

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

A. Información de carácter general:

1. Detalles de la notificación

a) Estado miembro de la notificación:	ESPAÑA
b) Número de la notificación:	B/ES/15/11
c) Fecha del acuse de recibo de la notificación:	10/11/2015
d) Título del proyecto:	Ensayo Clínico de terapia génica fase I/II con rAAV9.CMV.NAGLU para la Mucopolisacaridosis tipo IIIB
e) Período propuesto para la liberación:	El periodo de liberación propuesto para todo el ensayo es desde el primer cuatrimestre del 2016 hasta el tercer cuatrimestre del 2018. La duración del ensayo es de 31 meses o 2,6 años, desde el primer paciente reclutado hasta la última visita del último paciente. Cualquier cambio de este periodo será notificado al CIOMG/CNB.

2. Notificador

Nombre de la institución o empresa:	Abeona Therapeutics 10000 Cedar Avenue Cleveland, OH 44106, EEUU
-------------------------------------	--

3. Definición de la OMG

rAAV9.CMV.NAGLU es un producto de terapia génica innovador cuya indicación propuesta es el potencial tratamiento de la Mucopolisacaridosis tipo IIIB (MPSIIIB-Síndrome de Sanfilippo de tipo B).

Este virus recombinante es un organismo modificado genéticamente (OMG) basado en un virus adeno-asociado humano del serotipo 9 (AAV9) sin capacidad de replicar, dado que el virus adenoasociado modificado tiene una delección completa de todos los genes codificantes para las proteínas virales de la cepa salvaje, a excepción de las regiones terminales invertidas (RTIs). La zona delecionada se reemplaza con un casete de expresión génica recombinante, por lo que rAAV9.CMV.NAGLU contiene el cADN humano de la α -N-acetilglucosaminidasa (NAGLU), dirigido por una combinación del enhancer y el promotor temprano del citomegalovirus humano (CMV).

a) Indíquese si el OMG es:	Viroide	<input type="checkbox"/>
	Virus ARN	<input type="checkbox"/>
	Virus ADN	<input checked="" type="checkbox"/> rAAV- producto de terapia génica recombinante no replicativo.
	Bacteria	<input type="checkbox"/>
	Hongo	<input type="checkbox"/>
	Animal	<input type="checkbox"/>
	- mamíferos	<input type="checkbox"/>
	- insectos	<input type="checkbox"/>
	- peces	<input type="checkbox"/>
	- otro animal	<input type="checkbox"/> especifique el phylum y la clase
Otro, especifíquese (reino, phylum y clase)		
b) Identidad del OMG (género y especie)		
Family: <i>Parvoviridae</i>		
Genus: <i>Dependovirus</i>		
Species: Es un virus AAV recombinante (no replicativo) derivado del serotipo 9 también denominado rh14.		
rAAV9.CMV.NAGLU es un organismo genéticamente modificado que deriva del virus adeno-asociado salvaje del serotipo 9 (rh 14). Este virus adeno-asociado (AAV) es un miembro del género <i>Dependovirus</i> , que subyace dentro de la familia <i>Parvoviridae</i> . El serotipo 9 (también llamado rh14) fue aislado de mamíferos, en concreto de humanos, y fue diferenciado desde un punto de vista serológico de los otros serotipos conocidos (para mayor información sobre los orígenes de los serotipos de AAV ver la publicación anexa de Gao et al. 2004).		
rAAV9.CMV.NAGLU es el único nombre utilizado para el presente OMG.		

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

El OMG ha sido preparado a través de la eliminación de todos los genes virales (excepto las regiones terminales invertidas o RTIs) y la incorporación de un casete de expresión génica mediante tecnología de ADN recombinante. Debido a la ausencia de genes virales este OMG es incompetente para su replicación y por consiguiente es por defecto estable genéticamente, ya que no presenta mecanismos intrínsecos para la variación/transferencia genética.

La secuencia del genoma se confirma mediante la identificación del ADN de los tres plásmidos (vectores) usados para su producción, que se lleva a cabo mediante análisis de restricción y secuenciación del ADN. Estas identificaciones se incluyen entre los criterios de liberación de lote de fabricación de los plásmidos. Debido a que el OMG no tiene capacidad de replicarse, no es posible que se produzcan cambios en la secuencia de su genoma.

El rAAV9.CMV.NAGLU se basa en un AAV9 por lo que su estabilidad genética se considera equivalente, de forma que mantiene el genoma de forma estable.

Es importante señalar que el genoma del OMG se mantiene en las células huésped sin integrarse, formando concatámeros y manteniéndose de forma episomal.

4. Tiene previsto el mismo notificador la liberación de ese mismo OMG en algún otro lugar de la Comunidad (de acuerdo con el apartado 1 del artículo 6)?

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo, indique el código del país:	

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

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/> *
En caso afirmativo: - Estado miembro de la notificación: - Número de la notificación:	
(*) A fecha de la notificación, el presente OMG (rAAV9.CMV.hNAGLU) es la primera vez que se usa en humanos como tratamiento. No se plantea ninguna otra liberación en la Comunidad Europea.	

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

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

En caso afirmativo:

- Estado miembro de la notificación:
- Número de la notificación:

*Para el desarrollo clínico de este producto de terapia génica se prevén dos ensayos clínicos de escalada de dosis, uno llevado a cabo por el National Children's Hospital (NCH- Columbus, Ohio, EEUU) y otro por Abeona Therapeutics como promotores de sendos ensayos. El reclutamiento de los pacientes con MPSIIIB que se tratan con rAAV9.CMV.NAGLU se llevará a cabo en un primer momento en el NCH, a través del ensayo clínico unicéntrico (IND # 1401-1289), cuyo promotor es el mismo hospital. El segundo ensayo clínico multicéntrico e internacional es también un estudio de escalada de dosis, que consiste en dos cohortes de pacientes MPSIIIB hasta un total de dieciocho pacientes. Este segundo reclutamiento de pacientes se llevará a cabo en dos centros Hospital Universitario Cruces (España) y el Adelaide Women's & Children's Hospital, Adelaide (Australia).

En base a la legislación americana no es necesaria la notificación de liberación de OMG. La presentación en Australia se realizará en los próximos meses.

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

El organismo modificado genéticamente de esta notificación de liberación voluntaria es un OMG basado en virus adeno-asociado del serotipo 9 o rh14 llamado rAAV9.CMV.hNAGLU. El presente OMG tiene una delección completa de todos los genes virales (excepto las regiones terminales invertidas o RTIs) e incorpora un casete de expresión mediante tecnología de ADN recombinante. Este OMG es un virus de replicación incompetente con un casete de expresión basada en el cADN de α -N-acetilglucosaminidasa humana (NAGLU) dirigido por combinación del enhancer y el promotor temprano del citomegalovirus humano (CMV).

Está previsto que el rAAV9.CMV.NAGLU se administre en España y Australia en un ensayo clínico de escalada de dosis multicéntrico internacional de terapia génica de fase I/II, en el que se tratará un total de 18 pacientes. Como se trata de un ensayo competitivo, no es posible determinar de antemano el número de pacientes a tratar en cada país. El escalado de dosis consistirá en el tratamiento de dos pacientes con una dosis baja de 2×10^{13} genomas de virus recombinante por kilogramo (gv/kg) (la dosis se adaptará al peso del paciente) y un máximo de 16 pacientes con una alta dosis de 5×10^{13} gv/kg. Considerada la tipología de pacientes (pediátricos), se espera que el peso máximo será de alrededor de 50 kg, por lo que la dosis máxima estimada a administrar en un paciente será de 25×10^{14} de genomas de virus recombinante o OMG. El total de los pacientes se reclutan y tratan durante un total de 26 semanas, dado que hay establecidos períodos de seguridad de 1 o 4 semanas de acuerdo con el plan de dosificación presentado en el protocolo clínico adjunto.

El ensayo en España va a ser unicéntrico y llevado a cabo en el Hospital Universitario de Cruces (Baracaldo), bajo la coordinación del Dr. Aldamiz como Investigador Principal y Jefe de la Unidad Metabólica en este centro. El OMG será recibido en el departamento de farmacia y se almacenará a -80°C con acceso limitado al equipo clínico. La administración será intravenosa y se realizará en una habitación individual del hospital y los pacientes se quedarán ingresados en el hospital por un mínimo de 48 horas tras la administración bajo una estricta monitorización. Después, el paciente será seguido por un total de 24 meses a lo largo de los cuales asistirá a 11 visitas en el centro. Las muestras para el estudio de la excreción del OMG (suero, orina, saliva y heces) se recogerán desde el tiempo

basal hasta el día 90 después de la administración. En base a los datos preclínicos no se espera que las muestras sean positivas en los días 60 y 90 después de la administración. Dichas muestras se recogerán, pero se analizarán sólo en caso de no obtener dos negativos consecutivos en las muestras anteriores (4 horas, 8 horas, 24 horas, 48 horas, día 7, día 14 y día 30).

La máxima presencia del OMG se espera en el suero, debido a la administración intravenosa. Los datos preclínicos publicados han demostrado que la vida media de rAAV9 en circulación es de aproximadamente 4 horas durante las primeras 10 horas después de la inyección, y aproximadamente 10 horas durante los siguientes 3 días. Por lo tanto en los humanos se espera que el OMG en circulación durante los primeros 3 días pase a través de 9-10 vidas medias, lo que implica una reducción exponencial de la carga de diseminación. Hay que destacar que en la mayor parte de ese periodo de tiempo los pacientes se mantienen en el hospital (desde el día 0 hasta el día 2), bajo estricto control.

En condiciones naturales, el AAV de tipo salvaje requiere la presencia de un virus auxiliar (*helper*) (adenovirus o herpes virus) para replicarse en el tracto respiratorio de sus huéspedes, que son exclusivamente los primates tanto humanos como no humanos. El rAAV9.CMV.NAGLU es no replicativo con una capacidad limitada para infectar células de mamífero, e incapaz de infectar las células vegetales.

Los datos preclínicos en ratones han demostrado una muy baja diseminación en el medio ambiente por la orina, saliva o heces. Las muestras fueron positivas hasta 35 días después de la administración. Por lo tanto, este rAAV tiene una mínima posibilidad de propagarse a otras personas, animales o al medio ambiente. Además, el paciente se aislará en una habitación individual por un mínimo de 48 horas y el equipo de profesionales involucrados en el estudio deberá estar entrenado en el manejo seguro de este OMG y en las prácticas de bioseguridad BSL-I. Esto incluirá las instrucciones (incluso para el paciente) para hacer frente a cualquier exposición accidental y minimizar la propagación a otras personas o al medio ambiente.

La transferencia génica horizontal es poco probable y debido a las características de secuencia de rAAV9.CMV.NAGLU no existe la posibilidad de conferir una ventaja selectiva a las bacterias u otros microorganismos, ya que no contiene ningún promotor procariota ni genes de resistencia a antibiótico, u otro tipo de genes de resistencia que favorezcan o restrinjan su crecimiento.

En lo que se refiere a los seres humanos, el riesgo de infección con este OMG es prácticamente nulo debido a que su liberación por los pacientes es limitada en el tiempo y a dosis muy bajas, y, en el improbable caso de que se transmita de un paciente a otro ser humano, contiene un casete de expresión que codifica para una proteína humana que se encuentra en los individuos sanos de forma natural. La probabilidad de que se produzcan efectos negativos en seres humanos se considera insignificante y no existe ningún riesgo para las personas, animales, microorganismos ni el medio ambiente.

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 checked="" type="checkbox"/> Virus de ADN de cadena sencilla, de sentido positivo o negativo. Serotipo 2 (AAV2) para el genoma (RTIs) y serotipo 9/rh14 (AAV9) para la cápside
Bacteria	<input type="checkbox"/>
Hongo	<input type="checkbox"/>
Animal	<input type="checkbox"/>
- mamíferos	<input type="checkbox"/>
- insectos	<input type="checkbox"/>
- peces	<input type="checkbox"/>
- otro animal	<input type="checkbox"/> (especifique el phylum y la clase)

Otros, (especifíquense):

El virus adeno-asociado (AAV) es un pequeño virus que infecta a los seres humanos y a algunas otras especies de primates. Mide 20 nm, es defectuoso para la replicación y sin envuelta. La infección productiva por AAV requiere una co-infección con virus helper que proporciona las funciones que ayudan en la replicación del AAV.

El genoma de AAV se constituye de ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla (ssADN), ya sea de sentido positivo o negativo de aproximadamente 4,7 kb. El genoma comprende regiones terminales invertidas (RTIs) en ambos extremos de la cadena de ADN, y dos marcos abiertos de lectura (ORFs): rep y cap. El primero está compuesto por cuatro genes superpuestos que codifican las proteínas Rep requeridas para el ciclo de vida de AAV, y el segundo contiene secuencias de nucleótidos superpuestas de las proteínas de la cápside VP1, VP2 y VP3, que interactúan entre sí para formar una cápside de simetría icosaédrica. El virus causa una respuesta inmune muy leve, remarcando su aparente falta de patogenicidad. Se considera que AAV no tiene ningún papel en el desarrollo de una enfermedad. Debido a que el ADN de AAV se encuentra más comúnmente en muestras de semen de hombres con semen anormales, se piensa que puede estar involucrado en la infertilidad masculina. Sin embargo, no se ha encontrado relación de causalidad entre la infección por AAV y la infertilidad masculina.

Hasta el año 2008, se han descrito 12 serotipos de AAV. Todos los serotipos conocidos pueden infectar células de diversos tipos de tejidos. La especificidad tisular está determinada por el serotipo de la cápside, de forma que el pseudotipo de los AAVs para alterar el rango de su tropismo se convierte en un factor determinante para su uso en terapia.

Los virus adeno-asociado (AAV) han sido ampliamente utilizados como virus recombinantes para la terapia génica debido a su perfil de seguridad, su capacidad para transducir tanto las células quiescentes o en división, y su baja inmunogenicidad. Hasta la fecha, los AAV recombinantes se han utilizado en cerca de 117 ensayos clínicos de todo el mundo. Recientemente, se han obtenido resultados prometedores en ensayos de Fase I y II para una serie de enfermedades, incluyendo Amaurosis Congénita de Leber, hemofilia, insuficiencia cardíaca congestiva, deficiencia de lipoproteína lipasa, y enfermedad de Parkinson.

2. Nombre

i) Orden y taxón superior (animales):---
ii) Género: <i>Parvoviridae</i>
iii) Especie: <i>Dependovirus</i>
iv) Subespecie: <i>Dependovirus</i>
v) Cepa: Serotipos 2 y 9
vi) Patovar (biotipo, ecotipo, raza, etc.): ---

vii) Nombre vulgar: Serotipo 2 (AAV2) para el genoma (RTIs) y serotipo 9/rh14 (AAV9) para la cápside

La descripción de los virus AAV está en el punto número 1 de esta sección. rAAV9.CMV.NAGLU es un organismo modificado genéticamente (OMG) basado en un virus adeno-asociado. El OMG se basa en el genoma viral de AAV2, como todos los virus de terapia génica recombinantes con AAV hoy en día. rAAV9.CMV.NAGLU tiene una delección completa de los genes virales del AAV2 salvaje, excepto las RTIs e incorpora un casete de expresión génica recombinante y contiene el gen de α -N-acetilglucosaminidasa (NAGLU) humano dirigido por una combinación del *enhancer* y el promotor temprano del citomegalovirus humano (CMV). Este OMG se construye basándose en la cápside viral de AAV9, de manera que todas las proteínas virales (PV) derivan de este serotipo, para así poder asegurar un amplio tropismo, que es el objetivo en el enfoque terapéutico de la enfermedad de SanfilippoB.

3. Distribución geográfica del organismo

a) Autóctono del país que notifica o establecido en él:

Sí

No

No se sabe

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

A pesar de que los AAV han sido estudiados durante los últimos 50 años, poco se sabe acerca de la infección natural por estos virus. Sin embargo, es importante señalar que como resultado de las infecciones naturales los anticuerpos para AAV se pueden encontrar en muchos animales, incluidos los seres humanos. La exposición natural a AAV puede resultar en la producción de anticuerpos de las cuatro subclases de IgG, con una respuesta predominante de IgG1 y bajas producción de IgG2, IgG3, IgG4. La caracterización de la presencia de estos anticuerpos es la mejor manera disponible para definir la distribución geográfica de este virus. Sorprendentemente, aproximadamente entre un 30 y un 80% de la población es seropositiva a anti-AAV (de todos los serotipos) y se ha visto que aproximadamente el 60% de la población tiene anticuerpos neutralizantes a los 10 años, que generalmente persistirán en la edad adulta. En todas las poblaciones humanas estudiadas, en las que se incluyeron muestras de 10 países y 4 continentes (América, Europa, África y Australia), la prevalencia de anticuerpos neutralizantes a los serotipos AAV7, AAV8 y AAV9 oscilaban entre un 15 y un 30%. Es de destacar, que las frecuencias significativamente más altas de anticuerpos neutralizantes para todos los serotipos de AAV se observaron en África.

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

Sí

No

Existen programas de investigación desarrollando virus recombinantes AAV basados en el serotipo 9 para diferentes enfermedades genéticas. Bosch et al. 2013 es un ejemplo de publicación reciente.

Todo el trabajo preclínico del programa del rAAV9.CMV.NAGLU ha sido realizado en EEUU.

Existe ya una notificación de una liberación voluntaria de un virus AAV recombinante basado en el serotipo 9 con el código de notificación B/ES/14/09. El OMG presentado en esta liberación voluntaria está basado en el mismo organismo parental, AAV9; y es propuesto para una indicación similar, tratamiento de mucopolisacaridosis de tipo III en un ensayo clínico unicéntrico en España.

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):

A pesar de que los AAV han sido estudiados durante los últimos 50 años, poco se sabe acerca de la infección natural por estos virus. Sin embargo, vale la pena mencionar que, como resultado de las infecciones naturales, los anticuerpos para AAV se pueden encontrar en muchos animales, incluidos los seres humanos. El serotipo 9 (también llamado rh14) fue aislado a partir de tres seres humanos y se observó que era serológicamente distinto de los otros serotipos conocidos (para más información sobre el origen de los serotipos de AAV ver publicación de Gao et. al. 2004).

El tipo salvaje de AAV es capaz de sobrevivir en el medio ambiente como una infección persistente en las especies de vertebrados huéspedes o como una infección latente en el núcleo de algunas células infectadas, donde puede permanecer inactivo por tiempo indefinido, o ser reactivado dando lugar a la secreción de virus. Debido a su dependencia de un virus *helper* para la replicación (típicamente adenovirus) AAV puede ser considerado como un virus estacional. En las regiones templadas se describen vaivenes estacionales de la incidencia de infecciones por adenovirus, con las mayores incidencias en otoño, invierno y principios de primavera.

AAV se difunde a través de la inhalación de las gotitas de aerosol, por contacto con las membranas mucosas o por ingestión, pero no causa ninguna enfermedad en el hombre, específicamente el serotipo 9 que fue aislado de los seres humanos.

La replicación del ADN se produce en el núcleo de la célula durante el ciclo lítico. En su estado latente, el ADN se mantiene como un episoma estable (circular o linear).

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

No aplica

5.a) Técnicas de detección

Los virus adeno-asociado de tipo salvaje se detectan generalmente en los tejidos mediante PCR específica de acuerdo a las secuencias generales de los AAV o específicas para el serotipo analizado. También se describen algunos casos en los que se ha utilizado una técnica de hibridación in situ (ISH) con sonda AAV marcada con digoxigenina en los tejidos embebidos en parafina de los casos positivos de AAV. Adicionalmente, las partículas de AAV también pueden detectarse usando el método de ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

5.b) Técnicas de identificación

Los virus adeno-asociado salvajes se identifican generalmente en los tejidos mediante PCR específica de acuerdo a las secuencias generales de AAV o específicas para el serotipo del análisis. También se describen algunos casos en los que se ha utilizado una técnica de hibridación in situ (ISH) con sonda AAV marcada

con digoxigenina en los tejidos embebidos en parafina de los casos positivos de AAV y las partículas de virus recombinantes de AAV. Adicionalmente, se pueden detectar también usando el método de ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Finalmente, la identificación completa de una secuencia específica de un serotipo puede realizarse en última instancia por secuenciación del ADN.

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 <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
<p>En caso afirmativo, especifíquese:</p> <p>En base a la Directiva 2000/54/CE relativa a la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados a la exposición a agentes biológicos durante el trabajo, el tipo salvaje de AAV no se clasifica en los grupos de riesgo 2, 3 o 4 de la Unión Europea (UE). Por lo tanto, se designa más apropiadamente cómo agente biológico del grupo de riesgo 1, definido en la UE como "poco probable que cause enfermedad en seres humanos".</p> <p>Además, el Advisory Committee on Dangerous Pathogens (ACDP) no asigna los AAVs a ninguna categoría, por lo que los virus AAV recombinantes se clasifican, en base a los criterios de bioseguridad, como clase I. También, la Organización Mundial de la Salud (OMS), clasifica los AAVs de manera similar a la UE. Lo mismo ocurre en los Estados Unidos, Canadá y Australia.</p> <p>Por lo tanto se puede resumir que el riesgo de estos virus es poco probable . De hecho, las notificaciones previas para la liberación voluntaria de virus AAV recombinantes en los ensayos clínicos en humanos, tales como B/ES/12/53 o B/ES/14/09 han sido autorizados por CIOMG con esta clasificación bioseguridad.</p>	

7. ¿Es el organismo receptor, 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"/>
<p>Los AAVs se encuentran con frecuencia en los seres humanos y los animales, pero no son patogénicos, tóxicos, virulentos, alergénicos, o vectores de patógenos. Los huéspedes conocidos incluyen seres humanos y primates no humanos. Vale la pena mencionar que, en condiciones naturales, los virus adeno-asociados requieren un virus helper para la replicación. Los AAV no activan virus latentes y no son capaces de colonizar otros organismos.</p> <p>En caso afirmativo</p> <p>a) ¿Para cuál de los organismos siguientes?:</p> <p>humanos <input type="checkbox"/></p> <p>animales <input type="checkbox"/></p>		

plantas	<input type="checkbox"/>
otros	<input type="checkbox"/>

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

8. Información sobre reproducción

<p>a) Tiempo de generación en ecosistemas naturales: En condiciones naturales, los virus adeno-asociados salvajes requieren un virus <i>helper</i> para la replicación. El ciclo de infección de un AAV salvaje, desde la infección de la célula hasta la producción de nuevas partículas infecciosas consta de los siguientes pasos: (1) adhesión a la membrana celular; (2) endocitosis mediada por receptor; (3) incorporación al endosoma; (4) liberación por parte del endosoma o lisosoma; (5) translocación al núcleo; (6) eliminación de la envoltura; (7) formación de la forma replicativa de ADN de doble cadena desde el genoma de AAV; (8) expresión de genes rep; (9) replicación del genoma; (10) expresión de genes cap, síntesis de las partículas ssADN; (11) ensamblajes de los viriones completos, y (12) liberación desde la célula infectada.</p>
<p>b) Tiempo de generación en el ecosistema en el que vaya a ser liberado: El OMG permanece en las células transducidas siendo las proteínas producidas las que tendrán un efecto en las células anexas. El organismo modificado genéticamente rAAV9.CMV.NAGLU es un virus recombinante sin capacidad de replicación debido a la falta de los genes virales</p>
<p>c) Modo de reproducción</p> <p style="text-align: center;">Sexual <input type="checkbox"/> Asexual <input checked="" type="checkbox"/></p>
<p>d) Factores que afectan a la reproducción: El AAV de tipo salvaje necesita un virus auxiliar (adenovirus o herpesvirus) para una replicación eficaz.</p>

9. Capacidad de supervivencia

<p>a) Capacidad de formar estructuras que favorezcan la supervivencia o el letargo</p> <p>(i) endosporas <input type="checkbox"/></p> <p>(ii) quistes <input type="checkbox"/></p> <p>(iii) esclerocios <input type="checkbox"/></p> <p>(iv) esporas asexuales(hongos) <input type="checkbox"/></p>

- | | |
|----------------------------------|--------------------------|
| (v) esporas sexuales
(hongos) | <input type="checkbox"/> |
| (vi) huevos | <input type="checkbox"/> |
| (vii) pupas | <input type="checkbox"/> |
| (viii) larvas | <input type="checkbox"/> |
| (ix) otras (especifíquense) | Ninguna |

b) Factores pertinentes que afectan a la capacidad de supervivencia

El AAV no forma estructuras de supervivencia, pero puede mantener su capacidad infectiva después de la desecación simple o liofilización por lo menos durante un mes a temperatura ambiente.

Como todos los OMG basados en virus adeno-asociados, rAAV9.CMV.NAGLU es susceptible a la acción de los desinfectantes virucidas para virus no envueltos como hipoclorito de sodio al 1-10% (durante por lo menos 20 minutos), soluciones alcalinas a pH > 9, fenol al 5%, el calor (> 80 ° C durante 60 minutos), radiación UV y pH extremos (<2 y > 12). Todos los desinfectantes requieren un mínimo de 20 minutos de tiempo de contacto para ser eficaces.

10.a) Vías de diseminación

El AAV de tipo salvaje se disemina por vía respiratoria, transmisión fecal-oral, conjuntival directa y transmisión sexual. Requiere un virus *helper* (adenovirus o herpesvirus) para que pueda replicarse eficazmente. En condiciones naturales, en los serotipos típicos de los primates (humanos y no humanos) no se conoce una transferencia activa del material genético a otros organismos que no sean primates, no obstante la ausencia de zoonosis no está documentada.

10.b) Factores que afectan a la diseminación

Ninguno.

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)

Diferentes son los programas de investigación existentes en los que se desarrollan OMG AAV recombinantes basados en el serotipo 9 para enfermedades genéticas. Bosch et al. 2013 es un ejemplo de una publicación reciente.

Todo el trabajo preclínico del programa con el rAAV9.CMV.NAGLU fue desarrollado en Estados Unidos.

Además, en España ya existe una notificación de liberación voluntaria de un OMG AAV recombinante basado en el serotipo 9 con código de notificación B/ES/14/09. El OMG presentado en esta liberación voluntaria se basa en el mismo organismo

parental, AAV9; y se propone para una indicación similar, el tratamiento de mucopolisacaridosis tipo III, en un ensayo clínico unicéntrico en España. Otra notificación para la liberación voluntaria de un virus AAV recombinante basado en un serotipo diferente, también dentro de los ensayos clínicos en humanos fue la notificación B/ES/12/53.

C. Información sobre la modificación genética

1. Tipo de modificación genética:

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

2. Resultado que se pretende obtener mediante la modificación genética

rAAV9.CMV.NAGLU es un virus recombinante fabricado por ingeniería genética, a partir del serotipo 9 (AAV9/rh14) del virus adeno-asociado. Para la preparación del OMG, todas las secuencias que codifican para las proteínas virales, excepto las regiones terminales invertidas (por lo tanto, la delección de material genético está marcado) son reemplazadas por un casete de expresión completa que contiene una secuencia de alfa-N-acetilglucosaminidasa humana y secuencias reguladoras adicionales necesarias para la expresión de la proteína, tales como un promotor y el poli A (por lo tanto, la inserción de material genético está marcado). Estas modificaciones genéticas permiten la pérdida completa de la capacidad de replicación del virus y hacen posible la expresión o síntesis de la proteína NAGLU por las células transducidas. El propósito de esta modificación genética es la obtención de un vehículo eficiente para lograr una correcta actividad de la enzima alfa-N-acetilglucosaminidasa humana (NAGLU) en el SNC y periférico en pacientes MPS IIIB y poder así corregir el curso de su enfermedad.

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

Sólo el casete de expresión recombinante se incluirá en el OMG final como secuencia genética. Las proteínas virales (VP) constituirán la cápside del OMG final. Los genes auxiliares solo se utilizan para el correcto empaquetamiento del OMG.

En caso negativo, pase a la pregunta 5

4. Si ha contestado afirmativamente a la pregunta 3 b), aporte la información siguiente

a) Tipo de vector

- | | |
|---------------------------|-------------------------------------|
| plásmido | <input checked="" type="checkbox"/> |
| bacteriófago | <input type="checkbox"/> |
| virus | <input type="checkbox"/> |
| cósmido | <input type="checkbox"/> |
| Elemento de transposición | <input type="checkbox"/> |
| Otros (especifíquense): | <input type="checkbox"/> |

b) Identidad del vector:

Para la obtención del OMG se han utilizado 3 plásmidos (vectores):

- El pTR-hNAGLU que proporciona el casete de expresión completo que contiene una secuencia de alfa-N-acetilglucosaminidasa humana y las regiones terminales invertidas (RTIs) del AAV2.
- El plásmido AAV2-9 helper que proporciona los componentes del cápside del OMG; codificando por las 4 proteínas de tipo salvaje rep del AAV2 y las 3 proteínas virales (VP) de AAV de tipo salvaje procedentes del serotipo 9.
- El plásmido pHELP adenovirus helper que contiene las regiones del genoma del adenovirus necesarias para la replicación del AAV (E2A, E4ORF6 y ARN VA).

c) Gama de organismos huéspedes del vector:

No existen huéspedes identificados para ninguno de los tres plásmidos ya que son productos comerciales que no están en el medio natural y no tienen capacidad de infectar. El contenido genético del pTR-hNAGLU es el gen humano para la expresión de la enzima NAGLU, por lo que el hipotético huésped sería el ser humano. El plásmido AAV2-9 helper contiene los genes del AAV, por lo que los huéspedes hipotéticos serían los mismos del AAV de tipo salvaje, es decir primates humanos y no humanos. Finalmente, el plásmido pHELP contiene aproximadamente solo un 40% del genoma de adenovirus, y no contiene los elementos cis críticos para la replicación tales como las repeticiones terminales del adenovirus. Este último plásmido solo se utiliza para la fabricación (correcto empaquetamiento) del OMG, y no está presente en el OMG.

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

Sí No

Resistencia a los antibióticos

Otras, (especifíquense)

Indique qué gen de resistencia a los antibióticos se inserta:

En los tres vectores el gen de resistencia a los antibióticos es el Amp de resistencia a ampicilina, que permiten una amplificación selectiva de los mismos.

e) Fragmentos constituyentes del vector

Los fragmentos constituyentes de cada vector se presentan en las figuras y tablas del Anexo I.

f) Método de introducción del vector en el organismo receptor

i) transformación

ii) electroporación

iii) macroinyección

iv) microinyección

v) infección

vi) otros, (especifíquense) Transfección

Los componentes del vector utilizados para preparar el OMG son producidos por una transfección simultánea de ADN en células 293 humanas de tres plásmidos que contienen la secuencia para la generación del virus recombinante de AAV: casete de expresión génica recombinante entre RTIs, genes de la cápside y genes auxiliares. Sólo el casete de expresión recombinante se incluirá en el OMG final como secuencia genética. Las proteínas virales (VP) constituirán la cápside del OMG final. Los genes auxiliares solo se utilizan para el correcto empaquetamiento del OMG.

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, (especifíquense)

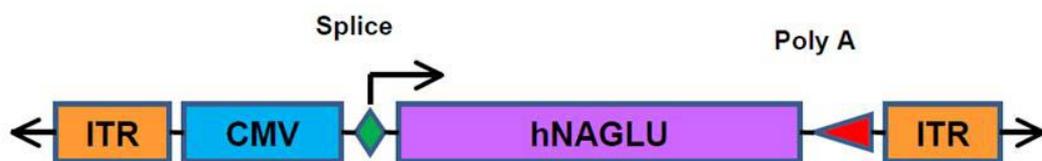
6. Información sobre el fragmento de inserción:

a) Composición del fragmento de inserción:

Los componentes del vector utilizados para preparar el OMG, rAAV9.CMV.NAGLU, son producidos por una transfección simultánea de ADN en células 293 humanas con tres plásmidos que contienen la secuencia para la generación del virus recombinante de AAV: casete de expresión génica recombinante entre RTIs, genes de la cápside y genes auxiliares.

Sólo el casete de expresión recombinante se incluirá en el OMG final como secuencia genética. Las proteínas virales (VP) constituirán la cápside del OMG final. Los genes auxiliares sólo se utilizan para el correcto empaquetamiento del OMG. Por lo tanto, aquí se indica una descripción completa del casete de expresión génica recombinante, contenido en el plásmido pTR-hNAGLU (secuencia completa en Anexo 1).

El casete de expresión génica recombinante se construye mediante técnicas moleculares de recombinación genética en el plásmido pTR-hNAGLU. Contiene un casete de expresión NAGLU humana flanqueada por secuencias de regiones terminales invertidas (RTIs) de AAV2. El casete contiene el promotor temprano del citomegalovirus humano (CMV) para dirigir la expresión de genes, la secuencia de cADN para la NAGLU humana, el intrón SV40 (SD/SA) para promover un alto rendimiento de la expresión génica, y la señal de poliadenilación de hormona de crecimiento bovina para la terminación de la transcripción eficiente. El esquema del casete de expresión se muestra a continuación:



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

1. ITRs (regiones terminales invertidas): del serotipo 2 de AAV.
2. CMV promotor temprano: una secuencia de *enhancer* y promotor temprano del citomegalovirus humano (hCMV).
3. SV40 Intrón: del virus de simio (SV40) 16S/19S molde de empalme aceptor/donante.
4. Gen NaGLu humano: del hNAGLU humano, cADN.
5. Secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina del gen de la hormona de crecimiento bovina.

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

1. ITR: la región terminal invertida funciona tanto como origen de replicación del ADN del virus así como señales de empaquetamiento para cápsides/genoma. Las secuencias RTIs representan el único elemento cis necesario del virus original para empaquetar las partículas de AAV.
2. Promotor temprano CMV: para promover y aumentar la transcripción constitutiva y un alto nivel de expresión de alfa-N-acetilglucosaminidasa.
3. SV40 Intrón: de SV40 de los sitios aceptor/dador de splicing para promover una alta expresión génica. Al ser un intrón se transcribe, pero se elimina del ARNm maduro mediante splicing reuniendo las secuencias localizadas a ambos lados del intrón. Este componente se ha visto que facilita el transporte del ARNm desde el núcleo al citoplasma, promoviendo la acumulación de un nivel constante de ARNm para su traducción. Ésta es una característica común en casetes genéticos diseñados para incrementar el nivel de expresión génica.
4. Gen NaGlu humano: permite una correcta producción de α -N-acetilglucosaminidasa y así obtener la corrección funcional de la patología de almacenamiento lisosomal.
5. Secuencia de poliadenilación: polyA de la hormona bovina de crecimiento, es una secuencia en cis que se usa para una eficiente poliadenilación del transcrito de ARNm de NaGlu. Funciona como una señal para la finalización de la transcripción, punto específico de corte en el 3' final del transcrito naciente y adición de una cola larga de poliadenilación.

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

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

El inserto descrito es recombinante y reemplaza completamente el genoma del huésped u organismo parental (AAV9 y 2).

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

Sí No

En caso afirmativo , especifíquese:

La secuencia completa del inserto se proporciona en el Anexo 1.

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

1. Indíquese si es:

Viroide	<input type="checkbox"/>
Virus ARN	<input type="checkbox"/>
Virus ADN	<input type="checkbox"/>
Bacteria	<input type="checkbox"/>
Hongo	<input type="checkbox"/>
Animal	<input type="checkbox"/>
- mamíferos	<input checked="" type="checkbox"/> Humanos (el inserto es un cADN para alfa-N-acetilglucosaminidasa (NAGLU))
- 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):--
ii) Familia (plantas): --
iii) Género: <i>Homo</i>
iv) Especie: <i>Sapiens</i>
v) Subespecie: <i>Sapiens</i>
vi) Cepa: --
vii) Cultivar/línea de reproducción: --
viii) Patovar: --

ix) Nombre vulgar: **Humano**

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

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo, especifíquese		
(a) ¿para cuál de los organismos siguientes?	humanos <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	animales <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	plantas <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	otros <input type="checkbox"/>	<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"/>
De hecho, el gen que se incluye en el vector es el gen humano “correcto” de NAGLU, cuyo defecto está causando la enfermedad en pacientes SanfilippoB.		
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"/>
-----------------------------	--	-------------------------------------

Teniendo en cuenta como donante el gen NAGLU humano y como organismo receptor el virus recombinante AAV9, se puede afirmar que no hay intercambio natural del material genético entre ellos. El virus adeno-asociado puede infectar a los humanos, pero dichas infecciones son asintomáticas.

2. Estabilidad genética del organismo modificado genéticamente

En concreto, el genoma de este OMG es un ADN recombinante fabricado en laboratorio a través de un plásmido de ADN. El casete de expresión génica contenido en el plásmido se analiza varias veces durante el proceso de fabricación con diferentes pruebas para evaluar su identidad (Q-PCR, secuenciación de ADN y análisis de restricción).

Teniendo en cuenta que el OMG contiene el genoma del plásmido utilizado para su producción y no puede replicarse, se considera genéticamente estable.

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

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

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

Punto 11 de la letra A de la sección II (d) del anexo IIIA: los virus AAV recombinantes son capaces de infectar células humanas y de primates no humanos, pero no son patogénicos, tóxicos, virulentos, alergénicos, o vectores de un patógeno. Entre los huéspedes más comúnmente conocidos se encuentran los seres humanos y los primates no humanos. No son capaces de replicar ni de activar otros virus latentes, por lo tanto no son capaces de colonizar otros organismos.

Punto 2 de la letra C de la sección II (i) del Anexo IIIA: Con respecto a la salud humana, animal y vegetal, el virus recombinante AAV y sus productos no presentan efectos tóxicos o alergénicos. El virus recombinante AAV no es patogénico y no tiene la capacidad de colonización, a pesar de que se puede mantener dentro de las células infectadas en forma episomal.

De hecho, los virus recombinantes adeno-asociados (rAAVs) han sido ampliamente utilizados para proporcionar genes en modelos animales, y actualmente, se están evaluando para la terapia génica humana, después de ensayos clínicos exitosos en el tratamiento de enfermedades hereditarias, degenerativas o adquiridas, tales como amaurosis congénita de Leber , enfermedad de Parkinson, insuficiencia cardíaca, etc. El virus recombinante adeno-asociado que lleva la cápside del AAV9, transduce con eficiencia diferentes tejidos, debido a tropismo diferente. Una de las principales razones del uso del AAV9 en el tratamiento de enfermedades neurológicas es su capacidad de atravesar la Barrera hematoencefálica (BHE).

4. Descripción de los métodos de identificación y detección

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

Existen varias técnicas para detectar el OMG en el medio ambiente, pero la más común es la PCR cuantitativa con primers específicos para las secuencias del mismo. El correcto diseño del primer asegura la detección específica del OMG. Las muestras de los fluido y excreción que se obtendrán en el ensayo clínico (suero, saliva, heces y orina) se analizarán con esta técnica, lo que permitirá la detección (con un límite mínimo de detección de alrededor de 10 copias) y cuantificación del perfil de excreción.

Las partículas de AAV también pueden ser fácilmente detectadas usando el método ELISA. Este es un método indirecto capaz de detectar y cuantificar los anticuerpos totales desarrollados contra las proteínas de la cápside. Las muestras que se obtendrán en el ensayo clínico se analizarán con esta técnica que permitirá una cuantificación total de los anticuerpos. La detección de anticuerpos mediante ELISA es una medida requerida como criterio de exclusión en el estudio.

También se han descrito algunos casos en los que se ha utilizado una técnica de hibridación in situ (ISH) con sonda AAV marcada con digoxigenina en los tejidos embebidos en parafina de los casos positivos de AAV. Dicha técnica no se utiliza para este OMG.

Por último, la identificación de una secuencia específica de un OMG puede realizarse por secuenciación del ADN.

b) Técnicas utilizadas para identificar el OMG:

Todas las técnicas que se han descrito en el punto (a) para detectar el organismo modificado genéticamente también son capaces de identificarlo, ya que son específicos.

F. Información sobre la liberación

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

El propósito de la liberación voluntaria del presente OMG es un ensayo clínico de fase I/II de terapia génica con rAAV9.CMV.NAGLU para Mucopolisacaridosis (MPS) IIIB. Este estudio incluirá pacientes pediátricos de 2 años de edad o mayores, con el fin de evaluar la seguridad y la respuesta clínica a la terapia con el OMG propuesto. El objetivo principal de este desarrollo clínico es ser capaz de restaurar la actividad de la enzima α -N-acetilglucosaminidasa (NaGlu) en el sistema nervioso central y el periférico para detener la progresión de la enfermedad causada por un déficit de esta misma enzima.

Se trata de un ensayo clínico internacional realizado en dos países, España y Australia, con un total de 18 pacientes que cumplen los criterios de inclusión. El estudio en España se llevará a cabo en el Hospital Universitario Cruces (Baracaldo), España con Luis Aldamiz como investigador principal. El estudio en Australia se llevará a cabo en el Adelaide Women's & Children's Hospital con Nick Smith como investigador principal. Es importante destacar que el desarrollo inicial de este virus recombinante de terapia génica AAV9.CMV.hNAGLU se llevará a cabo simultáneamente con otro ensayo clínico de escalada de dosis cuyo promotor es Nationwide Children's Hospital (NCH) (NCH) bajo el IND # 1.401-1.289.

En ambos ensayos el escalado de dosis consistirá en el tratamiento primero con una dosis baja de 2×10^{13} de genomas de virus recombinante por kilogramo (gv/kg) seguido por una alta dosis de 5×10^{13} gv/kg. Los pacientes se administrarán uno por uno, de acuerdo con un plan de aumento de dosis con períodos de seguridad. Los pacientes serán hospitalizados durante al menos 48 horas después de la administración del fármaco para una estricta monitorización de la seguridad. Después, el paciente será seguido por un periodo de 2 años, durante el cual acudirá al hospital para visitas periódicas. Además, por ser una terapia avanzada, los pacientes deben seguirse hasta 5 años después del fin de ensayo para fines de seguridad.

No se espera ningún beneficio para el medio ambiente. Se espera detectar el OMG en suero, orina, saliva y heces hasta 30 días tras la administración. Sin embargo, si necesario, se monitorizará el contenido de OMG en suero, orina, saliva y heces hasta 90 días después del tratamiento.

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:

Como se indicó anteriormente, en general los huéspedes de los virus adeno-asociados son los seres humanos y los primates no humanos. Para la presente liberación voluntaria, el organismo modificado genéticamente rAAV9.CMV.NAGLU será administrado por vía intravenosa a un total de 18 pacientes en dos hospitales diferentes: Hospital Universitario del Hospital de Cruces, Baracaldo, Vizcaya, España y el Adelaide Women's & Children's Hospital, Australia.

El personal del hospital recepcionará, almacenará, manipulará, y destruirá el producto de terapia génica y todas las muestras biológicas (que potencialmente pueden contener el OMG) bajo normas de bioseguridad tipo I (BSL-I). El Hospital Universitario de Cruces seguirá los procedimientos internos para la gestión de productos biológicos.

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

a) Localización geográfica (región administrativa y coordenadas de referencia cuando proceda):

Para España, el país al que aplica la presente notificación de liberación voluntaria, el OMG será administrado por vía intravenosa a pacientes pediátricos reclutados en el Hospital Universitario de Cruces. El Hospital se encuentra en la siguiente dirección: Plaza de Cruces, 12, 48903 Baracaldo, Vizcaya - España.

b) Área del lugar (m²):

El OMG será recibido por el servicio de farmacia de acuerdo con las instrucciones del promotor descritas en el Manual de Farmacia. El almacenamiento se realizará en un congelador de -80°C con un acceso limitado situado en la Unidad de Investigación Biocruces. La preparación final del producto (descongelación, dilución y preparación de la jeringa) se llevará a cabo en una cabina de bioseguridad tipo 2 (de flujo vertical para una completa protección del medio ambiente y del personal del hospital). La jeringa preparada para la administración será transportada a la habitación individual donde estará hospitalizado el paciente en una caja que evite derrames y etiquetada como "contiene OMG". Todo el material usado para la manipulación de OMG será destruido siguiendo los procedimientos internos para la gestión de material biológico y BS-I.

Los pacientes serán admitidos en el Hospital Universitario de Cruces de uno en uno, para una única administración intravenosa. Los pacientes se quedarán en una habitación individual del hospital durante al menos 48 horas después del tratamiento bajo una estricta monitorización y después volverán al hospital para visitas periódicas (día 7, día 14, día 30, etc).

(i) lugar real de la liberación (m²): Administración intravenosa en una habitación individual del Hospital de Cruces.

(ii) área de liberación más amplia (m²): No procede.

c) Proximidad a biotipos reconocidos internacionalmente o zonas protegidas (incluidos depósitos de agua potable) que pudieran verse afectados:

El Hospital de Cruces se encuentra a unos 40 kilómetros de tres áreas protegidas: (1) Reserva de la Biosfera de Urdaibai; (2) biotipo protegido: San Juan de Gaztelugatxe e Itxina.

Es importante destacar que el OMG, al igual que el organismo parenteral del que deriva, no es patógeno.

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

El tipo salvaje así como el AAV9 recombinante pueden infectar células de mamífero, pero no células vegetales.

Por otra parte, se espera que haya una liberación limitada del OMG en las aguas residuales después de la administración a los pacientes. Los datos preclínicos muestran una excreción positiva, con una muy baja cantidad de OMG, en heces y orina por un período de 35 días. Además, el pH y las condiciones biológicas en orina y heces disminuyen potencialmente la supervivencia del organismo modificado genéticamente. El agua residual no es un ecosistema donde OMG puede sobrevivir durante un largo período de tiempo. Finalmente, los fluidos de los pacientes tratados serán neutralizados con lejía al 10 % antes de su eliminación por las vías habituales hasta el día 90 de tratamiento (instrucciones del paciente). Teniendo en cuenta estas características y la incapacidad de replicación del OMG, no se espera ninguna interacción del mismo con la flora, fauna, ganado o especies migratorias.

4. Método y amplitud de la liberación

a) Cantidad de OMG que vaya a liberarse:

El diseño del estudio (internacional, multicéntrico y de escalado de la dosis) se describe en el punto 1 de la sección F. Un total de 18 pacientes serán tratados en dos centros con un reclutamiento competitivo (España y Australia), por lo que no se puede estimar el número de pacientes a tratar en cada hospital de antemano.

Dos pacientes (en total en los dos centros) recibirán una dosis baja de 2×10^{13} gv/kg y un total de 16 pacientes recibirán una dosis alta de 5×10^{13} gv/kg. Se tratará de una administración única por cada paciente a través de una inyección intravenosa en una vena periférica de una extremidad.

Es de esperar que el OMG se excrete en cantidades muy pequeñas a través de los fluidos biológicos hasta varios días después de la administración del OMG. Los datos preclínicos en animales administrados con una dosis 10 veces más alta que la dosis máxima del ensayo clínico mostraron unos perfiles de excreción de aproximadamente 300 genomas de OMG en 40 microlitros en orina. El diseño del ensayo clínico incluye la recolección de muestras para la excreción (suero, saliva, heces y orina) hasta 90 días después de la administración del fármaco. Se espera que las muestras se negativicen en 30 días, no obstante las muestras se seguirán analizando (hasta los 90 días) en el caso de no obtener dos resultados negativos consecutivos en una mismo fluido corporal. Todos los resultados de excreción y

diseminación serán reportados al CNB al final del estudio.

b) Duración de la operación:

El organismo modificado genéticamente se almacena en congelador a -80°C en la Unidad de Investigación Biocruces. Para realizar la administración a los pacientes, los viales congelados se descongelarán en una campana de seguridad biológica tipo 2 (de flujo vertical por razones de seguridad) y se preparará la jeringa para la infusión. Este proceso puede llevar alrededor de 30 a 45 minutos de tiempo.

La jeringa preparada para la administración será transportada a la habitación individual donde está hospitalizado el paciente, en una caja que evite derrames y etiquetada como "contiene OMG". Los pacientes serán admitidos en el Hospital Universitario de Cruces de uno en uno, mediante una única administración intravenosa. La infusión durará aproximadamente unos 10-20 minutos. El tubo de infusión se lavará con solución salina fisiológica al final de la infusión.

Todo el material usado para la manipulación de OMG será destruido siguiendo los procedimientos internos para la gestión de material biológico y BSL-I.

Los análisis de excreción en los flujos corporal del paciente tratado con el OMG se llevarán a cabo hasta 90 días después de la infusión de OMG.

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

El OMG será almacenado en una zona de acceso limitado. Todo el personal sanitario que participe en este ensayo deberá utilizar el nivel 1 de las buenas prácticas de bioseguridad durante el transporte, antes y después de la administración, y para la eliminación de los residuos. Los pacientes serán hospitalizados durante al menos 48 horas después de la infusión del OMG bajo una estricta monitorización. La posible presencia del OMG en la orina y heces del paciente se neutralizará con hipoclorito de sodio al 10% antes de su eliminación habitual hasta el día 90 (instrucciones del paciente). En caso de derrame, se recubrirá el material derramado con papel absorbente y se limpiará la zona con un desinfectante virucida. Como todos los OMG basados en virus adeno-asociados, rAAV9.CMV.NAGLU es susceptible a la acción de los desinfectantes virucidas para virus sin envuelta como hipoclorito de sodio al 1-10% (durante por lo menos 20 minutos), soluciones alcalinas a pH > 9, fenol al 5%, el calor (> 80 ° C durante 60 minutos), radiación UV y pH extremos (<2 y > 12). Todos los desinfectantes requieren un mínimo de 20 minutos de tiempo de contacto para ser eficaces.

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

El organismo modificado genéticamente se almacena en la Unidad de Investigación Biocruces a -80°C. El OMG se utiliza para el tratamiento de los pacientes en una habitación independiente del Hospital Universitario Cruces (España) bajo condiciones ambientales hospitalarias.

No se descarta que las partículas del OMG potencialmente diseminadas puedan estar en las aguas residuales a temperatura ambiente.

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

Todas las liberaciones previamente notificadas con AAV9 como organismo parental no han proporcionado todavía ningún dato sobre los efectos de la misma. En concreto, rAAV9.CMV.NAGLU en los estudios pre clínicos, llevados a cabo con una dosis 10 veces más alta que la dosis máxima que se usará en el ensayo clínico, se ha demostrado una excreción positiva, con una muy baja cantidad de OMG, en heces y orina por un período de 35 días. Al momento de la presente notificación no se dispone de datos del perfil de diseminación de rAAV9.CMV.NAGLU en ensayos clínicos en humanos, si bien el ensayo clínico con número de identificación IND # 1401-1289 en el Nationwide Children's Hospital (NCH), Columbus, Ohio, Estados Unidos iniciará en los próximos meses.

De todos modos hay que recordar que el OMG no es patógeno, y no se han reportado efectos secundarios para el medio ambiente o la salud humana después de la liberación de OMG similares al presente OMG (serotipos 2, 5, 8 y 9 de los virus adeno-asociados).

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

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

i) Orden y taxón superior (animales): --
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: Humano

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

La transferencia de genes para la mucopolisacaridosis IIIB (MPS IIIB) se llevará a cabo en dos ensayos de fase I/II (EE.UU., España y Australia) durante los próximos tres años (seis meses de reclutamiento y dos años de seguimiento). Los ensayos propuestos están diseñados para evaluar la seguridad y la respuesta clínica a la restauración de la actividad de la enzima α -N-acetilglucosaminidasa (NaGlu) en el SNC y el periférico después de la inyección intravenosa de rAAV9 que lleva el transgen humano NAGLU bajo el control del promotor CMV. En base a los estudios pre-clínicos, el rAAV9 y el promotor CMV permitirán una expresión eficaz a largo plazo del transgen y la secreción de NaGlu funcional, con una elevada posibilidad de lograr beneficios clínicos en el tratamiento neurológico, así como en los trastornos somáticos en pacientes MPS IIIB. El genoma del OMG no se integra en el genoma del huésped, ya que es un virus recombinante no integrativo, que se mantiene como concatameros extra-cromosomales (lineal o circular).

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

No previsible. Considerando que el genoma del OMG es estable y que la diseminación al agua residual procederá de la excreción de orina bajo condiciones de pH extremo, la transferencia horizontal a bacterias u otros microorganismos es probablemente mínima aunque no puede excluirse.

4. ¿Es probable que se dé una selección posterior a la liberación del OMG como, por ejemplo, una competencia mayor. un carácter más invasivo, etc.?

Sí	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe
Especifíquese: rAAV9.CMV.NAGLU es incompetente para su replicación por definición, por lo que no es capaz de propagarse, y por lo tanto no está sujeto a presión selectiva.		

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

El área en la que el rAAV9.CMV.NAGLU se liberará es el Hospital Universitario de Cruces (España), en el que el producto se manejará bajo normas BSL-I y procedimientos internos adecuados para residuos biológicos. Incluso en el caso de persistencia en las aguas residuales no se prevé que el OMG pueda quedarse establecido en el sistema, ya que presente una replicación incompetente.

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

Ninguno.

i) Orden y taxón superior (animales):
ii) Familia (plantas):
iii) Género:
iv) Especie:
v) Subespecie:
vi) Cepa:
vii) Cultivar/línea de reproducción:
viii) Patovar
ix) Nombre vulgar:

7. Probabilidad de intercambio genético en vivo

<p>a) Del OMG a otros organismos del ecosistema de liberación:</p> <p>La transferencia horizontal a bacterias u otros microorganismos es probablemente mínima aunque no puede excluirse.</p> <p>La transferencia génica horizontal es poco probable y debido a las características de secuencia de rAAV9.CMV.NAGLU no existe la posibilidad de conferir una ventaja selectiva a las bacterias, ya que no contiene ningún promotor procariota, antibiótico u otros tipos de genes de resistencia que favorezcan o restrinjan su crecimiento. Por lo tanto, es improbable que rAAV9.CMV.NAGLU pueda interferir con el control de microorganismos patogénicos o que tuviera un efecto en la dinámica natural de las poblaciones microbianas o los ciclos biogeoquímicos en cualquier sitio del medioambiente.</p> <p>No es de esperar un intercambio genético en vivo a otros organismos del ecosistema. El OMG se puede liberar al medio ambiente, si bien en cantidades infinitesimales. Además, el virus tiene muy baja probabilidad de ser infectivo debido a las condiciones fisicoquímicas de los fluidos biológicos en los que se libera. Por otro lado, destacar que ha perdido su capacidad de replicación.</p> <p>Es altamente improbable que se produzca una liberación al medio ambiente que sea efectiva, debido al número de partículas liberadas, a la necesidad de entrar en contacto directo de las mucosas del receptor con los productos de excreción de paciente tratado y la restricción del hospedador del virus que constituye ser el OMG. En la remota situación de que se liberaran partículas infectivas del OMG, y que alcance un hospedador (humano o primate no humano), no hay efectos tóxicos descritos derivados ni del virus utilizado en el OMG, ni de la actividad biológica de la enzima NAGLU en la especie huéspedes del OMG.</p>
<p>b) De otros organismos al OMG:</p> <p>No esperado</p>
<p>c) Consecuencias probables de la transferencia de genes:</p> <p>Ninguna (el OMG no aporta ninguna ventaja ni desventaja)</p>

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.)

Todas las liberaciones previamente notificadas con AAV9 como organismo parental no han proporcionado todavía ningún dato sobre los efectos de la misma. En concreto, rAAV9.CMV.NAGLU en los estudios pre clínicos, llevados a cabo con una dosis 10 veces más alta que la dosis máxima que se usará en el ensayo clínico, ha demostrado una excreción positiva, con una muy baja cantidad de OMG, en heces y orina por un período de 35 días.

No se dispone de referencias sobre el comportamiento de rAAV9.CMV.NAGLU en ambientes naturales. Se espera que el OMG se degrade tras la administración a los seres humanos por la acción de las proteínas endógenas y las vías catabólicas de ADN. Además se considera que el vector de ADN excretado no es estable en las aguas residuales.

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

La potencial liberación de OMG al medio ambiente será analizada en muestras de suero y fluidos biológicos obtenidos de todos los pacientes tratados de acuerdo al protocolo del ensayo clínico. Suero, saliva, orina y heces se recogerán en el día 0, 1, 2, 7, 14, 30, 60 y 90 después de la administración del OMG. Las muestras se analizarán para la detección y cuantificación de OMG mediante qPCR específica. También se obtendrán muestras para monitorizar la respuesta humoral y celular a través de ELISA y PBLs que también serán unos indicadores indirectos de los efectos del OMG por medio de anticuerpos y respuesta 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 (m²)

En España, el tratamiento se preparará en una cabina de bioseguridad tipo 2 (de flujo laminar) en la Unidad de Investigación Biocruces. El tratamiento del paciente, a través de una única administración intravenosa, se realizará en una habitación individual en el Hospital de Cruces para cada paciente.

5. Duración del seguimiento

En base a los datos de pre-clínica, la excreción del OMG se estudiará hasta 90 días después de la administración.

6. Frecuencia del seguimiento

La monitorización de la liberación del OMG se realizará en suero y fluidos biológicos (saliva, orina y heces) de todos los pacientes tratados en base al siguiente esquema: preselección (un mes antes del tratamiento), día 0 o día de tratamiento (4 y 8 horas después del tratamiento), día 1, día 2, día 7, día 14, día 30, día 60 y día 90 después del tratamiento.

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

1. Tratamiento del lugar tras la liberación

En términos generales, la descontaminación o tratamiento del sitio tras la liberación se realizará siguiendo los procedimientos internos para el manejo de agentes biológicos y BSL-I.

En caso de derrame, el área se cubrirá con papel absorbente y se usará un desinfectante virucida apropiado. Como todos los OMG basados en virus recombinantes adeno-asociados, rAAV9.CMV.NAGLU es susceptible a desinfectantes virucidas con actividad para virus sin envuelta como una solución del 1-10% de hipoclorito sódico (durante al menos 20 minutos), soluciones alcalinas a pH>9, fenol al 5%, calor (>80°C durante 60 minutos), radiación UV y pHs extremos (<2 y >12). La desinfección efectiva requiere un mínimo de 20 minutos de contacto con el OMG.

La destrucción de todo el material usado para la manipulación del OMG se realizará siguiendo los procedimientos internos para el manejo de agentes biológicos y BSL-I.

2. Tratamiento del OMG tras la liberación

En líneas generales, todo equipo utilizado durante el procedimiento será eliminado de acuerdo al procedimiento de eliminación de residuos biológicos peligrosos o bien descontaminado con agentes virucidas según lo establecido en el plan local de manejo de residuos biológicos peligrosos.

3(a) Tipo y cantidad de residuos producidos

Los viales vacíos y viales de rAAV9.CMV.NAGLU usados así como los componentes del sistema de infusión (tubo guía, cánula, estilete, aguja de inyección y jeringa), gasas y equipamiento protector personal, y todos los componentes usados para la toma de muestras de fluidos corporales tras la administración.

El volumen final de desechos no puede estimarse debido a la naturaleza del reclutamiento competitivo del estudio, pero el volumen final no será alto considerando que el número de pacientes es limitado debido a la naturaleza de enfermedad rara y a que es un estudio de diseño fase I/II.

En cualquier caso, todos los residuos tendrán una eliminación controlada.

3(b) Tratamiento de residuos

Tras la administración del OMG, los viales vacíos así como los componentes del sistema de infusión (tubo guía, cánula, estilete, aguja de inyección y jeringa), serán eliminados de acuerdo a las normas BSL-I y los procedimientos internos de la institución adecuados para el manejo de residuos biológicos. Además los instrumentos quirúrgicos desechables u otros materiales utilizados durante el procedimiento de administración o recogida de los fluidos corporales se eliminarán de acuerdo con el estándar de seguridad de la biotecnología de la institución.

Todo el equipamiento quirúrgico no desechable se limpiará usando un desinfectante

químico con actividad virucida probada (ej., solución de hipoclorito al 1%) y luego se esterilizará mediante autoclave siguiendo la práctica habitual de la institución.

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

En caso de dispersión imprevista, (por ejemplo derrame), el área afectada se cubrirá con material absorbente y después se descontaminará con desinfectante apropiado, como se ha descrito previamente.

En caso de daño, el sitio dañado se desinfectará apropiadamente de acuerdo a las buenas prácticas de bioseguridad y procedimientos internos.

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

De acuerdo a las normas BSL-I el personal sanitario involucrado en el ensayo llevará vestimenta protectora.

En caso de derrame, el área se cubrirá con papel absorbente y se usará un desinfectante químico apropiado para limpiar la zona, como una solución al 1% de hipoclorito sódico. El desinfectante requiere un mínimo de 20 minutos de contacto con el OMG antes de ser retirado.

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 OMG no es capaz de transducir células vegetales.

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

Se realizará un seguimiento de seguridad de los pacientes de 5 años de duración tras la finalización del estudio, según el protocolo del ensayo clínico. Los efectos adversos serán registrados y evaluados por los investigadores del ensayo clínico y se notificarán a las autoridades sanitarias cuando sean relevantes. Todas las áreas e instalaciones que se usen para administrar el producto serán limpiadas y descontaminadas utilizando desinfectantes virucidas como los descritos en este SNIF.

No se consideran planes específicos para el medio ambiente. Debido a las acciones preventivas tales como hospitalización de los pacientes durante al menos 48 horas después del tratamiento, control de la diseminación a través la desinfección de las aéreas posiblemente contaminadas, y la neutralización de los fluidos de los pacientes, se espera una liberación del OMG muy residual. Además, al ser el OMG utilizado no replicativo tampoco se espera su diseminación. Si se observaran efectos de la relevancia sobre el medio ambiente, la utilización del OMG se paralizaría hasta que se aplicarían las medidas adecuadas que eliminen el posible riesgo.

