

**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**

Estado miembro de la notificación: España
Número de la notificación: B/ES/25/03
a) Fecha del acuse de recibo de la notificación: 23/01/2025
Título del proyecto: Ensayo clínico de fase I de terapia con células CART para la leucemia linfoblástica aguda refractaria/recidivante con necesidades insatisfechas en niños, adolescentes y adultos jóvenes: estudio de viabilidad y seguridad (REALL_CART)
Período propuesto para la liberación: 05-2025 a 05-2028

**2. Notificador**

Nombre de la institución o empresa: FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO LA PAZ
---

**3. Definición del OMG**

a) Indíquese si el OMG es:	
Viroide	<input type="checkbox"/>
Virus ARN	<input type="checkbox"/>
Virus ADN	<input type="checkbox"/>
Bacteria	<input type="checkbox"/>
Hongo	<input type="checkbox"/>
Animal	<input type="checkbox"/>
- mamíferos	×
- 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)
<p>b) Identidad del OMG (género y especie)</p> <p>El OMG (CART45RA-NKG2D) son células T de memoria de donante haploidéntico (<i>Homo sapiens</i>) que se modifican genéticamente por medio de un vector lentivirico sin capacidad de replicación para que expresen un receptor quimérico dirigido contra el antígeno ANTI-NKG2D.</p> <p>El OMG (CART 19/22) se compone de células T CD3 autólogas (<i>Homo sapiens</i>) y diferenciadas, que se modifican genéticamente mediante un lentivirus sin capacidad de replicación para que expresen un receptor de antígeno quimérico dual en tándem anti-CD19 y anti-CD22.</p>
<p>c) Estabilidad genética, de acuerdo con el punto 10 de la letra A de la sección II del anexo III A:</p> <p>Durante la fabricación del OMG células CART45RA-NKG2D y CART 19/22 se realizan controles en proceso y controles de calidad establecidos para la sustancia activa y en el producto terminado, entre ellos estabilidad genética para verificar que no se producen alteraciones genéticas en las células durante el proceso productivo.</p> <p>La metodología empleada es cariotipo e hibridación genómica comparativa (CGH) (se determina la estabilidad genética de las muestras con el análisis comparativo de 20 metafases de células transducidas y de células sin transducir. Adicionalmente se lleva cabo un array CGH a partir de ADN extraído empleando la plataforma OncoHematoArray@v1.0 (8x60K, Agilent).</p> <p>El criterio de aceptación/especificación para ambos análisis es resultado “normal”, de lo contrario, el producto no cumple con los parámetros de calidad establecidos.</p> <p>En la validación del proceso de fabricación se han realizado estudios de estabilidad genética en el producto final y los resultados aseguran la ausencia de alteraciones genéticas.</p>

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

En caso afirmativo:

- Estado miembro de la notificación: ESPAÑA
- Número de la notificación: B/ES/23/16

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"/>
<p>En caso afirmativo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Estado miembro de la notificación:</li> <li>- Número de la notificación:</li> </ul>	

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

El posible impacto ambiental es la liberación de los OMG CART45RA-NKG2D y CART 19/22, en ambos casos se trata de células T que se modifican genéticamente por medio de un vector lentiviral sin capacidad de replicación para que expresen un receptor quimérico. No se espera que la administración de los OMG mencionados (CART45RA-NKG2D; CART 19/22) a una cantidad reducida de sujetos en el estudio clínico tenga ninguna repercusión en el medio ambiente. Ambos OMG no son nocivos para el medio ambiente, ni son capaces de sobrevivir sin las condiciones controladas de cultivo adecuadas o el cuerpo humano del paciente. A pesar de ser OMG, la modificación no aporta a la célula una capacidad de supervivencia mayor fuera de las condiciones de cultivo. En el caso improbable de que los linfocitos se expusieran al medio ambiente, por ejemplo, si se liberasen por accidente del envase, perderían viabilidad rápidamente y el ADN genómico de las células, que contiene la secuencia del transgen, se degradaría. El motivo es que los linfocitos T modificados genéticamente son muy lábiles y solo pueden sobrevivir *ex vivo* en condiciones de cultivo celular especiales. Por tanto, fuera de este entorno, los linfocitos dejarán de ser viables y no conservarán su funcionalidad.

No pueden existir interacciones de ninguno de los OMG mencionados con otros organismos ajenos ya que los pacientes receptores de los 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	× Células T
- insectos	<input type="checkbox"/>
- peces	<input type="checkbox"/>
- otro animal	<input type="checkbox"/>
(especifique el phylum y la clase)	
Otros, (especifíquense):	

**2. Nombre**

i) Orden y taxón superior (animales):
ii) Género: <i>Homo</i>
iii) Especie: <i>sapiens</i>
iv) Subespecie: <i>sapiens</i>
v) Cepa:
vi) Patovar (biotipo, ecotipo, raza, etc.):
vii) Nombre vulgar: humanos

**3. Distribución geográfica del organismo**

a) Autóctono del país que notifica o establecido en él:		
Sí ×	No <input type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>

b) Autóctono de otros países de la Comunidad o establecido en ellos:

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):

b) Si es un animal , hábitat natural o ecosistema agrícola habitual: ser humano (circulación sanguínea)

#### 5. a) Técnicas de detección

Citometría de flujo

5. b) Técnicas de identificación

Citometría de flujo, qPCR

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

Sí  No

En caso afirmativo, especifíquese:

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

Sí  No  No se sabe

En caso afirmativo

a) ¿Para cuál de los organismos siguientes?:

humanos

animales

plantas

otros

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

*11. Rasgos patológicos, ecológicos y fisiológicos de los organismos:*

*d) patogenicidad: infectividad, toxigenicidad, virulencia, alergenidad, portador (vector) de patógeno, vectores posibles, gama de huéspedes incluidos los organismos que no sean objeto de la investigación.*

*Posible activación de virus latentes (provirus). Capacidad para colonizar otros organismos*

En el caso de CART45RA-NKG2D se utilizarán células T de memoria procedentes de donantes emparentados con el antígeno (HLA). Los investigadores clínicos realizarán una evaluación completa del estado de salud del donante y una evaluación detallada de sus antecedentes médicos. Se utilizará la tipificación del antígeno leucocitario humano (HLA) para emparejar a pacientes y donantes. Se seleccionará un donante haploidéntico.

En el caso de CART 19/22 se compone de células T CD3 autólogas y obtenidas por aféresis no movilizada, transducidas con un lentivirus para expresar un receptor de antígeno quimérico dual en tándem anti-CD19 y anti-CD22 y expandidas en cultivo. Los linfocitos T que serán modificados genéticamente serán obtenidos de pacientes con leucemia linfoblástica aguda refractaria/recidivante y se infundirán de nuevo de forma autóloga a estos mismos pacientes.

Tanto en el caso del donante para la producción del CART45RA-NKG2D (donante alogénico) como en el CART19/22 (donante autólogo), los análisis serológicos deben ser negativos para las siguientes enfermedades infecciosas: virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), hepatitis B (VHB) y C (VHC), citomegalovirus (CMV), toxoplasmosis, virus Epstein Barr (EBV) y virus HTLV I y II. Además, en caso de que puedan tener una infección activa u otras condiciones médicas graves serán excluidos como donantes. Se tendrá en cuenta como criterio de exclusión cualquier otra condición que, en opinión del investigador, pueda interferir con la evaluación de la eficacia y/o seguridad del ensayo.

Las células T de los donantes son testadas de acuerdo con la Directiva 2001/18/CE.

Así mismo, después de la modificación genética de los linfocitos T, y previo a su infusión en los pacientes, se determinará la ausencia de lentivirus competentes en replicación (RCL, replicative-competent lentivirus) en los linfocitos T transducidos.



No aplica

**10. b) Factores que afectan a la diseminación**

No aplica

**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 aplica

**C. Información sobre la modificación genética**

**1. Tipo de modificación genética:**

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

**2. Resultado que se pretende obtener mediante la modificación genética**

Para el OMG CART45RA-NKG2D la modificación genética conducirá a la expresión en la superficie de las células transducidas (linfocitos T de memoria del propio paciente) del receptor NKG2D (receptor quimérico antigénico-CAR) para su reconocimiento específico y lisis de las células tumorales. Los ligandos del receptor NKG2D (NKG2DL) se expresan en la mayoría de tumores y células inmunosupresoras del microambiente tumoral y su expresión en tejidos sanos es limitada, por lo que constituyen una diana terapéutica adecuada para el tratamiento del cáncer. Las interacciones entre NKG2D y sus ligandos son esenciales para el reconocimiento y eliminación de las células tumorales.

Para el OMG CART 19/22, la modificación genética de los linfocitos T CD3 conducirá a la expresión en su superficie de un receptor antígeno quimérico dual en tándem anti-CD19 y anti-CD22., De esta forma, reconocerán específicamente células tumorales de leucemia linfoblástica aguda que expresan dichos antígenos CD19 y/o CD22. Se espera que el OMG, tras reconocer específicamente a su diana proliferare para crear clones de ataque frente al tumor eliminando así el tumor del paciente.

**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	×
cósmido	<input type="checkbox"/>
Elemento de transposición	<input type="checkbox"/>
Otros (especifíquense):	
b) Identidad del vector: vector lentiviral	
<p>El vector lentiviral CAR NKG2D es un vector pseudotipado con la glucoproteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), no replicativo, que contienen las secuencias del receptor antigénico quimérico con especificidad anti- NKG2DL conjugado con las regiones coestimuladora 4-1BB y activadora CD3ζ.</p> <p>El vector lentiviral CAR 19/22 es un vector pseudotipado con la glucoproteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), no replicativo, que contienen las secuencias del receptor antigénico quimérico con especificidad anti-CD19 y anti-CD22, conjugado con las regiones coestimuladora 4-1BB y activadora CD3ζ.</p>	
c) Gama de organismos huéspedes del vector: células de mamíferos. vector autoinactivante, sin capacidad de replicación, derivado de VIH-1	
En ambos casos, el vector lentiviral está pseudotipado con la envuelta VSV-G, es capaz de transducir numerosos tipos celulares de distintas especies.	
d) Presencia en el vector de secuencias que den un fenotipo seleccionable o identificable	
Sí	No X
Resistencia a los antibióticos	<input type="checkbox"/>
Otras, (especifíquense)	
e) Fragmentos constituyentes del vector:	
Vector CAR NKG2D:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aislador LTR 3' autoinactivado (SIN)</li> </ul>	

- Secuencia larga terminal de repetición (LTR)
- Secuencia CAR NKG2D (transgén de interés)

Vector CART 19/22:.

- Aislador LTR 3' autoinactivado (SIN)
- Secuencia larga terminal de repetición (LTR)
- Secuencia CAR CD19/CD22 (transgén de interés)

f) Método de introducción del vector en el organismo receptor

i) transformación

ii) electroporación

iii) macroinyección

iv) microinyección

v) infección

vi) otros, (especifíquense) TRANSDUCCIÓN

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:

El inserto CAR NKG2D se fabricó utilizando como molde el CAR anti CD19-411BB-CD3z, diseñado por Imai y colaboradores (Imai C *et al.*, 2004). Éste contenía el dominio extracelular de NKG2D (diseñado por Wai-Hang y WingLeung), la región bisagra de CD8a y los dominios señalizadores 4-1BB y CD3z.

El constructo CAR NKG2D está compuesto por el dominio extracelular NKG2D (dominio de reconocimiento antigénico); el dominio transmembrana CD8, el dominio coestimulador 4-1BB y el dominio citotóxico CD3z.

El constructo CAR 19/22 está compuesto por el dominio en tándem de reconocimiento externo CD19/CD22; dominio transmembrana CD8; dominio de coestimulación 4-1BB y dominio de citotoxicidad CD3z.

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

A nivel estructural, los dominios que forman el constructo NKG2D CAR se detallan a continuación:  
Dominio extracelular NKG2D (Gen NKG2D (KLRK1) codificado en el cromosoma 12 humano).  
Dominio transmembrana CD8a (Gen CD8a codificado en el cromosoma 2 humano).  
Dominio coestimulador 41BB (Gen TNFRSF9 codificado en el cromosoma 1 humano).  
Dominio de señalización CD3z (Gen CD3z (CD247) codificado en el cromosoma 1 humano).

A nivel estructural, los dominios que forman el constructo CAR 19/22 se detallan a continuación:

Dominio en tándem de reconocimiento externo CD19/CD22 (cadenas pesadas y ligeras de un fragmento variable de cadena única (scFv) de un anticuerpo unidas por una secuencia polipeptídica).  
Dominio transmembrana CD8a (Gen CD8a codificado en el cromosoma 2 humano).  
Dominio de coestimulación 4-1BB (Gen TNFRSF9 codificado en el cromosoma 1 humano).  
Dominio de citotoxicidad CD3ζ (Gen CD3z (CD247) codificado en el cromosoma 1 humano)

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

El desarrollo de receptores antigénicos quiméricos (CAR) con capacidad de reconocer antígenos previamente seleccionados y la inducción de su expresión por los linfocitos T de los pacientes, genera una respuesta inmune forzosa sobre las células que presentan dichos antígenos.

Los receptores de antígeno quimérico (CAR), por analogía con el receptor de los linfocitos T (TCR) responsable del reconocimiento antigénico en la respuesta inmune y de la especificidad de ésta, poseen los elementos principales que conforman la sinapsis inmunológica durante el reconocimiento de un antígeno: **una cadena que reconoce específicamente al antígeno/deseado/s, un dominio transmembrana, un dominio de señalización y una unidad coestimuladora.**

En el inserto **CAR NKG2D** (fragmento de inserción del OMG células CART45RA-NKG2D):

1. El dominio de reconocimiento antigénico es el dominio extracelular NKG2D y la región bisagra que lo une al dominio transmembrana deriva del CD8.

El dominio de unión al antígeno en los CAR normalmente pertenece a las cadenas pesadas y ligeras de un fragmento variable de cadena única (scFv) de un anticuerpo unidas por una secuencia polipeptídica, si bien en el caso del CAR NKG2D ese dominio de reconocimiento antigénico pertenece al dominio extracelular del receptor endógeno NKG2D presente en linfocitos T y células Natural Killer (NK).

2. El dominio transmembrana corresponde al del gen CD8a.

3. El dominio de señalización (citotóxico) corresponde a la molécula CD3ζ (transmite al interior celular la señal activadora producida por la unión del receptor CAR a su antígeno).

4. Finalmente, el dominio coestimulador es la molécula 4-1BB (CD137), que potencia el efecto de la cadena ζ aumentando así la proliferación y la persistencia de la célula T. La molécula 4-1BB parece conferir mayor persistencia in vivo, actividad anti-tumoral y tráfico al tumor que la obtenida con otras moléculas como CD28.

El inserto **CAR 19/22** está compuesto por:

1. Los dominios de reconocimiento antigénico son los dominios extracelulares CD22 y CD19, y la región bisagra que lo une al dominio transmembrana deriva del CD8.

El dominio de unión al antígeno en los CAR pertenece a las cadenas pesadas y ligeras de un fragmento variable de cadena única (scFv) de un anticuerpo unidas por una secuencia polipeptídica. Las cadenas ligeras y pesadas se derivan del scFv (anti) CD22 humano 16P17 y del scFv (anti) CD19 humano M19217-1.

2. Dominio transmembrana idéntico al que se encuentra en la cadena alfa de la glicoproteína de superficie de células T humanas CD8 más los tres primeros aminoácidos del dominio intracelular de CD8 alfa (ID de secuencia Uniprot: P01732).

3. Dominio coestimulador derivado del 4-1BB humano que potencia el efecto de la cadena  $\zeta$  aumentando así la proliferación y la persistencia de la célula T. La molécula 4-1BB parece conferir mayor persistencia *in vivo*, actividad anti-tumoral y tráfico al tumor que la obtenida con otras moléculas.

4. Dominio intracelular de la cadena CD3zeta humana que transmite al interior celular la señal activadora producida por la unión del receptor CAR a su antígeno (isoforma 2, Gene bank Sequence ID: NP\_000725.1).

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 type="checkbox"/>
Virus ADN	<input type="checkbox"/>
Bacteria	<input type="checkbox"/>
Hongo	<input type="checkbox"/>
Animal	×
- mamíferos	×
- 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): primates
ii) Familia (plantas):
iii) Género: <i>Homo</i>
iv) Especie: <i>sapiens</i>
v) Subespecie: <i>sapiens</i>
vi) Cepa: no aplica
vii) Cultivar/línea de reproducción: no aplica
viii) Patovar: no aplica
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 <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 type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo , especifíquese:	

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"/>

<p>Especifíquese:</p>
<p>b) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta al modo o índice de reproducción?</p> <p>Sí <input type="checkbox"/>                      No X <input checked="" type="checkbox"/>                      No se sabe <input type="checkbox"/></p> <p>Especifíquese:</p>
<p>c) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta a la diseminación?</p> <p>Sí <input type="checkbox"/>                      No X <input checked="" type="checkbox"/>                      No se sabe <input type="checkbox"/></p> <p>Especifíquese:</p>
<p>d) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad?</p> <p>Sí <input type="checkbox"/>                      No X <input checked="" type="checkbox"/>                      No se sabe <input type="checkbox"/></p> <p>Especifíquese:</p>

## 2. Estabilidad genética del organismo modificado genéticamente

Durante la fabricación del OMG células CART45RA-NKG2D y del OMG CART 19/22 se realizan controles en proceso y controles de calidad establecidos para la sustancia activa y en el producto terminado, entre ellos estabilidad genética para verificar que no se producen alteraciones genéticas en las células durante el proceso productivo.

La metodología empleada es cariotipo e hibridación genómica comparativa (CGH) (se determina la estabilidad genética de las muestras con el análisis comparativo de 20 metafases de células transducidas y de células sin transducir. Adicionalmente se lleva cabo un array CGH a partir de ADN extraído empleando la plataforma OncoHematoArray®v1.0 (8x60K, Agilent).

El criterio de aceptación/especificación para ambos análisis es resultado “normal”, de lo contrario, el producto no cumple con los parámetros de calidad establecidos.

En la validación del proceso de fabricación se han realizado estudios de estabilidad genética en el producto final y los resultados aseguran la ausencia de alteraciones genéticas.

--

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

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo:		
a) ¿Para cuál de los organismos humanos siguientes?		<input type="checkbox"/>
	animales	<input type="checkbox"/>
	plantas	<input type="checkbox"/>
	otros	<input type="checkbox"/>

- 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

*11. Rasgos patológicos, ecológicos y fisiológicos de los organismos:*

*d) patogenicidad: infectividad, toxigenicidad, virulencia, alergenicidad, portador (vector) de patógeno, vectores posibles, gama de huéspedes incluidos los organismos que no sean objeto de la investigación.*

*2. Información sobre el OMG final:*

*i) aspectos relativos a la salud humana y la salud animal, así como aspectos fitosanitarios;*

Durante la fabricación de ambos CAR-T la formación de virus competentes en replicación es poco probable. Respecto a la ausencia de virus competentes para la replicación en las células modificadas genéticamente, se demuestra la no formación de virus competentes para la replicación en la fase de producción viral, y además se realiza el análisis de las células transducidas para detectar la presencia de lentivirus competentes para la replicación (RCL), es decir, en el producto terminado (OMG).

En cuanto a aspectos relativos a la salud humana, animal y fitosanitarios, es de aplicación sólo lo concerniente a la salud humana: pueden darse posibles reactivaciones virales tras la administración del OMG, pues los pacientes potencialmente receptores del medicamento en investigación son oncológicos, con un largo historial de tratamientos previos, por lo que en general son pacientes inmunodeprimidos. Además, antes de la administración del OMG se les realiza una linfodepleción, por lo que sí existe el riesgo de que se produzcan reactivaciones virales de citomegalovirus, adenovirus y virus Epstein Barr en el receptor. Esta situación es similar a lo que sucede en el contexto del trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TPH), por lo que el equipo clínico responsable del paciente conoce y maneja estos riesgos de forma rutinaria. Al paciente se le realizan monitorizaciones seriadas de virus y galactomananos tras la administración del OMG, normalmente con una frecuencia semanal.

#### 4. Descripción de los métodos de identificación y detección

a) Técnicas utilizadas para detectar el OMG:

Se utilizan técnicas de citometría de flujo (identificación de marcadores de superficie celular específicos de las células) y técnicas genéticas: copias integradas en el genoma celular y partículas virales en el sobrenadante del cultivo celular (en ambos casos mediante PCR cuantitativa-qPCR). Una vez en el interior del organismo receptor/paciente el OMG se detecta mediante citometría de flujo (identificación de marcadores de superficie celular específicos de las células) y por qPCR en muestras de sangre periférica y médula ósea del paciente.

b) Técnicas utilizadas para identificar el OMG:

Se detectan mediante citometría de flujo (identificación de marcadores de superficie celular específicos de las células) y por técnicas genéticas: copias integradas en el genoma celular y partículas virales en el sobrenadante del cultivo celular (en ambos casos mediante PCR cuantitativa-qPCR). Una vez en el interior del organismo receptor/paciente los OMG se detectan mediante técnicas de citometría de flujo (identificación de marcadores de superficie celular específicos de las células) en muestras de sangre periférica y médula ósea del mismo. El análisis por qPCR permite la detección de los OMG mediante la amplificación de determinadas secuencias del vector lentiviral, no así su identificación, pues dichas secuencias son comunes a los vectores lentivirales utilizados en otras terapias CART tanto académicas como comerciales.

## F. Información sobre la liberación

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

Estas terapias basadas en el OMG células CAR-T, al ser más específicas y menos tóxicas, tienen el potencial de mejorar la supervivencia y la calidad de vida en los pacientes y adultos jóvenes ya que tienen menos toxicidad para el tejido sano (menos efectos secundarios a largo plazo) a diferencia de los tratamientos convencionales como la quimioterapia, así como el desarrollo de malignidades secundarias. Las células tumorales son reconocidas y eliminadas por el sistema de vigilancia inmune.

Las dos ramas de tratamiento en este ensayo clínico son:

1) Grupo A: se infundirán un total de dos dosis de células CART 19/22 autólogas

El OMG CART 19/22 se compone de células T CD3 autólogas y diferenciadas, obtenidas por aféresis no movilizada, transducidas con un lentivirus para expresar un receptor de antígeno quimérico dual en tándem anti-CD19 y anti-CD22 y expandidas en cultivo. Estos linfocitos T serán infundidos en los propios pacientes de los que se obtuvieron, por lo que la proteína terapéutica se expresará en estos linfocitos T y eliminarán las células tumorales que expresan CD19 y/o CD22. De esta forma se evitará la progresión de la leucemia linfoblástica aguda y la calidad de vida de los pacientes podría mejorar notablemente.

2) Grupo B: se infundirán un total de tres dosis de células CART-NKG2D alogénicas.

El receptor NKG2D (NKG2DR) es fundamental para inducir el control tumoral, con respecto a su papel y el de sus ligandos NKG2D (NKG2DL), se ha publicado cómo este receptor puede reconocer a la mayoría de los cánceres infantiles, incluyendo la leucemia linfoblástica aguda refractaria/recidivante. Sin embargo, el tumor puede bloquear la capacidad del NKG2DR de reconocer y eliminar a las células tumorales. Sin embargo, utilizando un receptor NKG2D quimérico (CAR NKG2D), los resultados preclínicos obtenidos en un modelo de osteosarcoma que indican que este CAR induce la lisis específica del tumor, es seguro para las células normales y proporciona a las células efectoras la capacidad de eludir los mecanismos de resistencia inducidos por las células tumorales (Fernández L, Metais JY, Escudero A, et al. Memory T Cells Expressing an NKG2D- CAR Efficiently Target Osteosarcoma Cells. Clin Cancer Res. 2017 Oct 1;23(19):5824-5835. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0075. Epub 2017 Jun 28. PMID: 28659311.).

No se prevé que el OMG tenga ningún efecto sobre el medioambiente.

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: Hospital Universitario La Paz Paseo de la Castellana 261, 28046 Madrid (España)</p>
<p>b) Área del lugar (m<sup>2</sup>): No procede</p> <p>i) lugar real de la liberación (m<sup>2</sup>):</p> <p>ii) área de liberación más amplia (m<sup>2</sup>):</p>
<p>c) Proximidad a biotipos reconocidos internacionalmente o zonas protegidas (incluidos depósitos de agua potable) que pudieran verse afectados: No aplica</p>
<p>d) Flora y fauna, incluidos cultivos, ganado y especies migratorias que pueden potencialmente interactuar con el OMG: No aplica</p>

4. Método y amplitud de la liberación

<p>a. Cantidad de OMG que vaya a liberarse:</p> <p>En ambos casos la dosis de OMG depende del peso del paciente:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Brazo A, 2 infusiones de hasta <math>0,75 \times 10^6</math>/kg de células CAR-T 19/22.</li> <li>• Brazo B, 3 infusiones de hasta <math>3 \times 10^6</math>/kg células CART-NKG2D.</li> </ul>
<p>b. Duración de la operación: se pretende incluir a los pacientes en el plazo de 36 meses de reclutamiento; el seguimiento de los pacientes incluidos será de 24 meses. Se evaluará, entre otros parámetros, la persistencia de cada OMG en cada punto temporal de las visitas realizadas por los pacientes hasta finalizar su seguimiento dentro del estudio.</p>

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

Ambos medicamentos en investigación (OMGs) se administran al paciente mediante infusión intravenosa en condiciones controladas estándar en el centro clínico.

El personal del centro hospitalario que participa en el ensayo tiene formación en los procedimientos de manipulación y administración, descongelación y contabilidad de este tipo de productos, así como en la eliminación de residuos y en la forma de actuar en caso de derrame accidental.

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

Ambos medicamentos en investigación (OMGs) se administrarán en un ambiente controlado en el centro hospitalario.

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 aplica

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

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

Los linfocitos T transducidos se distribuirán por el sistema sanguíneo donde irán reconociendo las células que expresen los ligandos del receptor NKG2D (NKG2DL) o CD19/22 que vayan encontrando, según el tratamiento administrado. Tras este encuentro, habrá una respuesta proliferativa que dará clones de linfocitos T específicos que eliminan a esta población tumoral.

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

Al igual que con el OMG células CART45RA-NKG2D autorizadas en el Ensayo Clínico CAR4SAR (B/ES/23/16; autorización de instalación y actividad A/ES/23/I-42 Y A/ES/23/127 respectivamente), no es previsible que existan interacciones con otros organismos ajenos ya que los pacientes receptores de OMG células CART19/22 deben estar libres de VIH y así eliminar la posibilidad de recombinación entre el vector lentiviral y VIH 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 ×	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 los OMGs se extiendan a otros ecosistemas. El ensayo se llevará a cabo en el Hospital U. La Paz (Paseo de La Castellana, 261, 28046 - Madrid).

**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): No aplica
ii) Familia (plantas): No aplica
iii) Género: No aplica
iv) Especie: No aplica
v) Subespecie: No aplica
vi) Cepa: No aplica
vii) Cultivar/línea de reproducción: No aplica
viii) Patovar
ix) Nombre vulgar: No aplica

**7. Probabilidad de intercambio genético en vivo**

a) Del OMG a otros organismos del ecosistema de liberación: Las células T modificadas genéticamente se inactivan rápidamente fuera de un huésped. Por tanto, incluso si se produjera una mínima exposición o liberación accidental, no tendría efectos adversos en el medio ambiente.

En el caso de ambos OMGs, 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: en ambos OMGs, aunque siempre es posible que los sujetos humanos se vean infectados por otros organismos, no existe riesgo añadido para el sujeto, ya que el OMG no codifica ningún gen viral o patogénico.

c) Consecuencias probables de la transferencia de genes: en ambos OMGs, 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.

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 aplica.

## H. Información sobre el seguimiento

### 1. Métodos de seguimiento de los OMG

Tras la administración de ambos productos en investigación a los pacientes, se realizarán ensayos de citometría de flujo y qPCR para monitorizar la persistencia de linfocitos T.

### 2. Métodos de seguimiento de las repercusiones en el ecosistema

No aplica

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

No aplica

### 4. Tamaño del área de seguimiento (m<sup>2</sup>)

No procede

### 5. Duración del seguimiento

El seguimiento de los pacientes será de al menos 1 año. La duración global del estudio es de 60 meses (36 meses de reclutamiento y 24 meses de seguimiento).

### 6. Frecuencia del seguimiento

Tras la administración del tratamiento, se realizará un control estricto inicialmente en el día 7, 14, 21 y 28, luego en el mes 2, 3, 6 y 12. Posteriormente, se realizará un seguimiento a largo plazo cada 3 meses hasta completar el año.

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

### **1. Tratamiento del lugar tras la liberación**

En la limpieza de las salas en las que se almacena/n, prepara/n y administra/n el/los producto/s en investigación se seguirá/n los procedimientos estándar del hospital para hemoderivados. No se requieren medidas especiales de limpieza o desinfección.

### **2. Tratamiento del OMG tras la liberación**

No se aplica ningún tratamiento después de la liberación del OMG/s, aparte de la eliminación de los residuos del producto y los materiales contaminados de acuerdo a los procedimientos del centro hospitalario para residuos de riesgo biológico o de categoría III.

### **3. a) Tipo y cantidad de residuos producidos**

Para ambos OMG, los residuos son categoría III, concretamente:

- Residuos generados durante la preparación y manipulación del producto final.
- Los residuos derivados de la administración al paciente del OMG.
- 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 van a una empresa externa especializada que recoge los contenedores de residuos biológicos sellados y que posteriormente se inactivarán mediante autoclavado y que luego pasarán a incineración. Los residuos líquidos se tratarán con desinfectantes y no serán más de 1 L.

### **3. (b) Tratamiento de residuos**

Según el Anexo I del Decreto 83/99 de la CAM, los residuos del medicamento en investigación se incluyen en la categoría de Residuos Biosanitarios Especiales Clase III (en adelante RBE).

La gestión de los residuos se realizará de acuerdo al procedimiento interno del Hospital La Paz.

## **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**

Para ambos OMG, como medida de precaución, se aplicarán las medidas de bioseguridad para nivel de contención 2 durante su preparación y administración. Los pacientes tratados se mantendrán en el hospital durante al menos 30 días después de la administración de la última dosis de OMG.

En caso de liberación accidental, se procederá de acuerdo al procedimiento de recogida de material biosanitario de riesgo 2, aplicando determinadas medidas para material biosanitario de riesgo 3:

- Se utilizarán los equipos de protección individual del kit de derrames de material biosanitario.
- Se impedirá el paso a la zona afectada durante el tiempo necesario para la recogida.
- Se colocarán los EPI en el orden establecido en el procedimiento. El trabajador encargado de recoger el derrame se colocará los EPI del kit en el siguiente orden de colocación: calzas, mascarilla FFP2, gafas, 1er par de guantes, bata y 2º par de guantes (por encima de la bata).
- Controlar la fuente del derrame.
- Retirar los restos groseros, si son de cristal con las pinzas del kit.
- Cubrir el derrame con un empapador de celulosa. Retirar el empapador con un segundo empapador.
- Aplicar un desinfectante apropiado sobre el empapador de celulosa y la zona inmediatamente circundante. Debe utilizarse un desinfectante eficaz y aplicar de modo que se reduzca al mínimo la formación de aerosoles.
- Aplicar nuevamente desinfectante y después del tiempo necesario (15 minutos), retirar todos los materiales. Todos los materiales que entren en contacto con el agente derramado deben tratarse como residuo.
- Retirarse los EPI, según el procedimiento el orden será el siguiente: 2º par de guantes, bata, calzas, mascarilla FFP2 y 1er par de guantes.
- Eliminar los EPI (excepto las gafas). Limpiar las gafas con agua y jabón. Secar y guardar.
- Identificar, cerrar y retirar el contenedor según el protocolo de gestión de residuos categoría III.
- Lavarse las manos con agua y jabón/ o solución hidroalcohólica.
- Limpieza y desinfección de la zona.

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

Para ambos OMG, 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**

No aplica. El ensayo se realiza en un entorno controlado y los residuos se gestionan para su correcta eliminación.

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

Se comunicará al Consejo Interministerial de Organismos Modificados Genéticamente y a la Comisión Nacional de Bioseguridad cualquier incidencia o accidente que pudiera ocurrir con repercusiones para la salud humana o animal, o para el medio ambiente.