

PARTE 1 (DECISIÓN DEL CONSEJO 2002/813/CE)

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

A. Información de carácter general

1. Detalles de la notificación

a) Estado miembro de la notificación: ESPAÑA
b) Número de la notificación: B/ES/12/17
c) Fecha del acuse de recibo de la notificación: 23/12/2011
d) Título del proyecto: “Ensayo clínico, abierto, de Fase I para evaluar la eficacia y seguridad del tratamiento con células mesenquimales autólogas infectadas con un nuevo adenovirus oncolítico (CELYVIR) en el tratamiento de pacientes pediátricos con tumores sólidos refractarios o recidivantes”
e) Periodo propuesto para la liberación: Inclusión primer paciente: Diciembre 2011 Inclusión último paciente: Diciembre 2012

2. Notificador

Nombre de la institución o empresa: FUNDACION PARA LA INVESTIGACION BIOMEDICA HOSPITAL UNIVERSITARIO INFANTIL NIÑO JESUS

3. Definición del OMG

a) Indíquese si el OMG es:

- viroide (.)
- virus ARN (.)
- virus ADN X
- bacteria (.)
- hongo (.)
- animal:
 - mamíferos (.)
 - insectos (.)
 - peces (.)
 - otro animal (.)
- otro, especifíquese (reino, *phylum* y clase): ...

b) Identidad del OMG (género y especie): **ICOVIR-5 es un adenovirus oncolítico que en este estudio va a infectar células mesenquimales (CELYVIR) para su posterior infusión a pacientes con tumores sólidos refractarios o recidivantes.** Por ello, el nombre del estudio es **CELYVIR (células mesenquimales infectada con adenovirus ICOVIR-5).** ICOVIR-5 (HAd5-DM-E2F-K-Δ24-RGD) es un adenovirus oncolítico derivado de HAd5. Se ha diseñado para el tratamiento sistémico de tumores

diseminados. El genoma de ICOVIR5 contiene diversas modificaciones que le confieren capacidad de replicación selectiva en células tumorales en las que la ruta de retinoblastoma/E2F se encuentra desregulada. ICOVIR5 incluye las siguientes modificaciones:

- 1) La sustitución de parte de promotor endógeno de E1A por el promotor E2F-1 para controlar la expresión de la proteína viral E1A
- 2) La inserción de una secuencia “aislante” (DM) precediendo el promotor
- 3) La inserción de una secuencia kozak en el codón de inicio de E1A (K)
- 4) La presencia de una deleción de 8 aminoácidos en el dominio de unión de E1A con pRb (deleción Δ 24)
- 5) La inserción del tripéptido RGD en la fibra viral

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

Los adenovirus salvajes son estables. En pacientes inmunodeprimidos, la recombinación entre adenovirus parece que puede jugar un papel en la evolución de nuevas cepas con distintas propiedades inmunogénicas pero nunca se han detectado híbridos con secuencias de HAd5. Los adenovirus genéticamente modificados son genéticamente estables siempre y cuando el tamaño de su genoma no exceda el 105% del tamaño del genoma del adenovirus salvaje. Genomas más grandes hacen que el virus crezca más lentamente, y sufra reordenaciones espontáneas que resultan en la pérdida de secuencias de ADN no esenciales, normalmente los insertos.

El conjunto de alteraciones genéticas introducidas en ICOVIR-5 hacen que el tamaño final de su genoma sea de 36928 bp, lo que representa un 102,76% del tamaño génico del virus nativo HAd5. Consecuentemente la probabilidad de que ICOVIR-5 sea genéticamente inestable es despreciable.

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 (.)

No X

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

Sí (.)

No X

En caso afirmativo:

- Estado miembro de la notificación: ...
- Número de la notificación: B/./././...

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

Sí (.)

No X

En caso afirmativo:

- Estado miembro de la notificación: ...

- Número de la notificación: ../../...

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

No existen datos respecto a una posible liberación al medio ambiente de ICOVIR-5, dado que el virus no ha sido administrado nunca a pacientes humanos. Extrapolando de los datos obtenidos en otros estudios clínicos con adenovirus oncolíticos similares a ICOVIR-5 administrados sistémicamente se sabe que se puede producir liberación de virus a través de la orina, saliva y posiblemente esputo hasta el día 14 post-administración y especialmente a las dosis más altas (> 2.10¹² partículas virales/paciente). Esto es posible dado el estado relativamente inmunocomprometido de los pacientes de cáncer, que presentan una respuesta adaptativa más lenta.

El hombre es el huésped natural del adenovirus. Las infecciones adenovirales son endémicas y la mayor parte de la población es seropositiva para anticuerpos antiadenovirus neutralizantes. La infección adenoviral es básicamente asintomática, autolimitante y restringida a determinados tejidos permisivos. Si la patogenicidad de ICOVIR-5 estuviese incrementada, las potenciales consecuencias para la salud pública podrían ser importantes, por ejemplo resultando en fenotipos patológicos y nuevas manifestaciones clínicas en la población.

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

Para rellenar la siguiente información se ha tenido en cuenta las siguientes premisas:

- OGM: ICOVIR-5 (incluido en células mesenquimales en este estudio; **CELYVIR**)
- Receptor HAd5
- Donante: fragmentos del genoma humano y sintéticos añadidos a HAd5 para generar el adenovirus de replicación selectiva ICOVIR-5.

1. Identificación del organismo receptor o parental

a) Indíquese si el organismo receptor o parental es:

- viroide (.)
- virus ARN (.)
- virus ADN
- bacteria (.)
- hongo (.)
- animal:
 - mamíferos (.)
 - insectos (.)
 - peces (.)
 - otro animal (.)
- otro, especifíquese (reino, *phylum* y clase): ...

2. Nombre

i) Orden y taxón superior (animales): Adenoviridae...
ii) Género: Mastadenovirus
iii) Especie: Adenovirus humano salvaje (Had) del serotipo 5
iv) Subespecie: Adenovirus del tipo C
v) Cepa:
vi) Patovar (biotipo, ecotipo, raza, etc.): ...
vii) Nombre vulgar: HAd5

3. Distribución geográfica del organismo

a) Autóctono del país que notifica o establecido en él:	Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No (.)	No se sabe (.)
b) Autóctono de otros países de la Comunidad o establecido en ellos:	i) Sí <input checked="" type="checkbox"/>		
En caso afirmativo, indíquese el tipo de ecosistema en que se encuentra:			
Atlántico: <input checked="" type="checkbox"/>			

Mediterráneo: X
Boreal: X
Alpino: X
Continental: X
Macaronésico: X
ii) No (.)
iii) No se sabe (.)
c)

4. Hábitat natural del organismo

a) Si es un microorganismo:

- Agua (.)
- Suelo, en libertad (.)
- Suelo, en simbiosis con sistemas radiculares de plantas (.)
- En simbiosis con sistemas foliares o caulinares de plantas (.)
- En simbiosis con animales (.)
- Otros especifíquense : HAd5 no se encuentra en ecosistemas naturales ya que necesita células humanas para activarse. La especificidad del HAd5 hace que únicamente sea capaz de replicar en células de humanos. También se ha descrito que en las ratas algodoneras (*Sigmodon hispidus*) y también algunos tipos de hámster (*Mesocricetus auratus*) los adenovirus humanos, como el HAd5, son semi-permisivos para la replicación del adenovirus humano.

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

5. a) Técnicas de detección:

La detección se efectúa por la técnica de PCR en Tiempo Real (RealTime- PCR) directa a partir del ADN obtenido del tejido/órgano a testar, y usando oligonucleótidos que amplifican una región no codificante del genoma de ICOVIR-5.

La sensibilidad de estas técnica es de aproximadamente 10-20 genomas/20 ng de ADN.

5. b) Técnicas de identificación:

La identidad se analizará a nivel de ADN genómico viral por PCR y análisis de restricción del ADN viral purificado.

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 X

No (.)

En caso afirmativo, especifíquese: **El HAd5 está clasificado como nivel de bioseguridad de clase II.**

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

Sí X	No (.)	No se sabe (.)
<p>En caso afirmativo:</p> <p>a) ¿Para cuál de los organismos siguientes?</p> <ul style="list-style-type: none"> - Humanos X - Animales (.) - Plantas (.) - Otros (.) 		
<p>b) Aporte la información pertinente especificada en la letra d) del punto 11 de la letra A de la sección II del anexo III A de la Directiva 2001/18/CE:</p> <p>El HAd5 es un virus humano con un nivel de biopeligrosidad de clase 2 . Las infecciones por HAd5 son mayoritariamente asintomáticas pero pueden causar enfermedades del sistema respiratorio, ocular y gastrointestinal, especialmente en niños. El periodo de incubación de la enfermedad es de 1 a 10 días. Se ha descrito que los órganos linfoides pueden dar lugar a un <i>shedding</i> persistente, pero esta circunstancia se considera muy poco habitual y sólo se han demostrado efectos de dicha persistencia anecdótica en el caso niños pequeños sometidos a un trasplante de médula ósea. La mayoría de la población es seropositiva para adenovirus, y entre ellos los adenovirus del grupo C son los más ampliamente extendidos lo que provoca que cualquier infección adenoviral sea fácilmente neutralizada.</p> <p>Los adenovirus entran en su huésped vía el tracto respiratorio o los ojos, mediante aerosoles generados por los individuos afectados (por estornudos o expectoraciones). La transmisión de adenovirus también puede producirse por contacto con la saliva, o por la vía oral-fecal. De acuerdo con la Agencia de Salud Pública de Canadá, el límite inferior para la infección por inhalación es de 150 unidades formadoras de calvas. Las infecciones adenovirales son normalmente auto-limitantes. Los estudios con vacunas vivas basadas en adenovirus han demostrado que después de la administración entérica, se produce transmisión, presumiblemente por la vía oral-fecal, pero dicha transmisión requiere un contacto físico íntimo. La infección por contacto casual después de la administración entérica es altamente improbable, incluso con la forma salvaje/nativa del adenovirus. También se ha visto que dicha transmisión horizontal sólo se produce entre humanos, y no afecta a ninguna otra especie, a excepción hecha del chimpancé.</p> <p>A diferencia de los retrovirus y los lentivirus, los adenovirus son virus no integrativos. Se ha descrito la persistencia a largo plazo de genomas adenovirales en ciertos tejidos linfoides pero se cree que esta persistencia es episomal y no debida a eventos de integración de muy baja frecuencia. Independientemente del mecanismo no se han descrito nunca efectos adversos asociados a dicha presencia de genomas a largo plazo. A pesar de los esfuerzos de diversos grupos de investigación, no sido posible crear ratones transgénicos por medio de la inyección directa de adenovirus en los testes.</p>		

8. Información sobre reproducción.

a) Tiempo de generación en ecosistemas naturales: Irrelevante, porque HAd5 no se encuentra en ecosistemas naturales. Sólo se encuentra en células humanas....
b) Tiempo de generación en el ecosistema en el que vaya a ser liberado: Irrelevante
c) Modo de reproducción: Irrelevante.
d) Factores que afectan a la reproducción: Irrelevante.

9. Capacidad de supervivencia

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

- | | |
|--------------------------------|---------------------|
| i) endosporas | (.) |
| ii) quistes | (.) |
| iii) esclerocios | (.) |
| iv) esporas asexuales (hongos) | (.) |
| v) esporas sexuales (hongos) | (.) |
| vi) huevos | (.) |
| vii) pupas | (.) |
| viii) larvas | (.) |
| ix) otras (especificúense): | Amplificación viral |

b) Factores pertinentes que afectan a la capacidad de supervivencia:

Los adenovirus pierden rápidamente su bioactividad a temperatura ambiente. Pese a ello esta pérdida es logarítmica y por tanto a tiempos largos tiene una cierta estabilidad, aunque en muchos casos la cantidad de virus remanente está por debajo del umbral de infectividad. Los adenovirus son sólo parcialmente resistentes a agentes químicos y físicos. El AdH5 es susceptible a hipoclorito sódico 1%, glutaraldehído 2% y dodecilsulfato sódico (SDS) 0,25%.

También es sensible al calor (>56°C) La inactivación de HAd5 se consigue en autoclave a 121°C durante 15 minutos, con una eliminación 100% eficaz. Se permite el empleo de temperaturas más elevadas, o de una mayor duración del proceso de autoclavado.

10. a) Vías de diseminación:

Los adenovirus afectan a numerosos y variados aparatos de nuestro organismo. Los síndromes más frecuentes y conocidos son:

- Infecciones del tracto respiratorio. Son muy frecuentes, sobre todo las infecciones de las vías altas, como las faringoamigdalitis, que se presentan a lo largo de todo el año. Los adenovirus también producen infecciones de las vías bajas, como las tráqueobronquitis, donde la tos es un síntoma característico, hasta el punto de provocar síndromes pertusoides. Más raramente, pueden ser responsables de cuadros de neumonía.
- Infecciones de tracto digestivo. Deben distinguirse las producidas por los serotipos 40 y 41, que cursan con fiebre, gastroenteritis y un tiempo de evolución superior a los 8 días, de las más leves originadas por los otros serotipos.
- Infecciones oculares. Pueden presentarse como una conjuntivitis, a veces acompañando a otros cuadros clínicos, por lo general la faringitis, o como una

queratoconjuntivitis, más grave, que comienza por una conjuntivitis folicular y llega a invadir la córnea.

- Infecciones genito-urinarias: la forma más habitual es la cistitis hemorrágica, aunque se han descrito también casos de cervicitis y uretritis como manifestaciones de una enfermedad de transmisión sexual.
- Infecciones en el paciente inmunodeprimido. De forma muy ocasional los adenovirus pueden afectar a estos enfermos, produciendo cuadros graves de neumonía o de infección generalizada en los que el patógeno puede aislarse en diversos órganos como, por ejemplo, en el hígado trasplantado a un paciente.

10. b) Factores que afectan a la diseminación:

Irrelevante

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).

Se han realizado notificaciones previas para el uso confinado de ICOVIR-5 en procedimientos de investigación.

Estas autorizaciones se han efectuado por parte del Departament d'Agricultura Ramaderia i Pesca (DARP) de la Generalitat de Catalunya (órgano competente).

Los números de autorización son respectivamente para las instalaciones y el procedimiento:

A/ES/05I-14

A/ES/05/15

C. Información sobre la modificación genética

Para rellenar la siguiente información se ha tenido en cuenta las siguientes premisas:

- OGM: ICOVIR-5 (virus incluido en células mesenquimales en este estudio; **CELYVIR**)
- Receptor HAd5
- Donante: fragmentos del genoma humano y sintéticos añadidos a HAd5 para generar el adenovirus de replicación selectiva ICOVIR-5

1. Tipo de modificación genética:

- i) Inserción de material genético X
- ii) Eliminación de material genético X
- iii) Sustitución de una base (.)
- iv) Fusión celular (.)
- v) Otro (especifíquese):
ICOVIR-5 (HAd5-DM-E2F-K- Δ 24-RGD) es un adenovirus oncolítico derivado de HAd5 diseñado para el tratamiento sistémico de tumores diseminados. Su genoma contiene diversas modificaciones que le confieren capacidad de replicación selectiva en células tumorales en las que la ruta de retinoblastoma/E2F se encuentra desregulada. Las diferentes modificaciones genéticas que contiene ICOVIR-5 son:
 - 1) la sustitución de parte de promotor endógeno de E1A por el promotor de E2F-1 para controlar la expresión de la proteína viral E1A.
 - 2) la inserción de una secuencia "aislante" (DM) precediendo el promotor
 - 3) la inserción de una secuencia kozak en el codón de inicio de E1A (K)
 - 4) la presencia de una delección de 8 aminoácidos en el dominio de unión de E1A con pRb (delección Δ 24)
 - 5) la inserción del tripéptido RGD en la fibra viral.

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

El conjunto de alteraciones incluidas en el genoma de ICOVIR-5 consiguen que la replicación del virus quede restringida a células tumorales (con niveles de E2F-1 altos). Además consiguen también restringir la expresión de las proteínas virales a las células constituyentes del tumor, con lo cual el virus puede ser administrado sistémicamente sin que dé lugar a toxicidad hepática. La inclusión del péptido 4C-RGD consigue incrementar la eficacia de infección del adenovirus por las células tumorales (que sobreexpresan integrinas). El uso previsto de ICOVIR es como tratamiento antitumoral de tumores infantiles del sistema nervioso central refractarios o recurrentes.

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

Sí X

No (.)

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 X

No (.)

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 X
- Bacteriófago (.)
- Virus (.)
- Cósmido (.)
- Elemento de transposición (.)
- Otros (especifíquese): ...

b) Identidad del vector:

Para generar el virus de replicación condicional ICOVIR-5, se digirió el plásmido pICOVIR-5 con el enzima *PacI* y se transfectó en células HEK293 (procedentes de la ATCC: American Type Cell Collection).

El plásmido pICOVIR-5 proviene de la recombinación del plásmido pShuttle-DM-E2FK- Δ24 (que contiene las modificaciones en el promotor de E1A del adenovirus HAd5, tales como la secuencia aislante DM-1, el promotor E2F-1 humano y la secuencia de Kozak, y también la versión Δ24 de E1A) con el plásmido pVK503 (plásmido que contiene el genoma entero de HAd5 modificado en su fibra en el aminoácido 480, insertando 27 pares de bases que codifican para el péptido RGD-4C: Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys). La identidad del vector pICOVIR-5 se puede confirmar mediante digestión con *KpnI*, que da lugar a un patrón diferencial.

c) Gama de organismos huéspedes del vector:

pICOVIR-5 sólo se replica en bacterias.

La transfección de una versión digerida del vector pICOVIR-5 da lugar a una copia completa del genoma adenoviral de ICOVIR-5 con capacidad de replicación en células humanas con niveles elevados de expresión de E2F-1 (tumoraes).

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

d1. En pICOVIR-5

Sí X

No (.)

- Resistencia a los antibióticos X
- Otras (especifíquense):
- Indique qué gen de resistencia a los antibióticos se inserta: ampicilina

d1. En el virus ICOVIR-5

- | | |
|--------------------------------------|------|
| Sí (.) | No X |
| - Resistencia a los antibióticos (.) | No X |

e) Fragmentos constituyentes del vector:

El plásmido pICOVIR-5 proviene de la recombinación del plásmido pShuttle-DM-E2F-K- Δ 24 (que contiene la región 34931-35935 del genoma de HAd5 seguida de la región 1-5790 con las modificaciones en el promotor de E1A del adenovirus HAd5, tales como la secuencia aislante DM-1, el promotor E2F-1 humano y la secuencia de Kozak, y también la versión Δ 24 de E1A) con el plásmido pVK503 (plásmido que contiene el genoma entero de HAd5 modificado en su fibra en el aminoácido 480, insertando 27 pares de bases que codifican para el péptido RGD-4C: Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys). De esta forma pICOVIR-5 contiene el genoma completo de ICOVIR-5. Además pICOVIR-5 contiene el gen de resistencia a ampicilina y un origen de replicación en bacteria, flanqueado por dianas *PacI* (de forma que tras la digestión con *PacI* los elementos que permiten su propagación en bacteria desaparecen).

f) Método de introducción del vector en el organismo receptor:

- | | | |
|---------------------|-----|--|
| i) Transformación | (.) | |
| ii) Electroporación | (.) | |
| iii) Macroinyección | (.) | |
| iv) Microinyección | (.) | |
| v) Infección | (.) | |
| vi) Otros | | La transfección de una versión digerida del vector pICOVIR-5 da lugar a una copia completa del genoma adenoviral de ICOVIR-5 con capacidad de replicación en células humanas con niveles elevados de expresión de E2F-1 (tumoraes) |

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

- | | | |
|-------------------------|-----|--|
| i) Transformación | (.) | |
| ii) Microinyección | (.) | |
| iii) Macroencapsulación | (.) | |
| iv) Macroinyección | (.) | |
| v) Otros | ... | |

6. Información sobre el fragmento de inserción:

- a) **Composición del fragmento de inserción:** El genoma de ICOVIR-5 contiene 5 inserciones respecto al genoma de HAd5:
- Aislante genético del gen de la distrofia miotónica del genoma humano DM-1: Genbank L08835

- Promotor del gen de E2F1 del genoma humano: Genbank S74230
- Secuencia humana de Kozak : secuencia CCACC
- Secuencia artificial de unión a integrina de la familia α v: secuencia TGTGACTGCCGCGGAGACTGTTTCTGC

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

- Aislante DM-1 : locus DM1 humano. Se obtuvo por PCR a partir de ADN obtenido de células mononucleares de sangre periférica humana normal, usando oligonucleótidos que amplificaban la región comprendida entre la posición 13006 y la 13474 de la secuencia del locus génico de DM-1 (GenBank accesión number L08835). Aísla el promotor E2F1 en el genoma viral.
- Promotor E2F1: Secuencia no codificante de origen humano. Se obtuvo por PCR a partir de ADN obtenido de células mononucleares de sangre periférica humana normal, usando oligonucleótidos que amplificaban la región comprendida entre la posición -218 y la + 51 de la secuencia del gen de la E2F-1. Controla la expresión de genes en dependencia de E2F-1.
- secuencia de Kozak. Secuencia no codificante de origen humano generada sintéticamente a partir de oligonucleótidos diseñados para que incluyan la secuencia CCACC y posterior PCR. Facilita el reconocimiento de la maquinaria de traducción de los mARN.
- secuencia sintética de unión a integrinas. Secuencia artificial generada sintéticamente como oligonucleótidos diseñados para que incluyan la secuencia TGTGACTGCCGCGGAGACTGTTTCTGC y posterior PCR. Permite que el virus se una a integrinas sobreexpresadas en tumores.

c) Función prevista de cada parte constitutiva del fragmento de inserción en el OMG:
Véase la sección anterior

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

- En un plásmido libre (.)
- Integrado en el cromosoma (.)
- Otros (especifíquense): Integrados en el genoma de HAd5..

e) ¿Contiene el fragmento de inserción partes cuyo producto o funciones se conozcan?

Sí (.)

No X

En caso afirmativo, especifíquese: ...

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

Para rellenar la siguiente información se ha tenido en cuenta las siguientes premisas:

- OGM: ICOVIR-5 (virus que infecta células mesenquimales en este estudio; **CELYVIR**)
- Receptor HAd5
- Donante: fragmentos del genoma humano y sintéticos añadidos a HAd5 para generar el adenovirus de replicación selectiva ICOVIR-5

1. *Indíquese si es:*

- viroide (.)
- virus ARN (.)
- virus ADN (.)
- bacteria (.)
- hongo (.)
- animal:
 - mamíferos X
 - insectos (.)
 - peces (.)
 - otro animal (.)

- otro, especifíquese (reino, *phylum* y clase): Especie humana (*Homo sapiens sapiens*) y sintético.

2. *Nombre completo:*

i) Orden y taxón superior (animales): Primates.
ii) Familia: Hominidae
iii) Género: Homo
iv) Especie: Homo sapiens
v) Subespecie: Homo sapiens sapiens
vi) Cepa: No procede
vii) Cultivar/línea de reproducción: No procede
viii) Patovar: No procede
ix) Nombre vulgar: Especie humana

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

Sí (.)	No X
--------	------

En caso afirmativo, especifíquese:

a) ¿Para cuál de los organismos siguientes?

- Humanos (.)
- Animales (.)
- Plantas (.)
- Otros ...

b) ¿Están implicadas de alguna forma las secuencias donadas en las propiedades patógenas o nocivas del organismo?

Sí (.)

No X

No se sabe (.)

En caso alternativo, proporcione la información pertinente de conformidad con la letra d) del punto 11 de la letra A de la sección 11 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 X

En caso afirmativo, especifíquese: ...

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

Sí X

No (.)

No se sabe (.)

E. Información sobre el organismo modificado genéticamente

Para rellenar la siguiente información se ha tenido en cuenta las siguientes premisas:

- OGM: ICOVIR-5 (en células mesenquimales; CELYVIR)
- Receptor HAd5
- Donante: fragmentos del genoma humano y sintéticos añadidos a HAd5 para generar el adenovirus de replicación selectiva ICOVIR-5

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 OGM del receptor en lo que a capacidad de supervivencia se refiere?

Sí (.)

No X

No se sabe (.)

Especifíquese:

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

Sí X

No (.)

No se sabe (.)

Especifíquese: Mientras HAd5 es capaz de replicarse en todas las células humanas, ICOVIR-5 sólo es capaz de replicarse en células humanas tumorales con niveles altos de E2F-1.

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

Sí (.)

No X

No se sabe (.)

Especifíquese:

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

Sí X

No (.)

No se sabe (.)

Especifíquese: Es defectivo en células normales humanas y por tanto solo afecta a células tumorales humanas. No genera la patogenicidad de vías respiratorias típica del HAd5.

2. Estabilidad genética del organismo modificado genéticamente:

Estable.

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

Sí X

No (.)

No se sabe (.)

En caso afirmativo:

a) ¿Para cuál de los organismos siguientes?

- Humanos X
- Animales (.)
- Plantas (.)
- Otros ...

b) Aporte la información pertinente especificada en la letra d) del punto 11 de la letra A de la sección II y el inciso i) del punto 2 de la letra E de la sección II del anexo III A: ...

El conjunto de modificaciones genéticas que incluye ICOVIR-5 impiden tanto la expresión de proteínas virales como la replicación misma del virus en las células normales que no presenten alteraciones en la vía de retinoblastoma. Así, los datos preclínicos obtenidos demuestran que:

- En astrocitos normales humanos primarios, ICOVIR-5 es incapaz de expresar niveles detectables de E1A, ni de proteínas tardías (fibra), su replicación está bloqueada (título de virus producido 5 logaritmos menor que para el virus salvaje HAd5), y no es citotóxico.

- En hígado normal tanto humano como de ratón, ICOVIR-5 no es capaz de expresar niveles detectables de E1A. En muestras primarias de hígado humano, el virus tampoco es capaz de replicarse.

- En fibroblastos humanos normales, ICOVIR-5 no es capaz de expresar E1A.

- En células tumorales humanas (con alteraciones en la vía de retinoblastoma) a las que se restaura la funcionalidad de la vía (por sobreexpresión de pRb o del regulador negativo p21), ICOVIR-5 es incapaz de expresar niveles detectables de E1A, ni de proteínas tardías (fibra) y su replicación se bloquea (título de virus producido 7 log menor que para la misma célula antes de restaurar la vía de pRb).

Los tejidos de ratón y de rata no son compatibles con la replicación eficiente de los adenovirus humanos. Sin embargo el ratón sí que puede ser empleado como huésped para modelos de tumores humanos xenógrafos en cepas inmunodeficientes (ratones *nude*). Los hámsteres sirios dorados (*Mesocricetus auratus*), las ratas aldoneras (*Sigmodon hispidus*) y el cerdo también se han propuesto más recientemente como modelos semi-permisivos que pueden emplearse en estudios preclínicos para evaluar eficacia, toxicidad y biodistribución del formas genéticamente modificadas del HAd5.

En modelos de ratón (inmunocompetentes y *nude*) la administración endovenosa en forma de dosis única de ICOVIR-5 se elimina de la sangre con tiempo de vida media de 3 minutos, lo que la hace muy similar a la cinética de *clearance* del adenovirus nativo en el mismo modelo. El t1/2 de otro vector viral con la inserción RGD en la fibra (virus no replicativo AdTLRGD) también es muy parecido (2,13 minutos) al obtenido con HAd5 y con ICOVIR-5. Todo ello indica que la presencia del tripéptido RGD en el bucle HI de la fibra no modifica la farmacocinética de ICOVIR-5 con respecto a la de otros virus derivados de HAd5. Consecuencia de ello es que a pesar que no existen datos clínicos de la administración sistémica de ICOVIR-5, se puede asumir que el perfil de farmacocinética será muy parecido al que se ha visto con otros adenovirus condicionalmente replicativos (oncolíticos) sin modificaciones en su cápside de los que existe experiencia clínica. Los datos obtenidos por PCR de genomas virales en los ensayos clínicos con Onyx-015 y con CV7870 administrado sistémicamente en dosis

única indican que el virus desaparece rápidamente postadministración con un t1/2 de 15 minutos y que el nadir de genomas ocurre típicamente entre las 9 y 12 horas post-administración.

En modelo de ratón ICOVIR-5 se acumula mayoritariamente en el hígado a partir de la hora post-administración; sin embargo el virus es sólo detectable a nivel de genoma ya que en las células no tumorales el virus no expresa proteínas ni se replica. Sin embargo una pequeña parte del virus administrado llega al tumor (en el subcutáneo del animal), y allí el virus empieza a replicar de forma que se puede detectar la presencia de proteínas de la cápside a partir de día 8 post-administración sistémica.

Numerosos datos clínicos y preclínicos con adenovirus oncolíticos similares a ICOVIR5 demuestran que la principal toxicidad es hepática. Tras una experiencia de administración endovenosa de altas dosis de adenovirus (superior a 10¹³ partículas virales) en más de 300 pacientes neoplásicos la toxicidad objetivada consistió en un cuadro febril transitorio, elevación de la cifra de transaminasas moderada transitoria y ocasionalmente náuseas. Al igual que en estudios preclínicos, el principal tejido afectado fue el hígado debido a la transducción hepática. Por otro lado, se ha publicado ampliamente la tolerancia a elevadas dosis de vector en diversos ensayos fase I y II en pacientes neoplásicos con adenovirus oncolíticos (véase una revisión del tema por Aghi y Martuza).

Se han realizado estudios de toxicidad sistémica aguda en ratón en modelos inmunocompetentes (ratones BalbC) con dosis crecientes de ICOVIR-5 (desde 1.10¹⁰ partículas virales/ratón hasta 1.10¹¹ partículas virales/ratón). En este estudio se incluyeron como controles la cepa salvaje de adenovirus (HAd5) y el virus oncolítico AdΔ24RGD a las dosis en que su toxicidad lo permitieron (desde 1.10¹⁰ partículas virales/ratón hasta 5.10¹⁰ partículas virales/ratón). Los resultados obtenidos han demostrado que:

- la expresión de la proteína viral E1a en hígado *in vivo* está eliminada. Las inmunohistoquímicas fluorescentes anti-E1a de cortes de hígados obtenidos 5 y 12 días tras la administración endovenosa de dosis crecientes de ICOVIR5 revelan la ausencia de expresión de E1a incluso a la dosis más alta (1.10¹¹ partículas virales por ratón). Dosis equivalentes de HAd5RGD ó AdΔ24RGD da lugar a una expresión importante de E1A.
- El valor de STD10 para ICOVIR-5 (dosis de toxicidad severa para el 10% de los animales) es de 1.10¹¹ partículas virales/ratón. La determinación del % de pérdida de peso y la letalidad asociada demostraron que ICOVIR-5 no es letal a dosis inferiores a 1.10¹¹ partículas virales/ratón. Dicha toxicidad es mucho menor a la determinada para la cepa de adenovirus salvaje (HAd5) y para el virus oncolítico sin regulación de E1a por promotor selectivo de tumor (AdΔ24RGD).
- Estudio anatomopatológico de tejidos. A día 3 y 5 post-administración del virus por vía endovenosa se recogieron distintos tejidos (hígado, pulmón, bazo, riñón, etc.) y las muestras fueron analizadas por un patólogo independiente sin conocimiento del origen de la muestra. Los resultados de las biopsias hepáticas determinaron que la administración de ICOVIR-5 a dosis inferiores a 5.10¹⁰ partículas virales/ratón no generaban ningún tipo de alteración significativa. A 5.10¹⁰ partículas virales/ratón se pudieron detectar algunos agregados linfocitarios localizados en un parénquima mayoritariamente sano sin evidencias de degeneración necrótica ni presencia de

esteatosis. El nivel superior de dosis (1.1011 partículas virales/ratón) daba lugar a hígados con pequeñas regiones localizadas esteatóticas y algún cuerpo de Councilman aislado. A dicha dosis también se pudo detectar la ocurrencia de inflamación infiltrante crónica. También se aprecia la presencia de actividad proloferativa. Dicho patrón dista de la hepatitis fulminante con ocurrencia de grandes áreas necróticas y macroesteatosis descrita después de la administración endovenosa de 5.1010 partículas virales/ratón de HAd5 ó AdΔ24RGD. El análisis de las muestras de pulmón murino obtenidas a día 5 post-administración no detectaron diferencias significativas en la morfología en ninguno de los niveles de dosis de ICOVIR-5 ensayados (hasta 1.1011 vp/ratón de ICOVIR-5). El estudio anatomopatológico de las muestras de riñón de los ratones inyectados sistémicamente demostraron no diferencias significativas versus el grupo control (vehículo, PBS) hasta la dosis de 5.1010 vp /ratón de ICOVIR-5, excepto por la presencia de una ligera infiltración limfocitaria intersticial. A la mayor dosis de ICOVIR-5 ensayada (1.1011 vp/ratón), tampoco se observaron alteraciones morfológicas significativas, aunque se apreció una infiltración linfocitaria superior, y un incremento de la actividad proliferativa, con la presencia ocasional de alguna célula en apoptosis.

- Análisis bioquímico de la función hepática en plasma de los ratones después de la administración endovenosa de ICOVIR-5: ICOVIR-5 no indujo alteraciones en los niveles de creatinina a ninguna dosis administrada. Por el contrario sí que provocó transaminitis a dosis elevadas (5.1010 y 1.1011 partículas virales/ratón) aunque ésta fue estadísticamente inferior a la inducida por dosis equivalentes de la cepa de adenovirus salvaje (HAd5) o la inducida por el virus oncolítico AdΔ24RGD. Los resultados obtenidos a día 12 post-administración indican que los niveles de transaminasas tienden a normalizarse después de la inyección de 5.1010 vp de ICOVIR-5, pero que a la dosis más alta (1.1011 vp) los niveles disminuyen más lentamente y correlacionan con elevaciones no significativas de creatinina.

- Análisis hematológico en sangre total de los ratones después de la administración endovenosa de ICOVIR-5: el virus sólo indujo una ligera plaquetopenia cuando se administró a 1.1011 partículas virales/ratón, frente a HAd5 ó AdΔ24RGD, que provocaron disminución del número de plaquetas a dosis inferiores. Por el contrario, ICOVIR-5 no provocó alteraciones en el recuento linfocitario a ninguna de las dosis ensayadas. Paralelamente, dosis superiores a 2,5.1010 partículas virales/ratón de ICOVIR-5 indujeron elevaciones estadísticamente significativas en los niveles de monocitos y neutrófilos a día 5 p.i., pero no de los eosinófilos. Estas elevaciones revertieron a día 12 post-administración.

Paralelamente se disponen de datos preliminares en modelo de hámster sirio dorado (donde el adenovirus humano es semi-permisivo de replicación), en los que ICOVIR-5 se inyectó a una dosis de hasta 4.1011 vp/animal por inyección endovenosa. Los animales no experimentaron pérdidas de peso respecto al grupo control en ningún punto post-administración (hasta día 29). Los resultados del análisis bioquímico a día 5 mostraron que ICOVIR-5 no indujo alteraciones en la función hepática y los niveles de creatinina y transaminasas (AST/ALT) no se incrementaron a ninguna dosis ensayada.

Con respecto a la liberación al medio ambiente, no existen datos al respecto dado que el virus no ha sido administrado nunca a pacientes humanos. Y en los ensayos clínicos realizados hasta la fecha con otros adenovirus oncolíticos de características similares se observó se puede producir liberación de virus vivo a través de la orina, heces y saliva hasta el día 14 post-administración y especialmente a las dosis más altas (> 2.1012

partículas virales/paciente). Esto es posible dado el estado relativamente inmunocomprometido de los pacientes de cáncer (véase apartado 2i del ERMA), que presentan una respuesta adaptativa más lenta. Sin embargo, no se ha reportado la infección del personal sanitario a cargo del paciente, ni diseminación de ningún virus a terceras personas.

El uso propuesto para ICOVIR-5 contempla la administración local directamente en el tumor, mediante un neuronavegador, y se intentará infundir el virus en varias localizaciones dentro de la masa tumoral y en la periferia del tumor.

El ensayo para el que se pide autorización es el primer ensayo clínico que se realiza con ICOVIR-5 y consecuentemente no se dispone de datos previos en humanos. Los estudios preclínicos en ratón efectuados hasta la fecha indican que su biodistribución en humanos será equivalente a la de HAd5. Los datos publicados en humanos, cerdos y otros primates indican que HAd5 tiene una biodistribución tisular amplia.

Tampoco se dispone de datos previos de persistencia. Sin embargo dadas las características de ICOVIR-5 se puede asumir que su persistencia será similar a la de otros adenovirus oncolíticos ya ensayados en fases clínicas (como Onyx-015). Para estos virus, se han detectado genomas en los pacientes diversos días después de la última administración, pero en ningún caso se han podido recuperar virus viables.

4. Descripción de los métodos de identificación y detección:

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

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Real-time-PCR).

- b) Técnicas utilizadas para identificar el OMG:

La identidad de ICOVIR5 se analizará a nivel de ADN genómico viral por PCR y análisis de restricción del ADN viral purificado.

A) por PCR se amplifica desde bp 321 de ICOVIR5 hasta el bp 2013. Esta región de 1692 flanquea el aislante DM1, el promotor E2F1 y la mutación Δ 24 de E1A.

B) En análisis de restricción se realizará cortando el ADN viral genómico con la enzima *Kpn* I. Esta enzima genera un fragmento de 1284bp y otro de 1738bp característicos de ICOVIR5. El mapa completo es: 6.4 / 5.7 / 5.1 / 4.8 / 3.6 / 2.9 / 2.3 / 1.7 / 1.6 / 1.2 / 1.0 Kb). El HAd5 genera una única banda de 2052bp en lugar de esas dos bandas características.

La secuenciación del genoma de ICOVIR-5 se realizará en las regiones diferenciales respecto HAd5. Se usarán los siguientes pares de oligonucleótidos

Región DM-1: DM-1-Up (5'-GGGCAGATGGAGGGCCTTTTATTC-3')

Región del promotor E2F: E2F-Up (5'-GTGTTACTCATAGCGCGTAA-3')

Región de la delección D24: D24-down (5'-CTCCGGTGATAATGACAAG-3')

Región de la fibra modificada en su tropismo por RGD: FiberUp (5'-AAACGCTGTTGGATTTATG-3').

F. Información sobre la liberación

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

La finalidad del presente ensayo clínico es determinar la dosis máxima tolerada (DMT) de la infusión, **mediante células mesenquimales (CELYVIR)**, del adenovirus oncolítico de replicación condicionada ICOVIR-5 , en pacientes con tumores sólidos, así como determinar la seguridad, perfil de toxicidad y datos preliminares de eficacia si la hay, proponer una dosis segura para subsiguientes estudios (dosis recomendada), y evaluar la biodistribución del adenovirus oncolítico de replicación condicionada ICOVIR-5, en suero y tumor en los pacientes con tumores sólidos tratados con una infusión de células mesenquimales autólogas infectadas con ICOVIR-5.

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

Sí (.)

No X

En caso afirmativo, especifíquese:

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

a) Localización geográfica (región administrativa y coordenadas de referencia cuando proceda): Hospital Universitario Infantil Niño Jesús, Avda. Menéndez Pelayo, 65, 28009 Madrid
b) Área del lugar (m ²): i) Lugar real de la liberación (m ²): 10 ii) Área de liberación más amplia (m ²): Hospital Universitario Infantil Niño Jesús Los pacientes serán tratados en habitaciones aisladas, de las que el paciente podrá salir en el momento en que las muestras de sangre, orina y esputo resulten negativas para la presencia de adenovirus (cuando éstas sean analizadas por la técnica de Real Time-PCR).
c) Proximidad a biotopos reconocidos internacionalmente o zonas protegidas (incluidos depósitos de agua potable) que pudieran verse afectados: Irrelevante
d) Flora y fauna, incluidos cultivos, ganado y especies migratorias que pueden potencialmente interactuar con el OMG:

Irrelevante

4. Método y amplitud de la liberación:

a) Cantidad de OMG que vaya a liberarse:

La dosis inicial será de 1.10^{11} partículas virales por paciente. Habrá tres pacientes en cada nivel de dosis. Si ninguno de los tres primeros pacientes tratados experimenta Toxicidad Limitante de Dosis, otros tres pacientes recibirán el nivel de dosis inmediatamente superior con un incremento de dosis de 5 veces por cohorte. Si uno de los tres primeros pacientes experimenta una toxicidad limitante de dosis, otros tres pacientes como máximo recibirán esa misma dosis. Si dos o más pacientes experimentan una toxicidad limitante de dosis no se tratarán más pacientes con esa dosis. La Dosis máxima tolerada será la dosis máxima con la que menos de 2 pacientes de seis experimentaron una toxicidad limitante de dosis. Solo se podrán poner en marcha nuevos niveles de dosis si todos los pacientes tratados con la dosis actual han sido evaluados.

b) Duración de la operación:

La infusión de ICOVIR5 mediante células mesenquimales (CELYVIR) se realizará en un acto quirúrgico.

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

Los procedimientos a seguir por el personal y los visitantes que entren en contacto con pacientes administrados con ICOVIR-5 quedan registrados en un PNT (protocolo normalizado de trabajo) que incluye todas las instrucciones a seguir. A continuación se hace un resumen dicho procedimiento:

- El personal que se pinche con agujas que hayan tenido contacto con el virus debe seguir los procedimientos estándar vigentes para este tipo de accidentes. Debe informar al departamento de seguridad laboral así como a los responsables del estudio.
- Cualquier miembro del personal involucrado en el ensayo que se siente mal debe informar al departamento de seguridad laboral así como a los responsables del estudio.
- No se permitirán visitas de personas inmunodeprimidas, trasplantados, en tratamiento con quimioterapia o corticoides, niños ni embarazadas.
- Sólo se admitirá un máximo de dos visitantes al mismo tiempo.
- Los visitantes deberán llevar bata desechable, gafas de seguridad y mascarillas cuando accedan a la habitación del paciente.

Todos los especímenes del paciente deberán ser introducidos en una doble bolsa sellada y transportados en un contenedor rígido cerrado.

Los contenedores y las bolsas serán etiquetados como productos biológicos de riesgo.

Las muestras serán manejadas por las enfermeras del estudio, que asegurarán su adecuado transporte al laboratorio apropiado.

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

Clima mediterráneo continental y condiciones climáticas controladas dentro del Hospital.

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

No se disponen de datos previos de *shedding* debido al carácter de primer ensayo realizado en pacientes humanos. Extrapolando de los datos obtenidos en otros estudios clínicos con adenovirus oncolíticos similares a ICOVIR-5 administrados sistémicamente se sabe que se puede producir liberación de virus a través de la orina, heces y saliva hasta el día 14 post-administración y especialmente a las dosis más altas (> 2.10¹² partículas virales/paciente). Esto es posible dado el estado relativamente inmunocomprometido de los pacientes de cáncer que presentan una respuesta adaptativa más lenta.

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

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

i) Orden y taxón superior (animales): Primates..
ii) Familia: Hominidae
iii) Género: Homo
iv) Especie: Homo sapiens
v) Subespecie: Homo sapiens sapiens
vi) Cepa: No procede
vii) Cultivar/línea de reproducción: No procede
viii) Patovar: No procede
ix) Nombre vulgar: Especie humana

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

El objetivo de la administración de ICOVIR-5 es el tratamiento antitumoral de tumores humanos sólidos refractarios o recidivantes. En base a las características de las células tumorales (que tienen niveles elevados de E2F-1) y de las modificaciones introducidas en el genoma de ICOVIR-5, se espera la replicación selectiva de ICOVIR-5 en las células tumorales lo que provocará la eliminación selectiva de las células malignas y la amplificación de la dosis inicial de ICOVIR-5 dentro de la masa tumoral. Al llegar a los márgenes del tumor, ICOVIR-5 entrará en las células no tumorales, pero allí es incapaz de expresar las proteínas del adenovirus y no puede activar su replicación, con lo cual no se propaga. De esta forma se consigue la eliminación de los tumores de los pacientes con tumores sólidos. El conjunto de alteraciones introducidas hacen que ICOVIR-5 pueda además ser administrado tanto localmente como sistémicamente en el torrente sanguíneo. Así:

- En astrocitos normales humanos primarios, ICOVIR-5 es incapaz de expresar niveles detectables de E1A, ni de proteínas tardías (fibra), su replicación está bloqueada (título de virus producido 5 logaritmos menor que para el virus salvaje HAd5), y no es citotóxico.
- en hígado normal tanto humano como de ratón, ICOVIR-5 no es capaz de expresar niveles detectables de E1A. En muestras primarias de hígado humano, el virus tampoco es capaz de replicarse.
- en fibroblastos humanos normales, ICOVIR-5 no es capaz de expresar E1A.
- en células tumorales humanas (con alteraciones en la ruta de retinoblastoma) donde la funcionalidad de la ruta pRb se restaura por sobreexpresión de pRb o el regulador negativo p21), ICOVIR-5 no es capaz de expresar niveles detectables de E1A or proteínas tardías (fibra) y su replicación es inactivada (título viral 7 logs por debajo de la misma línea celular antes de la restauración de la ruta pRb).

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

El HAd5 tiene una especie-selectividad muy restringida. Pese a que las células no humanas pueden ser infectadas con HAd5, estas infecciones son abortivas. Las modificaciones introducidas en ICOVIR-5 no modifican sustancialmente la selectividad de especie (humana) del virus con respecto a HAd5. Por tanto la posibilidad que la selectividad de especie se amplíe es despreciable para ICOVIR-5.

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 X

No se sabe (.)

Especifíquese: Es defectivo en células humanas normales y de otras especies, y solo puede invadir células tumorales humanas.

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

No está previsto que ICOVIR-5 interactúe con organismos distintos del objetivo, porque tiene una selección de huéspedes muy limitada y por la forma propuesta para la difusión. Debido al hecho que el hombre es el huésped exclusivo de HAd5, y que las modificaciones genéticas introducidas en ICOVIR-5 no modifican la especie-especificidad del virus, la probabilidad de transmisión productiva de ICOVIR-5 a animales es prácticamente nula. Y, en el caso improbable de que se produzca la administración involuntaria a organismos distintos del objetivo, la propia selectividad del virus impediría su diseminación entre células no tumorales.

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 procede. La probabilidad de transmisión productiva de ICOVIR-5 a animales es prácticamente nula.
ii) Familia: N/A.
iii) Género: N/A
iv) Especie: N/A
v) Subespecie: N/A.
vi) Cepa: N/A
vii) Cultivar/línea de reproducción: N/A
viii) Patovar: N/A
ix) Nombre vulgar: N/A

7. Probabilidad de intercambio genético in vivo:

a) Del OMG a otros organismos del ecosistema de liberación: No procede
b) De otros organismos al OMG: No procede
c) Consecuencias probables de la transferencia de genes: No procede

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

No procede

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

No procede

H. Información sobre el seguimiento

1. Métodos de seguimiento de los OGM:

El control de los efectos directos e indirectos del OGM en los pacientes (efecto antitumoral + toxicidad), se hará con las evaluaciones clínicas habituales: exploración física, ECG, constantes vitales (frecuencia cardíaca y presión arterial), notificación de acontecimientos adversos, evaluación de reacciones en el punto de inyección, histología y evaluaciones inmunitarias. Se hará todo lo posible para hacer un seguimiento de los pacientes en los 2 años siguientes a la administración de las inyecciones.

Además se obtendrán muestras para realizar un estudio de shedding del virus. Para este fin se obtendrán muestras de sangre para determinar títulos de ICOVIR-5 en plasma, su replicación y la presencia de anticuerpos antiadenovirus (días 0, 1, 2, 5, 12, 19, 26 y final de tratamiento).

También se obtendrán muestras biológicas de heces, orina y esputo en los días 0,5,12,19,26 y final de tratamiento.

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

Dada la poca probabilidad de infectar sujetos no tratados intencionalmente, y la nula replicación de ICOVIR-5 en células de sujetos no afectados de cáncer, se considera despreciable la posibilidad que haya diseminación de ICOVIR-5 al medio a partir de terceras partes.

3. Tamaño del área de seguimiento (m²):

10 m² del Hospital Universitario Infantil Niño Jesús

4. Duración del seguimiento:

La duración del seguimiento se alargará hasta que las muestras sean negativas y en un mínimo de 1 mes post-administración de ICOVIR-5 (**CELYVIR = células mesenquimales infectadas con el virus ICOVIR-5**)

5. Frecuencia de seguimiento:

La frecuencia del seguimiento del tratamiento será variable:

- en la primera semana se obtendrán muestras de forma diaria.
- en el primer mes, se obtendrán muestras de forma mensual.

Si al final de este proceso todas las muestras analizadas de los pacientes en estudio fuesen negativas, se detendría el programa de seguimiento del shedding.

I. Información sobre el tratamiento post-liberación y el tratamiento de residuos

1. Tratamiento del lugar tras la liberación:

El lugar donde se prepare el producto para la inyección se descontaminará, antes y después de la manipulación, con una solución basada en un desinfectante convencional. Una vez dado de alta el paciente, se limpiarán la habitación y las toallas de la forma convencional, con una solución basada en un desinfectante convencional para las superficies y el suelo.

2. Tratamiento del OMG tras la liberación:

Los residuos generados durante la manipulación directa de ICOVIR-5 serán depositados en contenedores específicos de bioseguridad (clase 3; residuos biológicos), debidamente rotulados y que serán gestionados por una empresa especializada.

Todos los especímenes del paciente para posterior análisis deberán ser introducidos en una doble bolsa sellada y transportados en un contenedor rígido cerrado.

Los contenedores y las bolsas serán etiquetados como productos biológicos de riesgo.

Las muestras serán manejadas por las enfermeras del estudio, que asegurarán su adecuado transporte al laboratorio apropiado.

3. a) Tipo y cantidad de residuos producidos

El tipo de residuos que se generarán durante el ensayo serán:

- material proveniente de la preparación de la solución de ICOVIR-5 a inyectar en los pacientes: los residuos generados en este proceso se manipularán como residuos biológicos de clase 2 y se eliminarán en contenedores específicos la gestión de los cuales se subcontratará a una empresa acreditada.

- material clínico: agujas, jeringas, viales, torundas, apósitos, vendas de los pacientes, batas de un solo uso, gafas de un solo uso y material de limpieza: En general, está previsto que los residuos sólidos (como batas, gafas, etc) se desactiven mediante autoclavado, y después se incineren convencionalmente. A los residuos líquidos y las superficies se les aplicará un desinfectante adecuado (como puede ser el Virkon).

Todos los demás residuos (vendas, torundas, etc.) se incinerarán en el centro hospitalario de la misma forma que los residuos clínicos habituales.

3. b) Tratamiento de los residuos

Se considerará que el material que entre en contacto con ICOVIR-5 está contaminado por material infeccioso. Debe conservarse en envases adecuados para residuos biopeligrosos y descontaminarse antes de desecharlo. La descontaminación y eliminación de todos los materiales y del producto, utilizado o no, se hará en las instalaciones centrales que indique el promotor.

Para su eliminación se seguirán estrategias distintas en función del tipo de muestra:

- Gestión por empresa especializada

- Inactivación de ICOVIR5 por autoclavado a 121°C durante 15 minutos. Se permitirá usar temperaturas superiores o tiempos más.

- Limpieza de superficies con jabón y desinfectante tipo Virkon.

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:

Se facilitará a todo el personal involucrado en la manipulación del producto ICOVIR-5 una descripción detallada de su preparación; también se expondrá una ficha técnica con el procedimiento de inyección, las condiciones de eliminación de los desechos y el procedimiento a seguir en caso de vertido accidental.

Todo traslado de la preparación se hará en un envase cerrado. Antes de administrar el producto debe prepararse en las condiciones necesarias para la preparación de inyectables.

Además el personal seguirá la política habitual del hospital, recomendada para la manipulación de vacunas con virus vivos.

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

En caso de derramarse el producto:

- En las áreas donde el producto es manipulado, almacenado y transportado, debe haber siempre un desinfectante disponible, como por ejemplo, lejía.
- Si hay un derramamiento del producto, el personal que lo vaya a limpiar debe seguir las normas especificadas en el punto anterior.
- Deben limpiarse y desinfectarse todas las superficies que hayan sido contaminadas. Las ropas o sábanas contaminadas deben depositarse en un contenedor de bioseguridad. Si no son desechables debe seguirse el protocolo vigente en cuanto a manejo de productos biocontaminantes.

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

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.

Las ropas o sábanas contaminadas deben depositarse en un contenedor de bioseguridad.. Si no son desechables debe seguirse el protocolo vigente en cuanto a manejo de productos biocontaminantes

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

ICOVIR-5 no da lugar a infecciones productivas en huéspedes distintos del hombre, no se integra en el genoma de las células huésped y está atenuado comparado con HAd5 en su ciclo viral. La probabilidad que la administración de ICOVIR-5 disturbe la dinámica de poblaciones en el medio natural es despreciable.

La infección de ICOVIR-5 en individuos no sujetos al tratamiento no se puede excluir totalmente aunque es altamente improbable. Sin embargo la presencia del promotor específico de tumor DM-K-E2F1 hace que ICOVIR-5 esté mucho más atenuado que el adenovirus HAd5 respecto a su ciclo vital y su interacción con el huésped y que no induzca una patogenicidad severa, efectos tóxicos o alérgicos en el huésped inmunocomprometido.

Así la carga viral a la que la población no sujeta a tratamiento estará expuesta es significativamente menor que la dosis que reciba el paciente que sea administrado sistémicamente con ICOVIR-5.