

PNRR Missione 4, Componente 2, Investimento 1.4 "Potenziamento strutture di ricerca e creazione di "campioni nazionali di R&S" su alcune Key Enabling Technologies"

Iniziativa finanziata dall'Unione europea - NextGenerationEU.

National Center for Gene Therapy and Drugs based on RNA Technology

Sviluppo di terapia genica e farmaci con tecnologia a RNA

Codice progetto MUR: CN00000041 – CUP UNINA: E63C22000940007

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E CHIRURGIA

CAPITOLATO TECNICO

PROCEDURA APERTA CON APPLICAZIONE DEL CRITERIO DELL'OFFERTA ECONOMICAMENTE PIÙ VANTAGGIOSA INDIVIDUATA SULLA BASE DEL MIGLIOR RAPPORTO QUALITÀ PREZZO, AI SENSI DEGLI ARTT. 71 E 108 COMMA 1 DEL D.LGS. N. 36/2023 S.M.I. AVENTE AD OGGETTO LA FORNITURA DI "VETTORE LENTIVIRALE (LVV) CODIFICANTE RECETTORE CAR SPECIFICO PER ANTIGENE CD19 DI GRADO GMP PER L'APPLICAZIONE DI STUDI CLINICI DI FASE 1 E 2".

Requisiti Tecnici per LVV di Grado GMP con CAR.CD19

L'Università di Napoli Federico II richiede l'attivazione della seguente fornitura: Vettore Lentivirale (LVV) di grado GMP contenente il costrutto CAR.CD19, come specificato di seguito, destinato all'uso in una sperimentazione clinica di Fase II in Italia. La spedizione dovrà essere effettuata presso la struttura GMP dell'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma, che sarà utilizzata come centro di produzione del prodotto a cellule CAR T per la sperimentazione.

Si richiede la fornitura di almeno 40 sacche (ogni sacca per la produzione di almeno 1 lotto/paziente) di grado GMP contenenti un vettore lentivirale (LVV) di terza generazione codificante per un CAR.CD19 di seconda generazione, come specificato di seguito. Il prodotto farmaceutico LVV deve essere sottoposto a filtrazione sterile prima del riempimento finale.

Il prodotto finale deve essere fornito entro 1 mese dalla firma dell'accordo.

La spedizione di tutte le sacche di LVV richieste deve essere effettuata in conformità con le normative GMP.

LVV di grado GMP CAR.CD19

Vettore lentivirale di terza generazione deve contenere un CAR.CD19 di seconda generazione caratterizzato da una sequenza specificata di seguito. Il LVV fornito sarà utilizzato come 'materiale di



partenza' per modificare geneticamente i linfociti T policlonali (transduzione ex vivo) destinati a una sperimentazione clinica di Fase II in Italia. Pertanto, il prodotto fornito deve:

1. Essere conforme alla normativa europea vigente in materia di ATMP e sperimentazioni cliniche nell'UE;
2. Essere prodotto in una struttura europea autorizzata per produzioni GMP;
3. Essere fornito in sacche in un volume per sacca di 10 ml per conformarsi a un protocollo di produzione già approvato;
4. Avere un titolo di LVV compreso tra 1×10^8 - 1×10^9 TU/mL;
5. Essere formulato in un **tampone di formulazione con pH 7.0-7.5**;
6. Essere filtrato a **0,2 μ m** in sacche di plastica pre-sterilizzate e conservato a **-70°C** prima della fornitura in una catena conforme alle GMP.

Descrizione dei Componenti Funzionali del LVV

Il plasmide vettore di trasferimento deve essere un lentivirus di terza generazione con un vettore **auto-inattivante (SIN) basato su HIV-1**.

- L'elemento di envelop deve essere **VSVG**;
- Il promotore per l'espressione di CAR deve essere il **promotore EF-1 α** ;
- Il costrutto CAR deve includere:
 - scFv anti-CD19 derivato dalla sequenza **FMC63**;
 - **spaziatore da sequenza del CD8**;
 - **dominio transmembrana dal gene TNFRSF19**;
 - **dominio co-stimolatorio del 4-1BB**;
 - **dominio di segnalazione da CD3 zeta**.

Questo tipo di costrutto garantirà **coerenza con i dati già ottenuti nelle sperimentazioni cliniche di Fase I**, facilitando l'approvazione della Fase II senza necessità di una sperimentazione di determinazione della dose in Fase I.

L'identità genomica del plasmide deve essere confermata mediante **sequenziamento** e inclusa nelle specifiche di rilascio del plasmide vettore di trasferimento e del vettore lentivirale.

Il LVV deve essere prodotto utilizzando una piattaforma **lentivirale di terza generazione**, con tre plasmidi di impacchettamento per generare vettori lentivirali **replicazione-incompetenti**: uno che esprime **gag/pol**, uno che esprime **rev** e uno che esprime **VSVG**. La produzione del vettore lentivirale deve avvenire in **cellule HEK 293T** con un **processo privo di siero**. L'assenza di contaminazione virale avventizia deve essere certificata e confermata nel lotto fornito con questa gara.

Materie Prime per la Produzione del LVV

Tutti i fornitori delle materie prime devono essere già **qualificati** dal fornitore del LVV secondo i requisiti GMP stabiliti. Le materie prime devono:

- Essere **di qualità GMP** e rilasciate con caratterizzazione specificata nella **Tabella 1**;
- Essere rilasciate secondo le rispettive specifiche, basate su **controlli di qualità**;
- Essere utilizzate per generare **lo specifico lotto** di vettori lentivirali CAR CD19 forniti in questa gara;

- Passare tutti i controlli di qualità specificati prima della fornitura, certificati da un **Certificato di Qualità del Prodotto**.

Il materiale di **imballaggio primario** deve consistere in **sacche sterili di EVA** con due tubi in **PVC/EVA**. Le sacche da **20 mL** devono essere testate per **biocompatibilità** in conformità con le normative **DIN EN ISO**. Il materiale di **imballaggio secondario** deve essere un **sacco biohazard sigillato in polietilene con materiale assorbente**.

Descrizione della Produzione

Il LVV deve essere prodotto e testato sotto un **sistema di gestione della qualità** in conformità alle **linee guida GMP UE**. La produzione deve avvenire in un **processo di sospensione privo di siero**. Le cellule di produzione finali devono essere testate come da indicazione di Farmacopea per la presenza di:

- Lentivirus competenti per la replicazione
- Micoplasma
- Test virali in vitro

Rilascio e Test GMP del LVV

Per il rilascio GMP finale del prodotto LVV, devono essere forniti **test di controllo qualitativo convalidati**, come riportato nella **Tabella 2, includendo**:

- Aspetto
- Identità/Funzionalità
- Integrità genomica
- Titolazione fisica e funzionale
- pH
- Residuo di DNA plasmidico
- Antigene T-Large
- Endonucleasi residua
- Proteine totali
- Residuo di E1A
- DNA totale residuo
- Proteine delle cellule ospiti
- Sterilità
- Endotossine
- Mycoplasma

Aspetti di Sicurezza

Il LVV deve essere fornito con una **dichiarazione del rischio TSE** indicata nel Certificato di Origine.

Stabilità e Shelf-Life

Il fornitore deve garantire un **piano di stabilità** fino a **60 mesi**, comunicando eventuali aggiornamenti al cliente. La **data di retest** deve essere indicata sul Certificato di Qualità del Prodotto secondo lo studio di stabilità condotto.



Tabella 1. Metodi analitici per la caratterizzazione e il rilascio GMP dei vettori transfer e packaging utilizzati per la produzione GMP del LVV.

Saggi	
Proprietà Fisico-chimiche	Apparenza
	pH
Concentrazion e	Concentrazione in gel di agarosio
Identificazione	Identità mediante enzimi di restrizione
	Sequenziamento
Purezza	Purezza (A_{260}/A_{280})
Sicurezza	Sterilità
	Endotossina
	Micoplasma
Impurezze Residue	Residuo di RNA dalle cellule ospite
	Residuo di DNA dalle cellule ospite
	Proteine di <i>E. coli</i>





Tabella 2. Metodi analitici per la caratterizzazione e il rilascio GMP del vettore LVV

Saggio	Specifiche
Contaminazione microbiologica	< 2 CFU/mL
Micoplasma	Minore del limite minimo
In vitro adventitious agents	Minore del limite minimo
Lentivirus competenti per la replicazione	Minore del limite minimo
Titolo infettivo del LVV	> 1.0E8 IU/mL
Sequenziamento genico	99% identico alla sequenza di riferimento
HCP residuo	Limiti come da Farmacopea
HCD residuo	Limiti come da Farmacopea
DNA plasmidico residuo	Limiti come da Farmacopea
E1A DNA residuo	Limiti come da Farmacopea
Endonuclease residuo	Limiti come da Farmacopea
SV40 Large T DNA residuo	Minore del limite minimo
Endotossina	≤ 10 EU/mL
Apparenza	Nessun colore o precipitazioni
Osmolalità	250-450 mOsm/kg
pH	7.5 +/- 0.5
Sterilità	Nessuna crescita
Bacteriostasis/Fungistasis	Assenza di inibizione

Responsabile Unico del Progetto
Dott. Mauro Ciriello

