apresentados pelos doentes. (Pasqualucci L., 2013)

Com recurso a tecnologia GEP (*genome-wide expressing profile*), este linfoma pode ser categorizado em 3 subtipos (Pasqualucci L., 2013):

- i. Subtipo de célula B centro germinal (GCB), presumivelmente derivado de um centroblasto da linha germinativa, expressando altos níveis de BCL6, regulador principal no processo de transcrição;
- ii. Subtipo de célula B ativada (ABC), cuja célula de origem encontra-se relacionada com uma célula B ativada por BCR;
- iii. Subtipo de linfoma primário de células B do mediastino primário (PMBCL).

Os sintomas e sinais podem variar de acordo com o local onde o linfoma tem início, no entanto, um sinal comum é o crescimento anormal dos nódulos. Outros sintomas e sinais são a perda de peso, pressão ou dor no peito, infeções recorrentes ou fadiga.

Este linfoma representa uma categoria heterogênea de tumores malignos agressivos e é considerado o tipo mais comum de linfoma não-Hodgkin de células B (B-NHL) em todo o mundo, sendo responsável por 30 a 40% de todos os novos diagnósticos e aproximadamente 20.000 novos casos a cada ano (Pasqualucci L., 2013).

Esses tumores afetam doentes de todas as idades, mas apresentam maior prevalência em indivíduos mais velhos (a idade média de diagnóstico é 70 anos) (Pasqualucci L., 2013).

Apesar de a etiologia ser desconhecida, a prevalência do DLBCL está relacionada com a infeção por HIV, uma vez que a imunossupressão é um fator de risco que permite o seu desenvolvimento. A incidência destes linfomas encontra-se aumentada em indivíduos portadores da imunodeficiência adquirida (AIDS) (Rezk S et al., 2018).

Recentemente, a ocorrência de casos foi associada à infeção pelo EBV (*Epstein-Barr vírus*) em cerca de 70 a 100% dos casos ocorrentes (Rezk S et al., 2018).

Atualmente existem várias opções de tratamento com diferentes combinações de fármacos, a mais comum denomina-se de R-CHOP (Galimberti, S. et al., 2019). Consiste numa combinação de quimioterapia constituída por Ciclofosfamida, Doxorrubicina (Hidroxi-daumina), Oncovina (Vincristina) e Prednisona juntamente com a administração de um anticorpo monoclonal denominado de Rituximab (American Cancer Society, 2018). Apesar de esta ser a prática padrão no tratamento da DLBCL, vários fatores têm que ser ponderados no início da terapêutica como a idade do doente, o seu estado de saúde geral e o grau de desenvolvimento do tumor. Nos casos onde o doente sofre uma recidiva, este poderá ser submetido a um transplante autólogo. Contudo, este procedimento acarreta vários riscos, não sendo muitas vezes a opção mais benéfica. Pode igualmente, ser submetido a novas combinações de quimioterapia de segunda linha, sendo esta a prática clínica mais comum nestes casos.

Ainda que a taxa de sobrevivência nos últimos anos tenha aumentado, existe ainda uma percentagem significativa de doentes que apresentam recidivas.

Dada a diversidade biológica do DLBCL, na maioria dos casos as abordagens terapêuticas de segunda linha não apresentam eficácia, existindo assim uma lacuna terapêutica.

Deste modo, o Tisagenlecleucel ou Axicabtagene ciloleucel surgem como opção terapêutica inovadora permitindo o aumento da probabilidade de sobrevivência destes doentes.

ABORDAGENS TERAPÊUTICAS – EVOLUÇÃO

Apesar das diversas opções terapêuticas com base em quimioterapia e imunoterapia já autorizadas há vários anos no mercado, continua a ser verificado um elevado número de recidivas nas patologias acima descritas.

Pode ser verificado um aumento progressivo do conhecimento da etiologia de ambas as patologias e, conseqüentemente, um incremento de inovação e complexidade das abordagens terapêuticas utilizadas. Abaixo é feita uma pequena descrição das abordagens que foram estabelecidas no mercado para o tratamento da ALL e DLBCL até ao desenvolvimento dos medicamentos contendo células CAR-T colocados no mercado recentemente.

Quimioterapia

I. Inibidores de cinases e citostáticos

As cinases são enzimas que estão diretamente envolvidas em processos de sinalização celular necessários ao funcionamento e crescimento da célula eucariótica. Atualmente existem fármacos que têm como alvo terapêutico estas enzimas, inibindo-as. Existem

diferentes tipos de inibidores de cinase de acordo com a cinase alvo, nomeadamente os inibidores da PI3K, proteína que regula o crescimento celular (Idealisib) e os inibidores da BTK (Ibrutinib), proteína que está relacionada com o crescimento e sobrevivência de alguns linfomas de linfócitos B (*American Cancer Society, 2018*).

Relativamente aos fármacos citostáticos, a ação terapêutica tem como objetivo reduzir o nível de proliferação celular, diminuindo o número de células cancerígenas. O uso destes depende de fatores intrínsecos do doente como o género, a idade e outras complicações que possam estar associadas à mesma, e por outro lado depende de fatores extrínsecos ao doente, como o tipo de tumor presente e o grau de diferenciação.

Os fármacos citostáticos podem ser usados de forma concomitante com outras terapias como é o caso de imunoterapia ou transplantes, contudo também podem ser usados isoladamente. Alguns exemplos de fármacos citostáticos são os agentes alquilantes (Cyclophosphamide), os corticosteroides (Prednisone), agentes platinados (Cisplatin), as antraciclinas (Doxorubicin). Frequentemente são prescritas aos doentes combinações de quimioterapia contendo fármacos de diferentes grupos. A combinação mais utilizada é CHOP sendo muitas vezes combinadas o rituximab como referido anteriormente. Recentemente, há um aumento na combinação de citostáticos com anticorpos monoclonais de ação dirigida com o objetivo de aumentar a eficácia nos tratamentos (exemplo: Brentuximab Vedotin).

II. Medicamentos com ação direta no tumor e abordagens não medicamentosas.

Neste tópico distinguem-se o modo de ação entre as abordagens referidas acima. No caso das abordagens com ação direta no tumor. Temos o exemplo dos inibidores de proteossomas onde ocorre um bloqueio dos complexos enzimáticos o que consequentemente inibe a divisão celular (Bortezomib). Com uma abordagem terapêutica semelhante existem os inibidores de desacetilase de histonas. Estes por sua vez atuam nos genes que estão diretamente envolvidos na expressão de histonas, inibindo a divisão e posteriormente o crescimento celular (Romidepsin).

A radioterapia é um tratamento oncológico com ação direta no tumor. Este consiste em sessões onde é fornecida radiação ao doente com o objetivo de reduzir ou mesmo eliminar o tumor. Este pode ser empregue em diferentes alturas do processo oncológico, nos graus de diferenciação iniciais ou, em conjunto com a quimioterapia, nos casos em que o tumor está mais avançado. Pode ainda ser usado de forma prévia

a um procedimento cirúrgico. É necessário estabelecer antecipadamente, os ângulos sob os quais a radioterapia vai ser fornecida e a dose correta de radiação que deve ser administrada de modo a potenciar o máximo efeito terapêutico, com efeitos adversos mínimos.

Imunoterapia

A imunoterapia centra-se na capacitação do sistema imunitário do doente orientando-o para a destruição do tecido tumoral que de outra forma é visto como tecido próprio porquanto não imunogénico. É uma área terapêutica na qual têm sido feitos grandes progressos no tratamento do cancro sobretudo através da ação de anticorpos monoclonais produzidos por tecnologia de DNA recombinante, incluem-se também nesta categoria as interleucinas que modulam o sistema imunitário.

Anticorpo monoclonal é uma imunoglobulina idêntica ou que reproduz as que integram o sistema imunológico, com as respetivas cadeias leves e pesadas e domínios variáveis e conservados, em que a sequência que confere especificidade de ligação a um dado antigénio específico do tumor é inserida no domínio variável da molécula. Consequentemente existem diferentes abordagens com anticorpos monoclonais ou seus derivados estruturalmente relacionados, de acordo com o antigénio alvo, e a própria estrutura desta molécula complexa.

A utilização de anticorpos monoclonais permitiu aumentar a probabilidade de sobrevivência dos doentes cujo as opções terapêuticas eram insuficientes. Exemplos desta terapia em tumores linfáticos são os anticorpos monoclonais dirigidos contra o antigénio alvo CD20; Este é uma proteína localizada na superfície dos linfócitos B, sendo esta terapia eficaz na DLBCL (Rituximab). Outro exemplo é o de anticorpo contra o antigénio alvo CD30 (Brentuximab Vedotin). Este anticorpo apresenta um mecanismo de ação diferente recorrendo a uma complementaridade baseada no direcionamento para alvo CD30 mas também associado a uma molécula de quimioterapia ligada covalentemente ao anticorpo. Neste caso, o anticorpo funciona como um *homing signal*, direcionando a atividade do agente citostático às células alvo, causando a morte das mesmas.

O Blinatumomab (Blinicyto) é outro anticorpo monoclonal indicado para o tratamento da ALL. Todavia, este anticorpo apresenta um mecanismo de ação diferente dos restantes anticorpos, uma vez que consegue estabelecer ligação simultânea com o CD19 presente nos linfócitos B tumorais e o CD3 presente nos linfócitos T. Consegue assim potenciar interação entre linfócitos B tumorais e linfócitos T com ação citotóxica com consequente recessão tumoral (*American Cancer Society*).

Inibidores de sinalização imunológica (Checkpoint Inhibitors)

Mais recentemente, foram desenvolvidos os inibidores de *Checkpoint imunológico* utilizados na prática clínica. Estes consistem noutra abordagem terapêutica alternativa que utiliza também o sistema imune para atacar o cancro mas removendo o efeito de travão conferido por estes checkpoints do sistema imune. Fisiologicamente, o sistema imune tem pontos de sinalização (*checkpoint*) a partir dos quais é assegurado a integridade do sistema imune limitando a sua expansão de forma a conter a resposta imunológica ao estritamente necessário. As células cancerígenas beneficiam com a existência destes pontos de sinalização ou de travão do sistema imune, o que significa que o tumor cresce sem sofrer qualquer perturbação. Consequentemente ao inibir o efeito de travão com inibidores de *checkpoint* tornam os tumores suscetíveis à citotoxicidade induzida por células T ativadas.

Atualmente no mercado existem o *Pembrolizumab* e o *Ipilimumab* que bloqueiam diretamente os pontos de sinalização, o que permite potenciar a resposta imune contra o tumor.

Terapias de base celular

I. Transplante

Transplantação de células linfopoiéticas da medula óssea é uma abordagem terapêutica estabelecida em doentes submetidos previamente a linhas terapêuticas com as quais não obtiveram eficácia. Uma vez reunidos os critérios para a realização do transplante, poderão ser administradas ao doente doses mais elevadas de fármacos citostáticos dado que vai haver uma reposição de células hematopoiéticas da médula óssea e por isso os efeitos secundários que advém de doses mais altas são menos significativos.

Esta abordagem têm duas variantes: alogénica e autóloga. A diferença consiste na origem das células recolhidas, em abordagens autólogas as células provêm do individuo submetido ao transplante, enquanto que em abordagens alogénicas as células são colhidas com recurso a um dador, sendo um familiar direto a melhor opção. Em regra procura usar-se o transplante alogénico compatível.

O transplante autólogo seria uma intervenção mais segura uma vez que o doente recebe as suas próprias células, não existindo possibilidade de desenvolver doença de enxerto contra hospedeiro (*GvHD graft versus host disease*), contudo não é uma opção tão eficaz existindo a possibilidade de o doente desenvolver novamente o tumor.

Como alternativa ao transplante autólogo, existe o transplante alogénico. Como referido anteriormente, a origem das células usadas deverá pertencer a um familiar direto (transplante haploidêntico por exemplo, de irmão), ou caso este não apresente compatibilidade, poderá ser um dador voluntário.

O transplante alogénico não é tão seguro quanto o autólogo. O desenvolvimento de GvHD é uma das reações adversas mais comuns, com consequências potencialmente fatais. Esta patologia é caracterizada um ataque linfocitário por parte dos linfócitos do dador contra as células do recetor que possuem, à superfície, antígenos considerados estranhos. Têm diferentes graus de severidade, sendo que o mais agudo é geralmente fatal. Contudo, este efeito pode ser benéfico embora num grau moderado, pois as células transplantadas podem reconhecer mais facilmente as células cancerígenas, eliminando-as. Este efeito é denominado por *graft-versus-cancer-effect* e pode ser vantajoso, uma vez que ao contrário do GvHD, este simplesmente ataca as células malignas.

II. Linfócitos tumorais (*Tumour infiltrating Lymphocytes, TIL*)

A administração de linfócitos de tumor (TIL) tem sido uma outra abordagem experimental com sucesso limitado. As populações de TILs que se encontram no tecido tumoral geralmente são compostos por células T CD8⁺ e CD4⁺. A capacidade de populações puras de TIL desencadearem a regressão de tumores em doentes forneceu a primeira evidência direta de que as células T desempenharam um papel vital na imunoterapia humana contra o cancro (*Science, 2015*).

Esta infusão de linfócitos é previamente ativada com o objetivo de eliminar eficazmente as células cancerígenas. Têm um método de produção complexo, sendo necessário fazer uma biopsia do tumor, o qual é dissecado em fragmentos, sendo posteriormente adicionado IL-2 (interleucina 2) para potenciar a resposta dos linfócitos presentes nestes fragmentos. De seguida, é verificada a reatividade em relação às células tumorais, sendo que as mais reativas são submetidas a um processo de expansão juntamente com a presença de IL-2 (Lee, S. & Margolin, K., 2018). Após este processo, os TIL poderão ser infundidos no doente. Após a infusão, é esperado uma recessão da carga tumoral. Estes têm sido combinados com fármacos citostáticos (ciclofosfamida) ou com a linfo-depleção prévia de modo a potenciar a sua ação.

III. Células T geneticamente modificadas

Por último, a terapia mais recente estabelecida no mercado com resultados de eficácia é baseada em medicamentos contendo células CAR-T. Esta abordagem terapêutica surgiu como um tratamento promissor para uma variedade de doenças incluindo cancro, doenças autoimunes, ferimentos ou doenças degenerativas (Issa, 2015). Com base no conceito de terapia génica, as células T do doente são previamente recolhidas e geneticamente modificadas por inserção do gene de recetor quimérico com recurso a um retrovírus. O DNA de interesse é inserido nas células recolhidas, de modo a expressar um recetor específico para o epitopo CD19 existente nos linfócitos B e que contém simultaneamente fatores de modulação do sistema imunitário contra as células B tumorais. O tisagenlecleucel (Kymriah) e o axicabtagene ciloleucel (Yescata) representam uma nova abordagem de terapia imunológica com base na modificação de células T. Os linfócitos do doente são reprogramados sendo assim uma terapia autóloga. Esta nova abordagem consiste em potenciar o direcionamento, ativação e expansão do sistema imune do doente, aumentando a atividade citotóxica do fármaco fornecido doente.

Esta terapia têm o estatuto de terapia génica já que as células recolhidas são geneticamente modificadas com recurso a um retrovírus contendo as sequências génicas necessárias contruído através da tecnologia de DNA recombinante.

As células T primárias podem ser isoladas e modificadas para expressar recetores de antígeno quiméricos sintéticos (CARs) - recetores com afinidade para um domínio de anticorpo extracelular de cadeia única, que reconhece um antígeno associado a um tumor específico, com domínios de sinalização intracelular do recetor de células T (TCR) (Issa 2015).

O recetor quimérico de antígeno CAR (*chimeric antigen receptor*) é uma construção proteica, sendo constituído por 3 domínios diferentes, nomeadamente:

- 1) Domínio extracelular com seletividade para o antígeno CD19, no qual estão presentes as cadeias pesadas (VH) e as cadeias leves (VL);
- 2) Domínio transmembranar responsável pela ligação entre a componente extracelular e intracelular;
- 3) Domínio intracelular responsável pela sinalização dentro da célula.

A região extracelular é constituída por um fragmento de recetor que reconhece o antígeno CD19. Consequentemente, este encontra-se ligado a dois domínios de

sinalização intracelular: o CD3-zeta responsável pela ativação dos linfócitos T e o CD137 ou CD28 encarregue da expansão dos mesmos.

O CD19 é uma glicoproteína transmembranar que se encontra expressa apenas nos linfócitos B, nomeadamente em células saudáveis; células malignas e células percursoras, o que o torna num alvo ideal para estas CD19 CAR-T (Ittershagen et al., 2019), uma vez que ambas as indicações terapêuticas são caracterizadas por um crescimento anormal das células B.

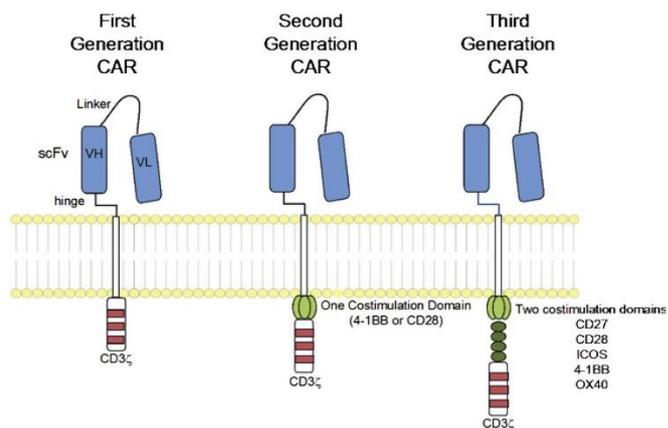


Figura I: Evolução do Recetor quimérico de antígeno expresso em Células T²

a) Tisagenlecleucel vs Axicabtagene ciloleucel³

O medicamento Kymriah apresenta um mecanismo de ação semelhante ao Yescarta, tendo obtido a aprovação pela FDA em Outubro de 2017 (dois meses após a aprovação do Tisagenlecleucel). À semelhança de Kymriah, as indicações terapêuticas para as quais foi aprovado são na área da oncologia (DLBCL e Non-Hodgkins Lymphoma), apresentado um tempo de produção relativamente mais curto (17 dias) do que Tisagenlecleucel que atualmente, a sua produção leva cerca de 22 dias.

Axicabtagene ciloleucel usa como vetor um retrovírus, tendo um domínio transmembranar diferente, o CD28. Têm um método de produção semelhante, recorrendo às células PBMC (*Peripheral blood mononuclear cell*) para ativar as células previamente recolhidas do doente.

São ambos abordagens terapêuticas autólogas, no entanto as células CAR-T apresentam diferentes tempos de permanência no organismo, tendo sido verificado um

² Retirado de: Maus, Marcela V, Stephan A Grupp, David L Porter, and Carl H June. 2014.

³ Retirado de: <https://nucleusbiologics.com/resources/kymriah-vs-yescarta/>

intervalo de 1 a 7 anos para o Tisagenlecleucel e um intervalo menor que 6 semanas para o Axicabtagene ciloleucel.

b) Tisagenlecleucel (Kymriah)

Dois estudos clínicos principais foram feitos, nomeadamente um para cada indicação terapêutica para a qual o Tisagenlecleucel se encontra atualmente autorizado:

- ✓ **B2202** - Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL). A população alvo neste estudo foram crianças e jovens adultos até aos 25 anos. A maioria destes doentes já tinham sido submetidos previamente a duas ou mais terapias, nomeadamente quimioterapia e transplantes alogénicos apresentando-se refratários a todas.

Todos os doentes anteriormente expostos a medicamentos de terapia génica foram excluídos do ensaio.

Este estudo é de fase 2, open-label, multicêntrico sendo constituído por um único braço. De forma a fornecer robustez a este estudo, evidenciando eficácia na indicação terapêutica o titular submeteu dois estudos de suporte, nomeadamente o **B2205J** e o **B2101J**.

- ✓ **C2201**- Linfoma de grandes células B refratário ou com recidiva (DLBCL). A população recrutada consistia em doentes com mais de 18 anos, expostos anteriormente às seguintes terapias: duas linhas de quimioterapia, as quais não foram eficazes na resolução da doença. Uma porção dos doentes recrutados não reunia condições necessárias ou não consentia com a realização do transplante alogénico. De igual modo, neste estudo todos os doentes anteriormente expostos a medicamentos de terapia génica foram excluídos do ensaio.

Estudo de fase 2, open-label, multicêntrico sendo constituído por um único braço. Para suportar os dados apresentados nesta indicação terapêutica, o titular submeteu um estudo metanálise – SCHOLAR-1 – que integra resultados de dois estudos clínicos e dois estudos observacionais, abrangendo cerca de 636 doentes com a mesma patologia em estado refratário.

Com base nos estudos principais apresentados, o B2202 e o C2201, é apresentada uma tabela no Resumo de Características do Medicamento com todas as reações adversas ocorridas durante os ensaios. As reações estão agrupadas por sistemas de classes de órgãos (SOC):

Tabela 3: Descrição de todas as reações adversas. (Retirado de [44])

Reação adversa medicamentosa (Classe de Sistema de órgãos MedDRA)	Estudos B2202 (N=75) + C2201 (N=111)	
	Muito frequentes ($\geq 1/10$)	Frequentes ($\geq 1/100, < 1/10$)
Infeções e infestações	Infeções – patógeno não especificado Infeções virais Infeções bacterianas Infeções fúngicas	
Doenças do sangue e do sistema linfático	Neutropenia febril Leucopenia Linfopenia Anemia Trombocitopenia	Coagulação intravascular disseminada Coagulopatia Linfocitose hemofagocítica Pancitopenia
Doenças do sistema imunitário	Síndrome de libertação de citocinas Hipogamaglobulinemia	Doença do enxerto contra hospedeiro
Doenças do metabolismo e da nutrição	Diminuição do apetite Hipocalemia Hipofosfatemia Hipocalcemia Hipomagnesemia Hipoalbuminemia Hiperuricemia Hiperglicemia	Excesso de líquido Hiper magnesemia Hiponatremia Hiperfosfatemia Síndrome de lise tumoral
Perturbações do foro psiquiátrico	Delírio Ansiedade Distúrbio do sono	
Doenças do sistema nervoso	Cefaleia Encefalopatia Tonturas	Tremor Neuropatia periférica Distúrbios da fala Convulsões Hemorragia cerebral Neuralgia Acidente vascular cerebral
Cardiopatias	Taquicardia	Insuficiência cardíaca Arritmia Paragem cardíaca
Vasculopatias	Hipotensão Hipertensão	Síndrome de hiperpermeabilidade capilar Rubor
Vasculopatias	Hipotensão Hipertensão	Síndrome de hiperpermeabilidade capilar Rubor
Doenças respiratórias, torácicas e do mediastino	Tosse Hipoxia Dispneia Edema pulmonar Derrame pleural Taquipneia	Epistaxe Infiltração pulmonar

Doenças gastrointestinais	Diarreia Náuseas Vômitos Obstipação Dor abdominal	Boca seca Hemorragia da boca Estomatite Distensão abdominal Ascite Síndrome compartimental abdominal
Afeções hepatobiliares		Hiperbilirrubinemia
Afeções dos tecidos cutâneos e subcutâneos	Erupção cutânea	Prurido Eritema Suores noturnos Petéquias Hiperhidrose
Afeções musculoesqueléticas e dos tecidos conjuntivos	Dor nas costas Mialgia Artralgia	
Doenças renais e urinárias	Lesão renal aguda	
Perturbações gerais e alterações no local de administração	Pirexia Fadiga Edema Dor Arrepios	Astenia Síndrome tipo gripe Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos
Exames complementares de diagnóstico	Hemoglobina diminuída Linfócitos diminuídos Glóbulos brancos diminuídos Neutrófilos diminuídos Plaquetas diminuídas Aspartato aminotransferase aumentada Alanina aminotransferase aumentada Bilirrubina sanguínea aumentada Relação internacional normalizada aumentada Diminuição do peso	Tempo de tromboplastina parcial ativada prolongado Diminuição do fibrinogénio sanguíneo Ferritina sérica aumentada Fosfatase alcalina sérica aumentada Fibrina d-dímero aumentada Tempo de protrombina prolongado

Desenvolvimento e Fabrico de Vetores virais

VETORES UTILIZADOS EM MEDICAMENTOS DE TERAPIA AVANÇADA

Medicamentos de terapia génica geralmente consistem em vetores ou sistemas de entrega contendo sequências genéticas construídas para expressar transgenes específicos (sequências terapêuticas) com o objetivo de regular, reparar, substituir, adicionar ou eliminar uma sequência genética (*Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products*).

No caso dos medicamentos de terapia avançada, os vetores virais não são o medicamento mas sim uma matéria-prima utilizada no seu fabrico. Estes são considerados matéria de risco devido aos riscos inerentes à sua produção e utilização. Deste modo, estes devem ser produzidos de acordo com os Guias de boas práticas de fabrico aplicadas a medicamentos de terapia avançada (GMP para ATMP Eudralex Vol IV, Novembro 2017) e devem seguir a legislação em vigor, nomeadamente a diretiva 2009/120/EC que os requisitos para a utilização autorização dos medicamentos de terapia avançada.

De acordo com a legislação em vigor, estes vetores virais ou sistemas de expressão génica devem apresentar segurança, eficácia e qualidade. Devem ser feitos estudos pré-clínicos com o objetivo de justificar a dose administrada, a via de administração e o padrão de administração nos estudos clínicos (*Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products*).

Através da utilização destes vetores, células alvo (por exemplo células somáticas) poderão ser atingidas o que conseqüentemente irá causar uma mudança fisiológica na sua ação podendo levar à reparação destas células na expectativa de o doente poder ficar curado.

Os vetores constituintes de medicamentos de terapia avançada poderão ser virais, vetores de DNA (plasmídeos) ou ainda vetores bacterianos. Os mais utilizados são os virais e os plasmídeos. Nomeadamente, na produção do Tisagenlecleucel são utilizados lentivírus não replicativos com base no vírus HIV-1, sendo necessário alterar a sua constituição para permitir utilização com segurança na prática clínica. Deste modo, é apresentado de seguida o método de produção dos lentivírus utilizado no fabrico de Kymriah.

FABRICO DE VETORES LENTIVIRAIS

I. Processo

No início do processo, existem vários fatores que tem que ser ponderados de forma a escolher o vetor com melhores características e através do qual, se esperam melhores resultados. Fatores como a capacidade de captação do vetor pelas células alvo; transporte (tropismo); o potencial de inserção/ transmissão através da linha germinativa; a sequência genética do vetor; dados acerca da sua persistência; expressão do gene de interesse; a especificidade da transcrição deste mesmo gene; proteínas que poderão surgir desta transcrição, potenciais problemas imunológicos e a imunidade do doente têm que ser devidamente abordados e ponderados para a eficácia clínica da terapia administrada.

a) Design de vetores lentivirais

No sentido de diminuir a patogenicidade inerente aos lentivírus, é recomendado alterar o vírus tendo em consideração os seguintes aspetos apresentados:

- ✓ Criação de “genoma lentiviral mínimo”, ou seja, eliminação de todas as sequências ou genes responsáveis pela virulência ou todos as sequências que sejam consideradas acessórias e que em nada contribuem para a eficácia do processo de transdução.
- ✓ Excisão de genes lentivirais e sequências essenciais à replicação destes vírus, de modo a impedir a replicação destes após administração.

De igual modo, durante o processo de produção, deve haver uma minimização de homologia entre sequência do vetor construído e o vírus parental selvagem. Esta diminuição de homologia previne potencial recombinação para evitar reativação da patogenicidade, produção de novos agentes infecciosos ou restabelecimento de retrovírus com capacidade replicativa (RCV – *replication competent viruses*).

São tomadas algumas precauções de modo a evitar o risco de recombinação e reativação da capacidade replicativa. Alguns exemplos para aumentar a segurança no uso destes vetores é a modificação SIN (*Self Inactivating*) que previne a mobilização e a recombinação com outros lentivírus que possam surgir após administração, em ambiente não controlado.

Outras modificações adicionais consistem na adição dos vários elementos genéticos necessários à produção do vetor viral, adicionando ao sistema celular de

empacotamento os vários componentes em separado de modo a aumentar a segurança, limitando a aquisição de características infecciosas do vírus parental.

b) Estratégias de produção de vetores lentivirais

O processo de produção destes vetores pode ocorrer de duas formas diferentes, sendo que:

- ✓ A linha celular é colocada em contacto com vetores de transferência e estruturas de acondicionamento, ocorrendo de seguida co-transfecção transiente na linha inicial;
- ✓ Cultura de linhas celulares contendo estruturas de acondicionamento incorporadas necessárias à produção de lentivírus, sendo estas depois combinadas com os vetores de transferência.

c) Caracterização e controlo aplicados aos vetores lentivirais

Após produção, cada lote de vetor recombinante lentiviral deve ser devidamente caracterizado relativamente à tradução e a geração de RCV. Deve ser ponderado um tratamento que permite remover potenciais resíduos indesejáveis de DNA (*DNase treatment*). Este tratamento permite garantir que o lentivírus final não se encontra contaminado com proteínas como VSG-G ou Gag/Pol, sendo as duas primeiras proteínas presentes no envelope viral e a proteína POL. Deste modo, ao eliminar eventuais vestígios do processo de produção a probabilidade de recombinação diminuí, o que torna o vírus final ainda mais seguro podendo ser utilizado num maior número de situações.

✓ Tradução

Aspetos a considerar dentro da tradução são a capacidade de integração, a expressão transgénica e ainda a funcionalidade do gene de interesse. Devem ser ainda consideradas outras características importantes que permitem avaliar o processo de produção, tais como: quantidade de proteína GAG, a relação entre a proteína GAG e o envelope viral ou a atividade da transcriptase reversa.

Capacidade de integração

A capacidade de integração é uma variável que clarifica a eficácia do processo e produção, pois quanto maior for a eficácia do processo, consequentemente,

maior vai ser a capacidade de integração dos vetores. Deste modo, para avaliar a capacidade de integração as células alvo (linhas celulares) podem ser utilizadas avaliando a expressão do DNA proviral ou usar técnicas de diluição.

Atividade biológica / funcional do transgene

A atividade do transgene é outro parâmetro que permite avaliar a eficácia do processo de produção e assegurar a eficácia clínica. De modo a avaliar este parâmetro, algumas condições têm que ser mantidas como as linhas celulares, a produção lentiviral e o tempo suficiente para a expressão do transgene. Só após a certificação destes parâmetros é que se torna possível avaliar a expressão transgênica.

✓ Quantificação

A quantificação de vetores lentivirais fornece informações acerca da eficácia do processo de tradução, mas também permite perceber se existe consistência entre os diferentes lotes produzidos. Existem diferentes métodos que permitem fazer a quantificação destes vetores. A medição pode ser feita através de processos NAT (*nucleic acid amplification test*), como é o caso por PCR (*polymerase chain reaction*) ou através da imunocoloração do envelope viral/proteínas da capsíde sendo posteriormente visualizadas através de microscopia confocal.

Durante este processo é necessário tomar as devidas precauções, uma vez que proteínas inseridas durante o processo de produção como Gag/Pol podem induzir variabilidade, contribuindo para valores errados de quantificação.

✓ Análise da replicação

Embora sejam aplicados inúmeros controlos durante todo o processo de produção, a replicação de lentivírus competentes continua a ser um dos principais receios deste processo e um fator que precisa de ser devidamente avaliado de modo que este possa ser considerado como seguro. Sendo assim, a possibilidade de replicação precisa de ser quantificada. Várias abordagens estão atualmente estabelecidas, nomeadamente através da infeção de várias linhas celulares onde posteriormente são aplicados sobrenadantes sendo depois, estas linhas celulares, submetidas a PCR para identificação do possível

DNA proviral integrado. Este teste é indispensável para a libertação de cada lote de vetor viral para utilização em doentes.

✓ Oncogénese

Dada a capacidade de infeção do lentivírus, o risco de inserção de mutagénese e a oncogénese são riscos que carecem de atenção e avaliação. Atualmente, uma das formas para assegurar a segurança em relação a este risco é a caracterização do padrão de infeção, assim como as potenciais consequências deste. O risco de mutagénese por inserção é tratado adiante.

II. Produção de vetores lentivirais do Tisagencleucel

Os vetores lentivirais são matérias-primas necessária à transdução das células do Tisagencleucel, sendo requisito obrigatório que a sua produção seja feita de acordo com os princípios das boas práticas de fabrico.

O HIV-1 contém dois genes reguladores, *tat* e *rev*, essenciais para a replicação viral, e quatro genes acessórios, *vif*, *vpr*, *vpu* e *nef*, que não são cruciais para o crescimento viral *in vitro*, mas são críticos para replicação e patogénese *in vivo* (Dull et al., 1998). As proteínas Tat e Rev regulam os níveis de expressão do gene HIV a nível transcricional e pós-transcricional, respetivamente (Dull et al., 1998).

A primeira estratégia para melhorar a biossegurança do vetor é usar plasmídeos contendo o genoma dividido, não sobrepostos, que exigiriam múltiplos eventos de recombinação com o vetor de transferência para geração de RCR (Dull et al., 1998). Para produzir os vetores lentivirais foram utilizados 4 plasmídeos diferentes (apresentados e caracterizados em cima). Por este motivo a hipótese de recombinação é reaquisição de capacidade replicativa é reduzida ao máximo.

A segunda estratégia para aumentar a segurança na produção baseia-se no conjunto de genes necessários para expressar um vetor lentiviral eficiente foi identificado sendo que os restantes genes foram eliminados do sistema. Como os produtos dos genes removidos são importantes para a conclusão do ciclo de vida do vírus e para a patogénese, nenhum vírus recombinante pode adquirir as características patogénicas dos vírus inalterados (Dull et al., 1998).

De acordo com os aspetos referidos anteriormente, especificamente, a produção do vetor lentiviral para Tisagencleucel deve ter em conta os seguintes aspetos (European Public Assessment Report, 2018):

a) Design do Vetor:

O processo de fabrico do vetor viral é feito por transfecção de células de empacotamento com 4 plasmídeos separados, nomeadamente:

- Plasmídeo pRKHG contendo sequência que codifica uma proteína do envelope viral, uma glicoproteína viral heteróloga (VSV-G) substituindo a glicoproteína *env* do HIV-1;
- Plasmídeo pRKHSYNGP que codifica as proteínas virais *Gag* e *Pol* que estão diretamente relacionadas com a estrutura lentiviral do HIV-1;
- Plasmídeo pRKHVmuEC19, plasmídeo de transferência contendo o genoma construído CTL019 contendo as sequências específicas para o CAR;
- Plasmídeo pRKHREV que engloba o genoma que codifica a proteína REV necessária à regulação da expressão em HIV-1.

Através da transfecção da cultura celular de produção é gerado o vírus recombinante contendo as sequências necessárias para a transdução eficaz das células do doente com inserção do gene de interesse no seu genoma. O vetor lentiviral é construído de forma a perder a capacidade replicativa por supressão de cerca de 85% da sequência replicativas do HIV-1 selvagem e ser *self-inactivating* (SIN vetor).

b) Perfil de inserção

O perfil de inserção do vírus usado deve ser avaliado cuidadosamente de modo a perceber qual a sua região de inserção. Vírus com perfis de inserção preferencialmente perto de regiões promotoras podem desencadear eventos de replicação descontrolada.

Foi assim verificado que o retrovírus não apresenta locais preferenciais de integração, o que significa que não foi identificada uma integração preferencial perto de genes promotores que possam desencadear proliferação desregulada.

Os vetores lentivirais de terceira geração descritos são considerados vetores incompetentes e auto-inativadores de replicação, devido ao número de genes essenciais que foram excluídos da estrutura lentiviral de terceira geração (*Affleck and Stoll, 2018*).

De modo a avaliar o perfil de inserção do lentivírus usado foram feitos dois estudos. No primeiro – *Intivirus insertion site analysis (LISA)* – foram recolhidas 6 amostras de doentes pediátricos onde Tisagenlecleucel foi administrado para a indicação ALL e 6

amostras de doentes adultos onde Tisagenlecleucel foi fornecido para a indicação DLBCL e ainda foram recolhidas 2 amostras de voluntários saudáveis. No segundo estudo, as 14 amostras foram devidamente processadas e de seguida, analisadas por PCR mediado por ligação (LM-PCR). Os resultados de ambos os estudos mostraram que os lentivírus usados possuem padrões de integração muito semelhantes a outros bem documentados, atualmente (*European Public Assessment Report, 2018*).

c) Produção

Os vetores lentivirais de terceira geração são por norma mais seguros em comparação com os sistemas de gerações anteriores, no entanto têm uma desvantagem. São obtidas quantidades mais baixas em vetores de terceira geração em comparação com os vetores lentivirais de segunda geração devido ao maior número de plasmídeos separados (4 em vez de 3, respetivamente) (*Affleck and Stoll, 2018*). Deste modo, para solucionar este problema e aumentar o rendimento, as linhas celulares devem ser co-transfectadas previamente.

A consistência entre os lotes deve ser verificada para garantir igual nível de qualidade ao longo de todo o processo de produção.

d) Dosagem do vetor

Foi estabelecida uma relação entre a probabilidade de ocorrência de mutagénese e o número de integrações viral por célula sendo que um maior número de integrações aumentam naturalmente, a ocorrência de possíveis eventos de mutagénese (*Reflection paper on management of clinical risks deriving from insertional mutagenesis*).

Análise de risco de Transdução com vetor lentiviral

A ocorrência de efeito adverso pode estar relacionada com o número de integrações que ocorre entre os linfócitos T administrados e as células B, em que um maior número de integrações poderá corresponder a uma maior probabilidade de ocorrência de mutagênese. No entanto, esta relação é ainda incerta, não existindo dados suficientes que a comprovem.

a) Transgene

Outro fator de risco pode resultar do próprio mecanismo de ação associado ao produto transgênico e se este tem uma expressão regulada. Expressões gênicas menos controladas aumentam a probabilidade de efeito adverso, o que torna a regulação um fator significativo no controle da expressão.

Os vetores lentivirais apresentam uma grande vantagem em relação aos oncoretrovirais: estes podem ser expressos em células diferenciadas, um alvo crucial para a modificação genética de tecidos considerados como os principais alvos potenciais da terapia gênica: o cérebro, o músculo, o fígado, os pulmões e o sistema hematopoiético (*Zufferey et al., 1998*). Os vetores produzidos apresentam um perfil de inserção bastante controlado o que torna a sua utilização segura.

b) Células e órgãos alvo

Um fator com um impacto bastante significativo na ocorrência de mutagênese é o alvo a que se destina o fármaco. Consoante o grau de diferenciação celular, maior ou menor poderá ser a probabilidade de ocorrência de mutagênese.

Foi verificado que os vetores lentivirais apenas infetam células diferenciadas, nomeadamente Linfócitos T. Dado que estas células já não se vão dividir, a probabilidade de possíveis eventos de mutagênese e proliferação descontrolada é baixa, sendo que este risco se encontra diminuído com o uso destes vetores.

c) Tradução – Avaliação do potencial de reativação de capacidade replicativa

Uma forma de analisar a capacidade de replicação destes é a quantificação de RCLs diretamente relacionada com a proteína Gag do HIV-1 com ensaios atualmente bem estabelecidos e sensíveis (ensaio imunocaptura p24 Gag). Podem também ser usados ensaios específicos para as proteínas presentes no envelope viral, VSV-G ou células sensíveis à infeção com HIV-1 para avaliar a presença de RCLs.

Para aumentar a eficácia da quantificação, um procedimento padrão deve ser previamente acordado de modo a aumentar a sensibilidade do processo. Deste modo, os limites de deteção de RCL devem ser aceitáveis e os resultados dos procedimentos padrão de deteção de limite negativos para ser assumida segurança.

Recolha e preparação dos Linfócitos T

LEUCOFÉRESE

A segunda matéria-prima essencial para a produção do Tisagenleucel é a preparação de células T do doente, a partir das quais a substância ativa vai ser produzida.

Inicialmente, o doente é submetido ao processo de aférese, onde ocorre uma separação dos leucócitos. Esta separação é conseguida através da aplicação de processos de centrifugação contínuos onde, conseqüentemente, os componentes do sangue são separados de acordo com a sua densidade (Fesnak, A. D. et al., 2017). Conseqüentemente, os linfócitos T são retirados sendo o restante conteúdo da corrente sanguínea reinfundido no doente.

O produto obtido deve ser submetido a uma lavagem de modo a retirar os vestígios de anticoagulantes usados previamente no processo. Estes são utilizados uma vez que facilitam a recolha da matéria-prima.

Após o processo referido, os linfócitos T devem ser automaticamente alterados de forma a originar o Tisagenleucel ou, em caso de impossibilidade, estes devem ser devidamente condicionados com o objetivo de manter as características e a qualidade inicial. Com este objetivo são utilizados recipientes Dewar que permitem um isolamento eficaz, impedindo mudanças de temperatura.

Contudo, existem pontos a ter em consideração nesta etapa nomeadamente, a ocorrência de feridas ou infeções no local onde é colocado o cateter (Fesnak, A. D. et al., 2017). Dado o estado de saúde muito debilitado destes doentes, é necessária uma recolha segura de modo a evitar um agravamento no estado de saúde. Outro ponto a considerar relaciona-se com a medicação à qual os doentes são expostos previamente. Esta consiste na sua maioria, em citotóxicos que diminuem significativamente o número de linfócitos existentes (Fesnak, A. D. et al., 2017). Frequentemente, a quantidade recolhida é reduzida sendo necessário um processo de expansão que permita aumentar o número destes. Sendo um processo qualificado, cada doente tem que ser testado de acordo com os requisitos da transplantação, cada local de colheita e de administração tem que adotar procedimentos de qualidade harmonizados conforme definidos pelo fabricante, procedimentos que asseguram a segurança e qualidade do produto (Fesnak A. D. et al., 2017). Ambas as operações são guiadas de acordo com as medidas de minimização do risco abordadas mais a frente.

Método de produção da substância ativa de Tisagenlecleucel

PROCESSO

A produção do Tisagenlecleucel inclui a recolha e preparação de duas matérias-primas: vetores lentivirais e os linfócitos T do doente. Após a recolha de ambas as matérias é que pode ser iniciada a produção da substância ativa: as *CAR-T cells*. Devido à alteração requerida nos linfócitos T, o processo de produção do Tisagenlecleucel é bastante complexo, sendo necessário um controlo rigoroso do mesmo de forma a obter qualidade e a assegurar a minimização de qualquer potencial risco.

a) Produção

A produção do Tisagenlecleucel tem uma duração de cerca de 10 dias e consiste em 11 passos que vão desde a recolha dos linfócitos do doente, até à infusão destes já alterados.

- Ativação

As células recolhidas devem ser ativadas. O processo de ativação consiste em interações estabelecidas entre os recetores das células T (TCR) e os complexos estabelecidos na superfície das células dendríticas e ainda, através de moléculas coestimulantes como é o caso do CD28. Durante o processo de produção de Tisagenlecleucel podem ser utilizadas *magnetic beads- Dynabeads*. Estas são partículas de polímero esféricas superparamagnéticas revestidas com anticorpos antiCD28/ antiCD3. As Dynabeads e respetivos anticorpos devem ser qualificados de modo a garantir a consistência e a qualidade do produto celular final.

- Tradução

Após o processo de ativação, no qual os linfócitos T são estimulados com células mononucleares recolhidas da corrente periférica, o produto obtido é posteriormente incubado com o vírus previamente fabricado em salas separadas nas quais é assegurado o cumprimento das GMP para ATMP (*Good Manufacturing Practice*), nomeadamente nas questões de produção, controlo de qualidade entre outros aspetos relevantes para a qualidade do vírus

(EudraLex – Volume 4 – Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapeutic Medicinal Products).

A este passo está associado um risco de inserção de mutagênese, sendo necessário verificar todos os lotes virais, a inexistência de vírus com capacidades replicativas (Fesnak A. D. et al., 2017).

É necessário ter em conta que o método de transdução acarreta alguma citotoxicidade podendo levar a perdas celulares durante o fabrico. É aconselhado recolher maior quantidade de linfócitos de modo a compensar eventuais perdas (Fesnak A. D. et al., 2017).

Através dos lotes utilizados nos estudos clínicos realizados, verificou-se haver uma correlação entre o número de cópias do transgene existentes e o número de recetores CAR expressos na célula, indicando que estes recetores têm uma expressão estável no genoma do hospedeiro. Foi demonstrada uma expressão de 2 transgenes ou mais por célula na maioria dos lotes produzidos (BLA 125646 Tisagenlecleucel Novartis Pharmaceuticals Corporation).

- Expansão

Após a transdução com o vírus, os linfócitos T alterados são submetidos a um processo de expansão. Existem diferentes abordagens com o objetivo de aumentar a quantidade de células, sendo que a mais utilizada recorre a birreatores onde é assegurado um fornecimento constante de nutrientes. Este processo de expansão no birreator tem uma duração de cerca de 4 a 5 dias. O birreator permite reduzir o número de operações desempenhadas pelo técnico de laboratório, aumentando a segurança e reduzindo também, o risco de contaminações (Fesnak A. D. et al., 2017).

As Dynabeads permanecem durante a incubação, com o objetivo de promover a produção de novos linfócitos T. Estas apenas são retiradas no final do processo, previamente à lavagem e criopreservação das células obtidas.

Consequentemente, a quantidade de fármaco produzido vai aumentar sendo, posteriormente, infundido no doente.

Todas as matérias-primas utilizadas devem ser estéreis e todo o processo de fabrico deve ocorrer em salas fechadas, nomeadamente em salas com a categoria A ou B de acordo com as GMPs, para ATMP (EudraLex – Volume 4 –

Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapeutic Medicinal Products).

A substância ativa e o produto final devem ser submetido a testes finais de qualidade (Fesnak, A. D. et al., 2017). Este deve apresentar um elevado grau de segurança, esterilidade e pureza, deste modo, outras células como por exemplo os linfócitos NK devem ser eliminados. A eficácia final deve ser, de igual modo, testada através da eficiência da tradução (determinar o número de cópias de vetor) ou através de testes citotóxicos. Atualmente a potência é avaliada de acordo com a atividade biológica do lote produzido, sendo que são definidos limites para esta variável. Um maior nível de atividade representa uma maior potência e vai conseqüentemente influenciar a eficácia do fármaco.

Finalizado o processo de expansão, o processo de produção da substância ativa (*CAR-T cells*) chegou ao fim, encontrando-se o produto pronto para ser administrado ao doente.

b) Distribuição

Atualmente Tisagenlecleucel é produzido em dois locais: *Morris Plains* (MP) em New Jersey (EUA) e *Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie* (FH IZI) em Perlickstraße, Leipzig (Alemanha). Deste modo, para garantir a qualidade do produto final é necessário um processo de distribuição bem implementado e eficiente, no qual haja boa comunicação entre os locais de produção referidos e os diferentes centros de perfusão nos vários países.

Apenas os centros qualificados pelo titular da AIM poderão disponibilizar Tisagenlecleucel. Esta qualificação vem de acordo com o cumprimento do Plano de Gestão de Risco, sendo um requerimento obrigatório na distribuição do fármaco. Deste modo, é apresentado abaixo um esquema com os principais pontos de distribuição de Kymriah:

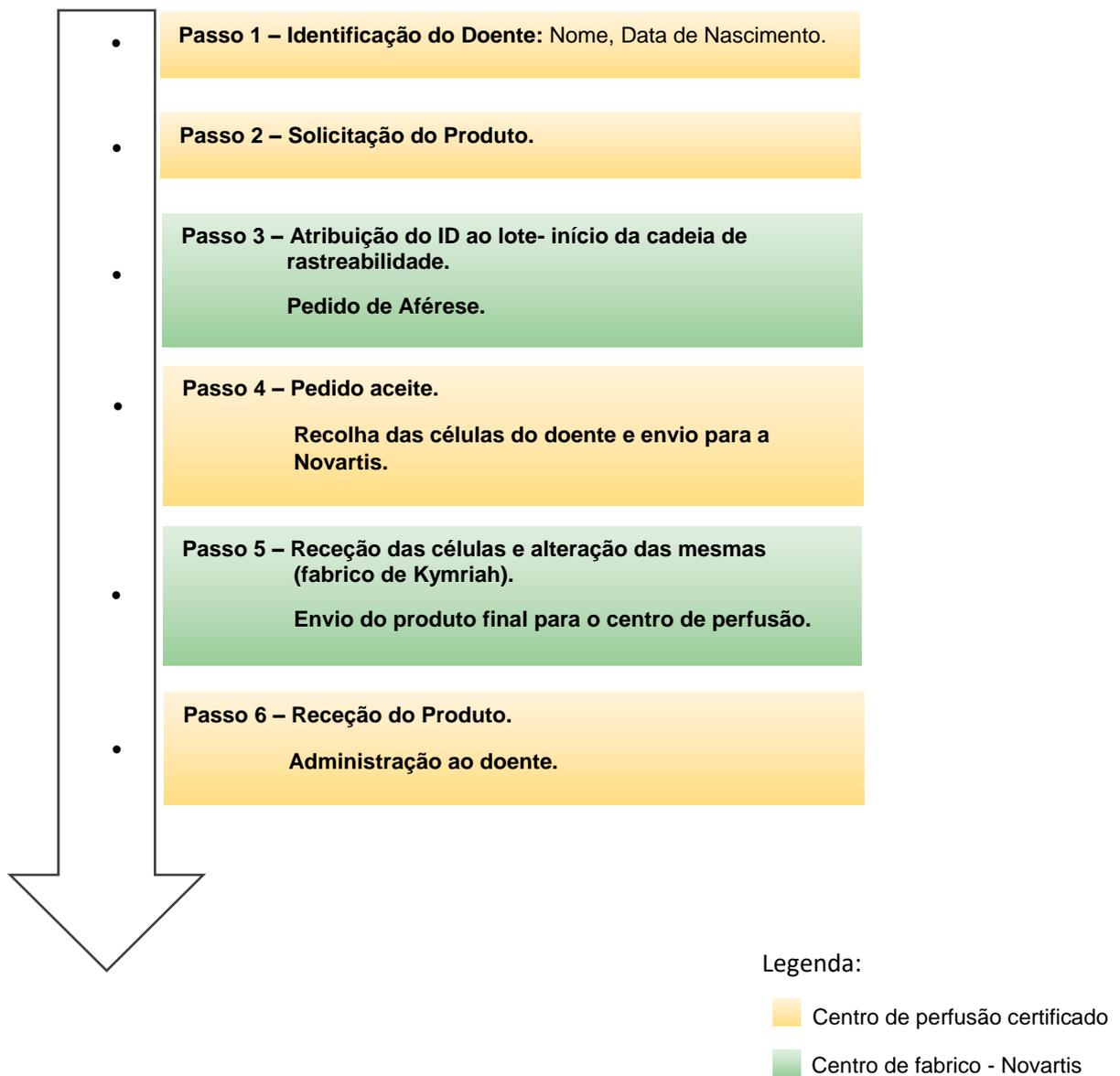


Figura 2: Esquema de distribuição de Tisagenlecleucel

c) Potenciais Riscos associados ao fabrico e distribuição

Existem vários riscos associados ao processo de produção e distribuição de Kymriah.

Associados ao processo de produção estão associados os seguintes riscos:

- I- Risco de transmissão de doença – Este risco relaciona-se com a origem das células e capacidade que estas possuem de se diferenciar e replicar. As células utilizadas no processo de produção são os linfócitos T, células especializadas presentes do sistema imune. Consequentemente a sua capacidade de proliferação e replicação é limitada, logo este risco encontra-se minimizado.

2- Risco de carcinogenicidade – Relaciona-se acima de tudo com o processo de produção viral. É necessário garantir que o retrovírus utilizado na produção de Tisagenlecleucel é devidamente alterado e seguro de modo a garantir a segurança de Tisagenlecleucel.

3- Risco relacionado com as condições de armazenamento, distribuição, receção e mudanças de temperatura, nomeadamente quebra da *cold chain* e *preparação final*

- Temperatura:

Tisagenlecleucel deve ser devidamente acondicionado dentro de um frasco Dewar para que a sua temperatura se mantenha constante. Contudo, foi criado o Cryoport com o objetivo de registar a temperatura do fármaco ao longo do tempo. O Cryoport consiste numa plataforma de monitorização da temperatura do Tisagenlecleucel após a sua produção até à chegada ao local de perfusão. Deste modo, é verificado, a cada cinco minutos, se Tisagenlecleucel sofre excursões de temperatura significativas (menos de -120°C) durante o seu transporte, de modo a garantir a sua qualidade no momento de administração ao doente.

- Certificados de Qualidade:

Devem ser verificados os certificados de qualidade. Estes são o documento chave na qualidade do produto final, sendo que são emitidos na etapa final da produção. Deste modo, no momento de receção de Tisagenlecleucel no centro de perfusão, o Profissional de Saúde deve certificar-se que o produto recebido está de acordo com o certificado emitido, de modo a garantir a qualidade do mesmo.

- Transporte e eliminação de resíduos:

Tisagenlecleucel deve ser transportado a -120°C num recipiente de armazenamento criogénico de modo a evitar qualquer fonte de poluição. De seguida, deve ser colocado em gelo seco para que a temperatura se mantenha constante e não ocorram degelos.

Todo o material usado no processo assim como aquele que é utilizado pelos profissionais de saúde deve ser eliminado de acordo as guidelines de biossegurança em vigor.

- **Receção:**

No momento de receção de Kymriah, no centro de perfusão, deverão ser entregues vários documentos. Estes divergem no conteúdo abordado, destinando-se a diferentes profissionais de saúde.

Devem estar disponíveis na plataforma CellChain (plataforma de rastreabilidade apresentada mais à frente) os certificados de lote. Estes devem verificados para certificar a qualidade do produto final e confirmação dos dados do doente antes da infusão.

Todos os materiais abrangidos pelo Plano de Gestão do Risco (PGR) destinado aos doentes deverão ser entregues aos médicos, para que posteriormente estes possam ser redistribuídos pelos doentes, nomeadamente: Cartão de Alerta do doente e Folheto Informativo.

4- Risco de erro na dosagem ou no processo de administração

- **Rótulo e Integridade das Bolsas:**

O Tisagenlecleucel é fornecido como uma dispersão celular apresentada em 1 a 3 bolsas prontas a serem administradas no doente. Deste modo, as bolsas apresentam um rótulo afixado com algumas informações pessoais do doente, nomeadamente: o nome, a data de nascimento e o número de identificação de doador (*donation identification number (DIN)*), o número da aférese ou ainda o número de lote.

É necessário confirmar os dados do doente, de modo a garantir que não houve qualquer troca ou erro durante a produção. Tisagenlecleucel é destinado apenas para uso autólogo, sendo essencial a confirmação dos dados.

- **Integridade das Bolsas:**

Previamente ao tratamento, o Profissional de Saúde tem que examinar cuidadosamente as bolsas fornecidas e assegurar a integridade das mesmas não apresentando nenhum dano.

Tisagenlecleucel deve ser administrado entre 2 a 14 dias após o tratamento com quimioterapia linfodepletora. Como referido anteriormente, o tratamento com Kymriah inclui 1 a 3 bolsas, contudo estas não devem ser submetidas ao processo de descongelação em simultâneo. Inicialmente, deve ser descongelada uma bolsa, sendo que só deve ser descongelada a segunda quando o conteúdo da primeira acabar. As bolsas devem ser descongeladas a 37°C e após a sua descongelação devem ser mantidas a uma temperatura entre 20-25°C. Após o processo de descongelação, o seu conteúdo deve ser infundido dentro de 30 minutos.

Tisagenlecleucel deve ser administrado por via intravenosa através de um aparelho sem latex de forma a evitar possíveis reações alérgicas a este componente. Não devem ser utilizados quaisquer filtros para os leucócitos, todo o conteúdo da bolsa deve ser infundido.

- 5- Risco de potencial transmissão viral entre o doente os Profissionais de Saúde, Cuidadores ou pessoas com um contacto próximo com o doente – De forma a garantir a saúde dos profissionais de saúde que estão em contacto com o doente, estes devem utilizar luvas e óculos durante a leucoférese assim como durante o manuseamento e a administração de Tisagenlecleucel.

d) Cadeia de Rastreabilidade

Considerando o caráter autólogo de Kymriah, é necessário a existência e manutenção de uma cadeia de rastreabilidade, de modo a garantir que cada doente recebe o medicamento produzido a partir dos seus linfócitos.

Deste modo, a cadeia de rastreabilidade é iniciada com a criação de um registo de acordo com a diretiva 2004/23/CE “os serviços manipuladores de tecidos e células devem conservar os dados necessários para assegurar a rastreabilidade em todas as fases.” Consequentemente, as células do dador devem ser devidamente identificadas na recolha. Os dados necessários para assegurar a rastreabilidade integral devem ser conservados durante pelo menos 30 anos após a sua utilização clínica (*Diretiva 2004/23/CE*).

De forma similar, os dados devem também ser identificados, sendo obrigatório cada dador possuir um código. Este código é alterado de acordo com a dádiva e ao produto associada à mesma, existindo apenas um código para cada doação feita.

A cadeia de rastreabilidade integra ainda, adicionalmente ao principal objetivo referido em cima, outras funcionalidades. Esta pode ser utilizada como uma ferramenta que permite verificar o nível de qualidade e segurança implementados ao longo de todo o processo de produção do medicamento, assim como em todos os processos que estão diretamente associados (colheita, distribuição).

Permite registar toda a informação de cada lote assim como, de qualquer reagente ou material que tenha estado em contacto com as células no seu processamento conforme disposto no Regulamento 1794/2007.

De forma a cumprir com os requisitos legais impostos, foi criada uma plataforma – *CellChain* – que permite acompanhar o processo de produção de Tisagenlecleucel desde do pedido inicial feito pelo profissional de saúde até ao momento de infusão no doente.

De forma paralela a plataforma *Cryoport*, apenas os profissionais de Saúde autorizados têm acesso a esta plataforma, inserindo as informações necessárias para o pedido e seguindo todo o processo produção do fármaco.

Posto isto, através do uso da *CellChain* a cadeia de rastreabilidade é mantida, uma vez que são registadas todas as etapas de produção. Esta plataforma também contribui para a garantia da qualidade, dado que permite, fazer um controlo rigoroso das etapas antecedentes à perfusão do doente.

Avaliação de Impacto Ambiental

Como referido anteriormente, Tisagenlecleucel utiliza um lentivírus HIV-1 geneticamente modificado, sendo categorizado como um organismo geneticamente modificado (*genetically modified organism*- GMO). Deste modo, é necessário equacionar o risco de impacto ambiental desde a produção deste organismo para avaliar o potencial de libertação para o meio ambiente bem como na sua utilização profissionais de saúde que preparam e administram o medicamento; cuidadores ou pessoas que contactem diretamente com o doente (familiares diretos), restante população, meio ambiente assim como animais.

Consequentemente, de acordo com a legislação em vigor (*Diretiva 2001/183/EC Regulamento 726/2004*), foi submetido juntamente com o pedido de AIM um documento denominado ERA (*environmental risk assessment*). Este documento têm como objetivo identificar e avaliar os potenciais efeitos adversos de um OGM, diretos ou indiretos, imediatos ou remotos, na saúde humana e no ambiente. Pode apresentar medidas de redução do risco, caso sejam verificados riscos inaceitáveis. O ERA deve ser elaborado de acordo com dados aferidos anteriormente ao momento de AIM: pré-clínico, clínico e qualidade durante o processo de produção. Contudo, por vezes não é possível reunir dados sobre questões importantes de segurança relativamente ao uso (recombinação do vírus, por exemplo), sendo que podem ser adotados dados qualitativos (grave, muito grave) ou, caso não existam quaisquer dados, é adotado o “pior cenário possível” e de acordo com este são construídas medidas para prevenir as consequências destes cenários.

O ERA deve apresentar os dados mais recentes, sendo que deve ser sempre atualizado, caso surjam dados novos. A sua submissão deve estar de acordo com o procedimento de autorização centralizado, sendo diretamente submetido a autoridade europeia (EMA). O conteúdo deste documento deve ser revisto caso haja alguma alteração aos termos da AIM.

De acordo com a regulação em vigor (*Good Practice on the assessment of GMO-related aspects in the context of clinical trials with human cell genetically modified by means of retro/lentiviral vectors*) o nível de biossegurança (*Biosafety Level*- BSL) deve ser assegurado durante a produção destes vetores. As condições BSL tratam-se de um conjunto níveis de segurança que foram estabelecidos com o objetivo de assegurar a produção segura de vetores virais. A necessidade destas condições surgiu do uso cada vez mais frequente destes vetores em abordagens terapêuticas, como é o caso da terapia génica. Deste modo, devem ser asseguradas as condições BSL-2 na maioria das operações de produção de lentivírus.

As condições BLS-1 aplicam-se apenas a etapas mais tardias após tradução e apenas se as condições BLS-2 foram asseguradas anteriormente.

ERA relativo à libertação deliberada no ambiente conforme exigido na Diretiva 2001/18/EC *on the deliberate release into the environment of genetically modified* organismos inclui 6 etapas principais:

ETAPA 1: Identificação de características que podem causar efeitos adversos

Esta etapa inicial serve para identificar todas as fontes de risco que podem causar efeitos adversos, tanto a humanos como ambientais. Todos os efeitos adversos devem ser considerados, independentemente se estes causam alteração genética. Devem ser também recolhidos efeitos adversos potencialmente derivados do método de preparação e utilização do GMO e não apenas derivados diretamente do GMO. Relativamente ao vetor viral utilizado no Kymriah, foram vários os riscos identificados e analisados: recombinação viral e suscetibilidade do doente ao vírus, podendo causar doença ao doente assim como a terceiros. Com base neste risco, a produção viral, assim como a produção do medicamento final foi devidamente avaliada de modo que ambos os métodos pudessem ser validados. Adicionalmente, outro risco identificado está relacionado com capacidade de replicação, o seu potencial oncogénico e a possibilidade de desenvolvimento de um segundo tumor. Como resolução para este risco, foram desenvolvidas várias abordagens para modificação do genoma viral (discutidas anteriormente no capítulo de produção viral) com o objetivo de aumentar a segurança na sua utilização.

ETAPA 2: Avaliação das potenciais consequências de cada efeito adverso e a magnitude das mesmas.

Para cada efeito adverso anteriormente aferido, as consequências devem ser identificadas e avaliadas. Este processo deve ser feito para os diferentes seres vivos que poderão ser afetados: humanos, animais e plantas.

Adicionalmente, a magnitude dos efeitos deve ser quantificada como método preventivo utilizado na minimização dos efeitos referidos, esta pode ser apresentada como: alta, moderada, baixa ou insignificante. É importante referir que as consequências derivadas da utilização do organismo podem ter início em diferentes momentos temporais, sendo que algumas consequências podem ter início imediato, enquanto outras podem iniciar-se apenas algum tempo após utilização do GMO. De igual modo, estas poderão ser originadas diretamente através do contacto com o vírus (doente tratado com terapia génica) ou ainda

poderão surgir indiretamente, como consequência de recombinação gênica do vírus modificado (GMO) com uma estirpe não modificada do mesmo gênero, causando doença consequentemente a organismos infetados.

Relacionado com a utilização do Kymriah, várias consequências foram devidamente abordadas: potencial oncogênico, potencial teratogênico, infertilidade, mortalidade. Sem dados suficientes para caracterizar as potenciais consequências referidas, todas estas situações são devidamente abordadas no Plano de Gestão de Risco, no qual são propostas medidas preventivas.

ETAPA 3: Avaliação da probabilidade de ocorrência de efeitos adversos identificados.

De modo a aumentar a credibilidade da avaliação dos efeitos adversos identificados e consequências correspondentes, a probabilidade de ocorrência dos mesmos deve ser contabilizada. Posto isto, devem ser consideradas os fatores influenciadores da probabilidade de causar efeito adverso, como por exemplo a natureza do GMO, o mecanismo de reprodução correspondente, o potencial de infecção, o nível de estabilidade e a persistência no meio ambiente. Devem também ser considerado o método como o GMO é libertado no meio ambiente, o número de GMOs utilizados e as particularidades do ambiente onde este é libertado.

O ERA deve focar-se em situações o mais realista possível, através das quais seja possível deduzir probabilidades significativas. Não sendo possível estabelecer um cenário, como anteriormente referido, é aconselhado analisar o “pior cenário possível” de modo a identificar e avaliar potenciais efeitos adversos. Esta abordagem é eficaz uma vez que permite analisar consequências na ausência de dados empíricos de utilização. O uso desta abordagem permite concluir quais são as consequências que necessitam de uma análise mais detalhada com a obtenção de mais dados. Com base nos dados de estudos clínicos realizados com Kymriah, não é possível fornecer uma percentagem quantitativa da probabilidade de ocorrência de cada efeito adverso identificado. Apenas pode ser afirmado a percentagem de ocorrência a nível qualitativo, sendo que para ambos os riscos identificados a probabilidade de ocorrência é baixa.

ETAPA 4: Estimativa do risco apresentado por cada característica do GMO

Este critério resulta da combinação entre a magnitude da consequência de cada efeito adverso potencial identificado com a probabilidade de ocorrência do mesmo. De acordo com a decisão da Comissão Europeia, os dados apresentados devem ser sempre relativos mesmo que qualitativos e devem surgir da comparação com organismos da mesma estirpe sem qualquer

modificação. Os riscos identificados devem ser apresentados sob a forma de tabela, com ambas as variáveis (magnitude e probabilidade) identificadas e relacionadas.

A decisão da Comissão refere ainda que deve ser discutida a incerteza de cada risco abordado no ERA. Caso seja verificada incerteza durante a avaliação do risco, a estimativa do perigo deve ser maximizada garantindo que são tomadas as adequadas medidas de segurança. Relativamente ao Kymriah, este processo foi realizado tendo sido estimados os riscos com as respetivas incertezas, o que contribuiu para a definição e aplicação das medidas de mitigação do risco.

ETAPA 5: Aplicação de estratégias de gestão para riscos provenientes da comercialização dos GMOs.

No desenvolvimento de um GMO, uma das principais abordagens aplicadas como estratégia preventiva de um risco consiste na remoção de elementos genéticos associados a potenciais riscos de forma que estes possam ser mitigados ao máximo. Embora a estratégia de remoção genética seja muito eficaz, existem riscos relacionados com a utilização que se mantêm, sendo necessário o emprego de medidas adicionais. Exemplos destas medidas consistem na utilização de um recipiente eficaz que permite o isolamento do GMO até à sua utilização, o armazenamento ou cuidados relacionados com a utilização que os profissionais de saúde deverão ter aquando da utilização, entre outras.

Deve existir um plano de emergência pronto a aplicar caso se verifique uma situação de perigo, como por exemplo em caso de fuga do GMO devido a uma falha no isolamento do recipiente. Todavia, é recomendado incorporar um plano de monitorização para avaliar as estratégias existentes. Este plano pode ser incorporado com recurso à Farmacovigilância e pode ser designado como PGR. Novos dados sobre a utilização do medicamento ou relacionados com os riscos previamente identificados devem ser incorporados no plano, ajustando as estratégias aplicadas, podendo mesmo alterá-las.

De modo a garantir a segurança da utilização do Kymriah, várias estratégias são aplicadas, sendo estas descritas no PGR, RCM e FI. O manuseamento e a administração do Tisagenlecleucel só é permitida caso estas estratégias sejam aplicadas, como por exemplo a formação dos Profissionais de saúde para o correto manuseamento do fármaco.

O PGR foi estabelecido e aprovado aquando da AIM, sendo este discutido mais à frente. Este integra todos os riscos aferidos permitindo também, a integração de novos dados.

ETAPA 6: Determinação do risco global da utilização do GMO

O ERA apresentado deve enumerar e descrever todas as características com potencial inerente para causar efeitos adversos. Idealmente deve ser apresentado uma descrição de todos os tópicos (1 a 5) para cada atributo do GMO. Esta descrição deve apresentar uma perspectiva geral do risco potencial para a saúde humana e para o ambiente, resultante da utilização do medicamento com o GMO incluído e ainda, deve referir as incertezas relacionadas com o seu uso.

Deste modo, o último tópico deve apresentar uma avaliação do risco global de utilização, tendo em conta todos os riscos aferidos assim como as medidas preventivas propostas. Com recurso a esta avaliação final, deverá ser possível concluir se o impacto ambiental resultante da preparação e utilização é aceitável e se a relação risco/benefício é positiva permitindo assim o uso seguro do GMO, e consequentemente, do medicamento.

Juntamente com a AIM, foi entregue o ERA do Kymriah. Este obteve uma avaliação positiva, sendo a sua utilização segura. Foi concluído que o impacto ambiental resultante da sua utilização não é significativo e é devidamente abordado no PGR, existindo medidas suficientes e eficazes que permitam que a utilização seja segura.

Mutagênese de Inserção

A terapia gênica com base em células geneticamente modificadas tem sido desenvolvida com a utilização de vetores virais para inserção de genes em células do doente. Sendo integrativos, a inserção tem que ser dirigida de forma a não causar mutagênese no genoma do hospedeiro. Os lentivírus são vírus integrativos, têm a capacidade de inserir uma sequência gênica no genoma do hospedeiro de forma estável e duradoura.

O risco de mutagênese aumenta quando o vetor utilizado possui promotores ativos como é o caso dos LTR (*long terminal repeat*). Estes contêm fortes sequências promotoras que possuem a capacidade de ativar oncogenes, uma vez integrados no genoma, o que constitui um risco no caso de os genes vizinhos serem oncogenes. Deste modo, a utilização de LTR deve ser evitada.

Durante o processo de produção do Tisagenlecleucel são usados lentivírus. A ocorrência de mutagênese é um risco que tem que ser devidamente abordado e ponderado. Dado a novidade desta terapia, é importante qualificar o padrão de integração dos vetores utilizados, limitando a possibilidade de integração *off-target* o que leva, conseqüentemente a eventos adversos.

A novidade do fármaco, assim como do processo de produção requerem uma análise detalhada que permita perceber o padrão de distribuição do vetor de acordo com a capacidade integrativa e um estudo de clonagem a nível molecular tanto em estudos pré-clínicos como clínicos, se estes forem significativos. Estes estudos vão permitir perceber melhor a biologia inerente do vetor de modo que o seu perfil de segurança possa ser melhorado. Deste modo, deve ser estabelecida uma estratégia clara e documentada que permita ser demonstrada a minimização do risco de mutagênese.

a) Metodologias que reduzem o risco de mutagênese

Uma das estratégias que pode ser atualmente utilizada como forma de prevenção da mutagênese consiste na inserção de sequências isolantes da cromatina (“*chromatin insulators*”). Estes funcionam como barreiras naturais que impossibilitam interações entre o vetor integrante e o genoma do hospedeiro, contudo a eficácia é limitada, podendo gerar transcrições da fusão de ambos.

- ✓ Aspectos a avaliar em modelos pré-clínicos (*Reflection paper on management of clinical risks deriving from insertional mutagenesis*)

Com o objetivo de diminuir o risco de mutagênese, vários modelos pré-clínicos têm sido estabelecidos. Deste modo, o uso de ratinhos como recetor de células tem sido um dos modelos mais utilizados, no entanto foi verificado que este era

pouco fidedigno dado que a ocorrência de leucemias e linfomas é baixa, mesmo quando são usados vetores com uma elevada taxa de mutagênese. Sendo necessário estudos mais longos ou um número maior de animais sujeitos a terapia. Pelo contrário, a possibilidade de aumentar o número de infusões como forma de acelerar o processo de hematopoiese também não é viável, uma vez que não se trata de um processo natural e por isso acaba por não ser representativo.

Estudos para avaliar a genotoxicidade em modelos animais doentes também são considerados válidos, uma vez que permitem avaliar o perfil de integração do vetor assim como a ação terapêutica do transgene. No entanto, estes modelos apresentam algumas limitações, nomeadamente em relação à imunidade que não é relevante em relação à do homem.

Por fim, podem ser utilizados modelos de ratinhos onde os seus genomas foram parcialmente modificados, sendo pré-sensibilizados à ativação oncogénica conferida pelo vetor. Estes modelos representam uma abordagem muito mais significativa na avaliação da genotoxicidade relativamente a ratinhos normais ou previamente doentes. Todavia, existem alguns aspetos negativos, nomeadamente o potencial oncogénico inerente a estes modelos pode ser uma variável de incerteza quando são administrados novos vetores. Estes podem apresentar uma taxa mais baixa de mutagênese, no entanto nestes modelos, dificilmente, vai ser avaliada com clareza.

No futuro, poderá ser utilizada uma abordagem conjunta onde será possível avaliar a mutagênese em modelos animais doentes e sensibilizados para a ativação oncogénica, sendo um modelo mais fiável para avaliação deste parâmetro.

✓ Aspetos a avaliar em ensaios Clínicos (*Reflection paper on management of clinical risks deriving from insertional mutagenesis*)

Dado a novidade desta metodologia, existem poucos dados que permitem fazer uma caracterização realista do risco. Contudo, atualmente sabe-se que o potencial desenvolvimento de um tumor leva anos e que eventos de mutagênese não são uma causa direta do processo oncogénico, mas sim fatores que contribuem para o desenvolvimento ou aceleração deste.

Deste modo, são feitas fortes recomendações pelas autoridades de acordo com o potencial risco identificado.

Importância da ligação entre Qualidade e Farmacovigilância

Da análise e controlo do processo de fabrico das matérias-primas e posteriormente, da substância ativa/ produto final conclui-se que a qualidade é condição fundamental que tem que ser garantida para existir segurança e eficácia na prática clínica.

Ao contrário dos fármacos sintetizados por via química, Tisagenleucel é um medicamento de terapia génica, com muitos requisitos de produção. Todos estes têm que ser cumpridos de acordo com as condições de aprovação da AIM.

Devido ao curto período de AIM e à inovação desta terapia imunológica (*CAR-T cells*), a abordagem baseada no risco assume um papel fundamental como ferramenta para garantir a eficácia e a segurança dos doentes.

Com base em todos os resultados obtidos previamente à AIM e de acordo com a abordagem acima referida, foram estabelecidos diferentes riscos de acordo com as etapas de produção e, segundo estes, foi proposto um Plano de Gestão de Risco com diferentes medidas face aos riscos apresentados.

É importante realçar que neste tipo de terapias, a Qualidade do Medicamento e a Farmacovigilância são temáticas paralelas. Contudo, a Farmacovigilância é a ferramenta de excelência baseada em Abordagem de Risco que irá permitir a correta identificação e caracterização dos riscos relacionados com as reações notificadas. Deste modo, uma maior segurança e eficácia vão ser garantidas durante a utilização clínica do Tisagenleucel.

Estes medicamentos são produzidos de forma individual, ou seja, cada medicamento representa um lote, ao contrário dos medicamentos de síntese química. A abordagem do risco em todas as suas componentes: possíveis reações adversas sofridas pelo doente ou por terceiros, necessária qualificação dos centros de infusão e formação dos Profissionais de Saúde e ainda, verificação dos procedimentos a tomar pelos mesmos vai permitir reduzir eventuais fontes de erro no caso de ser verificada alguma reação adversa.

Através do uso da Farmacovigilância aliada com a Abordagem de Risco, os riscos vão ser constantemente ajustados com base no conhecimento adquirido, o que irá permitir proceder a alterações aos processos de produção e/ou administração, caso sejam aferidos novos dados com impacto nos dados registados previamente.

A Farmacovigilância é apresentada como uma ciência com um contributo significativo na realização da Abordagem de Risco, permitindo de forma mais eficaz realizar as 4 etapas desta:

- ✓ Identificar os riscos associados ao uso clínico de um medicamento de terapia avançada;
- ✓ Identificar os fatores específicos do medicamento que têm impacto em cada risco identificado;

- ✓ Relacionar os dados relevantes para cada fator de risco identificado em relação a cada um dos riscos identificados;
- ✓ Estabelecer as relações de causalidade para cada fator de risco;

Deste modo a eficácia e segurança são asseguradas nestas terapias inovadoras. De seguida, vão ser apresentadas as medidas de Farmacovigilância propostas para cada risco identificado, possível ou suspeito (*missing information*). Todos estes foram aferidos com recurso à Abordagem de Risco e constam no Plano de Gestão de Risco.

FARMACOVIGILÂNCIA – SISTEMA DE GESTÃO DO RISCO

DEFINIÇÃO

Pode ser assumido que a indústria farmacêutica, ao longo dos anos, teve um forte crescimento económico com o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos. Todavia e apesar das inúmeras vantagens que os fármacos acarretam, há riscos na toma destes. Devido ao facto de serem substâncias químicas ou biológicas e existir incertezas quando em interação com o organismo, a toma de medicamentos pode ter consequências catastróficas. Prova destas consequências foi a relação causal atribuída entre a toma de Clorafenicol e o aparecimento de anemia aplástica que, levou nos anos 50, ao surgimento da “*Emenda Durham-Humphrey*” onde, pela primeira vez se definiram os produtos medicamentosos que devem ser “vendidos sob receita médica” e os que não necessitam de “receita médica”. (*Farmacovigilância em Portugal, 25+, 2018*).

No entanto, foi necessário mais uns anos para ocorrer o “Desastre da Talidomida”, onde cerca de milhares de crianças desenvolveram focomelia por exposição intrauterina à talidomida, sendo esta receitada a milhares de mulheres grávidas de forma a diminuir os sintomas de enjojo matinal. Após este desastre de proporções colossais, houve uma consciencialização dos riscos na toma de fármacos, tendo esta situação servido como primeiro estímulo na criação da Farmacovigilância.

Após este acontecimento, várias medidas foram acordadas como forma de reduzir desastres da mesma amplitude, sendo que uma delas foi: Adoção da Emenda ao Federal *Food, Drug and Cosmetic Act* de 1938, instituindo a investigação clínica para demonstração da segurança, nomeadamente com a pesquisa de efeitos iatrogénicos medicamentosos (*Farmacovigilância em Portugal, 25+, 2018*).

Deste modo, a Farmacovigilância foi cada vez mais bem estabelecida, abordando de forma cada vez mais pormenorizada, o risco dos medicamentos das mais variadas classes, de forma que estes possam ser fornecidos à população com a maior segurança possível.

Sendo uma área em constante desenvolvimento, a última atualização significativa remete-nos para o ano 2012, onde foi aprovada pela Comissão Europeia (CE) uma nova legislação com o objetivo de melhorar a Farmacovigilância aplicada aos fármacos circulantes na União Europeia, permitindo uma maior harmonização e evitando potenciais barreiras entre Estados Membros de modo a garantir a sua livre circulação, alcançado a proteção da saúde pública.

Consequentemente a Farmacovigilância pode ser definida como a “ciência e atividades relativas à identificação, avaliação, compreensão e prevenção de efeitos adversos ou quaisquer problemas relacionados ao uso de medicamentos” (OMS). Cabe assim à Farmacovigilância

avaliar a longo prazo a segurança e eficácia dos medicamentos colocados no mercado, sendo uma ciência fundamental na manutenção da relação Benefício/Risco (B/R) do medicamento. Dispõe de várias ferramentas que tornam esta monitorização possível. No seguinte esquema, encontram-se enumerados alguns exemplos:

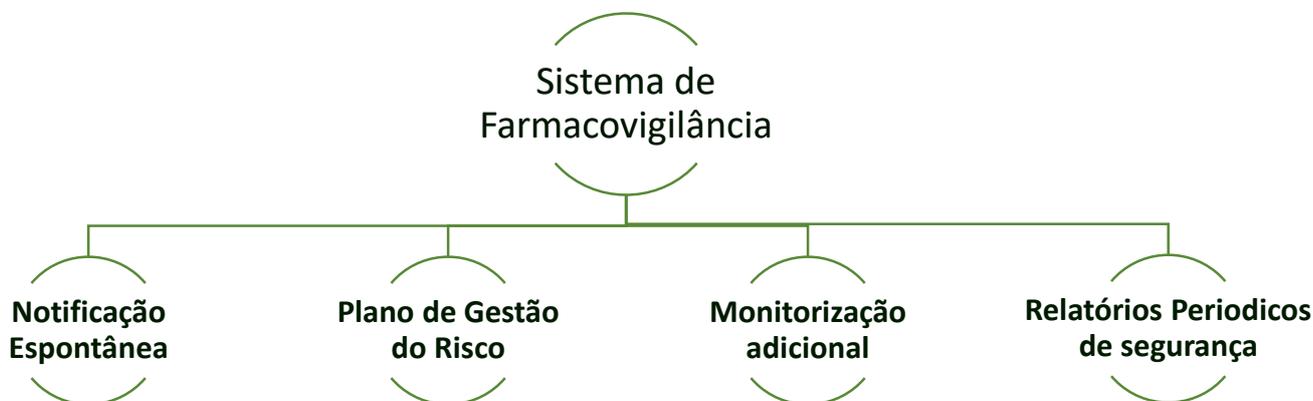


Figura 3: Representação esquemática de algumas ferramentas utilizadas pela Farmacovigilância.

NOTIFICAÇÃO ESPONTÂNEA

A notificação espontânea é um processo base na Farmacovigilância. Este processo permite a geração de sinais sobre um risco ou de informação que seja desconhecida ou que se encontre subvalorizada e que pode ter um impacto revelante na relação B/R do medicamento. Estes sinais podem depois ser avaliados em estudos observacionais ou intervencionais, de acordo com o modelo de estudo que mais se adequa.

É um método transversal a toda a população, o que significa que qualquer pessoa com mais ou menos conhecimento científico acerca do medicamento que ingeriu ou da patologia que sofre pode notificar. Podemos definir notificação espontânea “como uma comunicação solicitada, proveniente de um profissional de saúde ou de um utente (utilizador) a uma autoridade competente, titular de autorização de introdução no mercado ou outra organização (e.g. centros regionais de Farmacovigilância, centro de controlo de venenos), que descreve uma ou mais reações adversas suspeitas, sofridas por um doente a quem foi administrado um ou mais medicamentos, e que não deriva da realização de um estudo ou de um sistema de recolha organizada de dados” (GVP, module VI ⁴).

Este efeito é denominado como “Reação Adversa (RA)”. A nova legislação de 2012 alterou também este termo, tornando-o mais abrangente. Deste modo, reação adversa deixou de ser

unicamente efeitos nocivos ou anómalos, e engloba atualmente efeitos derivados de sobredosagem, erros de medicação, abuso, *off-label*, casos de exposição ocupacional e falta de eficácia. Esta notificação é fundamental para um maior conhecimento do fármaco, sendo que as notificações a longo prazo permitem um acréscimo significativo de informação que não foi possível descobrir durante os estudos clínicos.

O procedimento de notificar também foi modificado, devido à implementação da nova legislação em Portugal. Houve a criação de uma plataforma online denominada de “Portal RAM (Portal de submissão eletrónica de reações adversas medicamentosas)” que permite por parte de qualquer utente ou profissional de saúde a conceção de uma notificação eficaz. Anteriormente ao Portal, apenas os profissionais de saúde podiam notificar suspeitas de reações adversas, o que implicava que o doente tivesse que se dirigir, obrigatoriamente, a um profissional de saúde caso quisesse notificar um efeito adverso. Deste modo, o Portal veio facilitar o processo de notificação, promovendo a integração dos doentes e eliminar algumas barreiras existentes. Contém a opção de ser preenchido por um profissional de saúde ou por um doente, o que faz com que seja uma ferramenta verdadeiramente versátil.

Adicionalmente, é de referir que o Portal RAM agilizou algumas questões, nomeadamente facilitou o preenchimento, gravação dos dados do notificador e o envio destas notificações para a base de dados a nível europeu, a Eudravigilance. Por conseguinte, o impacto do Portal foi muito positivo uma vez que permitiu ultrapassar várias questões que contribuíam para a subnotificação, sendo esta o maior obstáculo relacionado com a Notificação Espontânea. Deste modo, o Portal funcionou como um estímulo junto de toda a população e foi apresentado como uma ferramenta que aumentou a adesão.

Foram feitas várias intervenções educacionais, nomeadamente ações de formação junto dos profissionais de saúde entre outras, de modo a alertar a população alvo sobre a necessidade e a importância da notificação. Consequentemente, o número de notificações tem aumentado de forma gradual, o que representa um ganho significativo de eficácia do Sistema de Farmacovigilância.

Evolução 1992 – 2018

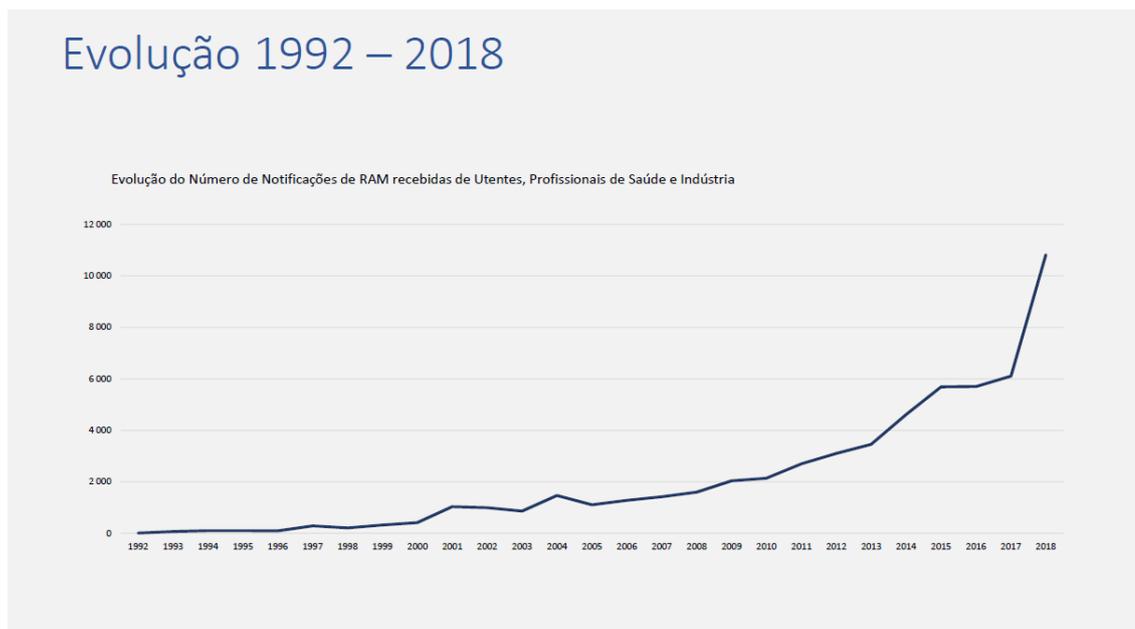


Figura 4: Evolução do n.º de notificações de RAM (Casuística de 2018). (Retirado de [63])

a) Notificações espontâneas – Tisagenlecleucel

A autorização de introdução no mercado resultou de um procedimento centralizado, sendo que esta foi concedida pela Comissão Europeia (CE) em 23/08/2018. Deste modo, o Kymriah obteve diretamente aprovação em todos os Estados Membros (EM) abrangidos pela Autoridade Europeia – *European Medicine Agency* (EMA).

Cada Estado Membro, após a autorização pode comercializar o medicamento no espaço nacional abrangente. No caso de Portugal, o Tisagenlecleucel ainda não se encontra comercializado, razão pela qual não é possível recolher notificações espontâneas.

Contudo, após o início da sua comercialização, quaisquer efeitos indesejáveis podem ser notificados, pelo doente que adquire Tisagenlecleucel assim como pelo profissional de saúde que prescreve, administra ou prepara. As notificações podem ser feitas ao representante nacional do titular, neste caso a Novartis ou então pode fazê-lo diretamente a autoridade nacional competente, o Infarmed I.P. Estas podem ser efetuadas através do Portal RAM, como anteriormente referido, ou então poderão ser registadas em formato papel, preenchendo devidamente os formulários.

PLANO DE GESTÃO DO RISCO

Com a legislação de 2012 surgiu o novo modelo de PGR. Em 2006 tivemos o primeiro modelo de PGR aprovado na UE. Os primórdios do PGR surgiram com a diretiva 2001/83/EC



Figura 5: Evolução e organização do Plano de Gestão de Risco. (Retirado de [50])

Diretamente ligado com o Sistema de Gestão do Risco (SGR), este consiste num documento dinâmico onde estão descritas todas as questões de segurança (*safety concerns*) e a gestão das mesmas.

Estas questões abrangem todos os riscos acerca do medicamento, independentemente do grau de informação que existe para caracterizar estes mesmos riscos. Deste modo, podemos dividir as preocupações de segurança em 3 grupos principais:

Tabela 4: Questões de segurança “*Safety concerns*”

Important Identified Risks	Engloba riscos ou sinais/sintomas que são indesejáveis no doente que toma o medicamento. Existe evidência científica suficiente para associar o aparecimento destes riscos com a toma do medicamento. Constituem o grupo dos eventos adversos e podem ser notificados em estudos clínicos, estudos epidemiológicos, uso <i>off-label</i> , decorrente do mau uso clínico, notificações espontâneas entre outras possibilidades.
Important Potential Risks	Contém de igual forma riscos ou sinais/ sintomas que são indesejáveis no doente, mas neste caso não existe evidência científica suficiente para comprovar a relação de causalidade com a toma do medicamento. Deste modo, existe só evidência científica suficiente para suspeitar de uma possível reação adversa (ex: quando se verifica teratogenicidade em ensaios pré-clínicos mas não são feitos estudos clínicos em mulheres grávidas ou são identificados riscos de outros medicamentos com o mesmo mecanismo de ação e da mesma classe)
Missing Information	Esta designação pode ser atribuída a falhas de conhecimento sobre o medicamento, aspetos que não foram abordados nos estudos clínicos. Exemplos destas falhas são: <ul style="list-style-type: none"> • As potenciais consequências no uso por longos períodos de tempo (este aspeto por vezes não é possível de clarificar devido a curta duração dos ensaios clínicos); • Uso do medicamento em populações que não foram estudadas nos estudos clínicos (crianças, idosos);

Por conseguinte, um plano de gestão do risco deve focar-se nos riscos identificados importantes “*important identified risks*” que possam ter um impacto direto na relação benefício/risco do medicamento. Deste modo, devem existir medidas de minimização para minimizar estes riscos e estes devem ser devidamente avaliados no plano de Farmacovigilância, garantido a sua correta caracterização.

Por outro lado, os riscos potenciais importantes “*important potential risks*” que são incluídos nos Planos de Risco, precisam de uma avaliação mais pormenorizada. No PGR deve constar o método como o titular pretende conhece-los, caracteriza-los e consequentemente minimiza-los de forma mais eficaz. No entanto, este tipo de riscos só deve ser integrado no plano de gestão do risco quando é verificado que podem eventualmente ter um impacto na relação benefício/risco após avaliação mais detalhada. Um exemplo destes riscos baseia-se num evento adverso que pode eventualmente ser atribuído a um uso fora da indicação para a qual o medicamento foi aprovado numa população que não foi estudada (por exemplo: uso *off label* em crianças).

Em relação à informação em falta “*missing information*”, esta só deve ser incluída caso o medicamento possa ser usado em áreas desconhecidas e para as quais se espera um perfil de segurança diferente daquelas áreas estudadas nos ensaios clínicos. É importante referir que nem toda a informação em falta deve ser incluída no plano de gestão do risco.

Consequentemente, o plano de gestão do risco é um documento dinâmico, pois podem ser adicionados riscos que inicialmente eram desconhecidos assim como, estes podem ser retirados após uso bem estabelecido do medicamento, passando a ser corretamente geridos sem necessidade de medidas adicionais de minimização do risco. À medida que o conhecimento acerca do medicamento aumenta, as mensagens transmitidas nas medidas adicionais de minimização do risco passam a estar bem incorporadas na prática clínica, não havendo necessidade de continuarem a existir. Os riscos estão minimizados porque o público-alvo destas medidas já conhece bem quais os riscos do medicamento e como os minimizar, ou seja, incorporam as mensagens transmitidas nas medidas adicionais do risco na sua prática normal, passando a ser de rotina.

A sua elaboração é feita pelo titular e pode ser submetido em qualquer fase do ciclo de vida do medicamento, sendo que a partir de 2012 passou a ser obrigatório para todas as novas Autorizações de Introdução no Mercado, sendo então submetido logo no início do ciclo de vida juntamente com o dossier de autorização.

Este documento surgiu da necessidade de gerir os riscos dos novos medicamentos que aparecem no mercado. No momento de autorização de introdução no mercado, existem

muitos fatores e informações que são desconhecidas. Isto ocorre devido ao facto que o medicamento é testado num ambiente clínico muito controlado, onde a população alvo de estudo é uma população extremamente controlada: não há toma concomitante de outros medicamentos ou terapêuticas, determinados grupos de população são excluídos (grávidas, crianças, idosos), doentes com patologias associadas também são excluídos, entre outros. Deste modo, os dados de segurança obtidos em ensaios clínicos podem não ser totalmente extrapoláveis para o uso do medicamento na vida real. Devido ao ambiente controlado dos ensaios clínicos e aos múltiplos fatores de medicação concomitante e patologias concomitantes que podem alterar o perfil de segurança do medicamento. Consequentemente, devido a esta necessidade de gerir os riscos de uma nova AIM, surgiu como medida preventiva, os Planos de Gestão do Risco. Esta ferramenta mudou o modo de ação da Farmacovigilância, deixando de ser essencialmente reativa agindo com base em sinais levantados ou questões de segurança que têm impacto direto na relação Benefício/Risco e passou a ser uma área proactiva, a qual tenta o mais cedo possível, definir e prever riscos e consequentemente, minimiza-los. Deste modo, a gestão do risco tornou-se numa área vital para a Farmacovigilância, sendo fundamental para cumprir o seu principal objetivo- potenciar ao máximo os benefícios dos medicamentos, minimizando os riscos.

Por conseguinte, o plano de gestão do risco além dos riscos, contém uma descrição geral do medicamento, o plano de Farmacovigilância onde são apresentadas todas as atividades previstas com o objetivo de caracterizar o perfil de segurança do medicamento e os planos dos estudos de eficácia pós-autorização. Por fim, também são apresentadas as medidas que pretendem prevenir ou minimizar os riscos que estão associados à toma do medicamento.

As atividades de Farmacovigilância apresentadas no PGR podem ser divididas em dois grandes grupos, designadamente: rotina ou adicionais.

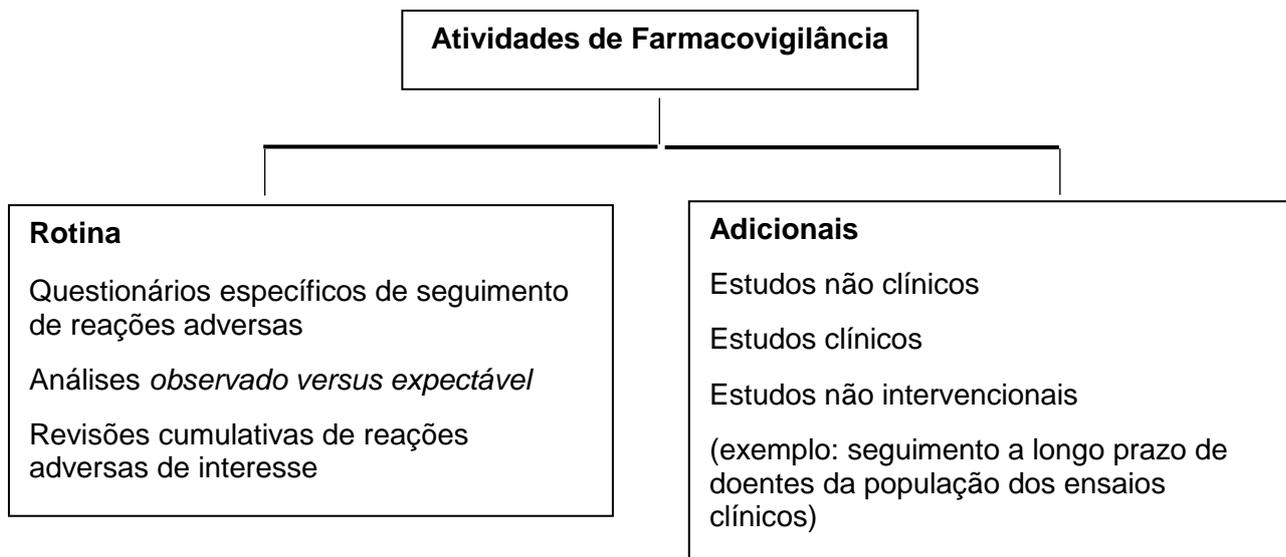


Figura 6: Atividades de Farmacovigilância. (Retirado de [57])

No plano de Farmacovigilância apenas têm de estar especificadas atividades de Farmacovigilância de rotina que não sejam a monitorização de sinais e a recolha de RAM, por isso há muitos medicamentos que têm esta secção em branco, simplesmente dizem que não está nada previsto para além do sinal e RAM.

Nesta secção do PGR devem apenas ser descritas as atividades que diferem dos requisitos normais. Um exemplo de uma atividade de rotina que deve ser incluída e descrita nesta secção do PGR são os questionários devidamente elaborados para o seguimento de reações adversas. Caso seja estabelecido, como requisito da AIM a existência desse questionário, o titular deve nesta secção descrever os questionários que serão usados de modo a dar cumprimento ao requisito estabelecido.

Por outro lado, as atividades adicionais de Farmacovigilância são todas aquelas que não são consideradas de rotina, sendo criadas e adaptadas para cada situação específica. Dentro deste grupo estão incluídos estudos epidemiológicos (não intervencionais), de modo a seguir uma coorte de doentes que foi inicialmente tratada com o fármaco em causa. Os estudos que são incluídos no plano de Farmacovigilância relacionam-se diretamente com os riscos previamente aferidos, com a informação que se encontra em falta e que pode ter um impacto significativo no perfil de segurança do doente e ainda podem ter como objetivo avaliar a eficácia das medidas de minimização aplicadas.

De igual modo às atividades de Farmacovigilância anteriormente referidas, são também apresentados no PGR as medidas de minimização do risco. Estas surgem como uma consequência do desenvolvimento do medicamento, da epidemiologia da patologia em causa, das questões de segurança levantadas como por exemplo, uma determinada população que

não é alvo dos estudos feitos e do plano de Farmacovigilância. As medidas de minimização do risco, à semelhança das atividades são também divididas em dois grandes grupos: rotina e adicionais.

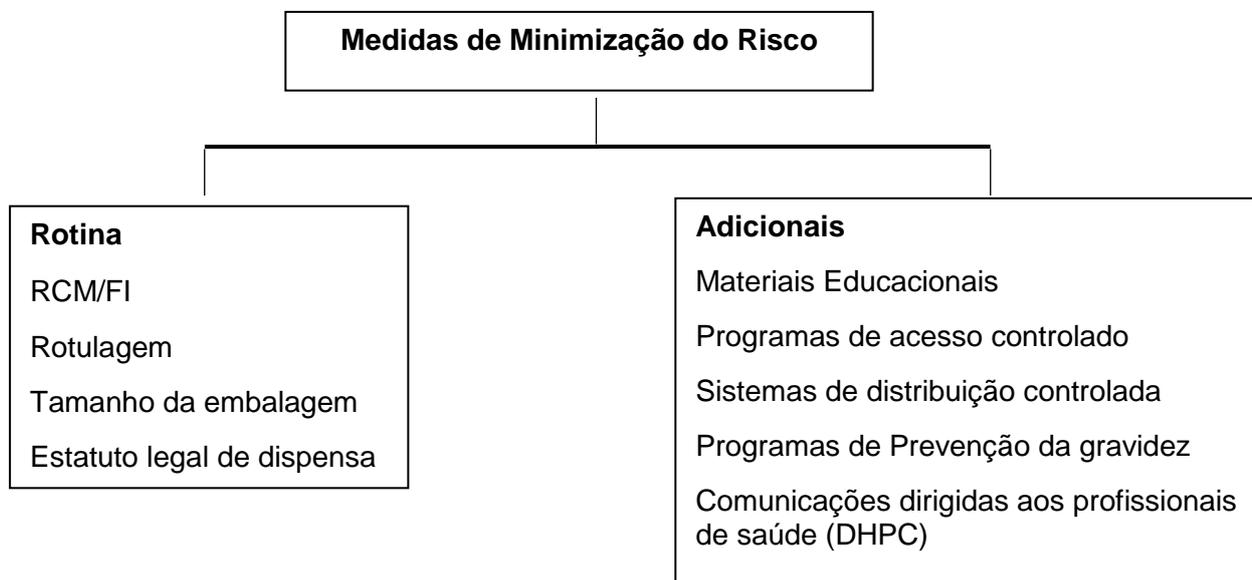


Figura 7: Medidas de Minimização do Risco. (Retirado de [57])

As medidas de minimização do risco de rotina aplicam-se a todos os medicamentos, sendo que o principal objetivo das mesmas é eliminar ou minimizar riscos inerentes à toma do medicamento, otimizando o benefício/risco dos mesmos. Por outro lado, as medidas de minimização do risco adicionais aplicam-se quando se verifica que existe um risco específico na toma/administração do medicamento e é verificada a necessidade da aplicação de mais medidas ou medidas com maior especificidade para tentar minimizar esse risco. Neste caso, medidas adicionais de minimização do risco são colocadas em prática juntamente com medidas de rotina de modo a promover a máxima minimização dos riscos.

Outro aspeto muito importante relacionado com a implementação das medidas de minimização do risco é a avaliação da sua efetividade. A criação/aplicação destas medidas cria outro risco que precisa de igual modo ser monitorizado: se estas são de facto implementadas e se a sua implementação é correta e eficaz. Consequentemente é necessário na Farmacovigilância, metodologias que permitam a avaliação deste aspeto. Estas devem ser aplicadas após um período de implementação das medidas de minimização do risco, sendo este mutável conforme a necessidade de avaliação. Questionários direcionados aos profissionais de saúde ou aos doentes poderão constituir uma das metodologias, como por exemplo os DUS (*drug utilisation studies*) que permitem verificar se a prática de utilização de

um medicamento se modificou. Usualmente estes estudos são aplicados a medicamentos que já se encontram no mercado e permitem verificar o número de prescrições antes e depois da implementação das medidas adicionais. A efetividade da aplicação das medidas de minimização de risco é deste modo crucial para perceber se as medidas aplicadas são eficazes ou se por outro lado, há necessidade de implementar mais medidas.

ESTRUTURA DE UM PLANO DE GESTÃO DO RISCO

Um plano de gestão de risco divide-se em 7 partes principais:

I. Descrição Geral do Medicamento

Neste parâmetro é contida informação geral acerca do medicamento, nomeadamente qual a substância ativa, o nome do titular e quais as indicações terapêuticas a que se destina.

II. Especificações de segurança

Neste ponto são discutidas as especificações de segurança, avaliando detalhadamente o perfil de segurança do fármaco.

Neste ponto, é apresentado um resumo de:

- *Important identified risks*
- *Important potential risks*
- *Missing information*

As especificações de segurança ainda se ramificam em 8 módulos. Estas servem de base para a elaboração de um plano de Farmacovigilância, uma vez que são suficientemente claras para perceber quais as ações que se devem aplicar e quais os riscos que se devem avaliar assim como descobrir informação em falta.

III. Plano de Farmacovigilância (incluindo estudos de segurança pós- autorização)

Nesta secção são apresentadas as atividades que são inicialmente planeadas com o objetivo de clarificar melhor os riscos que foram definidos aquando do desenvolvimento do fármaco. Um dos objetivos das atividades apresentadas neste plano é caracterizar pormenorizadamente os riscos, relatando a sua gravidade, frequência e fatores de risco que podem estar associados ao mesmo. Este vai definir como vai ser obtida a informação em falta e definir ferramentas que permitem perceber se um potencial risco deve ser considerado como identificado ou, por outro lado refutado.

O plano de Farmacovigilância permite também medir a efetividade das medidas de minimização do risco e pode apresentar, quando relevante, a esquematização de um ou mais estudos de segurança pós-autorização (PASS: *post-authorization safety studies*) para avaliar uma questão específica relacionada com a segurança.

Nesta secção, quando necessário, é apresentada uma tabela com as atividades de adicionais de Farmacovigilância. Estas podem ser de três tipos diferentes:

Tabela 5: Atividades adicionais de Farmacovigilância. (Retirado de [28])

	Type of activity	In annex II of MA (CAPs only)	Study category (PhV plan)	Status	Supervised under	
					Article 107m	Article 107 n-q
Imposed PASS	"Interventional"*	Yes, in annex IID	1	Mandatory and subject to penalties	No	No
	Non-interventional	Yes, in annex IID			Yes	Yes
Specific obligation	"Interventional"*	Yes, in annex IIE	2	Mandatory and subject to penalties	No	No
	Non-interventional	Yes, in annex IIE			Yes	Yes
Required	"Interventional"*	No	3	Legally enforceable	No	No
	Non-interventional	No			Yes	No

*Clinical interventional studies are subject to the requirements of Directive 2001/20/EC. Non-clinical interventional studies are subject to the legal and ethical requirements related to the protection of laboratory animals, and Good Laboratory Practice as appropriate.

Na tabela são indicadas 3 variantes de atividades adicionais de Farmacovigilância. A categoria número 1 "*Imposed PASS*" corresponde a um estudo que é imposto no momento da atribuição da AIM, pois este é referente a aspetos fundamentais relacionados com o perfil benefício/risco do medicamento. Deste modo, o titular é obrigado a realiza-lo sob pena de ser sujeito a penalidades caso não o faça.

A categoria número 2 "*Specific Obligation*" é atribuída a estudos que são realizados como obrigações específicas no âmbito da atribuição de uma AIM condicional ou da atribuição de uma AIM sob condições excepcionais. À semelhança da categoria 1, o titular é obrigado a realizar estes estudos sob pena de sofrer represálias.

Por fim, a categoria número 3 “*Required*” corresponde a estudos que são requeridos para analisar questões de segurança levantadas ou avaliar a efetividade das medidas de minimização do risco. O nível de obrigatoriedade é diferente, contudo apesar de não existirem penalidades, estes estudos tem um carácter de “legalmente executável”, o que significa que o titular tem que executa-los.

IV. Planos para estudos de eficácia pós-autorização (PAES: *post-authorization efficacy studies*)

Estudos de eficácia são por vezes necessários para avaliação mais pormenorizada da relação Benefício/Risco do medicamento. Isto acontece devido, por exemplo, a AIMS condicionadas que no momento de atribuição da AIM, o titular fica responsável por desenvolver um estudo de eficácia pós-autorização para avaliar questões onde a eficácia do fármaco não foi demonstrada nos ensaios clínicos de forma clara, sendo por isso necessário um estudo para esclarecer este ponto e a pertinência do fármaco em determinada indicação terapêutica.

V. Medidas de minimização do Risco

As medidas de minimização do risco são apresentadas de acordo com as especificações de segurança estabelecidas na secção 2 do PGR.

Consistem em ações que são estabelecidas com o objetivo de minimizar ou mitigar os riscos relacionados com a toma do fármaco. A eficácia destas deve ser avaliada regularmente de modo a perceber se de facto os riscos estão a ser mitigados ou se há necessidade de mais ou novas medidas de minimização.

VI. Resumo do plano de gestão do risco

Nesta secção deve ser apresentada um resumo consistente com a informação que é apresentada nos diferentes módulos (II, III, IV e V). Informações como a indicação terapêutica e as medidas de minimização dos riscos devem ser expostas nesta secção.

VII. Anexos

Por último, na secção “anexos” deve ser incluída toda a informação complementar. Esta secção encontra-se dividida em 8 anexos, sendo que cada anexo é direcionado para temáticas diferentes. É importante referir que esta secção não é de carácter obrigatório, logo poderão existir PGRs com todos os anexos elaborados assim como, poderão existir PGRs só com alguns anexos. A elaboração de cada anexo relaciona-se com a informação existente acerca do medicamento, por exemplo caso um PGR apresente no plano de Farmacovigilância a futura realização de um PASS, o protocolo deste deverá ser incluído no anexo 3. Por outro lado, caso não existam quaisquer estudos planeados ou a ocorrer, o anexo 3 deixa de fazer sentido não constando no PGR final.

Table V.1. Overview of the RMP parts and modules

Part I	Product(s) overview
Part II	Safety specification
Module SI	Epidemiology of the indication(s) and target population(s)
Module SII	Non-clinical part of the safety specification
Module SIII	Clinical trial exposure
Module SIV	Populations not studied in clinical trials
Module SV	Post-authorisation experience
Module SVI	Additional EU requirements for the safety specification
Module SVII	Identified and potential risks
Module SVIII	Summary of the safety concerns
Part III	Pharmacovigilance plan (including post-authorisation safety studies)
Part IV	Plans for post-authorisation efficacy studies
Part V	Risk minimisation measures (including evaluation of the effectiveness of risk minimisation activities)
Part VI	Summary of the risk management plan
Part VII	Annexes

Figura 8: Constituição de um Plano de Gestão de Risco-As 2 partes principais e os respetivos módulos.

a) Plano de Gestão do Risco do Tisagenleucel

Parte II- Especificações de segurança

Como referido anteriormente, o objetivo das especificações do risco é promover uma correta avaliação do perfil de segurança do medicamento. As especificações apresentadas nesta secção

servem de base para o plano de Farmacovigilância assim como para o plano de minimização do risco.

Deste modo, de acordo com os estudos clínicos realizados com Kymriah, são apresentadas as seguintes especificações de segurança:

Summary of safety concerns	
Important identified risks	<ul style="list-style-type: none"> • Cytokine release syndrome • Infections • Serious neurological adverse reactions • Tumor lysis syndrome • Prolonged depletion of normal B-cells/ Agammaglobulinemia • Hematopoietic cytopenias not resolved by day 28
Important potential risks	<ul style="list-style-type: none"> • Cerebral edema • Generation of replication competent lentivirus • Secondary malignancies (including vector insertion site oligo/monoclonality) • New occurrence or exacerbation of an autoimmune disorder • Hematological disorders (incl. aplastic anemia and bone marrow failure) • Aggravation of graft-versus-host disease • Transmission of infectious agents • Decrease in cell viability due to inappropriate handling of the product
Missing information	<ul style="list-style-type: none"> • Use in pregnancy and lactation • Use in patients with HBV/HCV/HIV • Use in patients with active CNS involvement by malignancy • Long-term safety • Immunogenicity

Figura 9: Especificações de Segurança. (Retirado do EPAR – *European public Assessment Report*)

Após a lista das “Safety Concerns” apresentada, é necessário implementar as devidas medidas de minimização do risco, assim como obter dados de segurança a longo prazo, de forma a caracterizar com mais detalhe as preocupações de segurança.

Alguns dos riscos que foram identificados foi a síndrome de libertação de citocinas, a ocorrência de eventos neurológicos e de infecções. A identificação destes riscos era esperada dado ser uma imunoterapia com recurso a lentivírus.

Parte III- Plano de Farmacovigilância

O objetivo do plano de Farmacovigilância apresentado nesta secção é o de apresentar quais as atividades que vão caracterizar melhor os riscos aferidos anteriormente, assim como qual a melhor forma de obter a informação considerada desconhecida.

Deste modo, para o Tisagenlecleucel foi definido no plano de Farmacovigilância a necessidade de um estudo pós-AIM que permitisse estudar a segurança a longo prazo de todos os doentes que foram expostos ao Kymriah, de modo a verificar a segurança desta terapia.

A este estudo é atribuída a denominação de PASS (*post authorization safety study*) tem como objetivos identificar, caracterizar ou quantificar qualquer problema de segurança, investigar o perfil de segurança do fármaco ao qual se aplica e ainda medir a efetividade das medidas de minimização do risco previamente acordadas.

A realização deste estudo é essencial, uma vez que Tisagenlecleucel é um medicamento de terapia génica onde é utilizada uma versão alterada de um lentivírus (HIV-1). Tendo em conta todas as preocupações de segurança que estão diretamente associadas com a utilização deste vírus (inserção de mutagénese, recuperação da capacidade de replicação), o processo de produção do fármaco e os perigos associados (cadeia de rastreabilidade, mudanças de temperatura) associado ao tempo limitado dos estudos clínicos, este PASS vai permitir responder à maioria das questões de segurança levantadas e permitir aferir a segurança desta terapia. Consequentemente foi estabelecido o seguinte PASS:

Descrição	Data limite
Estudo de segurança pós-autorização (PASS) não intervencional: De modo a caracterizar melhor a segurança – incluindo a segurança a longo prazo – de Kymriah, o requerente deve realizar e submeter um estudo baseado em dados de um registro de doentes com LLA e LDGCB.	Relatórios atualizados: Relatórios de segurança anuais e relatórios interinos de 5 anos em 5 anos Relatório final dos resultados dos estudos: dezembro de 2038

Figura 10. Estudo PASS acordado em AIM. (Retirado de [44])

Design – Este estudo vai ser multicêntrico e prospetivo. Vai ser um estudo observacional, não intervencional, o que significa que Tisagenlecleucel vai ser avaliado na sua prática clínica normal, a escolha da terapêutica não vai depender de qualquer protocolo e não serão utilizados quaisquer procedimentos diagnóstico adicionais.

População – Todos os doentes tratados com Tisagenlecleucel poderão integrar este estudo (crianças e adultos de ambas indicações terapêuticas). O doente pode ser recrutado no dia anterior à infusão, ou até no máximo 3 meses após infusão. O estudo vai ter uma duração cerca de 20 anos (data final: Dezembro de 2038), onde nos primeiros 5 anos há um acompanhamento muito próximo do doente, de modo a monitorizar o seu estado clínico e de seguida, é adicionado um *follow up* com duração de 15 anos, no qual são incluídos todos os doentes recrutados e tratados com Kymriah de modo avaliar tanto a eficácia como a segurança a longo prazo.

Objetivo do estudo – Avaliar o tipo, a frequência e a severidade de todas as reações adversas de acordo com todas as *safety concerns* propostas.

Parte IV – Planos para estudos de eficácia Pós-Autorização

Nesta secção são incluídos os PAES (*post authorization efficacy study*). De forma similar aos PASS, os PAES são também um modelo de estudo que se realiza após autorização, todavia estes têm como objetivo o esclarecimento de questões relacionadas com a eficácia. Atualmente existem patologias, que tal como a LLA e a DLBCL, não tem qualquer opção terapêutica eficaz, acabando por causar a morte aos doentes afetados. Dada a escassez de opções com eficácia terapêutica, o que ocorre muitas vezes é que estes doentes em risco de vida são tratados com fármacos ainda em fase II dos ensaios clínicos, pois este tratamento é a única opção viável com alguma probabilidade de sucesso. A fase II consiste no estudo do medicamento num número limitado de doentes com a patologia para a qual o fármaco está a ser desenvolvido onde os objetivos principais a serem avaliados passam por avaliar a eficácia terapêutica, definir a dose e curva de relação dose/resposta.

É neste cenário que alguns medicamentos, recentemente, têm obtido a sua AIM sendo o Tisagenlecleucel um exemplo. Dado a escassez e a vulnerabilidade dos doentes, estes foram tratados com Kymriah, tendo sido verificada eficácia terapêutica suficiente para justificar a sua AIM. Contudo, é importante referir que muitos destes doentes, tratados nestas condições, já foram anteriormente submetidos a outras opções terapêuticas, o que acaba por gerar uma variável de confundimento em relação à eficácia da terapia atual.

Esta situação foi refletida no estudo clínico desenvolvido na segunda indicação terapêutica. Os doentes recrutados para o C2201 apresentavam um estado muito débil, onde durante o período de espera (entre a leucoforese e a administração de Kymriah) foram tratados com quimioterapia linfodepletora. Após a toma desta e a administração de Tisagenlecleucel foram

verificadas algumas melhorias significativas nos doentes que completaram o estudo. Contudo, uma questão que foi levantada no final do estudo é se de facto, esta melhoria no estado clínico pode de facto ser atribuída a Tisagenlecleucel ou à terapia que foi administrada previamente. Até ao momento da toma de Tisagenlecleucel, outras opções terapêuticas foram utilizadas uma vez que Tisagenlecleucel não é um medicamento de primeira linha em nenhuma das indicações. Deste modo, é necessário questionar se as opções terapêuticas administradas previamente podem, de algum modo, influenciar a ação terapêutica de Kymriah, potenciando-a ou diminuindo-a.

Posto isto e verificados os resultados nos ensaios clínicos, vários PAES foram requeridos como forma de evidenciar a eficácia de Tisagenlecleucel

<p>Estudo de eficácia pós-autorização (PAES): De modo a caracterizar melhor a eficácia e a segurança de Kymriah em doentes com LLA com menos de 3 anos de idade, o requerente deve realizar e submeter um estudo baseado em dados de um registo de doentes com LLA.</p>	<p>Relatórios atualizados: Incluídos como parte dos relatórios anuais do estudo não intervencional PASS</p> <p>Relatório final: dezembro de 2023</p>
<p>Estudo de eficácia pós-autorização (PAES): De modo a avaliar melhor a eficácia de Kymriah em doentes com LDGCB recidivante/refratário, o requerente deve realizar e submeter um estudo observacional, prospetivo, em doentes com LDGCB r/r baseado em dados de registo com medida de resultados de eficácia em linha com o estudo C2201, incluindo detalhes do tempo de retorno de fabrico <i>manufacturing turnaround time</i> (isto é, tempo desde a última recidiva ou estado refratário confirmado, tempo desde a decisão de tratar e tempo desde a leucaferese até à perfusão).</p>	<p>junho de 2022</p>
<p>Estudo de eficácia pós-autorização (PAES): De modo a caracterizar melhor a eficácia a longo prazo e a segurança de Kymriah em LDGCB recidivante ou refratário, o requerente deve submeter 24 meses de seguimento dos doentes no principal <i>Cohort</i> e 24 meses de seguimento de todos os doentes que receberam perfusão do estudo C2201. Além disso, o requerente deve submeter o REC final incluindo 5 anos de seguimento.</p>	<p>Relatórios atualizados: setembro de 2019, novembro de 2020</p> <p>REC final: agosto de 2023</p>
<p>Estudo de eficácia pós-autorização (PAES): De modo a caracterizar melhor a eficácia a longo prazo e a segurança de Kymriah em LDGCB recidivante ou refratário, o requerente deve submeter os resultados do estudo CCTL019H2301 – aberto, de Fase III de Kymriah <i>versus</i> terapêutica padrão em doentes adultos com linfoma não-Hodgkin de células B recidivante ou refratário.</p>	<p>junho de 2022</p>

Figura 11. Estudos PAES acordado em AIM. (Retirado de [44])

- I. O primeiro PAES será feito de modo a caracterizar a eficácia e a segurança em crianças com menos de 3 anos de idade na indicação terapêutica LLA.

Vão ser recolhidas informações sobre a produção de Kymriah e se esta tem impacto na segurança ou na eficácia.

2. O segundo PAES vai ser conduzido em doentes diagnosticados com DLBCL. O objetivo deste é aferir a eficácia nestes doentes. De modo a ser mais significativo, a recolha de dados de eficácia vai seguir os moldes do estudo clínico realizado (C2201). Serão também feitas análises de subgrupo de modo a comparar os resultados com aqueles verificados em ensaios clínicos com todos os doentes em estudo, os doentes que foram inseridos em extensões do estudo (CORAL) e ainda os doentes que foram inseridos apenas no C2201.
3. O terceiro PAES vai ser conduzido com o objetivo de avaliar a eficácia e a segurança a longo prazo em doentes com DLBCL.
4. O quarto PAES é um estudo baseado numa comparação entre duas terapêuticas diferentes (Tisagenlecleucel e a terapêutica padrão) em doentes adultos com linfoma *Non-Hodgkin's Lymphoma* (NHL) de células B recidivo ou refratário. O resultado desta comparação tem como objetivo melhorar a caracterização da segurança e a eficácia a longo prazo do uso de Kymriah em doentes com DLBCL.

Parte V – Medidas de Minimização do Risco

a) MEDIDAS DE MINIMIZAÇÃO DO RISCO- ROTINA

1- Resumo de Características do medicamento (RCM)

Este documento é destinado aos profissionais de saúde. Possui informações acerca da patologia, dados de eficácia clínica incluindo reações adversas ocorridas durante os estudos clínicos, propriedades farmacológicas e ainda informações farmacêuticas como precauções especiais de utilização ou eliminação.

2- Folheto Informativo (FI)

Por outro lado, este documento é destinado aos doentes. Contém informações base acerca do Kymriah, advertências e precauções que deve tomar, informações que deve

fornecer ao médico antes de iniciar o tratamento, o modo de administração assim como, possíveis reações adversas que o doente pode sofrer ao longo do tratamento.

3- Estatuto legal de dispensa

O Kymriah é um medicamento sujeito a prescrição médica restrita, sendo que este medicamento só pode ser prescrito por médicos com especialidade médica relacionado com a patologia. Este modo de dispensa surge assim como uma medida de minimização do risco, uma vez que permite controlar o número de unidades de Tisagenlecleucel que são dispensadas.

Este tipo de dispensa médica aplica-se uma vez que o diagnóstico de ambas as patologias para as quais Tisagenlecleucel está indicado é feito em ambiente hospitalar, a administração tem que ser feita neste ambiente uma vez que esta requer procedimentos invasivos. Logo, são necessários profissionais de saúde devidamente qualificados. Por fim, a toma deste medicamento pode resultar em reações adversas graves, colocando a vida do doente em risco (exemplo: síndrome de libertação de citocinas). Deste modo, a administração deste medicamento exige uma monitorização do doente, sendo necessário a sua hospitalização de modo a facilitar esta monitorização.

Medidas de minimização do risco- Rotina: **“Important Identified Risks”**

1- Síndrome de libertação de citocinas

Esta síndrome consiste numa reação imunológica decorrente de terapias com antígenos dos linfócitos T, como é exemplo o Tisagenlecleucel. Corresponde a uma reação que ocorre quando o antígeno infundido se liga com o recetor fisiológico correspondente, causando uma libertação de citocinas. Esta libertação de citocinas quando ocorre de forma descontrolada – “tempestade de citocinas” – pode levar à morte do doente, pois este é exposto a um elevado número de citocinas num período curto de tempo. Foi verificado em estudos clínicos que à medida que a expansão de Tisagenlecleucel aumenta, há um aumento da probabilidade de ocorrência da síndrome, do mesmo modo a gravidade da síndrome é diretamente relacionada com a carga tumoral do doente. Se o doente apresentar uma carga tumoral elevada, existe maior probabilidade de este vir a desenvolver a síndrome e o grau de severidade ser maior. O grau de severidade de ocorrência da síndrome também foi associado com uma maior dose celular dada e com a quimioterapia prévia contendo fludarabina (Brudno, 2018).

Deste modo, são necessárias medidas de monitorização eficazes de modo a evitar a ocorrência desta.

Medida: É proposto a alteração da secção 4.4 do RCM “Advertências e precauções especiais de utilização”, adicionando a seguinte informação:

Recomendação para monitorização dos sinais e sintomas. O titular deve apresentar um algoritmo de gestão da síndrome de libertação de citocinas. Este algoritmo deve fornecer opções de tratamento baseadas no grau de gravidade apresentado. São ainda necessárias precauções antes da administração de Kymriah, nomeadamente, no controlo da carga tumoral.

Tabela 6: Algoritmo de Gestão da síndrome de libertação de citocinas

Gravidade da síndrome de libertação de citocinas	Gestão
<i>Síndrome prodrómica:</i> Febre baixa, fadiga, anorexia	Observação presencial; excluir infeção; administrar antibióticos de acordo com as directrizes locais em caso de neutropenia; suporte sintomático.
<i>Síndrome de libertação de citocinas requerendo intervenção ligeira - uma ou mais das seguintes:</i> – Febre alta – Hipoxia – Hipotensão ligeira	Administrar antipiréticos, oxigénio, fluidos por via intravenosa e/ou dose baixa de vasopressor, conforme necessário.
<i>Síndrome de libertação de citocinas requerendo intervenção moderada a agressiva - uma ou mais das seguintes:</i> – Instabilidade hemodinâmica apesar dos fluidos por via intravenosa e suporte vasopressor – Agravamento da dificuldade respiratória, incluindo infiltrados pulmonares, aumento da necessidade de oxigénio incluído oxigénio de alto débito e/ou ventilação mecânica – Deterioração clínica rápida	<ul style="list-style-type: none"> • Administrar doses altas ou múltiplos vasopressores, oxigénio, ventilação mecânica e/ou outro cuidado de suporte, conforme necessário. • Administrar tocilizumab. <ul style="list-style-type: none"> - Peso do doente inferior a 30 kg: 12 mg/kg via intravenosa durante 1 hora - Peso do doente \geq30 kg: 8 mg/kg via intravenosa durante 1 hora (dose máxima 800 mg) <p>Repetir tocilizumab conforme necessário com um intervalo mínimo de 8 horas se não houver melhoria clínica.</p> <p>Na ausência de resposta a segunda dose de tocilizumab, considerar uma terceira dose de tocilizumab ou procurar medidas alternativas de tratamento da síndrome de libertação de citocinas.</p> <p>Limite a um total máximo de 4 doses de tocilizumab.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Na ausência de melhoria dentro de 12 a 18 horas após a primeira dose de tocilizumab, ou agravamento em qualquer momento, administrar metilprednisolona 2 mg/kg como dose inicial, depois 2 mg/kg por dia até os vasopressores e oxigénio de alto débito não serem necessários, depois reduzir gradualmente.

O algoritmo apresentado foi concebido especificamente para gerir as reações relacionadas com a libertação de citocinas diretamente associadas à toma de Kymriah. Um aspeto importante a referir é que a utilização do algoritmo implica a administração de vasopressores e Tocilizumab. Deste modo, é indispensável a existência destas duas terapias nos centros onde é administrado Kymriah.

É proposto a conceção de uma secção 2.2 no FI “O que precisa de saber antes de tomar Kymriah” com o propósito de informar o doente sobre todos os riscos, precauções a ter e potenciais consequências antes de tomar Kymriah. Esta medida aplica-se a todos riscos identificados.

2- Infeções

A ocorrência de infeções durante ou após o tratamento com Tisagenlecleucel representa uma das reações adversas com maior probabilidade de ocorrer, sendo que estas podem ser causadas por vírus ou bactérias. Os fatores que contribuem em grande maioria para o desenvolvimento destas são a doença base (LLA ou DLBCL) que estimula o desenvolvimento de infeções e a quimioterapia prévia que é administrada ao doente antes da administração de Kymriah como parte do protocolo clínico. Esta é linfodepletora, causando neutropenia induzida para favorecer o “*engraftment*” das células geneticamente modificadas. Associado à toma de Tisagenlecleucel pode também estar associado diagnósticos de hipogamaglobulinemia.

Ambas as condições são propensas ao desenvolvimento de infeções, uma vez que o sistema imune se encontra fragilizado. De modo a evitar esta reação as seguintes medidas foram propostas:

Medida: Na seção 4.4 do RCM é proposto recomendações acerca da profilaxia e o início do tratamento com Kymriah em caso de infeção. Nomeadamente, doentes com infeções em estado ativo não devem iniciar o tratamento antes de estas serem resolvidas. Caso necessário, devem ser administrados antibióticos de largo espectro e devem ser utilizados testes de vigilância durante e após o tratamento de modo que seja possível monitorizar a possível ocorrência de infeções. Após o tratamento, em caso de hipogamaglobulinemia deve haver uma monitorização eficaz dos sinais e sintomas de modo que futuras infeções possam ser evitadas. Esta monitorização deve ter sempre em conta o estado do doente assim como a idade.

3- Eventos Neurológicos graves:

A maioria dos eventos neurológicos ocorreu nas primeiras 8 semanas após infusão do Kymriah. Estes podem ser divididos entre: encefalopatia, estado confusional ou delírio. Mais manifestações destes eventos incluem: afasia, convulsões e distúrbios da fala.

Em estudos clínicos foi estabelecida uma relação entre o aumento da incidência e severidade dos eventos neurológicos com a SLC. Foi possível deduzir que a ocorrência da síndrome potencia a ocorrência destes eventos. Deste modo, torna-se ainda mais necessário controlar a ocorrência da síndrome para minimizar o risco de eventos neurológicos. A severidade destes eventos também foi associada com a dose celular dada ao doente assim como com o regime de quimioterapia que é dado previamente, sugerindo que regimes contendo fludarabina contribuem para uma maior severidade (Brudno, 2018).

Medida: É proposto na seção 4.4 do RCM uma monitorização de sinais e sintomas destes eventos durante e após a resolução da SLC. São feitas recomendações para monitorizar durante e após a ocorrência destes eventos. Os doentes devem ser tratados de modo que os sinais e sintomas diminuam até serem inexistentes. Este tratamento deve ser feito de acordo com as práticas locais e com a opinião clínica. Devem ser aplicadas técnicas de diagnóstico de modo a despistar a possibilidade de ocorrência de qualquer evento.

4- Síndrome de Lise Tumoral (SLT)

É uma condição clínica que pode resultar do tratamento aplicado a diversos tumores, nomeadamente no caso do Tisagenlecleucel onde pode surgir como reação adversa. Ao administrar as células CAR-T devidamente alteradas, estas vão provocar a lise celular dos linfócitos B de forma seletiva. Concomitantemente à lise celular destes linfócitos, é libertado para a corrente sanguínea o seu conteúdo intracelular, nomeadamente ácido nucleico, eletrólitos e metabolitos. Uma vez presente na corrente sanguínea, em concentrações elevadas pode causar hiperuricemia, hipercalemia, hiperfosfatemia e hipocalcemia o que pode causar danos graves na função renal. Para além deste risco, SLT pode ainda causar náuseas, convulsões e em casos mais graves a morte.

Medida: Na recomendação 4.4 do RCM é proposto que os doentes sejam monitorizados em relação aos níveis sérios de ácido úrico e em relação à carga tumoral, uma vez que o aumento desta está diretamente relacionado com a probabilidade de ocorrência desta síndrome. Nos casos de níveis de ácido úrico acima do normal, é recomendado administrar aos doentes Alopurinol – medicamento usado na prática clínica para tratar estes episódios, tendo sido usado nos estudos clínicos sem qualquer risco. A monitorização deve ser também aplicada aos sinais e sintomas apresentados e devem ser tomadas medidas eficazes de diagnóstico e profilaxia de modo que este risco seja o mais minimizado possível.

5- Depleção prolongada dos linfócitos B:

Depleção prolongada dos linfócitos B ou Agamaglobulinemia podem ser verificadas após remissão completa da doença. Ambas as patologias são caracterizadas por níveis séricos de imunoglobulinas reduzidos. De igual forma à neutropenia febril, a quimioterapia prévia dada ao doente é o principal fator que promove o desenvolvimento destas condições clínicas. Devido aos baixos níveis de globulinas, os doentes têm maior probabilidade de desenvolver infeções.

Medida: Na seção 4.4 do RCM encontra-se a recomendação para monitorizar os níveis séricos de imunoglobulinas após o tratamento. Aplicam-se de igual forma as medidas referidas anteriormente para minimizar o risco de neutropenia. Adicionalmente, pode ser utilizada terapia de substituição para repor os níveis de imunoglobulinas.

6- Citopenias hematopoiéticas não resolvidas no dia 28:

Citopenia é caracterizada por um decréscimo no número de elementos celulares presentes no sangue. Existem diferentes tipos de citopenias, nomeadamente: anemia, trombocitopenia, neutropenia, linfopenia e leucopenia. Todos os exemplos apresentados podem levar a graves complicações como o caso de infeções ou problemas hemorrágicos e causar mesmo a morte do doente. A etiologia destas é variada, sendo que a própria doença de base (ALL) pode levar ao desenvolvimento de citopenias, uma vez que há uma grande produção de linfócitos imaturos impedindo a génese de células especializadas como é o caso das plaquetas ou de diferentes tipos de leucócitos. As terapias propostas (quimioterapia prévia e Kymriah) também podem

gerar citopenias, uma vez que estas não são completamente seletivas, acabando por eliminar de igual forma, linfócitos B malignos e linfócitos B saudáveis. Este mecanismo de eliminação interfere com a produção de células.

Posto isto, as citopenias hematopoiéticas com uma duração igual ou superior a 28 dias constituem um risco importante identificado, necessitando de medidas de minimização.

Medida: É recomendado na seção 4.4 do RCM que as citopenias devem ser geridas e tratadas conforme as normas padrão de cada estabelecimento. No entanto, não é recomendado ao doente, até ao dia 28 após infusão de Kymriah, fatores de crescimento mieloide, uma vez que estes podem afetar a SLC.

Deste modo, a administração destes fatores só deve ser feita após este período ou se existirem evidências que a SLC está resolvida, não constituindo qualquer risco para o doente.

Medidas de minimização do risco- Rotina: **“Important Potential Risks”**

I- Edema Cerebral:

Consiste numa acumulação de líquido intracraniano. A etiologia é variada, sendo que a ocorrência de infeções é uma das causas potenciais para a ocorrência deste. Devido a uma infeção existente, há uma inflamação local na qual se verifica uma acumulação de líquido devido ao aumento de permeabilidade característico da condição inflamatória. O edema cerebral é uma condição que acarreta risco de vida. É necessário um tratamento eficaz com fármacos ou processos mais invasivos, como é o caso da cirurgia, a todos os doentes que evidenciarem sintomas ou sinais desta condição.

Durante os estudos clínicos, foram verificados 3 casos fatais de doentes que desenvolveram edema cerebral, contudo estas mortes foram atribuídas a acontecimentos e condições prévias, não sendo diretamente ligadas a administração de Kymriah.

Todavia, o aumento de pressão intracraniana está relacionado a possíveis reações de neurotoxicidade relacionadas com as terapias CAR-T. O mecanismo de ocorrência desta é desconhecido. Causas possíveis são a exacerbação da doença de base ou da fragilidade autoimune do doente, replicação do lentivírus usado na construção das células CAR-T, recaída do doente ou nova incidência de desordens hematológicas. Devido ao curto follow-up efetuado, este risco é considerado potencial.

Medida: Não foi estabelecida nenhuma medida de minimização do risco de rotina.

2- Produção de lentivírus competentes de replicação:

O Kymriah é baseado no conceito de terapia gênica, conseqüentemente são utilizados vírus durante a sua produção. Vários vírus têm sido utilizados sendo que no presente caso são utilizados os lentivírus. Como referido anteriormente, estes possuem inúmeras vantagens, no entanto o risco de replicação indevida tem que ser considerado.

Vários riscos têm que ser considerados neste processo, nomeadamente o potencial de reativação de vírus competentes de replicação, a recombinação *in vivo* com sequências virais endógenas e a inserção de mutagênese.

Conseqüentemente várias abordagens têm sido desenvolvidas, nomeadamente o desenvolvimento de lentivírus não humanos, como é exemplo o vírus responsável pela imunodeficiência felina (FIV) ou o vírus responsável pela imunodeficiência símia (SIV). No entanto, é importante referir que atualmente não são conhecidas as potências conseqüências em caso de infecção por estes vírus.

Medida: Não foi estabelecida nenhuma medida de minimização do risco de rotina. Deste modo devem ser seguidas as orientações que referi em cima- “Desenvolvimento e Fabrico de vetores Lentivirais”.

3- Neoplasias secundárias (incluindo mutagênese de inserção)

Devido ao potencial oncogénico conferido pelo lentivírus associado à produção do Kymriah, a incidência de novas neoplasias ou neoplasias secundárias é um risco potencial que têm que ser considerado. Até ao momento não foram verificadas novas neoplasias, no entanto, durante o período de follow-up, os doentes têm que ser rigorosamente monitorizados para este risco. Todavia, como referido acima, estudos realizados para avaliar o potencial de inserção de mutagênese não relevaram quaisquer padrões de integração ou integração preferencial perto de oncogenes, o que confere alguma segurança em relação ao risco descrito.

Medida: Não foi estabelecida nenhuma medida de minimização do risco de rotina.

4- Incidência ou exacerbação de doenças autoimunes

Devido ao risco de neutropenia febril e hipogamaglobulinemia previamente identificados e caracterizados, o aparecimento ou o agravamento de doenças autoimunes é considerado um risco potencial.

Como referido anteriormente, a quimioterapia linfodepletora administrada é a principal causa de vulnerabilidade do sistema imune juntamente com a doença oncológica. Deste modo, os doentes tratados com Tisagenlecleucel devem ser cuidadosamente monitorizados para o potencial desenvolvimento de doenças autoimunes.

Medida: Não foi estabelecida nenhuma medida de minimização do risco de rotina.

5- Patologias hematológicas (incluindo anemia aplástica e insuficiência da medula óssea)

Com base na possibilidade de ocorrência de citopenia hematopoiética anteriormente caracterizada, os doentes tratados com Tisagenlecleucel tem possibilidades de desenvolver patologias hematológicas como consequência da condição referida. Consequentemente, caso o doente desenvolva uma citopenia após tratamento e esta condição se mantenha por um período superior a 28 dias, é aconselhável monitorizar o doente para o possível desenvolvimento de distúrbios hematológicos de forma a preveni-los.

Medida: Não foi estabelecida nenhuma medida de minimização do risco de rotina.

6- Agravamento da doença do enxerto contra o hospedeiro

A Doença do enxerto contra hospedeiro é uma patologia que tem uma incidência em cerca de metade dos doentes submetidos a transplantes alogénicos. Esta reação pode ser aguda ou crónica, sendo que a primeira ocorre por norma na 3 semana após o transplante, por outro lado, a variante crónica inicia-se cerca de 3 meses após o tratamento.

Como já fora referido, o tratamento com Tisagenlecleucel é um tratamento autólogo, onde os próprios linfócitos T do doente são devidamente alterados e devolvidos. Deste modo, o risco de ocorrência GVHD é baixo. No entanto, uma percentagem dos doentes submetidos ao tratamento com Tisagenlecleucel foi submetida no passado a um transplante alogénico (tratamento padrão nestas patologias), o que aumenta a

probabilidade de ocorrência e torna este risco num risco potencial. Assim sendo, é necessário aplicar medidas de gestão do risco de forma que a ocorrência de GVHD seja minimizada.

Medida: Na secção 4 do RCM em “razões para adiar o tratamento” é referido que um doente que não deve ser tratado com Kymriah se GVHD estiver ativa. Este só deve ser administrado caso a patologia esteja resolvida.

Doentes submetidos a um transplante alogénico num período inferior a 4 meses não devem ser submetidos ao tratamento com Kymriah. É importante referir que esta condição restringe um pouco o universo de população alvo do tratamento, mas de facto, a probabilidade de ocorrência deste evento encontra-se aumentada nestas situações.

Também há uma secção 2.2 no FI “O que precisa de saber antes de tomar Kymriah” com o propósito de informar o doente sobre este risco.

7- Transmissão de agentes infecciosos

Uma vez que Tisagenlecleucel é composto por células humanas, existe um risco potencial de transmissão de infecciosidade viral durante a produção e manuseamento deste fármaco sendo de máxima importância verificar que foram implementadas medidas eficazes que previnam este risco na produção. Após o tratamento, o doente pode de forma indireta receber e transmitir infeção a terceiros através da exposição ao sangue do doente que se encontra infetado. Deste modo, torna-se necessário alertar o doente e os cuidadores sobre este risco.

Medida: É referido na secção 4 do RCM “modo de administração” e na secção 3 do FI “como é administrado Kymriah” que durante o manuseamento de Kymriah, os profissionais de saúde devem tomar as precauções necessárias, utilizando luvas e óculos de modo a evitar qualquer potencial de transmissão do sangue do doente potencialmente infetado.

Relativamente ao risco de transmissão a terceiros, não existem dados suficientes que permitam concluir a probabilidade de ocorrência deste risco, não tendo sido estabelecida nenhuma medida de minimização do risco de rotina. Diretamente, o

doente tratado com Tisagenlecleucel está impossibilitado de doar sangue ou qualquer órgão evitando qualquer possibilidade de transmissão.

8- Diminuição da viabilidade celular devido ao inapropriado manuseamento do produto

A viabilidade celular do Kymriah é crítica e depende da forma como é descongelado e reconstituído no ato de administração. A questão da qualidade do Kymriah é abordada no capítulo 7 – “Método de produção de Kymriah” – e conseqüentemente são apresentadas várias soluções de modo a garantir a qualidade do fármaco. É importante referir que no momento de infusão, Tisagenlecleucel deve apresentar qualidade de modo a garantir a eficácia do fármaco e a segurança do doente.

Medida: São apresentadas recomendações na secção 4 e 6 do RCM relacionadas com o método de descongelação, perfusão e conservação de modo a assegurar a qualidade. Também, importa monitorizar a temperatura e verificar potenciais execuções que poderão danificar Kymriah impedindo a sua utilização durante o transporte em condições térmicas que asseguram a estabilidade.

Medidas de minimização do risco- Rotina: “**Missing Information**”

1- Uso na gravidez e lactação:

Os estudos clínicos não fornecem dados relativamente à utilização de Tisagenlecleucel em grávidas. Todavia, existe um potencial que os linfócitos alterados constituintes da terapia passem para o feto, causando possíveis complicações no recém-nascido. Existe também o risco de serem transmitido no leite materno. Assim, devem ser tomadas medidas eficazes de diminuir uma gravidez não planeada.

Medida: São referidas algumas normas de orientação no RCM na secção 2 e 4.6, nomeadamente, mulheres grávidas ou a amamentar ou ainda, mulheres que tencionam engravidar não devem ser submetidas ao tratamento, sendo estes fatores de exclusão. Deve ser ainda clarificado a todas as mulheres em idade fértil o que é Tisagenlecleucel e as potências conseqüências para o feto caso este seja administrado durante uma gravidez. Deste modo, as mulheres devem ser aconselhadas a tomar métodos de contraceção eficazes de modo a diminuir o risco de gravidez. A contraceção eficaz também se aplica a todos os homens que são ativos sexualmente.

Antes de iniciar o tratamento com Tisagenlecleucel, todas as mulheres devem fazer um teste de gravidez de modo a assegurar que não estão grávidas no momento inicial do tratamento.

Após o tratamento, caso a mulher queira engravidar, é recomendado que fale com o seu médico de modo a assegurar que a sua gravidez possa ser o mais segura possível. Devem ser medidos os valores de imunoglobulinas, isto porque foi verificado que mulheres grávidas que receberam Tisagenlecleucel no passado podem desenvolver hipogamaglobulinemia o que pode levar ao aparecimento de infeções com consequências gravosas para a própria e para o feto.

Também é feita referência na secção 2 no FI “O que precisa de saber antes de tomar Kymriah” de forma a alertar o doente para este risco.

2- Uso em doentes com HBV, HCV ou HIV:

Doentes com estes diagnósticos não entraram nos estudos clínicos que foram feitos. Uma vez que Tisagenlecleucel é produzido utilizando retrovírus, a administração do fármaco neste grupo de doentes poderia levar a eventos de recombinação ou reativação do vírus utilizado durante a produção. Dado que estes doentes se encontram imunocomprometidos, uma ativação do vírus ou recombinação poderia levar à ocorrência de infeções levando, conseqüentemente, à morte do doente. Deste modo, não existem quaisquer dados clínicos neste grupo de doentes.

Medida: Foram incluídas recomendações no RCM, nomeadamente na secção 4.2 e 4.4, onde é referido que doentes com infeções ativas não controladas não devem ser submetidos ao tratamento devido ao possível risco de recombinação/ativação do vírus. Conseqüentemente, o material de leucoferese destes doentes não deve ser aceite.

De igual modo, é feita referência na secção 2 no FI “O que precisa de saber antes de tomar Kymriah” de forma a alertar o doente para este risco.

3- Uso em doentes com complicações malignas ativas no Sistema Nervoso Central (SNC):

Não foram recolhidos dados clínicos em doentes com patologias que afetam significativamente o SNC, como é o caso de leucemias ou linfomas. Os principais motivos prendem-se com a probabilidade de Tisagenlecleucel tem de desenvolver

eventos adversos neurológicos e a fragilidade do doente conferida pela própria patologia, sendo fator de exclusão e limitante para o doente.

Medida: Foi incluída na seção 4.4 do RCM uma recomendação onde refere que administração de Kymriah nestes doentes não foi feita, não existindo assim qualquer informação clínica sobre a eficácia de Kymriah nestes doentes.

4- Segurança a longo prazo:

Tendo em conta que Tisagenlecleucel é um tratamento de terapia génica de única aplicação com efeito expectável para a restante vida do doente, podemos concluir que há falta de informação, nomeadamente sobre a sua eficácia e segurança a longo prazo. Apesar da relevância dos estudos clínicos que foram feitos, estes não permitem tirar conclusões acerca destes parâmetros, pois o tempo de duração destes é limitado. Todavia, torna-se essencial perceber se de facto este é eficaz e seguro de modo que as suas AIMS se mantenham viáveis. Assim sendo, é fundamental implementar medidas que permitam obter dados de modo a caracterizar a relação B/R no futuro.

Medida: Não foi estabelecida nenhuma medida de minimização do risco de rotina.

5- Imunogenicidade:

Tisagenlecleucel é uma imunoterapia, o que consequentemente pode desencadear respostas imunitárias inesperadas e perigosas. Deste modo, foram medidos os níveis de anticorpos anti-CAR19 murino (anti-mCAR19) em doentes tratados com Tisagenlecleucel antes e após a toma. Foi verificado um aumento destes anticorpos induzido pelo tratamento cerca de 34,6% dos doentes com ALL e 5% dos doentes com DLBCL. Todavia, este aumento não foi relacionado com a resposta clínica, nem com a persistência ou expansão de Kymriah no doente.

O tempo de follow-up após os estudos clínicos realizados foi reduzido e não permitiu concluir o impacto de Tisagenlecleucel no sistema imune do doente submetido ao tratamento.

Medida: Foi proposto monitorizar a resposta imunológica dos doentes tratados com Kymriah de modo a serem recolhidas mais informações acerca do potencial imunogénico contribuindo para a caracterização do risco.

Apesar de doentes com insuficiência renal, hepática e cardiovascular não terem sido incluídos como “*missing information*”, estes constituem um grupo populacional que deve ser ponderado com especial cuidado aquando do início da terapêutica. Este racional tem por base a etiologia da DLBCL. Ao contrário da ALL, verifica-se que a DLBCL tem uma maior incidência em pessoas acima dos 60 anos, sendo no momento do diagnóstico, a média de idades de 70 anos. Deste modo, é relativamente normal estes doentes apresentarem sintomatologias de base como as insuficiências referidas em cima. Tendo em conta a quantidade limitada de resultados clínicos, este grupo deve ser categorizado como *missing information*, juntamente com doentes em possam desenvolver fortes respostas imunitárias após tratamento com Kymriah.

b) MEDIDAS DE MINIMIZAÇÃO DO RISCO - ADICIONAIS

I- Programas de acesso controlado

Os programas de acesso controlado consistem em intervenções com o objetivo de controlar o acesso ao medicamento. Esta medida aplica-se mediante vários fatores: caso a terapia em causa represente algum risco para a saúde pública; caso esta requeira procedimentos invasivos, para os quais é necessário a experiência e formação de um profissional de saúde e por último, este tipo de acesso contribua para o rácio Benefício/Risco do medicamento, como é o caso do Tisagenlecleucel onde o acesso controlado é um fator positivo para a segurança da terapia.

Contudo, esta medida deve ser devidamente ponderada uma vez que tem um grande impacto para todas as partes envolvidas.

Medida: De modo a atingir este objetivo, atualmente a distribuição autorizada de Kymriah estende-se apenas a centros especializados ou hospitais devidamente formados na dispensa e administração de Kymriah, sendo indispensável, nestes estabelecimentos, o acesso ao Tocilizumab. Este é um anticorpo monoclonal imunossupressor do sistema imunitário. Possui uma ação farmacológica no recetor interleucina-6 (IL-6), sendo administrado em caso de ocorrência de SLC, onde os níveis de interleucinas estão aumentados.

2- Programa educacional

O programa educacional surge como abordagem adicional à informação que é apresentada no RCM e no FI. Pode ter várias variantes como é o caso de diferentes tipos de materiais educacionais de acordo com o público-alvo (profissionais de saúde, doentes, cuidadores) ou pode consistir em ações de formação onde o objetivo final é creditar o centro onde é administrado o medicamento.

A criação destes materiais advém de um risco específico presente no PGR, e por esta razão, estes devem apresentar mensagens claras e conceitos chave em relação à minimização ou prevenção do risco abordado. No conteúdo destes, deve também constar uma mensagem clara que apele à notificação de reações adversas.

Os materiais consistem em comunicações dirigidas onde é dada uma elevada importância ao universo de distribuição, sendo este constituído pela população alvo, método de distribuição e data da mesma.

Alguns dos temas que devem ser abordados por estes materiais são a gestão e alerta dos sinais e sintomas relacionados com a terapia administrada, o correto manuseamento e administração do medicamento, seleção dos doentes, informações especiais que devem ser dadas a estes e informações importantes em relação à gestão do tratamento, nomeadamente: qual a dose indicada, terapia necessária antes da administração, entre outros aspetos.

Medida: De forma a garantir a segurança da administração do Kymriah, os profissionais envolvidos no processo de administração assim como os centros especializados e hospitais devem completar o programa de formação, de modo a ficarem certificados. Este programa educacional abrange:

- O cartão de alerta para o doente. Este vai ser semelhante a um cartão de crédito de modo a incentivar o seu uso por parte do doente. O objetivo deste cartão é identificar que o doente foi tratado com Tisagenlecleucel, uma terapia *CAR-T cell*. Este cartão, apesar de ser do doente tem informação que se destina a qualquer médico que possa tratar o doente.

O doente deve sempre apresentar este cartão quando se dirigir a algum posto médico ou ao hospital, para que, conseqüentemente, os profissionais de saúde responsáveis por quaisquer tratamentos saibam e fiquem alerta acerca de possíveis sinais e sintomas que o doente possa apresentar. Dado o carácter

específico de Tisagenlecleucel, este cartão é muito útil no follow-up do doente. Por este motivo, o doente deve ter sempre este cartão consigo.

Por fim, o cartão ainda fornece algumas orientações, nomeadamente em relação à transplantação de órgãos. Estas são muito claras e indicam que um doente após o tratamento fica impossibilitado de fornecer qualquer órgão ou sangue.

- O folheto educacional para o doente. O folheto é o único documento que tem informação para o doente, não é complemento do cartão, pois o cartão apenas tem informação que se destina a profissionais de saúde. Este deve ser fornecido pelo médico prescritor, de forma semelhante ao cartão de alerta. O objetivo deste folheto é o esclarecimento do doente em relação ao tratamento a que vai ser submetido, assim como as reações adversas com maior probabilidade de ocorrência, de modo que possam ser mais facilmente identificadas, notificadas ao médico responsável pelo tratamento e resolvidas. Alguns tópicos abordados incluem “O que é Kymriah”, “O que devo esperar antes de receber KYMRIA?” ou ainda, “A que tenho de prestar atenção após o tratamento”.

O folheto fornece algumas indicações ao doente. Alguns exemplos consistem na recomendação da distância que deve ser mantida durante as 4 semanas após o tratamento, o possível efeito negativo que pode exercer sob possíveis testes de diagnóstico de HIV (o uso de lentivírus na produção de Tisagenlecleucel pode causar falsos positivos), instruções específicas para o doente, de forma a assegurar um controlo mais eficaz de sinais e sintomas que possam surgir após terapia e por fim, orientações sobre quais os comportamentos que o doente não deve ter após o tratamento, como é o caso da doação de órgãos ou sangue ou a utilização de máquinas ou condução de veículos.

- O programa educacional inclui um guia de slides que é fornecido aos profissionais de saúde no âmbito de uma formação de modo que os mesmos, assim como o centro de formação fiquem acreditados. Nestes slides são apresentadas recomendações de como identificar, prevenir, gerir e monitorizar eventuais sinais e sintomas que podem ocorrer no decorrer do tratamento com Kymriah. As recomendações feitas incidem em três aspetos principais, nomeadamente a síndrome de libertação de citocinas, eventos neurológicos graves e informações que devem ser fornecidas pelo médico ao cuidador e ao doente. Devem também ser fornecidas orientações sobre a notificação de

reações adversas, com o objetivo de promover a correta notificação. Após finalizada esta formação, os médicos estão aptos a usar o medicamento, no entanto o centro só pode dispensar Tisagenlecleucel quando possuir material certificado, as salas necessárias, as doses de Tocilizumab e um sistema de gestão de qualidade bem implementado.

- Deve ser também elaborado um guia de formação destinado aos centros de perfusão de Kymriah. Este deve ser eficazmente distribuído de modo que todos os profissionais de saúde envolvidos no processo de dispensa tenham acesso. Neste guia devem ser fornecidas orientações acerca do correto manuseamento de Kymriah, de modo que sejam asseguradas as devidas condições de descongelamento para que não hajam oscilações de temperatura (exemplo). A temperatura deve ser monitorizada de modo que possa ser garantida a qualidade do medicamento para uma utilização segura.

Este guia deve, de igual modo, alertar para a necessidade de quatro doses de Tocilizumab individuais no respetivo local de tratamento. Estas doses devem encontrar-se disponíveis, a qualquer momento para que possam ser administradas ao doente em caso de necessidade.

3- Rede de distribuição controlada

Esta medida de minimização do risco adicional deve ser aplicada quando o medicamento em causa tem um potencial impacto negativo na saúde pública ou quando utiliza matéria biológica como é o caso dos linfócitos T utilizados no Kymriah. Esta medida garante que todas as fases de distribuição são rastreáveis, permitindo a qualquer momento perceber em que ponto de distribuição o medicamento se encontra, fornecendo também uma perspetiva mais assertiva de quando tempo vai ser necessário até o medicamento chegar ao centro de perfusão, local onde vai ser administrado ao doente.

Esta medida permite um controlo muito apertado em relação a potenciais extravios e fugas, sendo que a probabilidade de estes ocorrerem é praticamente nula. Deste modo, a rede de distribuição é diminuída, sendo que após produção, Kymriah é diretamente encaminhado para os centros de perfusão. A existência de elementos secundários ou terciários responsáveis pela distribuição passa a ser desnecessária, ao contrário da maioria dos medicamentos comercializados que são distribuídos para venda por estes

mesmos elementos. Esta diminuição na cadeia de distribuição surge como uma vantagem, uma vez que se torna mais fácil rastrear pois existem menos elementos intervenientes.

EFETIVIDADE DAS MEDIDAS

A verificação da efetividade das medidas de minimização do risco é um processo necessário e que deve ser feito após a implementação das mesmas. Este é um processo que se encontra associado ao ponto III do PGR “Plano de Farmacovigilância”, como referido anteriormente. Com base no resultado do processo de verificação, podem ser retiradas conclusões acerca da eficácia das medidas implementadas:

- As medidas aplicadas são eficazes na minimização do risco e não é necessário alterá-las ou propor novas medidas;
- As medidas aplicadas são insuficientes, sendo necessário a revisão das mesmas assim como uma proposta com novas medidas.
- Neste caso, os riscos podem também ser alvo de revisão de modo a justificar a proposta de novas medidas. Posto isto, o RCM e o FI podem ser alvo de alterações
- A gestão dos riscos já está bem implementada na prática clínica, não havendo necessidade de continuar com as medidas adicionais de minimização do risco. As medidas podem ser descontinuadas.

Deve ser verificada a efetividade de cada medida assim como de todo o conjunto de medidas implementadas, de modo a clarificar qualquer aspeto negativo que exista. De igual modo, a verificação da efetividade deve ter em conta o uso clínico necessário para colocar as medidas em prática, assim como o tempo necessário para implementação destas. Deste modo, existem metas temporais específicas para proceder à verificação, sendo que a primeira é após a implementação das medidas, entre os 12 e 18 meses iniciais. Posteriormente, estas são alvo constante de avaliação. Consequentemente, há uma reavaliação das medidas uma vez que se o risco for deviatamente gerido na primeira autorização de mercado, provavelmente não serão necessárias as mesmas medidas nas autorizações subsequentes. A pertinência das medidas deve ser devidamente justificada, especialmente das medidas adicionais de minimização do risco.

De modo a facilitar a verificação, são estabelecidos indicadores para avaliar cada medida ou o conjunto de medidas implementadas. Estes indicadores devem estar relacionados com as medidas aplicadas e devem ser concisos de modo a facilitar a avaliação final. Deve ser estabelecido, à priori, o método ou a escala para medir cada indicador de forma a garantir uma interpretação fácil dos resultados.

O processo de verificação deve ser um processo abrangente, de modo a incluir indicadores que permitam avaliar a implementação do plano, como também, indicadores que permitem avaliar se os objetivos finais do plano foram alcançados. Consequentemente foram estabelecidas duas categorias diferentes de indicadores: de processo e indicadores de resultados.

- Os indicadores de processo são fundamentais para avaliar a implementação do processo, garantir que a sua implementação foi bem-sucedida. Fornecem informações acerca da extensão na qual o plano foi implementado e executado, examinando possíveis mudanças na prática clínica. Estes indicadores permitem avaliar se o plano inicialmente proposto é completamente executável e quais são os mecanismos com maior impacto no controlo dos riscos.
- Os indicadores de resultados, ao contrário dos anteriormente referidos, permitem analisar resultados finais, ou seja, avaliam por exemplo, se o número de reações adversas após implementação das medidas diminuiu. No caso de este ter diminuído, existe evidência que a implementação do plano foi eficaz, pois o risco de ocorrência de reação adversa foi diminuído. Estes indicadores fornecem informações relacionadas com o nível de controlo que foi alcançado graças as medidas previamente impostas.

Deve ser tido em conta que ambas as categorias são necessárias e não existe uma que se sobreponha a outra. Logo para uma verificação da efetividade eficaz devem ser estabelecidos indicadores de ambas as categorias, de modo que todo o processo de implementação do plano seja avaliado.

Ao verificar a efetividade das medidas, é importante também verificar se as mesmas tiveram algum impacto negativo junto dos profissionais de saúde assim como junto aos utentes que utilizam o medicamento. Um exemplo de uma possível consequência negativa que pode ser aferida, é o excesso de informação junto do profissional de saúde. Este excesso de informação

ao contrário do objetivo inicial de clarificar e auxiliar a toma, pode induzir dúvidas e práticas contraditórias induzindo ainda mais riscos dos que inicialmente identificados.

a) Efetividade das medidas de Minimização do risco do Tisagenlecleucel

Analisando todos os riscos que foram associados ao uso corrente de Kymriah, vários indicadores têm que ser estabelecidos de modo a verificar se os riscos foram minimizados.

Em termos de indicadores de processo, são enumerados abaixo alguns exemplos:

- Alcance da população alvo- este indicador deve focar-se na rede de distribuição. Uma rede de distribuição eficiente é primordial para a eficácia do programa educacional proposto, uma vez que as mensagens-chaves presentes neste programa só serão implementadas caso os materiais sejam corretamente entregues aos seus destinatários. Assim sendo, devem ser implementadas medidas, como por exemplo o envio por correio registado ou a entrega em mão, de modo a assegurar esta distribuição. No caso de Kymriah, o programa educacional vai ser entregue em mão de modo a minimizar qualquer problema relacionado com o alcance.
- Avaliação do conhecimento- Um objetivo inerente à existência de materiais tem o intuito de ensinar e orientar os profissionais de saúde na administração e manuseamento do fármaco. Contudo, uma forma eficaz de avaliar a aprendizagem destes profissionais é questioná-los em relação ao conteúdo como prova de aprendizagem dos mesmos. Neste âmbito, várias abordagens poderão ser feitas como é o caso de questionários em papel, por telefone ou até mesmo *online*.

No caso do Kymriah, este processo não se aplica, uma vez que a administração é bastante complexa e todos os erros de administração devem ser evitados antecipadamente. Deste modo, como só alguns centros estão aptos para fornecer Kymriah, estes devem ser formados previamente de modo a ficarem certificados pelo titular. Ao serem submetidos a esta formação, os centros referenciados ficam certificados, sendo que toda a informação necessária ao correto manuseamento e utilização de Tisagenlecleucel é facultada. Só centros com este grau de certificação estão autorizados a conceder Kymriah.

De seguida, são apresentados os indicadores de resultados:

- Número de reações adversas: este é um dos indicadores mais fiáveis em relação ao controlo do risco. Pode ser estabelecido uma relação praticamente direta entre a minimização do número de reações adversas notificadas e o aumento da segurança na toma do fármaco. Deste modo, são utilizados os RPS (Relatórios Periódicos de

Segurança) para enumerar todas as reações adversas ocorridas num determinado intervalo temporal. Estes relatórios para além de possuírem uma descrição de todas as reações relacionadas com os riscos anteriormente identificados, permitem também a recolha de reações adversas inesperadas, o que permite identificar potenciais sinais de segurança, contribuindo para a identificação de novos riscos. Vão ser apresentados RPS pelo titular do Kymriah e estes vão permitir avaliar o número de reações adversas ocorridas. Em detalhe, vai ser avaliado o número de reações relacionadas com a ocorrência da síndrome de libertação de citocinas, uma vez que é uma das maiores preocupações de segurança e para a qual foi estabelecido um algoritmo. O RPS permite, deste modo, avaliar a efetividade deste algoritmo.

- Estudos observacionais pós-AIM: Estes estudos podem ser estabelecidos e até requeridos no momento de atribuição da AIM como uma condição da mesma. Permitem avaliar a segurança e verificar potenciais alterações na relação B/R do medicamento, dado que podem ser feitas comparações com base nos resultados dos estudos clínicos previamente recolhidos. Deste modo, estes estudos acabam por ter um impacto muito significativo na monitorização da segurança do fármaco, pois permitem avaliar a segurança deste na prática clínica real com todas as variáveis existentes. Com o objetivo de monitorizar a segurança do Kymriah, foi estabelecido um PASS, este é mencionado e descrito no Plano de Farmacovigilância. Este foi estabelecido com o intuito de monitorizar a segurança dos doentes tratados com Tisagenlecleucel e avaliar a taxa de reações adversas em comparação com os números obtidos nos ensaios clínicos. Consequentemente vai ser possível constatar a eficácia de todas as medidas de minimização do risco implementadas.

Conclusões

De acordo com o primeiro objetivo estabelecido para este trabalho, todos os requisitos de qualidade foram aferidos, podendo concluir que existem 3 tipos de risco diferentes: riscos associados à produção das matérias-primas nomeadamente vetores lentivirais e a recolha de leucócitos do doente, riscos associados à produção das *CAR-T cells* (substância ativa e produto final, sem distinção entre si) e os riscos associados após produção que estão diretamente ligados com a administração do fármaco ao doente e as possíveis reações adversas que poderão ocorrer após administração.

Pode ser concluído que o processo de produção e administração do Tisagenleucel à semelhança do processo de outros fármacos de terapia génica, como por exemplo, o Yescarta, é bastante complexo existindo inúmeros requisitos de qualidade que têm de ser devidamente aferidos, compreendidos e respeitados para que estas novas terapias imunológicas apresentem eficácia e segurança a longo prazo, sendo deste modo possível reconhecer o seu valor terapêutico.

A abordagem de risco é apresentada neste trabalho como ferramenta essencial para aferir os diferentes riscos. Deste modo, também é abordada a Farmacovigilância e o contributo desta para um alto nível de eficiência na identificação, caracterização e minimização dos riscos. A Farmacovigilância é também apresentada como uma ciência que contribui de forma ativa para a requalificação dos riscos, uma vez que após AIM, vai ser através da Farmacovigilância que os riscos vão ser minimizados, assim como na integração de novos riscos que eventualmente venham a ser identificados, o que irá contribuir para um maior conhecimento do perfil de risco do fármaco e constante aferição do risco/benefício positivo necessário à manutenção no mercado.

Através do correto uso da Farmacovigilância e da Abordagem de Risco, o PGR vai ser constantemente atualizado, permitindo também atualizar as medidas tomadas na prática clínica de modo a salvaguardar o público-alvo.

Após avaliação do PGR, várias foram as medidas que foram tomadas para salvaguardar não só os doentes como todos os indivíduos que entram em contacto direto ou indireto com o Tisagenleucel.

Podemos concluir que o PGR apresenta um nível de medidas necessário e proporcional aos riscos levantados nos Ensaio Clínicos e após comercialização. Adicionalmente, pode ser concluído que a estrutura das medidas proposta, assim como a avaliação da efetividade das mesmas permite rastrear qual a fonte de erro caso seja verificada uma RA sendo possível

identificar as causas e os processos/requisitos de qualidade que precisam de ser alterados de modo a aumentar a qualidade desta terapia.

É indiscutível o valor que a Farmacovigilância e a Abordagem de Risco trazem neste tipo de terapias, uma vez que permitem avaliar e ajustar a forma como as medidas de minimização do risco (rotina e adicionais) são aplicadas de modo a controlar a eficácia e segurança destas medidas.

O contributo da Farmacovigilância é bastante significativo, uma vez que de acordo os resultados obtidos após-AIM é possível melhorar continuamente os processos de produção e administração do Tisagenleucel e aumentar o conhecimento da relação benefício/risco que após os estudos clínicos não é completamente conhecida. Esta começa a ser clarificada após uso bem estabelecido e após um determinado período de AIM.

A Farmacovigilância é uma ciência que permite garantir um incremento de segurança no uso clínico dos medicamentos ao longo da AIM dos mesmos. Contudo nas terapias avançadas, juntamente com a Abordagem de Risco o seu potencial impacto é ainda mais significativo, uma vez que existem vários aspetos acerca destas terapias que são desconhecidos devido ao seu carácter inovador.

Bibliografia

1. Adukauskienė, D. et al. (2007). Cerebral edema and its treatment. *Medicina (Kaunas)* 43 (2): 170-176
2. Affleck, Valerie, and Elizabeth Ann Stoll. 2018. "Manufacture of Third-Generation Lentivirus for Preclinical Use, with Process Development Considerations for Translation to Good Manufacturing Practice." 29(1): 1–15.
3. Antohe, Mihaela et al. 2019. "Tumor Infiltrating Lymphocytes: The Regulator of Melanoma Evolution (Review)." *Oncology Letters* 17(5): 4155–61.
4. American Cancer Society. Types of Stem Cell Transplants for Cancer Treatment, 30 de Abril de 2019 [Internet]. Retirado de: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/stem-cell-transplant/types-of-transplants.html>
5. American Cancer Society. Non-Hodgkin Lymphoma (Adults), 1 de agosto de 2018. [Internet]. Retirado de: <https://www.cancer.org/cancer/non-hodgkin-lymphoma.html>
6. American Cancer Society. What Is Acute Lymphocytic Leukemia (ALL), 17 de outubro de 2018 [Internet]. Retirado de: <https://www.cancer.org/cancer/acute-lymphocytic-leukemia/about/what-is-all.html>
7. BLA 125646 : Tisagenlecleucel, Novartis Pharmaceuticals Corporation. Retirado de: <https://www.fda.gov/media/106081/download>
8. Brudno, J.N. & Kochenderfer, J. N., (2019). Recent advances in CART-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management. *Blood Reviews* 34: 45-55. Retirado de: <https://doi.org/10.1016/j.blre.2018.11.002>
9. Calvo, V. J. M. (2019). Síndrome de lisis tumoral. *Medicina Clínica*:152:397- 404

10. Colomo, L. et al (2003). Clinical impact of the differentiation profile assessed by immunophenotyping in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 101:78-84
11. Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de Agosto. Estatuto do Medicamento
12. Desfarges S, Ciuffi A. (2010). Retroviral integration site selection; *Viruses* 2(1):111-30.
13. DIRECTIVA 2003/63/CE que altera a Diretiva 2001/83/CE do Parlamento Europeu e do Conselho que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos para uso humano.
14. DIRECTIVA 2004/23/CE relativa ao estabelecimento de normas de qualidade e segurança em relação à dádiva, colheita, análise, processamento, preservação, armazenamento e distribuição de tecidos e células de origem humana
15. DIRECTIVA 2009/120/EC que altera a Diretiva 2001/83 / CE do Parlamento Europeu e do Conselho que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos para uso humano no que diz respeito aos medicamentos de terapias avançadas
16. Dull, T et al. 1998. "A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System." *Journal of virology* 72(11): 8463–71.
17. EudraLex - Volume 4 – Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapeutic Medicinal Products. (novembro de 2017)
18. Farmacopeia EU, 04/209:0784.
19. Fesnak, A. D. et al. (2017). Production of Chimeric Antigen Receptor T cells. *Nature Protocols – Recipes for researchers*, [Internet]. Retirado de: www.nature.com/nprot/posters/cart/index.html
20. De Leval, Laurence, and Nancy Lee Harris. 2010. "Diffuse Large B Cell Lymphomas." *The Lymphoid Neoplasms 3ed* 22(5): 560–86.

21. Galimberti, Sara et al. (2019). "The Minimal Residual Disease in Non-Hodgkin's Lymphomas: From the Laboratory to the Clinical Practice." *Frontiers in Oncology* 9(June): 1–15.
22. Generics and Biosimilars Initiative. *Opportunities for biosimilar development*. GaBI Online [www.gabionline.net]. Mol, Belgium: Pro Pharma Communications International; [cited 2012 Jun 29]. Retirado de: www.gabionline.net/Biosimilars/Research/Opportunities-for-biosimilar-development
23. Good Practice on the assessment of GMO-related aspects in the context of clinical trials with human cell genetically modified by means of retro/lentiviral vectors, *version 2*. Retirado de: https://ec.europa.eu/health/human-use/advanced-therapies_en
24. Guideline on development and Manufacture of Lentiviral Vectors. CHMP/BWP/2458/03
25. Guideline on good pharmacovigilance practices (GVP) Module V - Risk management systems (Rev 2). EMA/838713/2011
26. Guideline on good pharmacovigilance practices (GVP) Module XVI - Risk minimisation measures: selection of tools and effectiveness indicators (Rev 2). EMA/204715/2011
27. Guideline on good pharmacovigilance practices (GVP) - Product- or Population-Specific Considerations II: Biological medicinal products EMA/168402/2014
28. Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins. EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006
29. Guideline on safety and efficacy follow-up and risk management of advanced therapy medicinal products. EMEA/149995/2008
30. Guideline on scientific requirements for the environmental risk assessment of gene therapy medicinal products. EMEA/CHMP/GTWP/125491/2006

31. Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014
32. Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells. (Rev. 1) EMA/CAT/GTWP/671639/2008
33. Guideline on the risk based approach according to Annex I, part IV of Directive 2001/83/EC applied to Advanced Therapy Medicinal Products EMA/CAT/CPWP/686637/2011
34. Herdeiro M.T., et al. (2012) O sistema português de farmacovigilância, *Acta Med Port*; 25(4):241-249
35. Hoffman, R. (2008). *Hematology: Basic Principles and Practice*, 5th edition, Churchill Livingstone.
36. ICH Considerations - General Principles to Address the Risk of Inadvertent Germline Integration of Gene Therapy Vectors. CHMP/ICH/469991/2006
37. ICH- Quality of Biotechnology Products: Analysis of the expression construct in cells used for production of r-DNA derived protein products Q5B (versão 4)
38. Inaba, Hiroto, Mel Greaves, and Charles G. Mullighan. 2013. "Acute Lymphoblastic Leukaemia." *The Lancet* 381(9881): 1943–55.
39. Issa, Fadi. 2015. "Remote Control of Therapeutic T Cells through a Small Molecule-Gated Chimeric Receptor." *Transplantation* 99(12): 2434.
40. Ittershagen S., et al. (2019). Industry's Giant Leap into Cellular Therapy: Catalyzing Chimeric Antigen Receptor T Cell (CAR-T) Immunotherapy. *Current Hematologic Malignancy Reports* (2019) 14:47–55. Retirado de: <https://doi.org/10.1007/s11899-019-0498-6>

41. Jones, et al. (2014) *Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer*. *Frontiers in pharmacology* 5: 254.
42. Kymriah, Public summary of opinion on orphan designation. EMA/COMP/603277/2015
43. Kymriah European Public Assessment report. EMA/485563/2018.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/kymriah-epar-public-assessment-report_en.pdf
44. Kymriah, Resumo das Características do Medicamento, 23 de agosto de 2018 [Internet European Medicine Agency.]. Retirado de: <http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/h1297.htm>
45. Lagoa, C. C., et al. *Biotecnología: La vida al servicio de la vida*. 2ª ed. Creaciones, 2010. ISBN: 978-84-92779-70-3
46. Lamprecht, M. & Dansereau, C. (2019). CAR T-Cell Therapy: Update on the State of the Science. *CJON* 2019, **23**(2), 6-12 DOI: 10.1188/19.CJON.S1.6-12. Retirado de: <https://sci-hub.se/https://cjon.ons.org/cjon/23/2/supplement/car-t-cell-therapy-update-state-science>
47. Lee, et al. (2014). Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood* 124.2: 188-195.
48. Lee, S. & Margolin, K. *Curr Oncol Rep* (2012). Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Melanoma 14: 468. Retirado de: <https://doi.org/10.1007/s11912-012-0257-5>
49. Lee, S. & Margolin, K. (2012) Tumour-infiltrating lymphocytes in melanoma. 14(5): 468–474. Retirado de: doi:10.1007/s11912-012-0257-5.
50. Mayall S.J., & Banerjee A.K. (2014). *Therapeutic Risk Management of Medicines*. 1st Edition. Woodhead Publishing Limited; 1-401 p
51. Maus, Marcela V, Stephan A Grupp, David L Porter, and Carl H June. 2014.

- “ANTIBODY DERIVATIVES AS NEW THERAPEUTICS FOR HEMATOLOGIC
Antibody-Modified T Cells: CARs Take the Front Seat for Hematologic
Malignancies.” 123(17): 2625–35.
52. Naldini L., et al. (1996). *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.* Science. 272(5259): 263-267
53. Novartis (2019). Kymriah (tisagenleucel) Suspension for IV infusion. Retirado de:
<https://www.hcp.novartis.com/products/kymriah/acute-lymphoblastic-leukemia-children/mechanism-of-action/>
54. Nunes G. P., (2013). Planos de Gestão de Risco: O papel do Profissional de Assuntos Regulamentares. Retirado de:
https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/editor2/Colegios_de_Especialidade/Titulo_Especialidade/Especialidade_AR/Especialistas_Anteriores/2011/2011_Goncalo_Pedro_Ramires_Nunes.pdf
55. Paul, S. et al (2016). Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. 1(11):1645-1666. Retirado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.09.010>
56. Pasqualucci, L (2013). The Genetic Basis of Diffuse Large B Cell Curr Opin Hematol 4(164): 336–44. Retirado de: doi:10.1097/MOH.0b013e3283623d7f
57. Pêgo, A., et al. *Farmacovigilância em Portugal 25+*. 1ª ed. INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P., 2018. ISBN 978-989-8369-17-8
58. Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA). (2016). Biologics & Biosimilars. Retirado de: <https://www.phrma.org/advocacy/research-development/biologics-biosimilars>
59. Salmikangas, P., Schussler-Lenz, M., Ruiz S., Celis P., Reischl I., Menezes-Ferreira M., Flory E., Renner M. and Ferry N. (2015). Marketing Regulatory Oversight of Advanced Therapy Medicinal Products (ATMP) in Europe: the EMA/CAT Perspective.

in *Regulatory Aspects of Gene Therapy and Cell Therapy Products*. Eds Mercedes Serabian and Maria Cristina Galli.

59. Reflection paper on management of clinical risks deriving from insertional mutagenesis. EMA/CAT/190186/2012
60. REGULAMENTO (CE) N.º 726/2004 que estabelece procedimentos comunitários de autorização e de fiscalização de medicamentos para uso humano e veterinário e que institui uma Agência Europeia de Medicamentos
61. REGULAMENTO (CE) N.º 1394/2007 relativo a medicamentos de terapias avançadas e que altera a Diretiva 2001/83 / CE e Regulamento (CE) n.º 726/2004
62. Relatórios de Análise Periódica de Dados do Infarmed. 2018. Disponível em: [www.infarmed.pt/ Entidades / Farmacovigilância / Desempenho do SNF / relatórios da análise periódica de Dados / Relatório Anual](http://www.infarmed.pt/Entidades/Farmacovigilância/Desempenho%20do%20SNF/relat%C3%B3rios%20da%20an%C3%A1lise%20peri%C3%B3dica%20de%20Dados/Relat%C3%B3rio%20Anual)
63. Rezk, S. et al (2018) Epstein – Barr Virus (EBV) associated lymphoid proliferations, a 2018 update. *Elsevier – Perspectives in pathology* 79, 18-4. Retirado de: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.05.020>
64. Sampaio, C. Medicamentos e planos de gestão de risco – diferentes perspetivas de uma mesma realidade. *Revista Portuguesa de Farmacoterapia*, (2012) 4:29-43
65. *Science*. 2015 Apr 3;348(6230):62-8. doi: 10.1126/science.aaa496
66. Serviço de transplantação de médula óssea. (2010). Doença enxerto contra hospedeiro. Retirado de:
67. Summary of the risk management plan for Kymriah (tisagenlecleucel)
https://www.ema.europa.eu/en/documents/rmp-summary/kymriah-epar-risk-management-plan-summary_en.pdf

68. Vormittag, Philipp, Rebecca Gunn, Sara Ghorashian, and Farlan S. Veraitch. 2018. "A Guide to Manufacturing CAR T Cell Therapies." *Current Opinion in Biotechnology* 53: 164–81. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.01.025>.
69. Young, N. *Clinical Hematology*, 1st edition, Mosby, 2005.
70. Zufferey, R. et al. (1998) Self-Inactivating Lentivirus for Safe and Efficient In Vivo. *Gene Delivery* 72(12): 9873-9880.