

MODELO DE RESUMEN DE LA NOTIFICACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE DISTINTOS DE LAS PLANTAS SUPERIORES DE ACUERDO CON EL ARTÍCULO 11 DE LA DIRECTIVA 2001/18/CE

A. Información de carácter general:

1. Detalles de la notificación

a) Estado miembro de la notificación:	ESPAÑA
b) Número de la notificación:	B/ES/12/37
c) Fecha del acuse de recibo de la notificación:	12/9/2012
d) Título del proyecto:	Ensayo clínico Fase I/II para evaluar la seguridad y eficacia de la infusión de células CD34+ autólogas movilizadas con mozobil y filgrastim y transducidas con un vector lentiviral portador del gen FANCA (medicamento huérfano) para pacientes con Anemia de Fanconi del Subtipo A
e) Período propuesto para la liberación:	Inclusión primer paciente: Junio-2013 Inclusión último paciente: Junio-2016

2. Notificador

Nombre de la institución o empresa:	Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT)
-------------------------------------	---

3. Definición de la OMG

a) Indíquese si el OMG es:	Viroide <input type="checkbox"/> Virus ARN <input type="checkbox"/> Virus ADN <input type="checkbox"/> Bacteria <input type="checkbox"/> Hongo <input type="checkbox"/> Animal <input type="checkbox"/> - mamíferos <input checked="" type="checkbox"/> - insectos <input type="checkbox"/> - peces <input type="checkbox"/> - otro animal <input type="checkbox"/> especifique el phylum y la clase
Otro, especifíquese (reino, phylum y clase)	
b) Identidad del OMG (género y especie)	El OMG son células CD34+ de pacientes de anemia de Fanconi subtipo A (<i>Homo sapiens sapiens</i>) transducidas con el vector lentiviral VL hPGK-FANCA-Wpre*.

c) Estabilidad genética, de acuerdo con el punto 10 de la letra A de la sección II del anexo III A:

La estabilidad genética es muy alta, una vez integrado el vector en el genoma de la célula CD34, gracias al promotor interno hPGK se expresará la proteína FANCA y corregirá el defecto genético. Solo en casos aislados puede ocurrir silenciamiento del vector por metilaciones en regiones promotoras. Si además la integración ocurre en zonas del genoma con poca transcripción, podrían ocurrir fenómenos de silenciamiento o de expresión baja. Pero como se infundirán millones de células transducidas, la mayoría serán estables y el silenciamiento del vector será irrelevante.

4. Tiene previsto el mismo notificador la liberación de ese mismo OMG en algún otro lugar de la Comunidad (de acuerdo con el apartado 1 del artículo 6)?

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo, indique el código del país: GB, FR	

5. Ha notificado ese mismo notificador la liberación de ese mismo OMG en algún otro lugar de la Comunidad?

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo: - Estado miembro de la notificación: - Número de la notificación:	

6. Ha notificado el mismo notificador u otro la liberación o comercialización de ese mismo OMG fuera de la Comunidad?

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo: - Estado miembro de la notificación: - Número de la notificación:	

7. Resumen del impacto ambiental potencial de la liberación de los OMG

Tanto el vector lentiviral terapéutico como la célula CD34+ transducida tienen unas características biológicas que impiden su multiplicación y/o dispersión fuera del paciente trasplantado. No pueden sobrevivir fuera del individuo y la proliferación de la célula CD34+ transducida para reconstituir la hematopoyesis del paciente solo ocurrirá en el paciente y no podrá multiplicarse fuera de este (células autólogas).

No existen ecosistemas en los que se puede diseminar el OMG y en el paciente no hay modificación genética de células germinales por lo que no se puede transmitir.

El uso propuesto para el producto final solo contempla la administración endovenosa del mismo. Otros tipos de interacciones no implicarían la dispersión biológica del mismo.

No pueden existir interacciones del OMG con otros organismo ajenos ya que los pacientes receptores del OMG deben estar libres de VIH. Solo en el caso de que exista infección del VIH en el paciente podrían existir recombinaciones entre secuencias residuales del vector lentiviral con secuencias del virus salvaje, debido a esto se descarta realizar la terapia en pacientes VIH positivos.

B. Información sobre el organismo receptor o sobre los organismos parentales de los que se deriva el OMG

1. Identificación del organismo receptor o parental

a) Indíquese si el organismo receptor o parental es :

Viroide

Virus ARN

Virus ADN

Bacteria

Hongo

Animal

- mamíferos

- insectos

- peces

- otro animal

(especifique el phylum y la clase)

Otros, (especifíquense):

2. Nombre

i) Orden y taxón superior (animales):

Orden: Primates

Familia: Hominidae

Subfamilia: Homininae

ii) Género: <i>Homo</i>
iii) Especie: <i>Homo sapiens</i>
iv) Subespecie: <i>H. sapiens sapiens</i>
v) Cepa:
vi) Patovar (biotipo, ecotipo, raza, etc.):
vii) Nombre vulgar: Ser humano.

3. Distribución geográfica del organismo

a) Autóctono del país que notifica o establecido en él:	
Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/>
b) Autóctono de otros países de la Comunidad o establecido en ellos:	
i) Sí <input checked="" type="checkbox"/>	
En caso afirmativo, indíquese el tipo de ecosistema en que se encuentra:	
Atlántico <input checked="" type="checkbox"/>	
Mediterráneo <input checked="" type="checkbox"/>	
Boreal <input checked="" type="checkbox"/>	
Alpino <input checked="" type="checkbox"/>	
Continental <input checked="" type="checkbox"/>	
Macaronésico <input checked="" type="checkbox"/>	
ii) No <input type="checkbox"/>	
iii) No se sabe <input type="checkbox"/>	
c) ¿Se usa frecuentemente en el país que notifica?	
Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>

d) ¿Es frecuente su tenencia en el país que notifica?

Sí

No

4. Hábitat natural del organismo

a) Si es un microorganismo:

Agua

Suelo, en libertad

Suelo, en simbiosis radiculares de plantas

En simbiosis con sistemas foliares o caulinares
de plantas

En simbiosis con animales

Otros , (especifíquense):

b) Si es un animal , hábitat natural o ecosistema agrícola habitual:

El hábitat natural del OMG es el microambiente hematopoyético del paciente receptor.

5.a) Técnicas de detección

La detección se realiza mediante técnicas de biología molecular (*Western blot*, PCR en tiempo real (Q-PCR) y RT-Q-PCR). Además, para identificar las células CD34+ se utiliza la citometría de flujo y el marcador CD34 (anticuerpos monoclonales unidos a un fluorocromo).

5.b) Técnicas de identificación

Se utilizan las mismas técnicas que las de detección: Q-PCR, RT-Q-PCR, *Western blot* y citometría de flujo.

6. Está clasificado el organismo receptor con arreglo a las normas comunitarias vigentes en relación con la protección de la salud humana y el medio ambiente?

Sí

No

En caso afirmativo, especifíquese:

Según el RD 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, las células CD34+ transducidas no requieren clasificación ya que llevan integrado el vector lentiviral y no hay posibilidad de producción de retrovirus competentes en replicación. Únicamente en el momento de la transducción de las células CD34+ se requiere un nivel de contención 2 para su manipulación.

7. ¿Es el organismo receptor, vivo o muerto (incluidos sus productos extracelulares), apreciablemente patógeno o nocivo de cualquier otra forma?

Sí

No

No se sabe

En caso afirmativo

- a) ¿Para cuál de los organismos siguientes?:

humanos

animales

plantas

otros

- b) Aporte la información pertinente especificada en la letra d) del punto 11 de la letra A de la sección 11 del anexo III A de la Directiva 2001/18/CE.

Para el virus VIH-1 es muy conocida la patogenicidad, etc...pero en el caso de nuestro vector lentiviral no hay infectividad ni propagación del vector. Debido a la envuelta podría transducir múltiples tipos celulares pero en el ensayo clínico la transducción será *ex vivo* y luego las células transducidas se infundirán en el paciente. Por lo que no habrá transducción de otras células. La integración del vector en la célula diana no activaría virus latentes y no podría colonizar otros organismos. En cualquier caso el organismo no es patógeno o nocivo.

10.a) Vías de diseminación

No existen vías de diseminación ya que las células transducidas injertarán en el paciente para reconstituir su hematopoyesis.

10.b) Factores que afectan a la diseminación

No procede.

11. Modificaciones genéticas previas del organismo receptor o parental de las que ya se ha notificado la liberación en el país notificador (se darán los números de la notificación)

No existen modificaciones genéticas previas que hayan notificado la liberación. Solo se ha notificado su utilización confinada para estudios experimentales (nº A/ES/05/06).

C. Información sobre la modificación genética

1. Tipo de modificación genética:

- | | |
|--------------------------------------|-------------------------------------|
| i) Inserción de material genético | <input checked="" type="checkbox"/> |
| ii) Eliminación de material genético | <input type="checkbox"/> |
| iii) Sustitución de una base | <input type="checkbox"/> |
| iv) Fusión celular | <input type="checkbox"/> |
| v) Otro (especifíquese) | <input type="checkbox"/> |

2. Resultado que se pretende obtener mediante la modificación genética

Después de la transducción de las células CD34+ de pacientes de anemia de Fanconi subtipo A con el medicamento lentiviral (medicamento huérfano, LV hPGK-FANCA-Wpre*), el vector terapéutico se integrará en el genoma de las células. Una vez integrado, el gen terapéutico (FANCA) se transcribirá y se traducirá para producir la proteína terapéutica FANCA. Como el promotor interno utilizado es ubicuo, todas las células expresarán el gen de interés.

Las células CD34+ del paciente transducidas serán entonces corregidas genéticamente, y por lo tanto capaces de activar la vía de la AF por la monoubiquitinización de FANCD2 y FANCI. Estas proteínas podrán entonces migrar a las zonas de daño en el ADN, y en cooperación con otras proteínas de reparación del ADN, promoverán la reparación del ADN en estas células, como ocurre en las células sanas.

3.a) ¿Se ha usado un vector en el proceso de modificación?

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
En caso negativo, pase a la pregunta 5.	

3.b) En caso afirmativo, ¿está presente el vector, total o parcialmente, en el organismo modificado?

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
En caso negativo, pase a la pregunta 5	

4. Si ha contestado afirmativamente a la pregunta 3 b), aporte la información siguiente

a) Tipo de vector

plásmido	<input type="checkbox"/>
bacteriófago	<input type="checkbox"/>
virus	<input checked="" type="checkbox"/>
cósmido	<input type="checkbox"/>
Elemento de transposición	<input type="checkbox"/>
Otros (especifiquense):	<input type="checkbox"/>

b) Identidad del vector:

Es un medicamento huérfano consistente en un vector lentiviral portador del gen *FANCA* para pacientes con anemia de Fanconi del Subtipo A. Es un vector basado en el lentivirus VIH-1. Los vectores lentivirales utilizados son de tercera generación (se utilizan 4 plásmidos para su producción lo que aumenta su seguridad), mejorados (contienen secuencias que mejoran su expresión como cPPT, tracto central de polipurina, y Wpre, elemento post-regulador del virus de hepatitis de *marmota*) y autoinactivantes (deleciones en la LTR por lo que una vez integradas no son activas).

Estos vectores están basados en el lentivirus HIV-1 al cual se le han eliminado los genes accesorios, alguno regulador y el gen de la envuelta está mutado. Son virus defectivos en replicación, no se conoce la formación de virus salvajes, ni de virus competentes en replicación.

Estos vectores se producen mediante cotransfección de 4 plásmidos en células 293T: vector transferente (pCCLsincPPT-hPGK-FANCA-Wpre*), vectores empaquetadores (rev y gag-pol) y el de la envuelta VSV.

Se muestra la construcción ya integrada en el genoma de la célula diana.

Self-inactivating (SIN) Lentiviral vector: LV PGK FANCA w*

Gonzalez-Murillo et al. Hum Gen. Ther. 2010; Tolar, J. et al Mol. Ther.2011

c) Gama de organismos huéspedes del vector:

Debido a que el vector lentiviral está pseudotipado con la envuelta VSV-G, es capaz de transducir numerosos tipos celulares de distintas especies. Como la manipulación del vector se realizará en un laboratorio de nivel de contención II y las células serán transducidas ex vivo, no podrá ocurrir transducción de células de otros organismos.

d) Presencia en el vector de secuencias que den un fenotipo seleccionable o identificable

Sí No

Resistencia a los antibióticos

Otras, (especifíquense)

Indique qué gen de resistencia a los antibióticos se inserta: gen de resistencia a Kanamicina. Pero en ningún caso esta secuencia se integrará en el genoma de la célula diana.

e) Fragmentos constituyentes del vector

El plásmido de expresión está construido sobre el pUC19 (plásmido de la Universidad de California) y tiene un tamaño de 11'6 kpb. Desde el plásmido, en células eucariotas, se transcribe el ARNm de 8 kb. En cada vector se encapsidan 2 moléculas idénticas que se retro-transcriben durante la infección en un ADN que contiene los módulos descritos en el punto 6.

f) Método de introducción del vector en el organismo receptor

i) transformación

ii) electroporación

iii) macroinyección

iv) microinyección

v) infección

vi) otros, (especifíquense)

5. Si las repuestas a C. 3) a) y b) son negativas, ¿qué método se siguió en el proceso de modificación?

i) transformación

ii) microinyección

iii) macroencapsulación

iv) macroinyección

v) otros, (especifíquense)

6. Información sobre el fragmento de inserción:

a) Composición del fragmento de inserción:

El fragmento de inserción se compone de las siguientes partes que se integrarán desde una LTR a la otra (ver figura del punto 4. b).

- LTR: Long Terminal Repeat (secuencia derivada del lentivirus).
- SD: *Splice Donor* o donador de *splicing*.
- Ψ : señal de empaquetamiento.
- PBS: *primer binding site*.
- ga: gen gag deletado.
- RRE: *Rev Response Element* o elemento respondedor de Rev.
- SA: *Splice Acceptor* o aceptador de *splicing*.
- cPPT: *Central Polypurine Tract*, tracto central de la polipurina, regula expresión del transgén.
- PGK: promotor interno que dirige la expresión ubicua de los genes de interés.
- FANCA: cDNA que codifica para la proteína del subtipo A de la anemia de Fanconi.
- Wpre, mutado: *Woodchuck pre-regulatory element* o elemento regulador del virus de la hepatitis de marmota. Estabiliza y mejora expresión del transgén. En este caso está mutado para mejorar la seguridad y eficacia de la secuencia.

b) Fuente de cada parte constitutiva del fragmento de inserción:

- LTR: secuencia derivada del Lentivirus y citomegalovirus.
- SD: Lentivirus.
- Ψ : Lentivirus.
- PBS: Lentivirus.
- ga: Lentivirus.
- RRE: Lentivirus.
- SA: Lentivirus.
- cPPT: Lentivirus.
- PGK: Humano.
- FANCA: Humano.
- Wpre, mutado: virus de la hepatitis de la marmota.

c) Función prevista de cada parte constitutiva del fragmento de inserción en el OMG

- **LTR en 3'**: Long Terminal Repeat (secuencia derivada del lentivirus). Las LTR se forman por la fusión de las regiones U3-R-U5 que se produce tras la retro-transcripción del vector y antes de su integración. La LTR silvestre del virus VIH-1 fue mutada eliminando la U3, por lo que la LTR resultante no es capaz de estimular la expresión de genes ni en el plásmido ni en la forma integrada tras la retro-transcripción. Para poder sintetizar el ARN mensajero se incorporó la potente secuencia promotor/enhancer del Citomegalovirus (CMV IE-I prom) en 3' de la secuencia RU5, de manera que este promotor dirija la expresión del ARN infectivo que se empaquetará en las cápsidas infectivas. Esta secuencia en ningún momento formará parte del virus por lo que tras su integración será incapaz de formar nuevas partículas infectivas: es un vector auto-inactivante o SIN (del inglés, *self-inactivating vector*)

- **SD**: *Splice Donor* o donador de *splicing*. La presencia de señales de procesamiento post/transcripcional mejora los títulos al reducir la degradación del ARN. Existe un SD dentro de la Secuencia Psi.

- **Ψ**: señal de empaquetamiento. Secuencia con una estructura secundaria característica que forma 4 bucles (SL1, SL2, SL3, SL4) que son necesarios para la correcta incorporación del ARN vírico en la cápsida.

- **PBS**: Primer Binding site: Incluye la secuencia donde se une el ARN transferente que sirve de cebador para la retro transcripción del Virus.

- **ga**: gen gag deletado. Las secuencias que codifican para proteínas víricas han sido eliminadas deliberadamente y forman parte de los genes facilitados en trans durante la producción, esta secuencia residual no codificante responde a la necesidad de mantener estructuras que participan en la encapsidación del ARN como SL4).

- **RRE**: *Rev Response Element* o elemento de respuesta a la proteína Rev.

- **SA**: *Splice Acceptor* o aceptador de *splicing*. La presencia de señales de procesamiento post/transcripcional mejora los títulos al reducir la degradación del ARN.

- **cPPT**: *Central Polypurine Tract*, tracto central de la polipurina, regula expresión del transgén.

- **PGK**: promotor interno que dirige la expresión ubicua de los genes de interés. Secuencia promotora del gen humano *PGK (Phosphoglycerate Kinase)*, que codifica para la proteína PGK de expresión ubicua y moderada.

- **FANCA**: cDNA que codifica para la proteína del subtipo A de la anemia de Fanconi. Secuencia ADNc del gen humano *FANCA* localizado en el cromosoma 16 en brazo largo 16q24.3. Que codifica para la proteína del grupo de complementación A de la anemia de fanconi (FANCA).

- **Wpre, mutado**: (del inglés, *Woodchuck Hepatitis virus (WHV) post-transcriptional regulatory element*) es una secuencia original del virus de la hepatitis de la marmota que tiene la capacidad de estabilizar los ARNm aumentando la cantidad de proteína generada. La versión silvestre codifica la proteína X relacionada con hepatocarcinoma. La versión mutada ha eliminados los posibles sitios críticos de expresión de dicha proteína.

- **LTR en 5'**: Las LTR se forman por la fusión de las regiones U3-R-U5 que se produce tras la retro-transcripción del vector y antes de su integración. La LTR silvestre del virus VIH-1 fue mutada eliminando 18 bases de la región promotor/enhancer U3 ($\Delta 18U3$) por lo que la LTR resultante no es capaz de estimular la expresión de genes ni en el plásmido ni en la forma integrada tras la retro-transcripción por lo que tras su integración será incapaz de formar nuevas partículas infectivas: es un vector auto-inactivante o SIN (del inglés, *self-inactivating vector*).

d) Localización del fragmento de inserción en el organismo receptor:	
- en un plásmido libre	<input type="checkbox"/>
- integrado en el cromosoma	<input checked="" type="checkbox"/>
- Otros especifíquense):	
e) ¿Contiene el fragmento de inserción partes cuyo producto o función no se conozcan?	
Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo , especifíquese:	

D. Información sobre el organismo u organismos de los que se deriva el fragmento de inserción (donante)

1. Indíquese si es:

Viroide	<input type="checkbox"/>
Virus ARN	<input checked="" type="checkbox"/>
Virus ADN	<input type="checkbox"/>
Bacteria	<input type="checkbox"/>
Hongo	<input type="checkbox"/>
Animal	<input type="checkbox"/>
- mamíferos	<input checked="" type="checkbox"/>
- insectos	<input type="checkbox"/>
- peces	<input type="checkbox"/>
- otro animal	<input type="checkbox"/> (especifique el phylum y la clase):
Otros (especifíquense)	

2. Nombre completo

i) Orden y taxón superior (animales): Primate
ii) Familia (plantas): Hominidae/Retroviridae
iii) Género: Homo/Lentivirus
iv) Especie: Homo sapiens/Lentivirus VIH-1
v) Subespecie: <i>Homo sapiens sapiens</i>
vi) Cepa: VIH-1
vii) Cultivar/línea de reproducción:
viii) Patovar:
ix) Nombre vulgar: Ser humano y lentivirus VIH-1.

3. ¿Es el organismo vivo o muerto (incluidos sus productos extracelulares), apreciablemente patógeno o nocivo de cualquier otra forma?

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo, especifíquese		
(a) ¿para cuál de los organismos siguientes?	humanos	<input type="checkbox"/>
	animales	<input type="checkbox"/>
	plantas	<input type="checkbox"/>
	otros	<input type="checkbox"/>
(b) ¿están implicadas de alguna forma las secuencias donadas en las propiedades patógenas o nocivas del organismo?		
Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo, proporcione la información pertinente de conformidad con la letra d) del punto 11 de la letra A de la sección II del Anexo III A:		

4. ¿Está clasificado el organismo donante con arreglo a normas comunitarias vigentes en relación con la protección de la salud humana y el medio ambiente como, por ejemplo, la Directiva 90/679/ CEE sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo?

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
--	-----------------------------

En caso afirmativo , especifíquese:

Según el RD 664/1997, de 12 de mayo, sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, el VIH está clasificado como agente biológico del grupo 3. No obstante, parte de su genoma ha sido modificado eliminando las secuencias virales necesarias para su propagación, suprimiendo así su capacidad infectiva, lo que requiere un nivel de contención 2 para su manipulación.

5. ¿Intercambian los organismos donante y receptor material genético de forma natural?

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
-----------------------------	--	-------------------------------------

E. Información sobre el organismo modificado genéticamente

1. Rasgos genéticos y características fenotípicas del organismo receptor o parental que hayan sufrido algún cambio como resultado de la modificación genética

a) ¿Se diferencia el OMG del receptor en lo que a capacidad de supervivencia se refiere?

Sí

No

No se sabe

Especifíquese

La ventaja competitiva de las células CD34+ transducidas/corregidas es posible y puede ser una gran ventaja para el efecto terapéutico, ya que pocas células podrían reconstituir al paciente con las células corregidas expresando el gen *FANCA*. Se contempla esta posibilidad porque en pacientes con una reversión de la mutación en una célula madre hematopoyética han mostrado una alta reconstitución hematopoyética por esas células revertidas, lo que se denomina pacientes con mosaicismo somático.

Por otro lado, la probabilidad de que el OMG adquiera ventaja o desventaja selectiva es muy baja en relación con el sitio de integración (descartando la expresión del gen terapéutico *FANCA*). En el caso de los vectores integrativos existe la posibilidad de mutagénesis insercional, siendo en el caso de los vectores lentivirales una opción muy remota. Los datos clínicos obtenidos en pacientes X1-SCID, en pacientes CGD, y más recientemente en pacientes Wiscott-Aldrich han mostrado que la transducción de células hematopoyéticas con vectores gammaretrovirales tienen beneficios clínicos incuestionables, aunque en algunos casos han generado síndromes linfoma o mieloproliferativos, debido a la transactivación de oncogenes por los promotores fuertes virales utilizados para expresar los genes. Con el fin de minimizar los riesgos leucemogénicos asociados a la utilización de vectores gammaretrovirales, una nueva generación de vectores lentivirales (VLs) autoinactivados se ha generado, que ya ha entrado en la clínica. y que han permitido el desarrollo de nuevos medicamentos huérfanos, como el actual o como el denominado "vectores lentivirales que lleva el Wiscott Aldrich proteína (WASP-LV)" (Ref141/2000).

En comparación a los vectores gammaretrovirales, los VLs tienen una menor preferencia por la integración en las regiones cercanas al inicio de transcripción de genes. Este hecho, junto con el diseño avanzado de auto-inactivación de los VLs implica una reducción de los riesgos de oncogénesis insercional. Este ha sido particularmente el caso de los VLs con el promotor presente en el medicamento huérfano con el que se realizará este ensayo clínico, el promotor del gen de la fosfoglicerato-quinasa (hPGK). La seguridad de VLs que portan tal promotor se deduce de un primer ensayo clínico realizado por el grupo de Milán en pacientes con leucodistrofia.

b) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta al modo o índice de reproducción?

Sí

No

No se sabe

Especifíquese:

c) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta a la diseminación?

Sí

No

No se sabe

Especifíquese:

d) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad?

Sí

No

No se sabe

Especifíquese:

2. Estabilidad genética del organismo modificado genéticamente

La estabilidad genética es muy alta, una vez integrado el vector en el genoma de la célula CD34, gracias al promotor interno se expresará la proteína FANCA y corregirá el defecto genético.

3. ¿Es el OMG, vivo o muerto (incluidos sus productos extracelulares), apreciablemente patógeno o nocivo de cualquier forma?

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo:		
a) ¿Para cuál de los organismos siguientes?	humanos	<input type="checkbox"/>
	animales	<input type="checkbox"/>
	plantas	<input type="checkbox"/>
	otros	<input type="checkbox"/>
<p>b) Aporte la información pertinente especificada en la letra d) del punto 11 de la letra A de la sección II y en el inciso i) del punto 2 de la letra C de la sección II del anexo III A</p> <p>Para el virus VIH-1 es muy conocida la patogenicidad, etc...pero en el caso de nuestro vector lentiviral no hay infectividad ni propagación del vector. Debido a la envuelta podría transducir múltiples tipos celulares pero en el ensayo clínico la transducción será <i>ex vivo</i> y luego las células transducidas se infundirán en el paciente. Por lo que no habrá transducción de otras células. La integración del vector en la célula diana no activaría virus latentes y no podría colonizar otros organismos.</p> <p>Como en el resto de los protocolos de transducción <i>ex vivo</i> realizados sobre células CD34⁺, el producto celular sometido al proceso de transducción será objeto de un lavado con el medio de infusión del paciente. Muchos reactivos ya se han incluido en el medio de transducción utilizado para la terapia génica de otras enfermedades tales como X1-SCID, ADA-SCID, beta-talasemia, adrenoleucodistrofia. En ninguno de ellos se han observado efectos asociados a la infusión del producto celular. Según lo previsto, las dosis residuales de algunos reactivos no habrán de generar ni efectos terapéuticos, ni efectos tóxicos.</p> <p>No se considera que la infusión de partículas lentivirales residuales presentes en el medio de infusión vaya a transducir células del paciente ya que estudios previos han demostrado que el complemento inactiva la envuelta VSV-G utilizada para el empaquetamiento de nuestro vector terapéutico, por lo que en presencia de complemento estos vectores infectan con una eficacia 95 veces inferior las células humanas.</p>		

4. Descripción de los métodos de identificación y detección

a) Técnicas utilizadas para detectar el OMG en el medio ambiente:

La detección se realiza mediante técnicas de biología molecular (*Western blot*, PCR en tiempo real (Q-PCR) y RT-Q-PCR). Además, para identificar las células CD34+ se utiliza la citometría de flujo y el marcador CD34 (anticuerpos monoclonales unidos a un fluorocromo).

b) Técnicas utilizadas para identificar el OMG:

Son las mismas técnicas que la para la detección: *Western blot*, PCR en tiempo real (Q-PCR), RT-Q-PCR y citometría de flujo.

F. Información sobre la liberación

1. Finalidad de la liberación (incluido todo beneficio ambiental potencial significativo esperado)

La principal finalidad es el tratamiento de los problemas hematológicos de pacientes con anemia de Fanconi del subtipo A (AF-A). El vector lentiviral terapéutico facilitará la expresión de la proteína FANCA en las células CD34+ transducidas. Con ello las células transducidas que anteriormente eran defectivas en proliferación y diferenciación, se comportarán como células con potencial de división normalizado, debiendo restaurar la hematopoyesis del paciente.

2. ¿Es diferente el lugar de liberación del hábitat natural o del ecosistema en el que se utiliza, se mantiene o se encuentra regularmente el organismo receptor o parental?

Sí

No

En caso afirmativo, especifíquese:

3. Información relativa a la liberación y a la zona circundante

a) Localización geográfica (región administrativa y coordenadas de referencia cuando proceda):

La liberación se producirá en el contexto de un ensayo clínico realizado en el Servicio de Onco-hematología y Trasplante del Hospital Universitario Infantil Niño Jesús de Madrid (Avda. Menéndez Pelayo, nº 65, 28009, Madrid).

b) Área del lugar (m²): No procede.

(i) lugar real de la liberación (m²):

(ii) área de liberación más amplia (m²):

<p>c) Proximidad a biotipos reconocidos internacionalmente o zonas protegidas (incluidos depósitos de agua potable) que pudieran verse afectados:</p> <p>No procede.</p>
<p>d) Flora y fauna, incluidos cultivos, ganado y especies migratorias que pueden potencialmente interactuar con el OMG:</p> <p>No procede.</p>

4. Método y amplitud de la liberación

<p>a) Cantidad de OMG que vaya a liberarse:</p> <p>Se prevé la liberación de 5 pacientes.</p>
<p>b) Duración de la operación:</p> <p>3 años.</p>
<p>(c) Métodos y procedimientos para evitar o reducir al mínimo la propagación de los OMG más allá del lugar de liberación:</p> <p>No hay posibilidad de propagación por lo que no se contemplan métodos especiales para evitar la propagación.</p>

5. Descripción resumida de las condiciones ambientales medias (clima, temperatura, etc.)

<p>No procede.</p>

6. Datos pertinentes sobre liberaciones anteriores del mismo OMG. si los hubiera, específicamente relacionados a las repercusiones potenciales de la liberación en el medio ambiente y la salud humana

<p>No existen datos de liberaciones anteriores del mismo OMG.</p>

G. Interacciones del OMG con el medio ambiente y repercusiones potenciales sobre este, si es apreciablemente diferente del organismo receptor o parental

1. Nombre del organismo objeto de investigación (si procede)

<p>i) Orden y taxón superior (animales):</p> <p>Primates.</p>

ii) Familia (plantas): Hominidae.
iii) Género: <i>Homo</i> .
iv) Especie: <i>Homo sapiens</i> .
v) Subespecies: <i>Homo sapiens sapiens</i> .
vi) Cepa:
vii) Cultivar/Línea de reproducción:
viii) Patovar:
ix) Nombre vulgar: Ser humano.

2. Mecanismo previsto y resultado de la interacción entre los OMG liberados y el organismo diana (si procede)

La interacción será la habitual de un trasplante de progenitores hematopoyéticos que se realizan de forma rutinaria en el Hospital. Las células CD34+ transducidas anidarán en la médula ósea del paciente receptor y allí proliferarán hasta reconstituir la médula ósea del paciente. No se prevé la interacción del vector directamente con las células del paciente. Así todo se han realizado estudios de biodistribución para asegurar que no va a ocurrir la transducción de células distintas de las CD34+ objeto del ensayo.

3. Otras interacciones potencialmente significativas con otros organismos en el medio ambiente

No pueden existir interacciones con otros organismos ajenos ya que los pacientes receptores del OMG deben estar libres de VIH. Solo en el caso de que exista infección del VIH en el paciente podrían existir recombinaciones entre secuencias residuales del vector lentiviral con secuencias del virus salvaje, debido a esto se descarta realizar la terapia en pacientes VIH positivos.

4. ¿Es probable que se dé una selección posterior a la liberación del OMG como, por ejemplo, una competencia mayor. un carácter más invasivo, etc.?

Sí	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe
Especifíquese:		

5. Tipos de ecosistemas a los que puede extenderse el OMG desde el lugar de liberación y en los cuales puede quedar establecido

Al tratarse de un ensayo clínico no existe la posibilidad de extenderse el OMG en otros ecosistemas.
--

6. Nombre completo de los organismos que no son el organismo diana, pero que (teniendo en cuenta la naturaleza del medio ambiente receptor) pueden sufrir accidentalmente daños importantes por la liberación del OMG

i) Orden y taxón superior (animales):
ii) Familia (plantas):
iii) Género:
iv) Especie:
v) Subespecie:
vi) Cepa:
vii) Cultivar/línea de reproducción:
viii) Patovar
ix) Nombre vulgar:

7. Probabilidad de intercambio genético en vivo

a) Del OMG a otros organismos del ecosistema de liberación: Solo en el caso de que exista infección del VIH en el paciente podrían existir recombinaciones entre secuencias residuales del vector lentiviral con secuencias del virus salvaje, debido a esto se descarta realizar la terapia en pacientes VIH positivos.

b) De otros organismos al OMG:

No existe esta posibilidad.

c) Consecuencias probables de la transferencia de genes:

La única consecuencia y que sería muy poco probable es que se pudiesen incorporar secuencias del vector lentiviral en el virus salvaje, pero no tendrían consecuencias biológicas relevantes.

8. Referencias de los resultados pertinentes (si los hay) de estudios sobre el comportamiento y las características del OMG sobre su repercusión ecológica llevados a cabo en ambientes naturales simulados (por ejemplo, microcosmos, etc.)

No existen.

9. Posibles interacciones ambientalmente significativas con procesos biogeoquímicos (si son diferentes del organismo receptor o parental)

No procede.

H. Información sobre el seguimiento

1. Métodos de seguimiento de los OMG

Tras la infusión del OMG al paciente se realizarán análisis por citometría de flujo a partir de las 72 horas y contajes de progenitores hematopoyéticos a partir de los 10 días. También se obtendrán diferentes muestras de los pacientes para su análisis a partir de las 3 semanas después de la infusión, donde podrá ser evaluada cuantitativamente la presencia de OMGs mediante la técnica de PCR; se trata de una técnica sensible y fiable que mediante el uso de secuencias específicas permite la amplificación y detección de las secuencias de interés. En muestras de sangre de los pacientes también se realizará un control hematológico y estudios de clonalidad por análisis del sitio de integración del vector lentiviral (análisis de LAM/LM -PCR). En las muestras de médula ósea se realizarán estudios de inestabilidad citogenética (basal e inducida con DEB).

2. Métodos de seguimiento de las repercusiones en el ecosistema

No procede ya que no habrá repercusiones en el ecosistema.

3. Métodos de detección de la transferencia del material genético donado del OMG a otros organismos

Mediante PCR cuantitativa (Q-PCR) podremos estudiar si ha habido transferencia de material genético a otros organismos.

4. Tamaño del área de seguimiento (m²)

No procede.

5. Duración del seguimiento

El seguimiento de los pacientes será al menos durante 5 años.

6. Frecuencia del seguimiento

Tras la infusión se tomarán muestras de sangre semanalmente, durante las 8 primeras semanas, mensualmente hasta el 1er año, y al menos cada 12 meses posteriormente. Las muestras de médula ósea se tomarán a 1, 3, 6 y 12 meses post-infusión, y al menos anualmente posteriormente.

I. Información sobre el tratamiento posliberación y el tratamiento de residuos

1. Tratamiento del lugar tras la liberación

Los pacientes serán tratados en habitaciones de trasplante hematopoyético estándar del servicio de Onco-hematología y Trasplante del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús en Madrid, donde permanecerán al menos 72 horas tras la infusión.

La liberación del producto final (CD34+ transducidas) se realizará mediante infusión al paciente en un centro hospitalario por lo que la preparación del lugar se adaptará a las normas establecidas en dicho centro para este tipo de intervenciones. El lugar donde se prepare el producto para la infusión se descontaminará, antes y después de la manipulación, con una solución basada en un desinfectante convencional

Todo el personal será informado de que las células CD34+ transducidas con el vector lentiviral se consideran un producto de nivel II de bioseguridad y estará formado para su manipulación siguiendo las normas adecuadas para dicho nivel de bioseguridad (manipulación del producto, equipos y materiales utilizados, correcta eliminación de residuos, etc.). Cualquier residuo generado durante la actividad de manipulación de las células CD34+ transducidas o que haya podido estar en contacto con el producto debe ser depositado en contenedores especiales de bioseguridad e incinerado.

El personal debe utilizar ropa protectora, de acuerdo a lo siguiente:

- Deben usarse batas.
- Deben usarse guantes para cualquier procedimiento que pueda conllevar un contacto directo con la piel.
- Todo el equipo y las superficies de trabajo deben ser limpiadas con lejía.
- Las agujas y jeringas utilizadas deben ser desechadas en contenedores de bioseguridad.
- Después de quitarse los guantes, el personal debe lavarse las manos.

Administración de las células CD34+ transducidas al paciente:

- Los pacientes serán infundidos de acuerdo a los protocolos habituales del Servicio de Onco-hematología y Trasplante del Hospital Infantil Niño Jesús.

Manejo del paciente que es dado de alta después del tratamiento:

- No se contemplan normas específicas una vez que el paciente es dado de alta.

Manejo del paciente que presenta problemas después del tratamiento:

- No se contemplan medidas específicas a las habituales en el Hospital.

Procedimientos a seguir por el personal y los visitantes:

- El personal que se pinche con agujas que hayan tenido contacto con las células transducidas debe seguir los procedimientos estándar vigentes para este tipo de accidentes. Debe informar al departamento de seguridad laboral así como a los responsables del estudio.
- Cualquier miembro del personal involucrado en el ensayo que se siente mal debe informar al departamento de seguridad laboral así como a los responsables del estudio.

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

En caso de derramarse el producto:

- En las áreas donde el producto es manipulado, almacenado y transportado, debe haber siempre un desinfectante disponible, como por ejemplo, lejía.
- Si hay un derramamiento del producto, el personal que lo vaya a limpiar debe seguir la normas especificadas en el punto anterior.
- Deben limpiarse y desinfectarse todas las superficies que hayan sido contaminadas.

Tratamiento de las muestras:

- El personal que maneje las muestras del paciente deberá llevar bata y guantes.
- Todas las superficies que hayan estado en contacto con el producto deberán ser desinfectadas con lejía.
- Los dispositivos como agujas y jeringas deberán depositarse en un contenedor de bioseguridad.
- Todas las muestras deben estar claramente etiquetadas con una etiqueta de bioseguridad.
- Todo el material residual deberá ser descontaminado con lejía.

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

2. Tratamiento del OMG tras la liberación

No hay unas medidas especiales para evitar la diseminación de los OMGs fuera del lugar de la liberación ya que los progenitores hematopoyéticos transducidos no pueden diseminarse fuera del organismo del paciente. Por lo que las medidas son las habituales para pacientes a los que se les ha infundido progenitores hematopoyéticos.

3(a) Tipo y cantidad de residuos producidos

Los tipos de residuos serán:

- Residuos generados durante la preparación y manipulación del producto final (células CD34+ transducidas con el vector lentiviral).
- Los residuos derivados de la infusión al paciente del OMG final.
- Los residuos derivados de la limpieza de las zonas de trabajo.

El volumen de residuos generados va a ser el habitual en un procedimiento de este tipo y no van a ser grandes volúmenes. La mayor parte de los residuos se

inactivarán mediante autoclavado y no serán más de dos bolsas de autoclave, que luego pasarán a incineración. Los residuos líquidos se tratarán con desinfectantes y no serán más de 1 L.

3(b) Tratamiento de residuos

El tratamiento propuesto para los diferentes tipos de residuos se adaptará a la normativa vigente. Conforme a lo establecido en el Real Decreto 83/1999 por el que se regulan las actividades de producción y gestión de los residuos biosanitarios y citotóxicos en la Comunidad de Madrid (B.O.C.M. 163), se clasifican los residuos en:

- Clase I y II. Los materiales son inactivados (líquidos mediante desinfectantes y sólidos por autoclavado) y eliminados conforme a lo establecido.
- Clase III. Los residuos son gestionados por la empresa CONSENUR, registrada y autorizada a tal fin, de acuerdo a lo establecido en el citado Real Decreto.

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

En el caso de que se produzca cualquier incidencia o accidente se deberá informar de manera inmediata al Ministerio de Medio Ambiente.

J. Información sobre planes de actuación en caso de emergencia

1. Métodos y procedimientos de control de la diseminación del OMG o de los OMG en caso de dispersión imprevista

Como medida de precaución, las medidas de contención del nivel 2 (clase II) se llevarán a cabo en el lugar de liberación. Los pacientes tratados se mantendrán en el hospital durante al menos las 72 horas posteriores a la infusión.

En el caso de liberación accidental, se llevarán a cabo las siguientes medidas:

Aislar la zona de derrame; absorber la solución derramada con toallas de papel desechables u otro tipo de material absorbentes. Se tratará con lejía al 5%, 0,5% solución de hidróxido de sodio o una solución de Virkom. También se emplearán otros desechables y un adecuado uso del recogedor, recoger el material derramado y poner todos los materiales de limpieza empleados en el lugar contaminado, en una bolsa de plástico desechable resistente. Cuando todos los materiales contaminados hayan salido de la sala, enjuagar la zona con agua limpia usando toallas desechables adicionales.

Al término de la limpieza, colocar todos los materiales contaminados de manera adecuada, debidamente etiquetados, y desecharlo todo como residuos biopeligrosos en contenedores específicos. Finalmente, quitarse los guantes lavarse las manos cuidadosamente con jabón y agua limpia.

2. Métodos de eliminación del OMG o de los OMG de las áreas potencialmente afectadas

En caso de derramarse el producto:

- En las áreas donde el producto es manipulado, almacenado y transportado, debe haber siempre un desinfectante disponible, como por ejemplo, lejía o Virkom.
- Si hay un derramamiento del producto, el personal que lo vaya a limpiar debe seguir las normas especificadas en el punto anterior.
- Deben limpiarse y desinfectarse todas las superficies que hayan sido contaminadas.

3. Métodos de eliminación o saneamiento de plantas, animales, suelos, etc. que pudieran ser expuestos al organismo durante la dispersión o después de la misma

Véase el apartado anterior.

4. Planes de protección de la salud humana y del medio ambiente en caso de que se produzca un efecto no deseable

En el ensayo clínico, los pacientes serán controlados durante al menos 5 años posteriores a la dosis única de tratamiento para controlar los elementos adversos clínicamente significativos. Debido a las razones anteriormente expuestas, y en referencia a la evaluación de riesgos, no se considerará necesaria la redacción de planes específicos para proteger el medio ambiente.