

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/23/15
c) Fecha del acuse de recibo de la notificación:	13/04/2023
d) Título del proyecto:	Estudio multicéntrico fase I/IIa de infusión de linfocitos T autólogos de sangre periférica expandidos y modificados genéticamente mediante transposones de la familia <i>Sleeping Beauty</i> para expresar un receptor antigénico quimérico con especificidad anti-CD19 conjugado con la región coestimuladora 4-1BB y de transmisión de señal CD3 ζ y huEGFRt (TranspoCART19) en pacientes con linfoma de células B en recaída o refractario.
e) Período propuesto para la liberación:	Junio 2023 - Junio 2028

2. Notificador

Nombre de la institución o empresa:	Fundación del Instituto de Estudios de Ciencias de la Salud de Castilla y León (IECSCYL)
-------------------------------------	--

3. Definición del 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
- Animal
- mamíferos Linfocitos T adultos y autólogos modificados genéticamente
- insectos
- peces
- otro animal especifique el phylum y la clase

Otro, especifíquese (reino, phylum y clase):

b) Identidad del OMG (género y especie)

Linfocitos T autólogos de sangre periférica expandidos y modificados genéticamente mediante transposones de la familia *Sleeping Beauty* para expresar un receptor antigénico quimérico con especificidad anti-CD19 conjugado con la región coestimuladora 4-1BB y de transmisión de señal CD3 ζ y huEGFRt (Células TranspoCART19)

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

La transfección de los linfocitos T autólogos adultos se llevará a cabo mediante electroporación de los dos componentes del sistema de transposones SB; la transposasa SB100X en forma de ARN mensajero (ARNm) que media la inserción en el genoma del otro componente, el transposón, en forma de minicírculo (MC) de ADN, que porta el CAR y el EGFRt.

La producción del ARNm de la transposasa SB100X se realiza mediante síntesis *in vitro* a partir de un plásmido secuenciado que contiene la secuencia de transposasa SB100X. Así mismo, el MC de ADN que porta el CAR y el EGFRt proviene de un plásmido secuenciado del que se eliminarán las secuencias bacterianas.

Después de la electroporación con el ARNm de la transposasa y el MC del transposón, el MC se integra en el genoma de los linfocitos T de forma estable. La presencia de esta secuencia y su estabilidad será confirmada mediante técnicas de citometría de flujo y PCR digital (ddPCR) en las células expandidas después de la electroporación y antes de la infusión en el paciente.

El CAR y el EGFRt se expresarán gracias al promotor interno presente en el transposón. Sólo en casos aislados puede ocurrir el silenciamiento de ambas moléculas por metilaciones en regiones promotoras. Si, además, la integración del transposón ocurre en zonas del genoma con poca transcripción, podrían ocurrir fenómenos de silenciamiento o de la expresión baja; pero como se infundirán millones de células modificadas, la mayoría serán estables y el silenciamiento del transposón 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 type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo, indique el código del país:	

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

El posible impacto ambiental de la liberación de los linfocitos T modificados genéticamente para la expresión del CAR y el EGFRt es muy bajo. El OMG son linfocitos T electroporados *ex vivo* en una instalación que cumple las Buenas Prácticas de Fabricación y posteriormente son infundidas a los pacientes en centros hospitalarios, lo que limita su impacto ambiental.

Por otro lado, tanto los componentes del sistema SB como los linfocitos modificados 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 los linfocitos T modificados sólo ocurrirá en el paciente, no pudiendo 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 a su descendencia.

No pueden existir interacciones del OMG con otros organismos ajenos, ya que el sistema de transposones SB ha sido reconstruido en diferentes laboratorios a partir de secuencias presentes en diferentes tipos de peces.

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	<input type="checkbox"/>
Virus ARN	<input type="checkbox"/>
Virus ADN	<input type="checkbox"/>
Bacteria	<input type="checkbox"/>
Hongo	<input type="checkbox"/>
Animal	<input checked="" 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): El organismo receptor final son células T humanas (linfocitos T) primarios	

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>Homo sapiens sapiens</i>
v) Cepa: N/A
vi) Patovar (biotipo, ecotipo, raza, etc.): N/A
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 <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>

4. Hábitat natural del organismo

a) Si es un microorganismo:	
Agua	<input type="checkbox"/>
Suelo, en libertad	<input type="checkbox"/>
Suelo, en simbiosis radiculares de plantas	<input type="checkbox"/>
En simbiosis con sistemas foliares o caulinares de plantas	<input type="checkbox"/>
En simbiosis con animales	<input type="checkbox"/>
Otros , (especifíquense):	

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

El hábitat natural del OMG es el cuerpo del receptor, ya que los linfocitos T circulan por la sangre periférica y se pueden extravasar a los diferentes tejidos donde son necesarios.

5. a) Técnicas de detección

La detección de la modificación genética se realiza mediante técnicas de biología molecular (*Western blot*, PCR cuantitativa (qPCR), PCR con transcripción reversa cuantitativa (qRT-PCR) y PCR digital (ddPCR)). Además, para identificar las células T que porten el CAR se utiliza la citometría de flujo y el marcador EGFRt (anticuerpos monoclonales unidos a un fluorocromo).

5. b) Técnicas de identificación

Se utilizan las mismas técnicas que las de detección: citometría de flujo, ddPCR, *Western blot*, qPCR y qRT-PCR.

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:

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.

Los linfocitos T se obtendrán mediante leucoaféresis convencional de linfocitos, sin estimulación previa mediante citoquinas en los pacientes con linfoma. Posteriormente se aislarán los linfocitos T mediante selección positiva y se realizará la transferencia génica del constructo descrito mediante electroporación de los componentes del sistema SB. Posteriormente a la modificación genética de los mismos se administrarán de forma autóloga a los mismos pacientes.

Se analizará a los pacientes para, al menos, identificar VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), VHC (virus de la hepatitis C) y VHB (virus de la hepatitis B), y en el caso de que diesen positivo se les excluirá del estudio clínico.

8. Información sobre reproducción

a) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

No aplicable, ya que los linfocitos T modificados no pueden reproducirse en ningún ecosistema natural, únicamente en condiciones de cultivo especiales o una vez trasplantados en el paciente. En ningún caso habrá afectación de las células germinales del paciente.

b) Tiempo de generación en el ecosistema en el que vaya a ser liberado:

No aplicable a Linfocitos T humanos

c) Modo de reproducción:

No aplicable a Linfocitos T humanos Sexual Asexual

d) Factores que afectan a la reproducción:

No aplicable a Linfocitos T humanos

9. Capacidad de supervivencia

a) Capacidad de formar estructuras que favorezcan la supervivencia o el letargo:

No aplicable a Linfocitos T humanos

- i) endosporas
- ii) quistes
- iii) esclerocios
- iv) esporas asexuales(hongos)
- v) esporas sexuales (hongos)
- vi) huevos

vii) pupas	<input type="checkbox"/>
viii) larvas	<input type="checkbox"/>
ix) otras (especifíquense)	

b) Factores pertinentes que afectan a la capacidad de supervivencia

La supervivencia de las células sanguíneas humanas fuera del respectivo huésped humano autólogo no es posible a menos que se apliquen condiciones de laboratorio y medios de cultivo especiales.

10. a) Vías de diseminación

Los linfocitos T modificados genéticamente se infundirán en el paciente. No existe posibilidad de transmitirse de persona a persona, a no ser que sean infundidos en receptores previamente sujetos a un acondicionamiento mieloablativo, y al no poseer capacidad de sobrevivir en el medio ambiente, no existe ninguna vía de diseminación.

10. b) Factores que afectan a la diseminación

En el caso de que los linfocitos T modificados genéticamente sean infundidos o inyectados en un individuo distinto al donante, se prevé que el sistema inmunitario del receptor los elimine al no ser histocompatibles.

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)

Ninguna.

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)	

2. Resultado que se pretende obtener mediante la modificación genética

Se obtendrán linfocitos T, diferenciados, adultos, autólogos, de sangre periférica, expandidos con citoquinas *in vitro* y modificados genéticamente mediante electroporación con un MC que codifica para la expresión de un CAR específico de CD19 conjugado con la región de coestimulación 4-1BB, la de transmisión de señal CD3 ζ y para la expresión del EGFRt y con un ARNm que codifica para una

transposasa. El transposón se integrará en el genoma celular y se expresará constitutivamente el CAR y el EGFRt de manera estequiométrica en las células modificadas. Estas células serán infundidas en los propios pacientes de los que se obtuvieron. Una vez en el paciente, estos linfocitos modificados, reconocerán a las células tumorales a través del CAR y podrán mediar su eliminación.

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 type="checkbox"/>
cósmido	<input type="checkbox"/>
Elemento de transposición	<input type="checkbox"/>
Otros (especifíquense): Minicírculo de ADN	
b) Identidad del vector: El vector utilizado es un minicírculo de ADN que porta un transposón de la familia <i>Sleeping Beauty</i> que codifica el receptor quimérico (CAR) que reconoce CD19 y hEGFRt (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano truncado). El minicírculo de ADN es un ADN circular de doble cadena derivado de un plásmido al que se le han eliminado las secuencias de origen bacteriano como los orígenes de replicación bacteriana y los genes de resistencias a antibióticos.	
c) Gama de organismos huéspedes del vector: El vector utilizado es un minicírculo de ADN no es posible que se incorpore de manera natural en ningún tipo de organismo ni ningún tipo celular por sí mismo. Para la modificación de los linfocitos T usando este vector se necesita la electroporación de las células, lo cual sólo se realiza en los laboratorios de nivel de contención II donde se produce el medicamento de terapia avanzada. Además, como las células son modificadas <i>ex vivo</i> , no es posible la modificación de otras células u organismos.	

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

Sí

No

Resistencia a los antibióticos

Otras, (especifíquense)

Se pueden identificar las células modificadas por la detección de la expresión del factor de crecimiento epidérmico o EGFRt mediante citometría de flujo, PCR, RT-PCR o ddPCR.

Indique qué gen de resistencia a los antibióticos se inserta:

No hay integración de ningún gen de resistencia a antibióticos.

e) Fragmentos constituyentes del vector

El minicírculo deriva del plásmido pT2 (cedido por el doctor Z. Ivics) que tiene un tamaño de 5675 pb. El minicírculo contiene las regiones terminales repetidas e invertidas de los transposones de la familia SB necesarias para su reconocimiento por la enzima transposasa SB100X y para su integración en el genoma, el promotor EF1 α , el CAR de segunda generación que reconoce el CD19 y tiene como dominio de co-estimulación 4-1BB y el EGFR humano truncado.

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 región terminal repetida e invertida o TIR (del inglés, *terminal inverted repeat*) a la otra:

- TIR: secuencias reconocidas por la transposa SB100X y que media su integración en el genoma.
- EF1 α : promotor interno que dirige la expresión constitutiva de los genes de interés.
- CAR: que consta a su vez de:
 - Péptido señal procedente del receptor CD8a.
 - scFv del clon FMC36 de ratón que reconoce el CD19 humano.
 - Región bisagra y dominio transmembrana procedente del receptor CD8a.
 - Dominio coestimulador 4-1BB
 - Dominio de señalización de CD3 ζ
- T2A: secuencia de salto ribosómico que asegura la traducción del CAR y el EGFRt por separado.
- EGFRt: secuencia utilizada como gen marcador y mecanismo de seguridad en caso de toxicidad del CAR para la eliminación de las células modificadas mediante el anticuerpo monoclonal cetuximab.
- Wpre mutada: *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.
- BGHpA: *bovine growth hormone poliadenylation*; secuencia encargada de la formación de la cola de poli A en el ARNm transcrito, lo que aumenta la estabilidad del ARNm.

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

- TIR: reconstruido a partir del genoma del pez *Tanichthys albonubes*.
- EF1 α : humano.
- CAR: mayoritariamente humano a excepción del scFv que es de ratón.
- T2A: virus *Thosea asigna*
- EGFRt: humano.
- Wpre mutada: virus de la hepatitis de la marmota.
- BGHpA: bobino.

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

- TIR: regiones que flanquean el transposón por ambos lados y son reconocidas por la transposasa SB100X para mediar la integración del transposón en el genoma celular.
- EF1 α : promotor constitutivo que dirige la expresión del CAR y el EGFRt.
- CAR: reconoce el antígeno CD19 presente en las células tumorales a través de su scFv y media la eliminación de estas células por la activación de los linfocitos producida por los dominios CD3 ζ u 4-1BB.
- T2A: secuencia de salto ribosómico que permite la traducción del CAR y el EGFRt de manera independiente a partir del mismo promotor.
- EGFRt: gen marcador y mecanismo de seguridad en caso de toxicidad descontrolada de las células modificadas.
- Wpre mutada: tiene la capacidad de estabilizar los ARNm aumentando la cantidad de proteína generada.
- BGHpA: da lugar a la cola de poli A en el ARNm la cual lo estabiliza.

d) Localización del fragmento de inserción en el organismo receptor:

- en un plásmido libre
- integrado en el cromosoma
- Otros especifíquense):

e) ¿Contiene el fragmento de inserción partes cuyo producto o función no se conozcan?

Sí No

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

2. Nombre completo

i) Orden y taxón superior (animales): Orden: Orthornavirae/ Blubervirales / Rodentia / Artiodactyla / Primate Familia: Permutotetraviridae / Hepadnaviridae / Muridae / Bovidae / Hominidae Subfamilia: Murinae / Bovinae / Homininae
ii) Familia (plantas): N/A
iii) Género: <i>Alphapermutotetravirus</i> / <i>Orthohepadnavirus</i> / <i>Mus</i> / <i>Bos</i> / <i>Homo</i>
iv) Especie: <i>Thosea asigna virus</i> / <i>Woodchuck hepatitis virus</i> / <i>Mus musculus</i> / <i>Bos Taurus</i> / <i>Homo sapiens</i>
v) Subespecie: <i>Homo sapiens sapiens</i>
vi) Cepa: N/A
vii) Cultivar/línea de reproducción: N/A
viii) Patovar: N/A
ix) Nombre vulgar: Ratón / Toro / Ser humano

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

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input 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 checked="" type="checkbox"/>
plantas		<input checked="" 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 checked="" type="checkbox"/>	No <input 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:		
<p>El virus de <i>Thosea asigna</i> infecta a larvas de la especie <i>Setothosea asigna</i>, que constituyen las principales plagas defoliadoras de las palmas aceitera y cocotera con brotes registrados en el noreste de Sumatra, Borneo y Malasia occidental. En este caso sólo se utiliza la secuencia T2A de este virus, una secuencia de salto ribosómico que permite producir, a partir de un mismo promotor, varias proteínas funcionales a la vez. Este virus no infecta humanos, y por tanto se considera de riesgo 1.</p> <p>El <u>virus de la hepatitis de la marmota</u> infecta a marmotas provocando esta enfermedad en estos animales. En este caso, la única secuencia utilizada de este virus es la secuencia Wpre, que es un elemento regulador post-transcripcional que genera una estructura terciaria en el ARN mensajero transcrito que incrementa su estabilidad y la traducción del mismo. La secuencia Wpre presenta la secuencia parcial de la proteína X, relacionada con la generación de hepatocarcinomas en estos animales, y un potenciador (<i>enhancer</i>) que puede actuar como promotor del péptido procedente de la proteína X. Esta secuencia se ha modificado para eliminar los sitios críticos de expresión este péptido procedente de la proteína X, reduciendo su posible toxicidad. Este virus se considera de tipo 1 al no infectar a humanos.</p>		

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, los *Orthohepadnavirus*, género al que pertenece el virus de la hepatitis de la marmota está incluido en la lista. Sin embargo, como este virus infecta sólo a marmotas y no humanos, se considera de tipo 1.

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

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 transposón en el genoma del linfocito T, gracias al promotor interno se expresará el CAR y el EGFRt y podrán reconocer y mediar la eliminación de células tumorales.

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 humanos siguientes?		<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>No se conoce patogenicidad (infectividad, toxigenicidad, virulencia, alergenidad, etc.) ni capacidad para colonizar otros organismos. Además, dado que en el ensayo clínico la modificación genética tendrá lugar <i>ex vivo</i> y luego las células se infundirán en el paciente, no existe posibilidad de modificación de otras líneas celulares.</p> <p>El producto celular, al igual que en otros protocolos <i>ex vivo</i> de terapia génica, se somete a un lavado antes de la infusión en el paciente, por lo que las dosis residuales de las sustancias utilizadas para el cultivo de las células estarán muy diluidas y no generarán efectos tóxicos en los pacientes. Por otro lado, no se considera que la infusión de moléculas de MC residuales vaya a modificar otras células, ya que este material no entra sin algún tipo de vehiculización o proceso físico como la electroporación en las células y será degradado en caso de que quede algún resto por el organismo.</p>		

4. Descripción de los métodos de identificación y detección

<p>a) Técnicas utilizadas para detectar el OMG:</p> <p>La detección se realiza mediante técnicas de biología molecular (<i>Western blot</i> y ddPCR) y citometría de flujo. Se hará seguimiento de los pacientes a los que se administre el OMG de forma periódica hasta que la pérdida del mismo, definida como ausencia de detección en dos muestras consecutivas por citometría de flujo.</p>
<p>b) Técnicas utilizadas para identificar el OMG:</p> <p>Se utilizan las mismas técnicas que las de detección, <i>western blot</i>, ddPCR y citometría de flujo. Se hará seguimiento de los pacientes a los que se administre el OMG de forma periódica hasta que la pérdida del mismo, definida como ausencia de detección en dos muestras consecutivas por citometría de flujo.</p>

F. Información sobre la liberación

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

El OMG no se liberará al medio ambiente. Se administrará de forma controlada a los sujetos seleccionados y que acepten su participación en el ensayo clínico. Los pacientes recibirán una infusión fraccionada de células TranspoCART19. Dichas células TranspoCART19 se administrarán en la planta de hospitalización de cualquiera de las instituciones participantes.

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 <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo, especifíquese:	

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

<p>a) Localización geográfica (región administrativa y coordenadas de referencia cuando proceda):</p> <p>El tratamiento de los pacientes se realizará en el contexto del ensayo clínico única y exclusivamente en los centros participantes:</p> <ul style="list-style-type: none">• Hospital Universitario de Salamanca• Clínica Universidad de Navarra• Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca• Hospital Virgen del Rocío• Hospital Institut Català d'Oncologia• Hospital Clínic de Barcelona• Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz• Hospital Universitario de Navarra
<p>b) Área del lugar (m²):</p> <p>No aplica. El medicamento se administra a un paciente mediante perfusión intravenosa en un entorno clínico hospitalario. No se espera que el OMG se libere al medio ambiente.</p> <p>i) lugar real de la liberación (m²):</p> <p>ii) área de liberación más amplia (m²):</p>
<p>c) Proximidad a biotipos reconocidos internacionalmente o zonas protegidas (incluidos depósitos de agua potable) que pudieran verse afectados:</p> <p>No aplica. El medicamento se administra a un paciente mediante perfusión intravenosa en un entorno clínico hospitalario. No se espera que el OMG se libere al medio ambiente.</p>
<p>d) Flora y fauna, incluidos cultivos, ganado y especies migratorias que pueden potencialmente interactuar con el OMG:</p> <p>No aplica. El medicamento se administra a un paciente mediante perfusión intravenosa en un entorno clínico hospitalario. No se espera que el OMG se libere al medio ambiente.</p>

4. Método y amplitud de la liberación

a. Cantidad de OMG que vaya a liberarse:

Se prevé la participación de 27 pacientes. Estos pacientes recibirán diferentes dosis dependiendo de la rama del ensayo en la que se encuentren, pudiendo recibir como máximo 5 millones de células modificadas/kg de peso

b. Duración de la operación:

5 años.

c. Métodos y procedimientos para evitar o reducir al mínimo la propagación de los OMG más allá del lugar de liberación:

No hay posibilidad de propagación, ya que la modificación genética de los linfocitos T se realizará *ex vivo* y estos no podrán sobrevivir a no ser que sean infundidos de nuevo en el paciente. No hay posibilidad de propagación por lo que no se contemplan métodos especiales para evitar la propagación.

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

No procede.

6. 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

No procede.

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 diana (si procede)

i) Orden y taxón superior (animales): Orden: Primate Familia: Hominidae Subfamilia: Homininae
ii) Familia (plantas): N/A
iii) Género: <i>Homo</i>
iv) Especie: <i>Homo sapiens</i>
v) Subespecies: <i>Homo sapiens sapiens</i>
vi) Cepa: N/A
vii) Cultivar/Línea de reproducción: N/A
viii) Patovar: N/A
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 células T que se realiza de forma rutinaria en el Hospital. La capacidad de supervivencia de los linfocitos T transfectados dentro del paciente depende enteramente del sistema hematopoyético del paciente. Las células TranspoCART19 se expanden *in vivo* mientras reconozcan antígeno por la capacidad intrínseca de proliferar que tienen los linfocitos T. Sin embargo, sin estímulo son células diferenciadas que probablemente desaparecerán. Los mecanismos de muerte celular son poco conocidos, pero teóricamente estas células desaparecen debido a la falta de factores de supervivencia (muerte por negligencia) o a la muerte inducida por activación sostenida y son eliminadas de la circulación por el sistema retículo-endotelial del bazo y el hígado (Norelli y col., 2016). No se prevé la interacción del transposón con las células del paciente, pero así todo se han realizado estudios de biodistribución donde se ha visto que esto no ocurre.

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

No es posible que existan interacciones con otros organismos ajenos, ya que los transposones SB han sido reconstruidos en el laboratorio a partir de secuencias presentes en diferentes organismos.

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 realizado en el ámbito hospitalario, no existe la posibilidad de que el OMG se extienda a 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: No es posible dado que el transposón se ha reconstruido a partir de secuencias presentes en diferentes tipos de peces.
b) De otros organismos al OMG: Tampoco es posible por el mismo motivo, el transposón ha sido reconstruido a partir de secuencias presentes en diferentes tipos de peces.
c) Consecuencias probables de la transferencia de genes: No aplica.

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

Se hará un seguimiento de los pacientes tras el tratamiento con los linfocitos T modificados genéticamente durante 36 meses para evaluar la seguridad del tratamiento. Para ello, se realizarán diferentes procedimientos y se realizarán estudios biológicos en muestras obtenidas de los pacientes. Adicionalmente, se realizará un seguimiento a largo plazo de los sujetos, que se someterán a análisis clínicos hasta los 60 meses post-tratamiento.

Tras la administración de las células TranspoCART19, se realizará una monitorización de la expansión de los linfocitos T CAR en los siguientes puntos temporales antes o después de la infusión de células TranspoCART19: screening, día 0, 7, 14, 21, 28, 56 y 100 días. En caso de persistencia de TranspoCART19, se extraerán de forma mensual durante el primer año y trimestral durante el segundo año. En caso de pérdida de TranspoCART19, definida como ausencia de detección en dos muestras consecutivas por citometría de flujo, se extraerán las muestras de forma trimestral. En los pacientes con persistencia de células TranspoCART19 más allá del año de la infusión, se extraerá una muestra cada 6 meses durante 2 años adicionales.

En pacientes con antecedentes de infiltración de Sistema Nervioso Central (SNC) se debe realizar monitorización del líquido cefalorraquídeo (LCR) al menos 1, 3 y 6 meses tras la infusión de células TranspoCART19 y después según indicación clínica. Ésta se realizará independientemente de que el paciente presente infiltración de LCR por células tumorales o de que la infiltración fuera exclusivamente parenquimatosa, siempre que no haya contraindicaciones para su realización.

Se realizará Citometría de flujo (muestra EDTA) para el estudio de subpoblaciones linfocitarias T, B y NK, así como el fenotipo de las mismas. Estudio de EGFR en la superficie de los linfocitos T para identificar aquellos electroporados con el transgén y realizar el seguimiento de los linfocitos T CAR *in vivo*.

2. Métodos de seguimiento de las repercusiones en el ecosistema

No procede. No habrá liberación al medio ambiente.

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

No procede. No habrá liberación al medio ambiente y por tanto no hay contacto con otros organismos.

4. Tamaño del área de seguimiento (m2)

N/A

5. Duración del seguimiento

El seguimiento de los pacientes se hará en contexto del ensayo clínico durante 36

meses y, además, se realizará un seguimiento a largo plazo (5 años).

6. Frecuencia del seguimiento

El seguimiento de los pacientes se hará en contexto del ensayo clínico. El seguimiento inicial será continuo mientras el paciente esté ingresado que será los primeros 10 días tras el tratamiento y, después, se realizarán visitas periódicas, semanalmente hasta el día +56, luego quincenales hasta el día +100 y posteriormente, se realizarán visitas mensuales el primer año, trimestrales el segundo año y semestrales el tercer año.

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

1. Tratamiento del lugar tras la liberación

Deben realizarse de acuerdo con los procedimientos del lugar de administración.

Los procedimientos de descontaminación siguen los procedimientos operativos estándar locales. La selección de desinfectantes se rige por la política del hospital.

El medicamento en investigación (IMP) residual, los residuos potencialmente contaminados y los materiales se eliminan de acuerdo con los procedimientos normalizados de trabajo (PNT) de riesgo biológico del centro.

2. Tratamiento del OMG tras la liberación

Seguimiento de las guías de práctica habitual para el tratamiento de los residuos biológicos del hospital donde se administre el tratamiento con el OMG, teniendo en cuenta que el OMG no puede diseminarse fuera del organismo del paciente.

3. a) Tipo y cantidad de residuos producidos

Residuos biológicos GRUPO III, son aquellos producidos por la actividad asistencial que conlleva algún riesgo potencial para los trabajadores expuestos, para la salud pública o para el medio ambiente, en concreto por ser restos relacionados con OMG, cortantes y/o punzantes o sangre y hemoderivados. Residuos biológicos en cantidad variable.

3. (b) Tratamiento de residuos

Todos los residuos se recogerán en contenedores rígidos con las características descritas en el Decreto 204/94. Llevan el pictograma de "residuos biocontaminados". El material cortante y punzante, se recoge en contenedores para objetos con el pictograma de "residuos biocontaminados, material de riesgo", están dotados de válvula de seguridad para evitar la salida accidental o la retirada de las agujas contaminadas. Cada centro tendrá un PNT para la eliminación de residuos de riesgo biológico. Esto debe incluir el mantenimiento de los residuos de riesgo biológico en un contenedor cerrado hasta que puedan ser esterilizados en autoclave y transportados a una empresa cualificada de eliminación de residuos de riesgo biológico para su incineración.

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

Todos los centros del ensayo clínico dispondrán de PNT escritos sobre el proceso de recepción, manipulación y administración del producto en investigación. Estos procedimientos están escritos para minimizar la exposición innecesaria y para mantener la salud y la seguridad del personal, así como del paciente.

Durante la descongelación y preparación de las células para su administración se debe utilizar equipo de protección personal (EPI). Las células deben prepararse para su administración en condiciones estériles. Las medidas se guiarán por los procesos del centro y la normativa local. Los procedimientos de descontaminación siguen los procedimientos operativos estándar locales y los requisitos normativos. La selección de los desinfectantes se rige por la política institucional. En caso de pinchazo accidental con una aguja, no hay requisitos específicos, ya que el riesgo de infección inadvertida es bajo. El centro tiene instrucciones de seguir los procedimientos de su hospital para notificar y gestionar un pinchazo de aguja.

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

La eliminación o inactivación de trazas del producto final al final del ensayo clínico debe realizarse de acuerdo con los procedimientos del lugar de administración

No hay unas medidas especiales para evitar la diseminación de los OMGs fuera del lugar de la liberación ya que los linfocitos T modificados genéticamente no pueden diseminarse fuera del organismo del paciente, las medidas son las habituales para pacientes tras la infusión de progenitores hematopoyéticos.

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

Seguimiento de las guías de práctica habitual para la limpieza y saneamiento del hospital donde se administre el tratamiento con el OMG. No se requieren medidas especiales.

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

El personal sanitario en contacto con el OMG llevará los equipos de protección individual necesarios.

Se deben utilizar las barreras primarias que correspondan, tales como máscaras contra salpicaduras, protección facial, batas y guantes y contar con barreras secundarias, tales como piletas para lavado de manos e instalaciones de descontaminación de desechos a fin de reducir la contaminación potencial del medio ambiente.

Se seguirán las guías de cada hospital para minimizar los riesgos y en caso de emergencia, si se diera el caso.