

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/23/18
c) Fecha del acuse de recibo de la notificación:	Fecha de presentación por sede electrónica 8/06/2023
d) Título del proyecto:	Estudio clínico T3P1001: Estudio de fase I/II y sin ocultación sobre T3P-Y058-739, una cepa modificada genéticamente de la bacteria <i>Yersinia enterocolitica</i> , en pacientes con tumores sólidos avanzados
e) Período propuesto para la liberación:	Desde el 1/1/2024 hasta el 1/6/2026

2. Notificador

Nombre de la institución o empresa:	T3 Pharmaceuticals AG (promotor del ensayo) Hegenheimermattweg 167A 4123 Allschwil, Suiza
-------------------------------------	---

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 checked="" type="checkbox"/>
Hongo	<input type="checkbox"/>
Animal	<input type="checkbox"/>
- mamíferos	<input 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)

Yersinia enterocolitica T3P-Y058-739 (denominada T3P-Y058-739) se ha derivado por ingeniería genética de la cepa parental *Yersinia enterocolitica* E40 (género *Yersinia*; especie *Yersinia enterocolitica*). *Y. enterocolitica* E40 pertenece a la subespecie *paleartica* poco virulenta de *Y. enterocolitica*, que carece de isla de alta patogenicidad (IAP) que codifica al sideróforo Yersiniabactina (Ybt) y, como resultado, tiene una adquisición de hierro deficiente.

Se le han suprimido 6 genes asociados a la patogenicidad para reducir la patogenicidad de la bacteria y aumentar la capacidad de crecer, de preferencia, en los tumores humanos. A T3P-Y058-739 también se le han introducido los genes de dos proteínas de carga humanas, para estimular la respuesta inmunitaria local y sistémica. Se ha eliminado un gen natural de resistencia a la ampicilina, la β -lactamasa A (*blaA*), para aumentar la susceptibilidad a las penicilinas (consulte el apartado C para más detalles).

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

Las supresiones genéticas de las 6 proteínas externas de *Yersinia* (Yops) normalmente codificadas en el plásmido de virulencia pYV, y la supresión genética del gen *blaA* del genoma bacteriano, son muy estables. Se comprobó que los transgenes terapéuticos introducidos en el plásmido pYV se mantienen de forma estable. El plásmido 739, que también codifica las proteínas terapéuticas, tendrá un número de copias reducido y acabará perdiéndose durante días o semanas durante el crecimiento en tumores sin presión selectiva.

Para más detalles sobre la estabilidad genética de T3P-Y058-739, consulte el apartado E.2.

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"/>
-----------------------------	--

<p>En caso afirmativo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 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 checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
--	-----------------------------

<p>En caso afirmativo:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Estado miembro de la notificación: Suiza (CH), Reino Unido (UK) (utilización confinada) - Número de la notificación:
--

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

T3P-Y058-739 se preparará y administrará a los pacientes en un entorno hospitalario de contención. Los centros de investigación desinfectarán a fondo el equipo y las superficies de acuerdo con las prácticas médicas habituales utilizando etanol, hipoclorito sódico, ácido peracético, peróxido de hidrógeno o sustancias equivalentes con actividad bactericida. Todos los materiales que entren en contacto con T3P-Y058-739, como residuos biológicos o de categoría III, de acuerdo con los procedimientos de los centros hospitalarios que participan en el ensayo. Estos procedimientos limitarán estrictamente la exposición de otros organismos (concretamente bacterias) a T3P-Y058-739 en el entorno hospitalario/clínico.

Si bien los pacientes se convierten en un hábitat temporal de T3P-Y058-739 hasta su eliminación, no se espera que T3P-Y058-739 se excrete, basándose en estudios preclínicos de T3P-Y058-739 y de cepas relacionadas. Esto se sustenta con los datos clínicos de las infecciones por *Y. enterocolitica* natural, que describen que la mayoría de las infecciones humanas se producen tras el consumo de carne de cerdo cruda o poco cocinada. Aunque *Y. enterocolitica* puede encontrarse en las heces de individuos con gastroenteritis, la transmisión de persona a persona es poco frecuente. La infección por vía inhalatoria o por exposición a la orina o la saliva no se ha descrito y no parece que se produzca. En los datos clínicos preliminares de 5 pacientes que han recibido al menos una dosis de T3P-Y058-739 en el ensayo T3P1001, no se detectó T3P-Y058-739 (mediante cultivo microbiológico) ni ADN de T3P-Y058-739 (mediante análisis de PCR digital en nanogotas) en sangre, orina o heces.

No puede descartarse la posibilidad de que T3P-Y058-739 se excrete en las heces, debido a que puede detectarse *Y. enterocolitica* natural en muestras de heces tras una gastroenteritis inducida por *Y. enterocolitica*. Sin embargo, en estos casos adquiridos de forma natural, *Y. enterocolitica* natural habría entrado en el intestino por vía oral, mientras que en los pacientes tratados con T3P-Y058-739, la bacteria entrará en el organismo por inyección intratumoral (i.t.) o por perfusión intravenosa (i.v.). La excreción al intestino desde la circulación no es la dirección habitual de paso de *Y. enterocolitica* y, por tanto, es poco probable que se produzca. Sin embargo, es plausible que en algunos pacientes (sobre todo los que tienen tumores que afectan a la orofaringe o están cerca de ella), la inyección directa de T3P-Y058-

739 en el tumor pueda provocar una fuga hacia la orofaringe o el esófago y, por lo tanto, la entrada en el intestino de la forma habitual, lo que podría dar lugar a la excreción en las heces. Estas entrarán en el sistema de alcantarillado, que está diseñado para eliminar las bacterias del agua. Se han tomado precauciones de seguridad adicionales (lavado de manos y precauciones higiénicas alimentarias prudentes) para evitar cualquier exposición de otras personas, animales y el medioambiente.

Además, es plausible que T3P-Y058-739 pueda transmitirse si se excreta de las zonas de inyección o de los apósitos que cubren los tumores ulcerados. Los apósitos usados que puedan estar contaminados con T3P-Y058-739 se colocarán en una bolsa de plástico sellada, que será eliminada por los hospitales como residuo biológico peligroso.

Es importante destacar que las modificaciones genéticas que se han realizado en T3P-Y058-739 no confieren ninguna ventaja conocida a la bacteria en relación con la supervivencia o la multiplicación en su hábitat natural (es decir, el agua o el suelo) y disminuyen la patogenicidad del microorganismo en comparación con sus homólogos de tipo natural.

Los pacientes con una infección reciente por *Y. enterocolitica* o con *Y. enterocolitica* natural presente en una muestra de heces de referencia no podrán entrar en el estudio. Por consiguiente, T3P-Y058-739 no se encontrará con *Y. enterocolitica* natural dentro del tubo gastrointestinal del paciente. También es muy poco probable que T3P-Y058-739 encuentre *Y. enterocolitica* natural en los apósitos de las heridas, debido a que *Y. enterocolitica* no es un comensal de la piel.

Aunque existe la posibilidad de que T3P-Y058-739 se excrete en las heces de los pacientes y se encuentre con otras bacterias en el sistema de alcantarillado, no se espera que se produzca una transferencia horizontal de genes. Además, debido a que los principales impulsores de virulencia (IAP y varios efectores de virulencia fundamentales) están ausentes en T3P-Y058-739, la transferencia de elementos genéticos de T3P-Y058-739 a otras cepas de *Yersinia* no conferiría virulencia y se esperaría que las cepas resultantes tuvieran una patogenicidad muy reducida en comparación con *Yersinia* patógena natural. No se ha descrito la transferencia de material genético de especies bacterianas diferentes de las Enterobacteriaceae a *Y. enterocolitica* y, por lo tanto, no se espera que se produzca.

La transferencia del plásmido que codifica los dos transgenes terapéuticos y un gen de resistencia al cloranfenicol es teóricamente posible. Sin embargo, el origen de replicación del plásmido limita los organismos a los que podría producirse la propagación. No se espera una exposición a los mismos en un entorno en el que pudiera considerarse que se produce una transferencia genética.

En resumen, el riesgo general del estudio clínico para la salud humana, los animales y el medioambiente se considera insignificante.

i) Sí

En caso afirmativo, indíquese el tipo de ecosistema en que se encuentra:

Atlántico

Mediterráneo

Boreal

Alpino

Continental

Macaronésico

ii) No

iii) No se sabe

c) ¿Se usa frecuentemente en el país que notifica?

Sí

No

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):

Las especies no patógenas de *Yersinia* se encuentran en abundancia en muestras de alimentos y del medioambiente, incluidas las heces humanas. Los cerdos son el principal reservorio animal de *Y. enterocolitica* patógena. Los cerdos son portadores de la bacteria en la cavidad bucal (lengua y amígdalas) y en los ganglios linfáticos.

Y. enterocolitica puede causar enfermedades en los seres humanos (gastroenteritis humana; la infección puede producirse tras el consumo de alimentos contaminados).

b) Si es un animal, hábitat natural o ecosistema agrícola habitual: No procede.

5. a) Técnicas de detección

Para el crecimiento selectivo de *Y. enterocolitica* se dispone de los medios correspondientes (es decir, el agar de Cefsulodina-Irgasán-Novobiocina [CIN]). La morfología de la colonia unida a una reacción diferencial resultante de la fermentación del manitol permite identificar *Y. enterocolitica* de la mayoría de las otras bacterias gramnegativas que tienen la capacidad de crecer en los medios selectivos. La confirmación puede obtenerse sometiendo colonias individuales a un análisis por espectrometría de masas.

Se ha demostrado que el agar CIN detecta de forma fiable *Y. enterocolitica* en concentraciones tan bajas como 10 unidades formadoras de colonias (UFC)/ml a partir de cultivos puros y 10^4 UFC/ml en mezclas que contienen otras bacterias.

5. b) Técnicas de identificación

El agar CIN se describe como muy selectivo, pero la discriminación de otras bacterias fermentadoras del manitol (como *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter agglomerans*, *Aeromonas* spp., *Citrobacter* spp., *Providencia* spp. *Acinetobacter johnsonii* y *Achromobacter xylosoxidans*) puede ser problemática, aunque modificaciones adicionales del agar pueden mejorar la identificación.

Se puede aumentar la confianza combinando la naturaleza selectiva del agar CIN con técnicas de identificación que hagan uso de la espectrometría de masas. Los distintos patrones observados en colonias individuales sometidas a espectrometría de masas (EM) de ionización láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) permiten la clasificación a nivel de especie con una precisión muy elevada.

Los marcadores fenotípicos y genéticos del microorganismo parental pueden evaluarse en las evaluaciones respectivas (por ejemplo, confirmación del serotipo mediante aglutinación, ausencia de la IAP mediante secuenciación).

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: *Yersinia enterocolitica* se categoriza como grupo de riesgo 2.

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	<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 11 del anexo III A de la Directiva 2001/18/CE.

8. Información sobre reproducción

a) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:
Y. enterocolitica se replica por división celular vegetativa y es una bacteria facultativa, psicrotrófica, capaz de crecer a temperaturas de refrigeración. Los tiempos de generación dependen de la temperatura y del medio de cultivo y oscilan entre 8 y 12 horas cuando se refrigera y 30-40 minutos cuando se cultiva por encima de 30°C.

b) Tiempo de generación en el ecosistema en el que vaya a ser liberado:
El tiempo de generación es el mismo que en los ecosistemas naturales.

c) Modo de reproducción Sexual Asexual

d) Factores que afectan a la reproducción:
La supervivencia y multiplicación de *Y. enterocolitica* se ve afectada por factores ambientales como la temperatura y el pH.

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)

Y. enterocolitica no forma ninguna de las estructuras enumeradas anteriormente.

b) Factores pertinentes que afectan a la capacidad de supervivencia

Y. enterocolitica es un anaerobio facultativo, que puede sobrevivir tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas. Se ha descrito que *Y. enterocolitica* sobrevive 448 días en agua entre -4°C y 8°C, y 10 días en agua entre 20°C y 30°C. Puede vivir hasta 10 días en el suelo y en estiércol de ganado entre -4°C y 30°C. *Y. enterocolitica* es una bacteria que no forma esporas. Se ha descrito la formación de biopelículas.

Ninguna de las modificaciones genéticas que se han realizado en T3P-Y058-739 confiere ninguna ventaja conocida a la bacteria en términos de supervivencia o multiplicación en su hábitat natural (es decir, el agua o el suelo).

10. a) Vías de diseminación

Y. enterocolitica es una enterobacteria. Se adquiere por vía oral, normalmente tras el consumo de alimentos contaminados. En relación con otros microorganismos, *Y. enterocolitica* es una causa poco frecuente de enfermedad transmitida por los alimentos. Aunque *Y. enterocolitica* puede encontrarse en las heces de individuos con gastroenteritis, la transmisión de persona a persona es poco frecuente. La contaminación de los alimentos por un manipulador de alimentos infectado y las infecciones nosocomiales se han notificado ocasionalmente, pero los brotes de gastroenteritis debidos a la contaminación de los suministros de agua por *Y. enterocolitica* son poco frecuentes (normalmente implican la contaminación del agua de pozo u otra agua potable no tratada por residuos de granjas porcinas cercanas en lugar de aguas residuales humanas).

Y. enterocolitica natural se encuentra en humanos, animales de sangre caliente (sobre todo en animales de granja y mascotas), aves y, en raras ocasiones, en reptiles, peces y mariscos. Las especies no patógenas de *Yersinia* se encuentran en abundancia en muestras de alimentos y medioambientales, incluidas las heces humanas. El cerdo es el principal reservorio animal de *Y. enterocolitica* patógena y se considera que el consumo de carne de cerdo cruda o poco cocinada es la principal vía de transmisión de *Y. enterocolitica* patógena al ser humano. Los cerdos son portadores de la bacteria en la cavidad bucal (lengua y amígdalas) y en los ganglios linfáticos, y se cree que el resto del animal en canal se contamina en el matadero. La capacidad de *Y. enterocolitica* para crecer a +4 C y multiplicarse en los productos derivados de la carne durante su conservación refrigerada aumenta el riesgo de transmisión a los seres humanos.

Y. enterocolitica natural también puede transmitirse en productos sanguíneos tras la conservación de sangre donada contaminada (bacterias presentes en concentraciones bajas en portadores asintomáticos) en condiciones que permiten la proliferación de la bacteria, a veces hasta niveles elevados tras una conservación prolongada.

10. b) Factores que afectan a la diseminación

La gastroenteritis debida a *Y. enterocolitica* es una infección zoonótica y rara vez está vinculada a la transmisión humana directa o a la contaminación del agua potable por aguas residuales humanas. La higiene alimentaria es fundamental para limitar la difusión de *Y. enterocolitica* natural patógena. En particular, las buenas prácticas en la cría de cerdos y en los mataderos son esenciales para evitar la contaminación de los suministros de agua con los efluentes de las granjas porcinas, así como la contaminación de las canales destinadas al consumo de carne.

Es más probable que la bacteriemia y la enfermedad sistémica tras una gastroenteritis se den en ancianos y en pacientes con afecciones inmunosupresoras subyacentes como la cirrosis o la diabetes *mellitus*. Debido a la deficiente adquisición de hierro de la subespecie *paleartica* de *Y. enterocolitica*, la sobrecarga de hierro y el tratamiento con el quelante del hierro deferoxamina también son factores predisponentes importantes para las infecciones causadas por la diseminación de la *Yersinia*.

El cribado de síntomas recientes de gastroenteritis en los donantes de sangre y la reducción del tiempo de conservación de los productos sanguíneos antes de la transfusión pueden reducir la posibilidad de reacciones a la transfusión debidas a *Y. enterocolitica*.

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 procede.

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 checked="" 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

T3P-Y058-739 deriva de la subespecie *paleartica* poco virulenta de *Y. enterocolitica* que presenta deficiencias en la adquisición de hierro.

Se han realizado las siguientes modificaciones genéticas en *Y. enterocolitica* E40 para generar T3P-Y058-739:

1. La supresión de uno de los dos genes naturales de resistencia a la ampicilina, la β -lactamasa A (*blaA*), conduce a una mayor

susceptibilidad a las penicilinas en comparación con *Y. enterocolitica* E40. La ausencia del gen *blaA* también puede utilizarse para ayudar a identificar T3P-Y058-739 (véase el apartado E4).

2. La supresión o inactivación de los seis genes que codifican proteínas efectoras endógenas relacionadas con el sistema de secreción de tipo tres (T3SS) de la bacteria (proteína externa de *Yersinia* [Yop]E, YopH, YopM, YopO, YopP y YopT). Estos genes están codificados en un plásmido endógeno de virulencia muy conservado (denominado plásmido de virulencia de *Yersinia* o pYV). Con estas modificaciones genéticas se pretende reducir aún más la patogenicidad de la bacteria y aumentar su capacidad para crecer preferentemente en el microentorno inmunodeprimido de los tumores humanos.
3. La inserción de dos genes que codifican proteínas de carga terapéuticas (gen humano inducible por ácido retinoico 1 [RIG-I] con dominio de activación y reclutamiento de caspasa [CARD] y GMP-AMP sintasa cíclica [c-GAS]), que inducen una respuesta de interferón de tipo I tras la translocación por el T3SS en células eucariotas, en el plásmido endógeno pYV en el locus natural de los efectores del T3SS YopE y YopH.
4. La transformación del plásmido 739 que también codifica las proteínas de carga terapéutica RIG-I-CARD y c-GAS en una estructura del operón.

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 checked="" type="checkbox"/>
bacteriófago	<input type="checkbox"/>
virus	<input type="checkbox"/>
cósmido	<input type="checkbox"/>
Elemento de transposición	<input type="checkbox"/>

Otros (especifiquense):

El vector (pKNG101) utilizado para suprimir secuencialmente los seis genes asociados a la patogenicidad y el gen *blaA* y para introducir los genes que codifican las dos proteínas de carga terapéutica, ya no está presente en el organismo modificado. Sin embargo, el organismo se transformó además con el plásmido 739 que codifica las cargas terapéuticas. Por consiguiente, la siguiente información se refiere solo al plásmido 739.

b) Identidad del vector:

El plásmido 739 es un plásmido sintético que codifica los dos transgenes terapéuticos. Contiene los elementos necesarios para permitir el aumento de la expresión y la secreción basada en el T3SS de los transgenes, a saber, el origen de replicación pBR322, el gen *cat* para la selección, el gen que codifica la chaperona SycE y el operón que codifica los transgenes.

c) Gama de organismos huéspedes del vector:

Este origen de replicación pBR322 limita la propagación del plásmido 739, ya que tiene un rango de hospedador limitado, es decir, ciertas *Enterobacteriaceae* y otros pocos organismos como *Serratia marcescens* y *Yersinia*.

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

Sí

No

Resistencia a los antibióticos

Otras, (especifiquense)

Indique qué gen de resistencia a los antibióticos se inserta:

cat: gen que codifica la cloranfenicol acetiltransferasa, que confiere resistencia al cloranfenicol.

e) Fragmentos constituyentes del vector

El plásmido 739 contiene los siguientes elementos:

- Origen de pBR322: origen de la replicación.
- Operón que codifica las proteínas de fusión terapéuticas RIG-I-CARD y c-GAS: la expresión de las proteínas de fusión contribuye al efecto terapéutico de T3P-Y058-739 tras su administración por el T3SS en células eucariotas. La expresión de estos dos genes está controlada por el promotor nativo de *yopE*.
- *syncE*: codifica la chaperona SycE que se une al extremo N-terminal de YopE y ayuda a la estabilización y secreción de YopE (y de las respectivas proteínas de fusión) por el T3SS.
- *cat*: gen que codifica la cloranfenicol acetiltransferasa. Este confiere resistencia al cloranfenicol al unir covalentemente un grupo acetilo de la acetilcoenzima A al cloranfenicol, lo que impide que el cloranfenicol se una a los ribosomas. El cloranfenicol se utiliza para seleccionar el plásmido 739 durante la fabricación.

f) Método de introducción del vector en el organismo receptor

- | | |
|-----------------------------|-------------------------------------|
| i) transformación | <input checked="" type="checkbox"/> |
| ii) electroporación | <input checked="" type="checkbox"/> |
| iii) macroinyección | <input type="checkbox"/> |
| iv) microinyección | <input type="checkbox"/> |
| v) infección | <input type="checkbox"/> |
| 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 | <input type="checkbox"/> |
| ii) microinyección | <input type="checkbox"/> |
| iii) macroencapsulación | <input type="checkbox"/> |
| iv) macroinyección | <input type="checkbox"/> |
| v) otros, (especifíquense) | |

6. Información sobre el fragmento de inserción:

a) Composición del fragmento de inserción:

Para obtener T3P-Y058-739 a partir de *Y. enterocolitica* E40, se han introducido las siguientes alteraciones genéticas (entre otras inserciones):

- Eliminación de *blaA*: la cepa resultante, *Y. enterocolitica* MRS40, tiene una mayor sensibilidad a las penicilinas.
- Mutación de los genes *yopO*, *yopP*, *yopM* y *yopT*, que resulta en la ausencia de las correspondientes proteínas efectoras funcionales YopO, YopP, YopM y YopT.
- Inserción de proteínas de carga RIG-I-CARD, fusionadas a un fragmento N-terminal de la proteína YopE, en el locus *yopE* reemplazando al gen *yopE* completo. Como resultado, la cepa ya no expresa YopE sino, en su lugar, la proteína de fusión terapéutica bajo el control del promotor nativo de *yopE*.
- Inserción de la proteína de carga cGAS, fusionada a un fragmento N-terminal de la proteína YopE, en el locus *yopH* reemplazando a todo el gen *yopH*. Como resultado, la cepa ya no expresa YopH sino, en su lugar, la proteína de fusión terapéutica bajo el control del promotor nativo de *yopH*.

La cepa también se ha transformado con el plásmido 739 que codifica:

- Las proteínas de carga RIG-I-CARD y cGAS en un solo operón bajo el control del promotor nativo *yopE*.
- La chaperona SycE que se une a la parte N-terminal de YopE y ayuda a la estabilización y secreción de YopE (y de las respectivas proteínas de fusión) por el T3SS. SycE se expresa en su promotor natural.
- El gen *cat* que codifica la cloranfenicol acetiltransferasa.

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

Los elementos genéticos introducidos en *Y. enterocolitica* E40 para generar T3P-Y058-739 derivan de secuencias endógenas de *Y. enterocolitica* E40 (por ejemplo, el N-terminal de YopE o SycE) o, en el caso de los transgenes introducidos (RIG-I-CARD y cGAS), derivan de las secuencias de proteínas humanas. Los transgenes terapéuticos introducidos contienen la parte N-terminal endógena de la proteína efectora YopE necesaria para que sea transportada por el T3SS.

El plásmido 739 es un plásmido totalmente sintético (sintetizado *de novo*) que también contiene los mismos dos transgenes terapéuticos. Además, contiene el origen de replicación pBR322 (derivado de un vector de clonación estándar de *E. coli*), la chaperona SycE (derivada de *Y. enterocolitica* E40) y el gen *cat* (derivado de un vector de clonación estándar de *E. coli*) para la selección de plásmidos *in vitro*.

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

- T3P-Y058-739 está diseñada para microinyectar dos proteínas de carga, RIG-I-CARD y cGAS, en células eucariotas circundantes. Ambas proteínas de carga se unen a un fragmento N-terminal de la proteína YopE. Esta parte N-terminal de la proteína YopE no tiene actividad enzimática pero permite el transporte de proteínas fusionadas al interior de las células eucariotas a través del T3SS. Las proteínas de carga, RIG-I-CARD y cGAS, activan vías diferentes: RIG-I-CARD activa la vía RIG-I, señalizando a través de la proteína mitocondrial de señalización antivírica (MAVS), mientras que cGAS activa la vía del estimulador de genes de interferón (STING). Sin embargo, estas vías convergen para dar lugar a la inducción de interferones de tipo I y otras citocinas.
- SycE es una chaperona de YopE. Se une al dominio de localización de la membrana de YopE que estabiliza la YopE en el citoplasma bacteriano y ayuda a su exportación por el T3SS. Para permitir la estabilidad y la secreción eficaz de las proteínas de fusión terapéuticas, la SycE se coexpresa en T3P-Y058-739.
- pBR322 controla la replicación del plásmido 739.
- Cat (cloranfenicol acetiltransferasa) confiere resistencia al cloranfenicol y se utiliza para seleccionar el plásmido 739 durante la fabricación.

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

- en un plásmido libre

- integrado en el cromosoma

- Otros especifíquense):

Los transgenes terapéuticos introducidos que codifican las proteínas de carga están localizados en el locus endógeno del gen *yopE* (RIG-I-CARD) y en el locus endógeno del gen *yopH* (cGAS). Ambos locus se encuentran en el plásmido pYV endógeno.

Los transgenes terapéuticos también están codificados en un operón del plásmido 739, que se ha transformado en T3P-Y058-739.

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 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):
iii) Género: Homo
iv) Especie: <i>Homo sapiens</i>
v) Subespecie:
vi) Cepa:
vii) Cultivar/línea de reproducción:
viii) Patovar:
ix) Nombre vulgar: humano

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 No No se sabe

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 No

En caso afirmativo, especifíquese:

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

Sí No No se sabe

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

<p>Especifíquese:</p> <p>d) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad?</p> <p>Sí <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/></p> <p>Especifíquese:</p> <p>T3P-Y058-739 ha sido modificada genéticamente para eliminar los seis principales factores de virulencia (Yops), lo que se traduce en una marcada atenuación de la virulencia. Se ha demostrado que la eliminación de los seis genes que codifican Yop reduce en gran medida la capacidad de la bacteria para causar bacteriemia y colonización de tejidos normales. Sin embargo, la colonización de los tumores no parece verse afectada.</p> <p>La introducción de genes para dos proteínas humanas que estimulan el sistema inmunitario (en contraste con las proteínas Yop que suprimen la respuesta inmunitaria a las bacterias) disminuye aún más el potencial de patogenicidad de T3P-Y058-739 en comparación con <i>Y. enterocolitica</i> natural.</p>
--

2. Estabilidad genética del organismo modificado genéticamente

<p>Se prevé que la estabilidad genética del plásmido de virulencia de <i>Yersinia</i> (pYV) sea alta debido a un sistema específico de replicación y partición que está muy conservado en <i>Y. enterocolitica</i>. Esto ha sido confirmado por los datos de fabricación que demuestran que el plásmido pYV se mantiene en cultivos líquidos sin necesidad de presión selectiva y por los datos no clínicos que demuestran que el plásmido pYV se mantuvo durante varios días de crecimiento dentro de tumores en modelos murinos de cáncer.</p> <p>La evaluación preclínica descubrió que el plásmido 739 se pierde gradualmente durante el crecimiento de T3P-Y058-739 dentro de los tumores. Esto es de esperar ya que no existe presión selectiva (cloranfenicol). Sin embargo, a pesar de la pérdida gradual al crecer dentro de los tumores, se prevé que la mayor expresión de las proteínas de carga terapéutica mejore la eficacia terapéutica de T3P-Y058-739.</p>
--

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"/>
<p>En caso afirmativo:</p> <p>a) ¿Para cuál de los organismos humanos siguientes? <input type="checkbox"/></p> <p style="padding-left: 150px;">animales <input type="checkbox"/></p> <p style="padding-left: 150px;">plantas <input type="checkbox"/></p> <p style="padding-left: 150px;">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

T3P-Y058-739 procede de una cepa poco patógena de *Y. enterocolitica* que presenta una adquisición deficiente de hierro. Además, en T3P-Y058-739 se han eliminado los genes de las seis proteínas Yops (YopE, YopH, YopM, YopO, YopP y YopT), esenciales para la enteropatogenia, y se han introducido dos genes inmunoestimuladores humanos. Se espera que estas modificaciones aumenten la eliminación de T3P-Y058-739 de los tejidos sanos, potencien el crecimiento selectivo en tumores y reduzcan significativamente las posibilidades de propagación sistémica, en comparación con *Y. enterocolitica* natural. Si se expusiera a una persona de forma involuntaria, se prevé que la dosis sea baja y es poco probable que la vía de transmisión sea infecciosa. Las posibles consecuencias de la ingestión oral de T3P-Y058-739 (por ejemplo, tras una contaminación accidental de los alimentos) serían considerablemente más leves que en el caso de *Y. enterocolitica* natural debido a la marcada atenuación de la virulencia. No se esperan efectos adversos para las personas que entren en contacto de forma accidental con T3P-Y058-739.

Y. enterocolitica natural puede infectar a un amplio espectro de animales y, en consecuencia, en teoría podría producirse la transmisión de T3P-Y058-739 a otros animales, incluidas las mascotas como los conejos, los ratones, los gatos y los perros. *Y. enterocolitica* no es patógena para los cerdos y las características clínicas en pequeños roedores como ratones y conejos son comparables a la enfermedad humana. *Y. enterocolitica* en primates no humanos y monos parece ser más grave, pero no se prevé la exposición de estas especies. Además, T3P-Y058-739 tiene una marcada reducción de la patogenicidad en comparación con *Y. enterocolitica* natural y se espera una eliminación natural por el sistema inmunitario.

En el estudio clínico T3P1001 se aplicarán medidas de lavado de manos y precauciones higiénicas alimentarias prudentes, así como de eliminación cuidadosa de los apósitos para evitar la exposición involuntaria y la transmisión de T3P-Y058-739 a los seres humanos, los animales domésticos y otros animales.

4. Descripción de los métodos de identificación y detección

- a) Técnicas utilizadas para detectar el OMG:

Los métodos de cultivo semicuantitativos (unidades formadoras de colonias) y el análisis cuantitativo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizan para detectar T3P-Y058-739 en muestras biológicas (por ejemplo, tejidos, sangre, orina y heces), como se describe en el siguiente apartado.

- b) Técnicas utilizadas para identificar el OMG:

Se han desarrollado PCR específicas para detectar las modificaciones genéticas introducidas en *Y. enterocolitica* E40 para generar T3P-Y058-739, para los análisis de identificación durante la fabricación. Estas permiten la identificación inequívoca de T3P-Y058-739.

Las eliminaciones de las proteínas efectoras y la introducción de los transgenes pueden verificarse mediante PCR y el análisis del tamaño del producto o de la secuenciación. Como todas estas modificaciones genéticas son exclusivas de T3P-Y058-739, se pueden utilizar para confirmar la identidad del OMG.

Se puede confirmar la presencia del plásmido 739 mediante el crecimiento en agar que contenga cloranfenicol.

Además de los análisis por PCR, se ha desarrollado un método basado en la PCR cuantitativa para la detección de T3P-Y058-739 en muestras biológicas, dirigido específicamente a la eliminación *blaA* de T3P-Y058-739, que es única para T3P-Y058-739. Este método también permite discriminar T3P-Y058-739 de *Yersinia* de tipo natural y de otras bacterias (como *E. coli* o *S. typhimurium*).

F. Información sobre la liberación

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

T3P-Y058-739 es un producto en investigación destinado a utilizarse en pacientes con tumores sólidos avanzados. Está previsto administrar T3P-Y058-739 mediante inyección i.t. directa o por perfusión i.v. en el primer estudio clínico en humanos en fase I/II T3P1001. Se espera que T3P-Y058-739 prolifere, preferentemente, dentro de los tumores, microinyecte las células circundantes con proteínas de carga y desencadene una respuesta inmunitaria contra el tumor, así como la regresión local y sistémica de los tumores sólidos.

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 checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
<p>En caso afirmativo, especifíquese:</p> <p>La administración de T3P-Y058-739 tendrá lugar en un entorno hospitalario de contención con administración directa al paciente a cargo de profesionales sanitarios formados. Los pacientes pasarán la noche ingresados tras la primera dosis para facilitar la supervisión y la toma de muestras pero, por lo demás, serán tratados como pacientes ambulatorios y se les permitirá irse a casa entre las administraciones de T3P-Y058-739. Habrá una destrucción controlada de cualquier resto de producto en investigación y materiales que entren en contacto con él, como residuos biológicos o de categoría III, de acuerdo con los procedimientos de los centros hospitalarios que participan en el ensayo.</p>	

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>En España están previstos los siguientes centros:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Hospital Universitario 12 de Octubre Avenida de Córdoba, s/n, Servicio de Oncología, 2º Planta. Hospital Materno – Infantil Madrid, 28041, España - Hospital Universitario La Paz Edificio Dotacional - 1ª Planta - Oncología Paseo Castellana 261 Madrid, 28046, España - ICO l'Hospitalet - Hospital Duran i Reynals Avinguda de la Gran Via de l'Hospitalet, nº. 199 -203 L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona), 08908, España - Hospital Universitari Vall d'Hebrón Unidad de Investigación de Terapia Molecular del Cáncer (UITM) – CaixaResearch, Passeig de la Vall d'Hebron, nº. 119 Barcelona, 08035, España
<p>b) Área del lugar (m²): No procede.</p> <ul style="list-style-type: none"> i) lugar real de la liberación (m²): No procede. ii) área de liberación más amplia (m²): No procede.
<p>c) Proximidad a biotipos reconocidos internacionalmente o zonas protegidas (incluidos depósitos de agua potable) que pudieran verse afectados:</p>

No se espera que se vea afectado ningún entorno fuera del centro hospitalario. Aunque existe la posibilidad de que T3P-Y058-739 se excrete en las heces de los pacientes, estas entrarán en el sistema de alcantarillado, que está diseñado para eliminar las bacterias del agua. Los apósitos contaminados se eliminarán en el sistema de residuos del hospital. En el domicilio, los apósitos usados que puedan estar contaminados con T3P-Y058-739 se colocarán en una bolsa de plástico sellada. El paciente debe llevar las bolsas al centro hospitalario para su eliminación como residuos con riesgo biológico.

d) Flora y fauna, incluidos cultivos, ganado y especies migratorias que pueden potencialmente interactuar con el OMG:

No se prevé que la flora y la fauna estén expuestas a T3P-Y058-739. No se espera que los pacientes que reciban T3P-Y058-739 contagien la infección a otras personas ni a los animales o el medioambiente. No obstante, se recomienda a los pacientes sometidos a tratamiento que extremen las condiciones de higiene (lavarse las manos especialmente) a la hora de manipular alimentos (tanto para el consumo humano como para alimentación animal) y presten atención a los apósitos. También se indicará a los pacientes que recojan los apósitos usados en bolsas de plástico cerradas (consulte el apartado (c) anterior).

4. Método y amplitud de la liberación

a. Cantidad de OMG que vaya a liberarse:

El OMG se administra a seres humanos en un ensayo clínico en un entorno hospitalario controlado.

El estudio T3P1001 tiene un diseño modular e incluye seis módulos (partes A, B, C, D, E y F). La cantidad de OMG liberada depende del número de pacientes inscritos en cada módulo del estudio; del número de niveles de dosis evaluadas en las partes A, B y C (los módulos de fase I, de determinación de la dosis); del número de módulos que se abran; de la dosis recomendada de fase II (DRF2) para T3P-Y058-739 i.t. e i.v.; y de la duración del tratamiento en cada paciente.

Con unos supuestos razonables para los parámetros anteriores, potencialmente se podría administrar a los pacientes alrededor de 2×10^{11} UFC de T3P-Y058-739 durante un periodo aproximado de cuatro años en todo el mundo.

En España, se espera tratar entre 20 y 30 pacientes. Así pues, la cantidad prevista de T3P-Y058-739 que se podría administrar a los pacientes durante el periodo en el que está en marcha el ensayo es de unas 4×10^{10} a 6×10^{10} UFC.

b. Duración de la operación:

En España, se prevé que el estudio clínico T3P1001 tenga lugar desde 01/01/2024 hasta 01/06/2026.

Se prevé que cada dosis de IT T3P-Y058-739 se administre en un minuto (hasta tres minutos en total debido a que podrían inyectarse hasta tres lesiones en cualquier momento).

Cada dosis de T3P-Y058-739 por vía intravenosa se administrará a través de una vía periférica siempre que sea posible durante un periodo de dos horas. La perfusión puede ralentizarse o interrumpirse si fuera necesario por síntomas relacionados con la perfusión, pero debe finalizarse (y desecharse cualquier resto de T3P-Y058-739) como máximo tres horas después del inicio de la perfusión.

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

T3P-Y058-739 se transportará al centro receptor en viales liofilizados sellados y en un envase secundario adecuado. Cada vial se etiquetará individualmente identificando la información del producto (contenido y cantidad de material), las condiciones de conservación y la información del fabricante. Además, la etiqueta incluirá el siguiente texto: «ESTE PRODUCTO CONTIENE UN ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE».

Los viales se almacenarán por debajo de -70 °C en congeladores de temperatura controlada y se transportarán en contenedores aislados (con hielo seco). Los contenedores de envío están aislados para evitar la rotura de los viales y el embalaje se ajustará a la normativa para el transporte internacional.

Profesionales médicos formados prepararán y administrarán T3P-Y058-739 a los pacientes que hayan cumplido los criterios de inclusión en el estudio. El transporte interno se realizará en contenedores cerrados que eviten derrames accidentales, de acuerdo con los procedimientos de los hospitales participantes en el ensayo. Todos los residuos del procedimiento se eliminarán de acuerdo con los procedimientos de los centros hospitalarios para residuos potencialmente biopeligrosos. En el centro médico, esto implicará la contención temporal en receptáculos claramente marcados (por ejemplo, riesgo biológico, residuos médicos) antes de la esterilización en autoclave o la incineración, ya sea dentro o fuera del centro, según las procedimientos de los centros hospitalarios para la manipulación de materiales potencialmente biopeligrosos. Los centros hospitalarios desinfectarán a fondo el equipo y las superficies de acuerdo con las prácticas médicas habituales utilizando sustancias con actividad bactericida.

Los detalles sobre la manipulación segura de T3P-Y058-739 también figuran en el Manual de Farmacia. En este documento se incluyen las medidas que deben tomarse en caso de derrames accidentales y los detalles sobre el equipo de protección personal, primeros auxilios, descontaminación y eliminación.

Debido a que T3P-Y058-739 podría estar potencialmente presente en los exudados de los tumores ulcerados tras el tratamiento con T3P-Y058-739, los tumores ulcerados, exudativos o que supuran tras la administración i.t. o i.v. estarán cubiertos durante al menos 14 días tras la inyección o hasta completar la pauta de antibióticos para eliminar la T3P. Se aconsejará a los

pacientes que no toquen ni se rasquen la zona de inyección y un profesional sanitario les mostrará cómo colocar y reemplazar el apósito si se desprende. Se aconsejará a los pacientes que coloquen los apósitos usados y los materiales de limpieza en una bolsa de plástico sellada, ya que pueden estar potencialmente contaminados. El paciente debe llevar las bolsas al centro hospitalario para su eliminación como residuos con riesgo biológico.

Basándose en los datos clínicos de infecciones por *Y. enterocolitica* natural y en estudios no clínicos de T3P-Y058-739 y cepas relacionadas, no se espera que T3P-Y058-739 se excrete al medioambiente tras su administración a los pacientes. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de excreción en las heces, debido a que puede detectarse *Y. enterocolitica* natural en las muestras de heces tras una gastroenteritis inducida por *Y. enterocolitica*. En estos casos adquiridos de forma natural, *Y. enterocolitica* habría entrado en el intestino por vía oral, mientras que en los pacientes tratados con T3P-Y058-739, la bacteria entrará en el organismo por inyección i.t. o perfusión i.v. La excreción al intestino desde la circulación no es la dirección habitual de paso de *Y. enterocolitica* y, en consecuencia, no se prevé que ocurra. Sin embargo, es plausible que en algunos pacientes (sobre todo los que tienen tumores que afectan a la orofaringe o están cerca de ella) la inyección directa de T3P-Y058-739 en el tumor pueda provocar una fuga hacia la orofaringe o el esófago y, por tanto, la entrada en el intestino de la forma habitual. En consecuencia, se aconsejará lavarse las manos y tomar precauciones de higiene alimentaria. Además, se aconsejará a los pacientes que cumplan los requisitos del protocolo sobre métodos anticonceptivos de barrera durante las relaciones sexuales y que tengan cuidado con las personas inmunodeprimidas o los neonatos para minimizar la posibilidad de intercambio directo de fluidos.

Todos los pacientes recibirán un ciclo de 5 días de antibióticos tras finalizar el tratamiento con T3P-Y058-739, y después se les supervisará mediante el análisis de muestras mensuales (de sangre, heces, orina y, si procede, hisopados de las lesiones ulceradas) para confirmar la eliminación de la bacteria.

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

T3P-Y058-739 se preparará y administrará a los pacientes en un entorno hospitalario. Los hospitales previstos para el estudio T3P1001 se encuentran todos en Europa, una región templada con buenas condiciones de salubridad. Aunque pueden existir variaciones en la temperatura ambiente, no se esperan variaciones extremas.

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

En la fecha de entrada en vigor de este documento, el ensayo clínico T3P1001 está en curso en el Reino Unido y Suiza. Hasta la fecha de corte para la inclusión de datos (marzo de 2023), 5 pacientes habían recibido al menos una dosis de T3P-Y058-739 en el ensayo T3P1001. Los datos de

seguridad emergentes son coherentes con las expectativas y no se había producido ningún acontecimiento relacionado con la seguridad inesperado (desde una perspectiva médica/científica).

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

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

En el estudio T3P1001, T3P-Y058-739 se administrará a pacientes con cáncer mediante inyección i.t. directa, inicialmente (en la Parte A del estudio). Posteriormente, se hará por perfusión intravenosa (en la parte B) y después por inyección i.t. o perfusión intravenosa en combinación con pembrolizumab (en la parte C del estudio). Independientemente de la vía de administración, se espera que T3P-Y058-739 sobreviva y prolifere preferentemente dentro de los tumores y se elimine rápidamente del resto del organismo.

Se espera que la entrega bacteriana de las proteínas RIG-I-CARD y cGAS a las células circundantes a través del T3SS bacteriano provoque la activación de la vía RIG y STING y la producción de interferones de tipo I (IFN) y otras citocinas inmunoestimuladoras y proinflamatorias. La microinyección de las proteínas de carga mediante T3P-Y058-739 puede ocurrir muy rápidamente (en cuestión de minutos) tras la introducción de las bacterias en un tumor por inyección i.t., y más lentamente a medida que T3P-Y058-739 coloniza los tumores tras su administración i.v. Además de la entrega de las proteínas de carga a través del T3SS, las bacterias T3P-Y058-739 estimulan la producción de potentes citocinas proinflamatorias, especialmente del FNT α .

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

No se prevén interacciones significativas entre T3P-Y058-739 y otros organismos del medioambiente.

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

No se espera que T3P-Y058-739 se excrete al medio ambiente tras su administración a pacientes con cáncer. No se espera que se vea afectado ningún entorno fuera del centro hospitalario (consulte el apartado F.3 (c)).

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: no procede. No se prevé que se produzcan daños en ningún organismo.

7. Probabilidad de intercambio genético en vivo

a) Del OMG a otros organismos del ecosistema de liberación:

La transferencia de material genético con especies bacterianas diferentes de las *Enterobacteriaceae* no se ha descrito para *Y. enterocolitica* y, por tanto, no se espera que ocurra.

No se ha descrito la transferencia horizontal de la IAP de *Y. enterocolitica* y depende de un sistema de conjugación endógeno que no está presente en T3P-Y058-739.

La transferencia del plásmido pYV es poco probable, ya que no es conjugativo y la región de movilización necesaria para la transferencia no está presente en el plásmido pYV de T3P-Y058-739.

La transferencia del plásmido que codifica los dos transgenes terapéuticos y un gen *cat* es teóricamente posible. Sin embargo, el origen de replicación del plásmido limita los organismos a los que podría producirse la propagación. No se espera una exposición a los mismos en un entorno en el que pudiera considerarse que se produce una transferencia genética.

Los pacientes con una infección reciente por *Y. enterocolitica* o con *Y. enterocolitica* natural presente en una muestra de heces de referencia no podrán entrar en el estudio. Por consiguiente, T3P-Y058-739 no se encontrará con *Y. enterocolitica* dentro del tubo gastrointestinal del paciente. Del mismo modo, es muy poco probable que T3P-Y058-739 encuentre con *Y. enterocolitica* en los apósitos de las heridas, debido a que *Y. enterocolitica* no es un comensal de la piel. Aunque existe la posibilidad de que T3P-Y058-739 se excrete en las heces de los pacientes, el sistema de alcantarillado está diseñado para eliminar las bacterias y no se espera que ocurra una transferencia horizontal de genes.

b) De otros organismos al OMG:

Como se ha indicado anteriormente (excepto la transferencia del plásmido 739).

c) Consecuencias probables de la transferencia de genes:

En el improbable caso de que se produjera una transferencia horizontal de elementos genéticos de T3P-Y058-739 a otras cepas de *Yersinia* u otras bacterias, cabría esperar una patogenicidad reducida y ninguna ventaja de supervivencia para las bacterias receptoras, debido a que los principales factores de virulencia (IAP y Yops) están ausentes de forma natural (IAP) o se han eliminado (Yops) en T3P-Y058-739. Además, si ocurriera la transferencia de los transgenes humanos cGAS y RIG-I-CARD de T3P-Y058-739 a *Yersinia* de tipo natural, se produciría la capacidad de activar la vía RIG y STING y una respuesta IFN de tipo I en las células de mamíferos, un efecto que perjudicaría aún más la patogenicidad.

No cabría esperar ninguna variación significativa en T3P-Y058-739 en el improbable caso de una transferencia de elementos genéticos procedentes de otras bacterias, ya que T3P-Y058-739 ha sufrido múltiples modificaciones (en particular la eliminación de seis genes *Yops* y la introducción de genes para RIG-I-CARD y cGAS) y todas ellas tendrían que invertirse para restablecer la virulencia y la patogenicidad. Es importante destacar que la inversión de estas variaciones genéticas simplemente restauraría la patogenicidad para igualarla a la de *Y. enterocolitica* natural.

En resumen, no se prevé que ocurra una transferencia espontánea de material genético de organismos endógenos ni que aumente la patogenicidad de T3P-

Y058-739. Aunque la reversión al tipo natural es teóricamente posible, esto requeriría la presencia previa de *Y. enterocolitica* natural.

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 se han llevado a cabo estudios de este tipo.

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

No se espera ninguna interacción con los procesos biogeoquímicos. No se tiene conocimiento de que *Y. enterocolitica* contribuya a ningún ciclo bioquímico importante (carbono, azufre o nitrógeno). No se espera que las variaciones genéticas introducidas en T3P-Y058-739 afecten a este aspecto.

H. Información sobre el seguimiento

1. Métodos de seguimiento de los OMG

La distribución y la excreción de T3P-Y058-739 se evaluarán en todos los pacientes del estudio clínico T3P1001 mediante métodos de cultivo microbiológico y PCR cuantitativa (consulte el apartado E.4).

2. Métodos de seguimiento de las repercusiones en el ecosistema

No se esperan efectos sobre el ecosistema y no existen planes para supervisarlos.

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

No se espera que ocurra transferencia de material genético de T3P-Y058-739, pero podría detectarse utilizando la PCR, como se describe en el apartado E4.

4. Tamaño del área de seguimiento (m2)

No procede.

5. Duración del seguimiento

A todos los pacientes se les tomarán muestras a intervalos mensuales tras la última dosis de T3P-Y058-739 hasta que al menos tres muestras sean negativas para garantizar la eliminación de T3P-Y058-739 tras la finalización del tratamiento y la administración de antibióticos.

6. Frecuencia del seguimiento

Se supervisará la distribución y excreción de T3P-Y058-739 en los pacientes que participen en el estudio T3P1001.

Los pacientes de la parte A (administración i.t.) y de la parte B (administración i.v.) del estudio tendrán que dar muestras de forma periódica para análisis microbiológicos mediante métodos de cultivo semicuantitativos y análisis de PCR cuantitativa. Se evaluarán muestras de sangre, heces y orina de todos los pacientes. A los pacientes con lesiones ulceradas se les tomarán hisopados de la lesión o de los apósitos de la herida. A los pacientes con tumores cercanos o que afecten a la orofaringe también se les tomarán muestras de saliva y se congelarán para posibles análisis futuros.

Se supervisará la eliminación de T3P-Y058-739 en todos los pacientes. A los pacientes se les tomarán muestras a intervalos mensuales tras la última dosis de T3P-Y058-739 hasta que al menos tres muestras sean negativas para garantizar la eliminación de T3P-Y058-739 tras la finalización del tratamiento y la administración de antibióticos.

Los pacientes de la Parte C del estudio tendrán el mismo programa de muestras que los de la parte A o de la parte B, dependiendo de si en esta parte del estudio se procede con T3P-Y058-739 i.t. o i.v.

El protocolo se modificará antes de que comiencen las partes D, E y F. Dependiendo de los resultados de las partes A, B y C, el calendario de supervisión podrá mantenerse o modificarse.

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

1. Tratamiento del lugar tras la liberación

T3P-Y058-739 se administra a pacientes en un entorno hospitalario. Cualquier superficie potencialmente contaminada con T3P-Y058-739 se descontaminará de acuerdo con las políticas y procedimientos aplicables específicos del centro, utilizando un desinfectante con actividad bactericida.

2. Tratamiento del OMG tras la liberación

La eliminación o inactivación de los restos de T3P-Y058-739 se hace de forma coherente con la normativa del país y los procedimientos de los centros que participan en el ensayo para materiales potencialmente biopeligrosos.

Todos los pacientes recibirán un tratamiento antibiótico de cinco días que comenzará como máximo 14 días después de la última dosis de T3P-Y058-739 para eliminar las bacterias.

El seguimiento de la seguridad continuará para todos los pacientes hasta que se documente la eliminación completa de T3P-Y058-739 mediante el análisis de muestras consecutivas de sangre, orina, heces e hisopados de lesiones ulceradas (si las hubiera) tomadas a intervalos mensuales durante al menos tres meses.

3. a) Tipo y cantidad de residuos producidos

Los residuos del OMG pueden consistir en viales, equipos de administración (tubos, jeringuillas, agujas y accesorios relacionados), apósitos para heridas y el equipo de protección personal utilizado por el personal clínico (por ejemplo, guantes, batas).

3. (b) Tratamiento de residuos

Todos los residuos generados (material en contacto con el OMG durante la preparación y administración de T3P-Y058-739 o residuos de categoría III) se eliminarán de acuerdo con los procedimientos de los centros hospitalarios participantes en el ensayo.

En las instalaciones médicas, los residuos desechables se depositarán en un recipiente para residuos biológicos peligrosos. Los residuos serán descontaminados antes de su eliminación (esterilización por vapor, desinfección química o incineración).

La orina, las heces y los restos fecales, se eliminarán en el sistema de alcantarillado de la forma habitual (no se requiere tratamiento adicional).

Se aconsejará a los pacientes que coloquen los apósitos usados y los materiales de limpieza en una bolsa de plástico sellada cuando estén en su domicilio, ya que es posible que estén contaminados. El paciente debe llevar las bolsas al centro hospitalario para su eliminación como residuos con riesgo biológico.

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

El OMG es un producto en investigación destinado a ser utilizado en un ensayo clínico, que se llevará a cabo en instalaciones médicas calificadas y bajo condiciones y procedimientos de manipulación controlados. No se prevé ninguna diseminación ni propagación inesperada. En caso de que exista una liberación accidental y una propagación inesperada, el riesgo potencial para los seres humanos, las plantas y los animales se considera insignificante. Es importante destacar que T3P-Y058-739 es menos peligrosa que *Y. enterocolitica* natural.

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

En caso de un vertido accidental de T3P-Y058-739, cualquier superficie contaminada se descontaminará de acuerdo con los procedimientos aplicables específicos del centro con un desinfectante con actividad bactericida.

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

No procede.

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

Los pacientes serán seleccionados cuidadosamente para el estudio. Los pacientes que corran el riesgo de sufrir una infección diseminada (como los pacientes que reciben medicación inmunosupresora, los pacientes con sobrecarga de hierro o los pacientes con implantes, productos o prótesis que puedan colonizarse por T3P-Y058-739) no podrán participar en el estudio.

Se supervisará a los pacientes que reciban el tratamiento con T3P-Y058-739 para detectar la aparición de acontecimientos adversos (AA) y acontecimientos adversos graves (AAG) según el protocolo clínico. El personal del hospital y el promotor del estudio registrarán y evaluarán cada AAG. Se notificará a las autoridades sanitarias cuando proceda.

T3P-Y058-739 es sensible a una serie de antibióticos. En caso de un acontecimiento indeseable (como una infección diseminada o la formación

de abscesos en zonas no tumorales), los antibióticos eliminarán eficazmente T3P-Y058-739. También es obligatorio un ciclo de antibióticos para todos los pacientes al finalizar el tratamiento con T3P-Y058-739. En el protocolo del estudio se dan detalles sobre qué antibióticos se deben utilizar y cuándo comenzar a tomarlos.

T3P-Y058-739 se administrará en los centros del ensayo clínico por profesionales sanitarios formados siguiendo las normas nacionales de manipulación y eliminación de organismos modificados genéticamente y sustancias biológicas peligrosas. Los procedimientos para la manipulación de T3P-Y058-739 incluyen el lavado minucioso de las manos después de la manipulación y el uso de equipos de protección individual para las personas que preparan o administran la dosis. Una vez finalizada cada perfusión o inyección, la zona de la administración debe tratarse de acuerdo con los métodos de desinfección institucionales aplicables, como la limpieza por fricción con alcohol, y se aplica un apósito cerrado.

Teniendo en cuenta el riesgo insignificante para el medioambiente, no se considera necesario ningún plan específico de protección del medioambiente.