

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/17/14 |
| c) Fecha del acuse de recibo de la notificación: | 7/7/2017 |
| d) Título del proyecto: | Ensayo clínico Fase I/II para evaluar la seguridad y eficacia de la infusión en pacientes con deficiencia de adhesión leucocitaria tipo I (<i>Leukocyte Adhesion Deficiency Type I, LAD-I</i>) de células CD34⁺ autólogas transducidas “<i>ex vivo</i>” con un vector lentiviral portador del gen de la Integrin beta 2 (<i>Integrin beta 2, ITGB2</i>). |
| e) Período propuesto para la liberación: | Del 01/12/2017 al 31/12/2020 |

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"/> | CD34+ autólogas modificadas genéticamente |
| | - 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)

Progenitores hematopoyéticos autólogos CD34⁺ de pacientes con deficiencia en adhesión leucocitaria tipo I (*Homo sapiens sapiens*) transducidos con el vector lentiviral auto-inactivante Chim.hCD18.wpre*.

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

La transducción de las células CD34⁺ se realizará con el vector lentiviral Chim.hCD18.wpre* sin capacidad de autoreplicación.

La producción del vector lentiviral Chim.hCD18.wpre* se realizará mediante un sistema de producción de tercera generación, en donde los genes virales han sido eliminados del vector de transferencia y su región 3'UTR se ha modificado para convertirlo en un vector autoinactivante (LTRs virales inactivas).

El ADN del vector de transferencia, así como de los plásmidos accesorios para la producción lentiviral, serán producidos por la empresa Plasmid Factory, que se encargará de su almacenamiento, amplificación y control de calidad de cada nueva producción, dentro de este control de calidad se realizará la secuenciación de estos plásmidos para confirmar su estabilidad genética durante su amplificación. Así mismo, la empresa productora del sobrenadante lentiviral realizará distintos controles de calidad del sobrenadante lentiviral producido, entre los cuales figura la ausencia de lentivirus competentes en replicación (RCLs) en sus producciones.

Después de la transducción con el vector lentiviral, la secuencia Chim.hCD18.wpre* se integra en el genoma de las células CD34⁺ de una forma estable. La presencia de esta secuencia y su estabilidad será confirmada mediante PCR cuantitativa (qPCR) en las células derivadas de los progenitores hematopoyéticos CD34⁺.

La proteína hCD18 se expresará gracias al promotor interno corrigiéndose 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 | |

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 las células CD34⁺ transducidas con el vector Chim.hCD18.wpre* es muy bajo. El OMG consiste en células CD34⁺ transducidas *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 el vector lentiviral terapéutico como las células CD34⁺ transducidas 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 las células CD34⁺ transducidas 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.

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 | <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"/> |
| | <input type="checkbox"/> (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 <input type="checkbox"/> | No <input checked="" type="checkbox"/> |

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 (células CD34⁺ transducidas).

5.a) Técnicas de detección

La detección de la modificación genética se realiza mediante técnicas de biología molecular (*Western blot*, PCR cuantitativa (qPCR) y PCR con transcripción reversa cuantitativa (qRT-PCR). Además, para identificar las células CD34⁺ se utiliza la citometría de flujo y los marcadores CD34 o CD18 (anticuerpos monoclonales unidos a un fluorocromo).

5.b) Técnicas de identificación

Se utilizan las mismas técnicas que las de detección: qPCR, qRT-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.

Los progenitores hematopoyéticos CD34⁺ que serán modificados genéticamente serán obtenidos de pacientes con deficiencia de adhesión leucocitaria tipo I (LAD-I) y se infundirán de nuevo de forma autóloga a estos mismos pacientes. Se analizarán para detectar agentes virales accidentales, tanto los pacientes como los progenitores hematopoyéticos CD34⁺, al menos para identificar HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), HCV (*Hepatitis C Virus*) y HBV (*Hepatitis B Virus*), y en el caso de que diesen positivo, se les excluirá del estudio clínico.

Así mismo, después de la modificación genética de los progenitores hematopoyéticos, y previo a su infusión en los pacientes, se determinará la ausencia de lentivirus competentes en replicación (RCL, *replicative-competent lentivirus*) en las células CD34⁺ transducidas.

8. Información sobre reproducción

| |
|--|
| a) Tiempo de generación en ecosistemas naturales: La células CD34 ⁺ transducidas no pueden reproducirse en ningún ecosistema natural, únicamente en condiciones de cultivo especiales o una vez trasplantadas las células en el paciente. Las células transducidas con el vector integrado se dividirán para reconstituir la hematopoyesis del paciente. En ningún caso habrá afectación de células germinales del paciente. |
| b) Tiempo de generación en el ecosistema en el que vaya a ser liberado: No procede |
| c) Modo de reproducción Sexual <input type="checkbox"/> Asexual <input type="checkbox"/> No procede |
| d) Factores que afectan a la reproducción: No procede |

9. Capacidad de supervivencia

| |
|---|
| a) Capacidad de formar estructuras que favorezcan la supervivencia o el letargo |
| (i) endosporas <input type="checkbox"/> |
| (ii) quistes <input type="checkbox"/> |
| (iii) esclerocios <input type="checkbox"/> |
| (iv) esporas asexuales(hongos) <input type="checkbox"/> |
| (v) esporas sexuales (hongos) <input type="checkbox"/> |
| (vi) huevos <input type="checkbox"/> |
| (vii) pupas <input type="checkbox"/> |
| (viii) larvas <input type="checkbox"/> |
| (ix) otras (especifíquense) <input type="checkbox"/> |

b) Factores pertinentes que afectan a la capacidad de supervivencia

La capacidad de supervivencia de la célula CD34⁺ transducida depende enteramente de su anidamiento en el microambiente hematopoyético del paciente receptor del OMG.

10.a) Vías de diseminación

Las células CD34⁺ transducidas injertarán en el paciente para reconstituir su hematopoyesis, sin que exista posibilidad de transmitirse de persona a persona, a no ser que sean infundidas 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 caso de que los progenitores hematopoyéticos transducidos 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)

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, A/ES/04/I-04 y A/ES/12/I-21).

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

El OMG está constituido por progenitores hematopoyéticos CD34⁺ de pacientes con deficiencia en adhesión leucocitaria tipo I transducidos con el vector lentiviral Chim.hCD18.wpre*. El vector terapéutico se integrará en el genoma celular y se expresará constitutivamente la proteína terapéutica hCD18. Estos progenitores hematopoyéticos modificados genéticamente serán infundidos en los propios pacientes de los que se obtuvieron, reconstituyéndose su sistema hematopoyético a partir de estas CD34⁺ modificadas, por lo que la proteína terapéutica se expresará en todas las células sanguíneas derivadas, en especial en el linaje mieloide, en donde la expresión de CD18 restituirá la deficiencia de adhesión leucocitaria y permitirá a las células migrar a los sitios de infección. De esta forma la susceptibilidad de los pacientes a desarrollar infecciones se verá muy disminuida y su estado de salud mejorará notablemente. En los casos más severos de la enfermedad les permitirá sobrevivir por encima de los dos años de edad.

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 (especifíquense): | <input type="checkbox"/> |
| b) Identidad del vector: | |
| <p>El vector lentiviral Chim.hCD18.wpre* 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 mutado 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 y también alguno regulador. Estos vectores están pseudotipados con una envuelta distinta a la del virus original, la envuelta VSV-G (virus de la estomatitis vesicular). Son virus defectivos en replicación, no se conoce la formación de virus salvajes, ni de virus competentes en replicación (RCLs).</p> <p>Estos vectores se producen mediante cotransfección de 4 plásmidos en células 293T: vector de transferencia (pCCLsincPPT-Chim.hCD18.wpre*, ver figura), vectores empaquetadores (rev y gag-pol) y el de la envuelta VSV.</p> | |
| | |
| <p>Figura 1. Esquema del provirus integrado pCCLsincPPT-Chim.hCD18.wpre</p> | |
| c) Gama de organismos huéspedes del vector: | |
| <p>Debido a que el vector lentiviral está pseudotipado con la envuelta VSV-G, es capaz de transducir numerosos tipos celulares de distintas especies. Pero, 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.</p> | |
| d) Presencia en el vector de secuencias que den un fenotipo seleccionable o identificable | |

Sí

No

Resistencia a los antibióticos

Otras, (especifíquense)

Se puede identificar las células transducidas por la detección de la expresión de hCD18 que se puede detectar por PCR, RT-PCR o citometría de flujo.

Indique qué gen de resistencia a los antibióticos se inserta:

No hay integración de ningún gene de resistencia antibióticos.

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 9.996 bp. Desde el plásmido, en células eucariotas, se transcribe el ARNm de 6.539 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 1 en la sección 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.
- Chim: promotor interno que dirige la expresión mieloide de los genes de interés.
- hCD18: cDNA que codifica para la proteína hCD18
- 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.
- Chim: Humano.
- hCD18: 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 delecionado. 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.

- **Chim**: promotor interno que dirige la expresión mieloide de los genes de interés. El promotor Chimera es el resultado de la fusión de las regiones promotoras de los genes *CTSG* y *cFES*. El gen *CTSG* codifica para la proteína Catepsina G que es una serin proteasa específica de neutrófilos. El gen *cFES* codifica para la proteína tirosina quinasa Fes/Fps expresada también por neutrófilos y macrófagos. En esta fusión de regiones promotoras *CTSG-cFES* se ha eliminado la caja TATA de la región promotora de *CTSG* para que la expresión venga dirigida sólo por la región promotora del gen *cFES*.

- **hCD18**: cADN de la proteína CD18 codificada por el *ITGB2* que se encuentra localizado en 21q22.3

- **Wpre***: (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 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



- 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 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"/> |
| | <input type="checkbox"/> (especifique el phylum y la clase): |
| Otros (especifíquense) | |

2. Nombre completo

| |
|---|
| i) Orden y taxón superior (animales): |
| ii) Familia (plantas): Primate |
| iii) Género: Hominidae/Retroviridae |
| iv) Especie: Homo/Lentivirus |
| v) Subespecie: Homo sapiens/Lentivirus VIH-1 |
| 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 <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/> Especifíquese | | |
| b) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta al modo o índice de reproducción? Sí <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/> Especifíquese: | | |
| c) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta a la diseminación? Sí <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/> Especifíquese: | | |
| d) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad? Sí <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/> 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 hCD18 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"/> |

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

No se ha descrito ni infectividad ni propagación de los vectores lentivirales auto-inactivantes, como es el vector Chim.hCD18.wpre*. Y debido a que en el ensayo clínico la transducción será ex vivo y luego las células transducidas se infundirán en el paciente no existirá la posibilidad de transducir otros tipos celulares, 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. Pero en ningún caso el OMG es patogénico o dañino.

Como en el resto de los protocolos de transducción ex vivo realizados sobre células CD34⁺, el producto celular sometido al proceso de transducción será objeto de 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.

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.

4. Descripción de los métodos de identificación y detección

| |
|--|
| <p>a) Técnicas utilizadas para detectar el OMG en el medio ambiente:</p> <p>La detección se realiza mediante técnicas de biología molecular (<i>Western blot</i>, PCR cuantitativa (qPCR) y PCR con transcripción reversa cuantitativa (qRT-PCR). Además, para identificar las células CD34⁺ se utiliza la citometría de flujo y los marcadores CD34 y CD18 (anticuerpos monoclonales unidos a un fluorocromo).</p> |
| <p>b) Técnicas utilizadas para identificar el OMG:</p> <p>Se utilizan las mismas técnicas que las de detección: Q-PCR, RT-Q-PCR, Western blot y citometría de flujo.</p> |

F. Información sobre la liberación

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

| |
|---|
| <p>El OMG no se libera al medioambiente, sino que se infunde al paciente LAD-I con la finalidad de la corrección de la deficiencia en la adhesión leucocitaria tipo I característica de estos pacientes.</p> <p>El OMG está constituido por progenitores hematopoyéticos CD34⁺ de pacientes deficientes en adhesión leucocitaria tipo I transducidos con el vector lentiviral Chim.hCD18.wpre*. El vector terapéutico se integrará en el genoma celular y se expresará constitutivamente la proteína terapéutica hCD18. Estos progenitores hematopoyéticos modificados genéticamente serán infundidos en los propios pacientes de los que se obtuvieron, reconstituyéndose su sistema hematopoyético a partir de estas CD34⁺ modificadas, por lo que la proteína terapéutica se expresará en todas las células sanguíneas derivadas, en especial en el linaje mieloide, en donde la expresión de CD18 restituirá la deficiencia de adhesión leucocitaria y permitirá a las células migrar a los sitios de infección. De esta forma la susceptibilidad de los pacientes a desarrollar infecciones se verá muy disminuida y su estado de salud mejorará notablemente.</p> <p>No se prevé que el protocolo tenga ningún efecto sobre el medioambiente.</p> |
|---|

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>La liberación se producirá en el contexto de un ensayo clínico realizado en diversos centros hospitalarios.</p> |
| <p>b) Área del lugar (m²): No procede</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 procede</p> |

| |
|---|
| |
| d) Flora y fauna, incluidos cultivos, ganado y especies migratorias que pueden potencialmente interactuar con el OMG: |
| No procede |

4. Método y amplitud de la liberación

| |
|---|
| a) Cantidad de OMG que vaya a liberarse: |
| Se prevé la liberación de 8 pacientes. Con una infusión aproximada de $2-8 \times 10^6$ células/kg. |
| b) Duración de la operación: |
| 3 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 de los progenitores hematopoyéticos 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. 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 existen datos de liberaciones anteriores del mismo OMG |
|---|

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)

| |
|---------------------------------------|
| i) Orden y taxón superior (animales): |
| Primates |
| 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 ha 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 es previsible que existan interacciones con otros organismos ajenos ya que los pacientes receptores del OMG deben estar libres de VIH y así eliminar la posibilidad de recombinación entre nuestro vector lentiviral y HIV naturales. |
|--|

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. El ensayo clínico se llevará a cabo en el Hospital Infantil Universitario Niño Jesús (Av. de Menéndez Pelayo, 65, 28009 Madrid, España). |
|--|

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 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

Se hará un seguimiento de los pacientes una vez infundidos con los progenitores hematopoyéticos modificados genéticamente durante cinco años para evaluar la seguridad del tratamiento. Obteniéndose diferentes muestras, tanto de sangre periférica como de médula ósea, de los pacientes a partir de la tercera semana después de la infusión, para evaluarse parámetros hematológicos (porcentajes de progenitores hematopoyéticos y diversos linajes sanguíneos) y cuantificar la presencia de OMGs mediante la técnica de PCR, que al tratarse de una técnica altamente sensible y fiable permite la amplificación y detección de las secuencias de interés. Así mismo, se realizará estudios de clonalidad para analizar el sitio de integración del vector lentiviral en el genoma celular, con el objetivo de identificar dominancia clonar debido a la modificación genética.

Adicionalmente, se realizará un seguimiento a largo plazo de los sujetos, que se someterán a análisis clínicos rutinarios durante diez años para confirmar la ausencia de efectos secundarios a más largo plazo.

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

No procede

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 de distintos centros hospitalarios, 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 de los distintos centros hospitalarios participantes en el ensayo clínico.

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.

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. 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 Agricultura y Pesca, Alimentación y 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 el tiempo necesario según los protocolos habituales del servicio hospitalario relacionados con los trasplantes hematopoyéticos con acondicionamiento.

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

Aislar la zona de derrame; absorber la solución derramada con toallas desechables de papel u otro tipo de material absorbentes. Se tratará con lejía al 5%, 0,5% solución de hidróxido de sodio o una solución de desinfectante. 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.
- 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.