

**MVA.HTI y MVA.HTI
B/ES/18/20**

**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**

17 Agosto 2018

*****NOTA PARA LOS REVISORES DE ESTE DOSIER*****

Los organismos modificados genéticamente (OMG) a utilizar en el ensayo son:

- **MVA.HTI**
- **ChAdOx1.HTI**

El OMG **MVA.HTI** ya ha sido liberado en el ensayo clínico “Estudio de seguridad y respuesta inmunológica a la combinación de las vacunas DNA.HTI y MVA.HTI para el VIH-1 en pacientes VIH-1 positivos tratados de forma precoz” (AELIX-002). El número de expediente para esta liberación es B/ES/16/11.

Por sugerencia del Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, la información relacionada únicamente a **MVA.HTI** no será repetida en este dossier. Toda la información es accesible a los revisores en el expediente B/ES/16/11.

A. Información de carácter general

1. Detalles de la notificación

a) Estado miembro de la notificación:	España
b) Número de la notificación:	B/ES/18/20
c) Fecha del acuse de recibo de la notificación:	13/07/2018
d) Título del proyecto:	Estudio de seguridad y respuesta inmunológica a la combinación de las vacunas DNA.HTI, MVA.HTI y ChAdOx1.HTI para el VIH-1 en pacientes VIH-1 positivos tratados de forma precoz (AELIX-002)
e) Período propuesto para la liberación:	Fecha del inicio liberación ChAdOx1.HTI: 02/2019 Fecha prevista para la última administración 07/2020

2. Notificador

Nombre de la institución o empresa:	Promotor del ensayo: AELIX Therapeutics SL, Baldiri Reixac 4-8, Barcelona, España, 08028 En colaboración con IrsiCaixa AIDS Research Institute Hospital Universitari Germans Trias i Pujol Carretera de Canyet s/n 08916 Badalona (Barcelona)
-------------------------------------	---

3. Definición de la OMG **MVA.HTI**

a) Indíquese si el OMG es:	Viroide	<input type="checkbox"/>
	Virus ARN	<input type="checkbox"/>
	Virus ADN	<input checked="" type="checkbox"/>
	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)

El organismo modificado genéticamente (OMG) a utilizar en el ensayo es el MVA.HTI. El vector de la viruela vacunoide de Ankara modificado (MVA) es un virus de la viruela vacunoide (vaccinia) vivo recombinante, atenuado por pases seriados en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo (o CEF, del inglés, chicken embryo fibroblasts) y que contiene seis deleciones genómicas grandes respecto al virus parental. En el MVA se ha insertado el transgén que codifica para el inserto HTI con el objetivo de inducir una respuesta inmunológica VIH-1 específica de células T. El tamaño del MVA.HTI tras la inserción se estima en aproximadamente 179.6 kb.

ChAdOx1.HTI

a) Indíquese si el OMG es:

- | | |
|---------------|-------------------------------------|
| Viroide | <input type="checkbox"/> |
| Virus ARN | <input type="checkbox"/> |
| Virus ADN | <input checked="" type="checkbox"/> |
| 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"/> |

Otro, especifíquese (reino, phylum y clase)

b) Identidad del OMG (género y especie)

Familia: Adenoviridae

Género: Mastadenovirus

Especie: adenovirus atenuado de chimpancé, sin capacidad de replicación, derivado del serotipo Y25.

El organismo modificado genéticamente (OMG) a utilizar en el ensayo clínico es el **ChAdOx1.HTI**, un adenovirus recombinado de chimpancé, vivo, sin capacidad de replicación debido a deleciones y modificaciones genómicas.

En el ChAdOx1.HTI se ha insertado el transgén que codifica para el inserto HTI con el objetivo de inducir una respuesta inmunológica VIH-1 específica de células T.

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

MVA.HTI

MVA es un virus genéticamente estable incapaz de integrar su ADN en el genoma del huésped y que permanece localizado en el citoplasma celular hasta la destrucción de la célula.

El OMG MVA.HTI se genera en fibroblastos de embrión de pollo (CEFs) y se purifica por gradiente de densidad desacarosa. El vector de la vacuna MVA es un virus vivo, recombinante y atenuado mediante pases seriados en CEF que contiene seis grandes deleciones genómicas en relación con el virus parental. El tamaño del genoma MVA tras la inserción de la secuencia codificante HTI se estima ser aproximadamente 179.6 kb. Las modificaciones genéticas del OMG MVA.HTI son estables y se mantienen tras pases sucesivos en CEFs.

La producción del virus recombinante MVA.HTI se realiza por la empresa alemana IDT Biologika y se basa en un sistema de lote semilla, en el que se prepara un 'lote de semilla maestra y un lote semilla de trabajo. Toda la preparación, la verificación de la estabilidad genética y el almacenamiento de los lotes semilla maestra y trabajo se realiza en IDT Biologika bajo condiciones cGMP y según la normativa de la UE.

La estabilidad genética se verifica en distintos pasos del proceso de producción, mediante análisis de integridad del vector y del inserto (patrón de restricción y secuenciación del transgen), pureza, potencia biológica y seguridad (análisis de ausencia de virus parental), tanto del inóculo inicial fabricado por el Dr. Tomas Hanke, del lote semilla maestra, del lote semilla de trabajo, así como del producto final. La estabilidad estándar (shelf life) asignada a las vacunas derivadas de MVA producidas por IDT Biologika bajo condiciones cGMP es de 36 meses cuando se almacenan a - 70°C y se repiten las pruebas de estabilidad MVA.HTI de forma anual.

Existe una gran experiencia con la estabilidad de poxvirus recombinantes y MVA recombinantes en particular, no sólo por parte de IDT Biologika. Hasta el momento actual, se ha construido en la Universidad de Oxford siete MVA recombinantes que han entrado en ensayos clínicos, dos de estos MVA recombinantes incluían un transgen, es decir contenían una secuencia de gen aislado de un organismo, en este caso derivado de VIH-1 (HIVA y HIVconsv). Los datos de estabilidad de dos de los productos estrechamente relacionados (MVA85A y MVA.HIVA), que habían pasado por el mismo proceso de fabricación, mostraron estabilidad durante un periodo de 6 años. Los transgenes de HIVA y 85A son 1.584 pb y 1107 pb de tamaño respectivamente, y por lo tanto similar al tamaño del gen HTI (1.587 pb).

Dentro de los ensayos de identificación y validación para confirmar la integridad global del genoma del MVA.HTI (por lo tanto de su estabilidad genética) incluye:

a) Identidad por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los cebadores J1312 y J1205, que producen un producto de 331 pb y confirma la presencia específica del producto HTI.

b) Pureza por PCR: ausencia de producto de PCR específico de la cepa MVA “wildtype” o no recombinada. La ausencia de la MVA.RFP (no recombinante) se comprueba por reacción de PCR utilizando cebadores específicos, que producen una banda de 688 pb RFP-específica. El plásmido pRFP se usa como control positivo en la PCR.

c) Identidad por secuenciación del ORF entero del HTI idéntico a la secuencia master.

La monitorización de la estabilidad de los lotes clínicos, tal como se indica en el IMPD, se realiza de forma periódica usando ensayos de infectividad en CEFs. El título del virus se expresa en unidades formadoras de placa por mililitro (pfu/ml). Se realizan pruebas para testar la estabilidad genética en diferentes puntos de la producción del lote final. La amplificación por PCR y su posterior secuenciación sirve para confirmar la presencia del inserto que codifica para el antígeno HTI así como para descartar la producción de mutaciones o deleciones.

Los test de estabilidad (titulación) se complementan con ensayos de potencia de inmunogenicidad *in vivo* en ratones.

ChAdOx1.HTI

Una vez administrado, ChAdOx1.HTI se dirige y localiza en el núcleo de la célula huésped, sin embargo, no integra su ADN en el genoma de esta (Rauschhuber *et al.*, 2012; Athanasopoulos *et al.*, 2017). La integración del ADN de adenovirus en el genoma es un evento extremadamente raro que solo se ha observado en algunos cultivos de líneas celulares primarias humanas (Hogg, 2000). Según las guías de la Agencia Europea del Medicamento (EMA), los vectores adenovirales se consideran vectores no integradores (EMA/273974/2005, 2006).

ChAdOx1.HTI es un virus genéticamente estable incapaz de integrar su ADN en el genoma del huésped y que permanece localizado en el citoplasma celular hasta la destrucción de la célula (Rauschhuber *et al.*, 2012; Athanasopoulos *et al.*, 2017).

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

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

En caso afirmativo, indique el código del país: -

MVA.HTI se liberará en el ensayo clínico HIVACAR EudraCT 2017-000566-30 (solicitud pendiente) en ES, BE, FR y DK

MVA.HTI y ChAdOx1.HTI se liberarán en el ensayo clínico AELIX-003 EudraCT 2018-002125-30 (B/ES/18/21 – solicitud en evaluación) en ES solo.

Además MVA.HTI ya ha sido liberado como la fase inicial (es decir en AELIX-002AB) del mismo ensayo que es el sujeto de este expediente EudraCT 2017-000532-34 (B/ES/16/11 y autorizado) en ES solo

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

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo: - Estado miembro de la notificación: - - Número de la notificación: - MVA.HTI y ChAdOx1.HTI se liberarán en el ensayo clínico AELIX-003 EudraCT 2018-002125-30 (B/ES/18/21 – solicitud en evaluación) en ES solo. Además MVA.HTI ya ha sido liberado como la fase inicial (es decir en AELIX-002AB) del mismo ensayo que es el sujeto de este expediente EudraCT 2017-000532-34 (B/ES/16/11 y autorizado) en ES solo	

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

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo: - Estado miembro de la notificación: - - Número de la notificación: -	

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

No hay razones científicas para suponer que el empleo del transgén HTI como inserto en los vectores virales MVA o ChAdOx1 modifique las características de distribución, “shedding” o capacidad replicativa con respecto a otros insertos utilizados en el mismo vector.

Los MVA y adenovirus (incluyendo serotipos derivados de chimpancés) han sido utilizados ampliamente en ensayos clínicos, tanto en administración directa como en estrategias de terapia celular. No se espera ninguna supervivencia del MVA.HTI o ChAdOx1.HTI dado que se encuentran exclusivamente en el citoplasma de la célula y son incapaces de producir partículas de vector en células humanas fuera del

lugar de inoculación. La posibilidad de transferencia génica a otras especies es mínima en las condiciones de liberación propuestas.

Ambos vectores son organismos atenuado para la replicación, no propagativo por lo que no se espera ninguna afectación a otros humanos, flora ni fauna cercana o lejana a la zona de liberación. Las vacunas virales modificadas genéticamente no son capaz de sobrevivir, establecerse, diseminarse ni de desplazar a otros organismos. MVA no es patogénica a animales ni plantas mientras ChAdOx1 normalmente no se encuentra en seres humanos aunque rastros de infección de otros serotipos de adenovirus se puede encontrar en la mayoría de las personas donde causan solo una patología limitada como un resfriado o a veces neumonía, crup, bronquitis y en casos raros enfermedades como gastroenteritis, conjuntivitis, cistitis (Wold *et al.*, 2013; Athanasopoulos *et al.*, 2017).

La proteína quimérica -HTI –el transgén- está constituida por 16 fragmentos del genoma del VIH-1 no implicados en la patogenicidad del virus; además no contiene proteínas nativas enteras por lo que no es funcionalmente activa, no es peligrosa y no tiene efectos dañinos para otros organismos.

Con todo lo expuesto, la probabilidad de que los OMGs se haga persistente y sea invasivo en hábitats naturales es muy baja. Nunca se ha documentado la reversión espontánea del MVA al virus de la viruela vacunoide competente para la replicación. Tampoco no se he observado reversión o complementación de vectores adenovirales en ensayos clínicos de terapia génica o vacunación. Las consecuencias de estos riesgos ambiental se consideran bajas o altamente improbables, en el contexto de las medidas propuestas para el uso contenido de las vacunas.

Existen antecedentes de la liberación de productos altamente similares en España, como el OMG MVA.HIVconsv bajo el expediente B/ES/12/10 y B/ES/15/12. Durante el período de liberación, no se recogió ninguna incidencia o accidente. Se llevaron a cabo estudios de biodistribución del OMG para asegurar la no diseminación en el medio ambiente a través de los fluidos corporales de los pacientes que participaban en el ensayo. El grupo investigador propuso realizar detección mediante PCR del inserto HIVconsv en muestras de orina recogidas a las 24 horas y 7 días post vacunación con el OMG MVA.HIVconsv. Los resultados dieron negativos, y no se encontró ADN (HIVconsv) en ninguna de las muestras de orina analizadas. Luego estos resultados demuestran que no es probable un shedding viral (Edmund Wee, 2015).

Además existen antecedentes de la liberación de productos altamente similares en España, como el OMG ChAdV63.HIV bajo el expediente B/ES/12/09 y B/ES/12/10, así como el OMG ChAd155-RSV bajo el expediente B/ES/16/07. La proteína quimérica HTI-el transgén- también está siendo utilizada en ensayos clínicos en España, también para vacunas experimentales contra VIH-1 (GMO MVA.HTI) bajo el expediente B/ES/16/11. Durante el período de liberación, no se recogió ninguna incidencia o accidente.

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:

MVA

a) Indíquese si el organismo receptor o parental es :

Viroide

Virus ARN

Virus ADN

MVA, virus de la viruela vacunoide (vaccinia) Ankara modificado.

Bacteria

Hongo

Animal

- mamíferos

- insectos

- peces

- otro animal

 (especifique el phylum y la clase)

ChAdY25a) Indíquese si el organismo receptor o parental es :

Viroide

Virus ARN

Virus ADN

Adenovirus de chimpancé Y25

Bacteria

Hongo

Animal

- mamíferos

- insectos

- peces

- otro animal

 (especifique el phylum y la clase)

Otros, (especifíquense):

El adenovirus de chimpancé Y25 se obtuvo originalmente de William Hillis, Universidad de Medicina John Hopkins (Hillis et al., 1969; Dicks et al., 2012). El aislado original fue de heces de chimpancé y fueron pasaron 6 veces en células HEp-2 antes de la caracterización inicial. La secuencia completa de su genoma está disponible como acceso de GenBank no. JN254802, así como la relación filogenética con otros serotipos (por comparación del hexón y las proteínas de fibra) y los principales componentes de la cápside expuestos a la superficie.

ChAdY25 se agrupa filogenéticamente con el virus E del adenovirus humano (HAdV), HAdV-4. Las secuencias de ADN de hexano y fibra de Y25, así como el adenovirus de simio SAdV-23, se agrupan por separado con otros miembros E de adenovirus humano.

2. Nombre

MVA

i) Orden y taxón superior (animales): Poxviridae/Chordopoxviridae
ii) Género: Orthopoxvirus
iii) Especie: Virus de la viruela vacunoide
iv) Subespecie: -
v) Cepa: Virus de la viruela vacunoide de Ankara modificado
vi) Patovar (biotipo, ecotipo, raza, etc.): -
vii) Nombre vulgar: MVA

ChAdY25

i) Orden y taxón superior (animales): Adenoviridae
ii) Género: Mastadenovirus
iii) Especie:
iv) Subespecie: -
v) Cepa: Adenovirus de chimpancé Y25
vi) Patovar (biotipo, ecotipo, raza, etc.): -
vii) Nombre vulgar: Adenovirus de chimpancé Y25

3. Distribución geográfica del organismo

MVA.HTI

a) Autóctono del país que notifica o establecido en él:		
Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
b) Autóctono de otros países de la Comunidad o establecido en ellos:		
i) Sí <input type="checkbox"/>		
En caso afirmativo, indíquese el tipo de ecosistema en que se encuentra:		
Atlántico	<input type="checkbox"/>	
Mediterráneo	<input type="checkbox"/>	
Boreal	<input type="checkbox"/>	
Alpino	<input type="checkbox"/>	
Continental	<input type="checkbox"/>	
Macaronésico	<input type="checkbox"/>	
ii) No <input checked="" type="checkbox"/>		
iii) No se sabe <input type="checkbox"/>		
c) ¿Se usa frecuentemente en el país que notifica?		
Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	
d) ¿Es frecuente su tenencia en el país que notifica?		
Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	

ChAdY25

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

Alpino	<input type="checkbox"/>
Continental	<input type="checkbox"/>
Macaronésico	<input type="checkbox"/>
ii) No	<input checked="" type="checkbox"/>
iii) No se sabe	<input type="checkbox"/>
c) ¿Se usa frecuentemente en el país que notifica?	
Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
d) ¿Es frecuente su tenencia en el país que notifica?	
Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>

4. Hábitat natural del organismo

MVA.HTI

a) Si es un microorganismo:	
Agua	<input type="checkbox"/>
Suelo, en libertad	<input type="checkbox"/>
Suelo, en simbiosis radiculares de plantas	<input type="checkbox"/>
En simbiosis con sistemas foliares o caulinares de plantas	<input type="checkbox"/>
En simbiosis con animales	<input type="checkbox"/>
Otros , (especifíquense):	
<p>El MVA no se encuentra en ecosistemas naturales. El MVA es un virus de la viruela vacunoide (virus vaccinia) vivo recombinante, atenuado con limitada habilidad para replicar en células humanas. Se replica bien en células de ave (fibroblastos de embrión de pollo o CEF) y de cría de hámster, pero se replica mal en la mayoría de las células de mamíferos (Mayr <i>et al.</i>, 1978; Drexler <i>et al.</i>, 2004) por lo que es incapaz de propagarse en células humanas normales.</p>	
b) Si es un animal, hábitat natural o ecosistema agrícola habitual:	
No aplica.	

ChAdY25

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):

Los adenovirus tienen distribución mundial. Los adenovirus de tipo silvestre se han detectado en aguas de todo el mundo, incluidas las aguas residuales, el agua de los ríos, el agua potable, los océanos y las piscinas. Los humanos y los animales son los reservorios naturales para los adenovirus de tipo salvaje.

El anfitrión natural del adenovirus ChAdY25 de tipo salvaje es el chimpancé. El adenovirus parental no se encuentra en el ecosistema natural fuera de su huésped natural. El organismo parental se aisló de las heces de un chimpancé y se modificó genéticamente. Fue creado y se mantiene en laboratorios debido a su incapacidad para la replicación (Hillis *et al.*, 1969; Dicks *et al.*, 2012).

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

No aplica.

5.a) Técnicas de detección

MVA.HTI

La identidad del MVA se puede confirmar por PCR. Está basada en la ausencia de genes deletados del virus vaccinia wild-type, características de la cepa MVA.

La infectividad del virus MVA se mide haciendo el promedio de 3 titulaciones independientes en fibroblastos de embrión de pollo. El título del virus se expresa en unidades formadoras de placa por mililitro (pfu/ml).

ChAdY25

Los adenovirus se detectan mediante PCR según secuencias genéricas de adenovirus de chimpancé o específicas para el serotipo Y25. También pueden detectarse con ensayos de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos específicos anti-hexón de ChAdY25.

•

5.b) Técnicas de identificación

Las mismas que en el apartado anterior (5a) para ambos OMGs

- 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?**

MVA.HTI

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo, especifíquese: Los MVA están clasificados como categoría I por su limitad patogenicidad.	

ChAdOx1.HTI

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
<p>En términos de clasificación de peligro potencial, el adenovirus humano se considera como un agente biológico de tipo 2, según la clasificación de la Comunidad Económica Europea (CEE) para la protección de los trabajadores con agentes biológicos (Directiva 2000/54/EC, 2000).</p> <p>La designación de grupo 2 se aplica a los agentes biológicos que puede causar enfermedades humanas y puede ser un peligro para los trabajadores, que es poco probable que se propaguen a la comunidad y para la cual generalmente hay disponible profilaxis o tratamiento efectivo. Sin embargo, muchos vectores adenovirales como nuestro organismo parental han sido construidos por delección de la región E1 que codifica genes clave requeridos para el crecimiento viral. Sin los genes de la región E1, los vectores adenovirales son incapaces de producir infección en humanos.</p> <p>Vectores de chimpancé similares han sido ya utilizados en dos notificaciones previas para la liberación voluntaria de adenovirus recombinantes en ensayos clínicos (B/ES/12/09 y B/ES/16/07).</p>	

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

Sí

No

No se sabe

En caso afirmativo

a) ¿Para cuál de los organismos siguientes?:

humanos

animales

plantas

otros

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

MVA

Los MVA están clasificados como categoría I por su limitada patogenicidad.

La respuesta inmune generada a partir de la infección por el virus vaccinia parental protege a la persona contra la viruela, por este motivo se utilizó como vacuna. La infección por el virus vaccinia es leve y normalmente asintomática en individuos sanos, pero puede causar una leve erupción y fiebre. Sin embargo, se producen a veces algunas complicaciones y efectos secundarios, y la probabilidad de que esto ocurra es significativamente mayor en las personas inmunocomprometidas. El MVA sin embargo, que fue utilizado como una vacuna contra la viruela en la década de 1970 hacia el final de la campaña de erradicación en más de 120.000 personas y no produjo ningún evento adverso grave.

Con la erradicación mundial de la viruela, la vacunación de rutina con el virus vaccinia ya no se realiza. Sin embargo, después del ataque de bioterrorismo con ántrax en octubre de 2001, el gobierno de Estados Unidos ha hecho todo lo posible para mejorar la preparación para la liberación intencional o accidental de virus vaccinia. Inicialmente, este comenzó con los intentos de vacunar a un gran número de posibles emergencias y trabajadores de la salud. También ha habido fondos para el desarrollo y la producción de una nueva vacuna contra la viruela, así como el desarrollo de terapias antipoxvirus. Algunos investigadores de laboratorio, trabajadores de la salud, primeros auxilios, y personal militar están siendo todavía vacunados. La vacuna con el virus vaccinia está solamente disponible en los Estados Unidos a través del “Center for Disease Control and Prevention”.

MVA no presenta ningún riesgo de integración o activación de provirus latentes, puesto que el vector se encuentra exclusivamente en el citoplasma y es altamente improbable que se produzca una diseminación significativa de las partículas infecciosas fuera del punto de inyección.

ChAdY25b) Aporte la información pertinente especificada en la letra d) del punto 11 de la letra A de la sección 11 del anexo III A de la Directiva 2001/18/CE.

Los adenovirus humanos comúnmente causan infección asintomática en humanos, aunque también pueden causar infecciones del tracto respiratorio, gastrointestinales, incomodidad o infecciones oculares de severidad variable. Son más comunes en niños y en la población inmunocomprometida. El período de incubación varía de 1 a 10 días. La mayoría de la población es seropositiva para más de una subespecie de adenovirus y puede producir rápidamente anticuerpos neutralizantes.

Normalmente, el virus se infecta a través del tracto respiratorio o los ojos a través de aerosoles producidos por personas infectadas. La mayoría de las infecciones son de naturaleza leve. Los adenovirus raramente se integran en el genoma de las células huésped y no persisten en los tejidos linfoides.

Las infecciones por adenovirus en primates no humanos (NHP) también son predominantemente leves.

Los adenovirus de chimpancé son cada vez más utilizados en ensayos clínicos como una alternativa ventajosa con respecto a los adenovirus humanos debido a su gran capacidad para generar respuesta inmune, la posibilidad de insertar secuencias más largas y la falta de inmunidad contra el vector debido a la no exposición previa.

En términos de clasificación de peligro potencial, el adenovirus humano se considera como un agente biológico de tipo II, según la clasificación de la Comunidad Económica Europea (CEE) para la protección de los trabajadores con agentes biológicos (Directiva 2000/54/EC, 2000). La designación de grupo II se aplica a los agentes biológicos que puede causar enfermedades humanas y puede ser un peligro para los trabajadores, que es poco probable que se propaguen a la comunidad y para la cual generalmente hay disponible profilaxis o tratamiento efectivo. Sin embargo, muchos vectores adenovirales, como nuestro organismo parental, han sido construidos por delección de la región E1 que codifica genes clave requeridos para el crecimiento viral. Sin los genes de la región E1, los vectores adenovirales son incapaces de producir infección en humanos.

Vectores de chimpancé similares han sido ya utilizados en dos notificaciones previas para la liberación voluntaria de adenovirus recombinantes en ensayos clínicos (B/ES/12/09 y B/ES/16/07).

8. Información sobre reproducción

a) Tiempo de generación en ecosistemas naturales:

MVA.HTI

No aplica, no se genera en ecosistemas naturales. Se replica bien en células de ave (fibroblastos de embrión de pollo o CEF) y de cría de hámster, pero se replica mal en la mayoría de las células de mamíferos (Mayr et al, 1978; Drexler et al, 1998) por lo que es incapaz de propagarse en células humanas normales.

ChAdY25 Se replica en células HEK 293. Se replica en células HEK 293 pero no se replica sin complementación de los genes perdidos.

b) Tiempo de generación en el ecosistema en el que vaya a ser liberado:

No aplica.

c) Modo de reproducción

No aplica.

Sexual

Asexual

d) Factores que afectan a la reproducción:

No aplica.

9. Capacidad de supervivencia

MVAy ChAdY25

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

(i) endosporas

(ii) quistes	<input type="checkbox"/>
(iii) esclerocios	<input type="checkbox"/>
(iv) esporas asexuales(hongos)	<input type="checkbox"/>
(v) esporas sexuales (hongos)	<input type="checkbox"/>
(vi) huevos	<input type="checkbox"/>
(vii) pupas	<input type="checkbox"/>
(viii) larvas	<input type="checkbox"/>
(ix) otras (especifíquense):	Irrelevante.

b) Factores pertinentes que afectan a la capacidad de supervivencia

No se espera ninguna supervivencia de ninguno de los dos vectores dado que se encuentran exclusivamente en el citoplasma de las célula y son incapaces de producir partículas de vector en células humanas fuera del lugar de inoculación. La posibilidad de transferencia génica a otras especies es mínima en las condiciones de liberación propuestas.

La bioactividad de ambos vectores decae a temperatura ambiente de forma logarítmica. Ambos son susceptibles a diferentes agentes químicos como el hipoclorito sódico al 1% y el glutaraldehído al 2%, utilizados como desinfectantes, y se ha demostrado sensibilidad al calor como método de inactivación física. Así, una eliminación completamente eficaz se consigue mediante autoclavado a 121°C durante 15 minutos.

10.a) Vías de diseminación

El MVA y el ChAdY25, permanecen localizados en el citoplasma celular hasta la destrucción de la célula. Según datos de estudios no clínicos y clínicos de productos altamente similares, no se ha observado diseminación de los vectores, por lo que se supone que su diseminación termina en el punto de inyección.

10.b) Factores que afectan a la diseminación

La capacidad de propagación depende de la dosis, la formación de aerosoles y la proximidad de contacto así como las medidas de seguridad tomadas en el entorno de investigación establecido en el protocolo.

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)

MVA

El vector viral MVA ya ha sido usado en numerosos ensayos clínicos (NCT01712425, NCT02099994, NCT01151319, NCT00982579 and NCT01371175) junto con otros candidatos como ChAdV63.HIVconsv, pSG2.HIVconsv ADN y pTHr.HIVA ADN.

En España un OMG altamente similar al propuesto en este formulario (MVA.HIVAconsv) ya ha sido notificado, expediente B/ES/12/10, B/ES/15/12 y ha sido usado en diferentes ensayos clínicos, incluyendo sujetos infectados por VIH.

Otros OMG con el mismo organismo receptor, MVA, han sido notificado España con expedientes B/ES/08/46 y B/ES/09/63.

ChAdY25 En España, dos OMG similares al propuesto en este documento (ChAd155-RSV y ChAdV63.HIVconsv) ya han sido notificados, con expedientes B/ES/16/07 y B/ES/12/09, y han sido liberados en diferentes ensayos clínicos.

C. Información sobre la modificación genética

1. Tipo de modificación genética:

MVA.HTI y ChAdOx1.HTI

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

MVA.HTI

El vector de la viruela vacunoide de Ankara modificado (MVA) es un virus vaccinia vivo recombinante, atenuado por pases seriados en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo (o CEF, del inglés, chicken embryo fibroblasts) y que contiene seis deleciones genómicas grandes respecto el virus parental (15% del genoma parental), incluidos los genes de receptores de citoquinas.

Entre los genes mutados se incluye una de las proteínas de membrana mayoritarias (ORF F5L), y entre las regiones delecionadas están genes clásicos de evasión inmune poxviral, genes de virulencia y dos de cinco genes del huésped (Im *et al.*, 2004; Meisinger-Henschel *et al.*, 2007; Meisinger-Henschel *et al.*, 2010; Gilbert, 2013) haciendo el MVA seguro para una aplicación clínica dada su limitada habilidad para replicar en células humanas.

El transgén que codifica para el inserto HTI se ha insertado en el locus de la timidina quinasa del genoma del MVA bajo el control del promotor modificado H5 con el objetivo de inducir una respuesta inmunológica VIH-1 específica de células T. Con todas estas modificaciones se pretende que en aquellas células que se infecten por MVA.HTI puedan expresar el inmunógeno HTI para la activación de respuestas inmunitarias frente al virus VIH-1.

ChAdOx1.HTI

El objetivo del proyecto es desarrollar un producto inmunoterapéuticos (a veces también denominado "vacuna terapéutica") para el tratamiento de la infección por VIH, a fin de lograr una cura funcional.

El transgén que codifica para el inserto HTI se ha insertado en el locus de la región E1, tras haber sido ésta eliminada.

Con estas modificaciones se pretende que aquellas células que sean infectadas por ChAdOx1.HTI puedan expresar el inmunógeno HTI para la activación de respuestas inmunitarias frente al virus VIH-1.

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

MVA.HTI y ChAdOx1.HTI

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?

MVA.HTI y ChAdOx1.HTI

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

En caso negativo, pase a la pregunta 5

Los OMG finales se incluirán como secuencia genética el casete de expresión recombinante con los antígenos del HTI y los genes de la cápsida del OMG (fibra y hexón). Los demás genes son auxiliares y solo se usarán para el embalaje correcto del OMG.

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

MVA.HTI y ChAdOx1.HTI

a) Tipo de vector

plásmido

bacteriófago

virus

cósmido

Elemento de transposición

Otros (especifíquense):

ChAdOx1.HTI

Vector de Cromosoma Artificial Bacteriano (BAC)

b) Identidad del vector:

MVA.HTI

plásmido p3055

ChAdOx1.HTI

plásmido pBACe3.6

plásmido SAdV-Y25 ΔE1

plásmido pC255 (SAdV-Y25 ΔE1 + HTI)

c) Gama de organismos huéspedes del vector:

MVA.HTI

E. coli

ChAdOx1.HTI

E. coli

Células HEK 293

El plásmido se replica en la cepa de laboratorio de *E. coli*.

El vector de adenovirus final solo puede replicarse en células que expresen E1 (como HEK 293)

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

Sí

No

Resistencia a los antibióticos

Otras, (especifíquense):

MVA.HTI

p3055 alberga el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) como marcador. Por otro lado, el MVA parental también incluye el gen de la proteína roja fluorescente (RFP). Después de la recombinación, existe una forma transitoria del virus que contiene tanto con GFP y RFP, y a continuación se resuelve espontáneamente a un estado incoloro por la recombinación de ambos marcadores.

ChAdOx1.HTI

Las regiones E1 y E3 del genoma de ChAdOx1 han sido deletadas, y la región E4 nativa ha sido modificada por la inserción de las regiones E4Orf4, Orf6 and Orf6/7 del adenovirus humano tipo 5.

Indique qué gen de resistencia a los antibióticos se inserta: No aplica

e) Fragmentos constituyentes del vector

MVA.HTI

El plásmido p3055 es un plásmido de co-expresión (creado en la Universidad de Oxford) que dirige la inserción de un gen de interés, en este caso el inserto HTI, en el locus de la timidina kinasa (TK) del genoma del virus vaccinia y contiene el gen la proteína verde fluorescente (GFP) y el promotor modificado H5. Por lo tanto, los fragmentos constituyentes del vector son: inserto HTI, gen de la timidina quinasa (TK), gen de la proteína verde fluorescente (GFP) y el promotor modificado H5.

Ilustración 1. Plásmido p3055

ChAdOx1.HTI

ChAdY25, después de haber sufrido todas estas modificaciones, se denomina ChAdOx1. Así pues, es en ChAdOx1 donde el antígeno HTI será insertado.

ChAdOx1 es el serotipo Y25 tras haber sido modificado genéticamente e incapacitado para la replicación para realizar dichas modificaciones se utilizó como herramienta (“vector de rescate”) un vector de Cromosoma Artificial Bacteriano (BAC) que contenía el genoma de ChAdY25 silvestre (plásmido pBAC e3.6). ChAdOx1, fue creado a partir de pBAC e3.6 utilizando técnicas de recombinación molecular estándar. El genoma resultante fue clonado en un vector BAC pBAC e3.6 ΔE1 clone. Finalmente, el cassette de expresión de HTI fue insertado en pBAC e3.6 ΔE1 clone para hacer el plásmido BAC pC255. El plásmido pC255 dirige la inserción de un gen de interés, en este caso el gen deficiente para la replicación del adenovirus de chimpancé ChAdOx1 con el inserto de antígenos HTI

f) Método de introducción del vector en el organismo receptor

i) transformación

ii) electroporación

- iii) macroinyección
- iv) microinyección
- v) infección

vi) otros, (especifíquense):

MVA.HTI

Recombinación homóloga

Brevemente, las CEFs se infectan con MVA parental a una MOI (multiplicity of infection) 1 y se transfectan con Superfectin (Qiagen) 3 µg de DNA.HTI (plásmido p3055) que contiene también el gen de la proteína verde fluorescente como marcador de selección. Dos días después, el virus total se recoge y se utiliza para re infectar las células CEF. Los rMVAs se someten a cinco rondas de purificación en placa, tras lo cual se obtiene el lote vírico de semilla maestra, purificado sobre un gradiente de sacarosa al 36%, titulado y almacenado a -65°C hasta su uso.

Para confirmar la identidad (presencia del inserto de interés) y la pureza (ausencia de MVA parental), se lleva a cabo una PCR.

ChAdOx1.HTI

Transfección.

Los lotes se producen transfectando pC255 linealizado en células HEK293A T-REx® comerciales, que expresan de manera estable la proteína represora de tetraciclina (Tet), usando lipofectamina.

5. Si las repuestas a C. 3) a)y b) son negativas, ¿qué método se siguió en el proceso de modificación? No aplica.

- i) transformación
- ii) microinyección
- iii) macroencapsulación
- iv) macroinyección
- v) otros, (especifíquense)

6. Información sobre el fragmento de inserción:

El inserto HTI es el mismo en ambos OMGs

a) Composición del fragmento de inserción:

HTI:

El HTI expresado por el OMG es un inmunógeno para la estimulación de células T. Se trata de una secuencia constituida por 16 segmentos del genoma VIH-1 de entre 11 y 78 aminoácidos cada uno, y que codifican para dianas críticas de las proteínas víricas Gag (45%), Pol (44%), Vif (8%) y Nef (3%) (ver Ilustración 3).

El diseño del inserto HTI se basó en la identificación de dianas del genoma del VIH para las células T, que provenían de 232 individuos infectados por el VIH (subtipo B), no tratados (Mothe et al., 2011). De los 410 18mer péptidos superpuestos, se seleccionaron 26 péptidos superpuestos los cuales generan una respuesta inmunogénica de interés. Estos péptidos superpuestos se corresponden con las proteínas del virus VIH siguientes: Gag (n = 10), Pol (n = 12), Vif (n = 3) y Nef (n = 1) (ver Tabla 1).

El fragmento HTI contiene enlazadores de alanina entre los segmentos (uno, dos o tres residuos de alanina, según se muestra en la figura), y que se incluyeron con el fin de inducir la escisión proteolítica preferencial entre los segmentos, y evitar así la digestión prematura del epítipo (Le Gall *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012).

Además, el fragmento HTI contiene un péptido señal GM-CSF humano (AA 1-17; Genbank Nr NP_000749) en el extremo N-terminal, con el objetivo de mejorar la translocación al retículo endoplásmico.

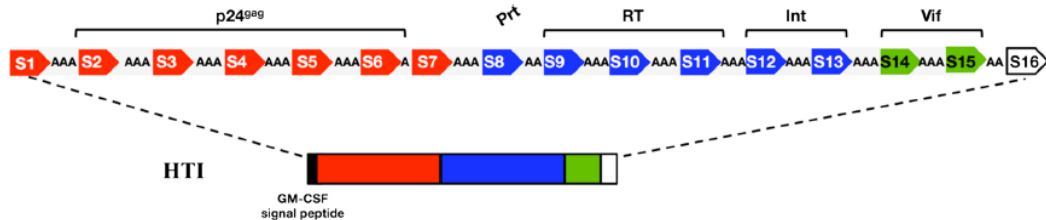


Ilustración 2 : La proteína HTI se compone de 16 segmentos individuales dispuestos de forma lineal y unidos a través de enlazadores de 1-3 aminoácidos alanina y contiene el péptido señal de GM-CSF (negro) para una mejor secreción. La longitud total de la proteína es HTI 529 aa, incluyendo enlazadores de alanina

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

Las secuencias del transgén HTI son 16 fragmentos correspondientes a dianas críticas del genoma del VIH-1, identificadas a partir de individuos infectados por el VIH-1 del subtipo B. A continuación se muestra una lista de los péptidos superpuestos identificados e incorporados en el diseño final del inmunógeno de células T (Mothe *et al.*, 2011).

Tabla 1: Lista de péptidos solapantes beneficiosos identificados (OLP, PR> 1) incorporado en el diseño final del inmunógeno de células T, basado en un análisis anterior.

OLP no.	Protein	Subunit	OLP clade B cons sequence
3	Gag	p17	EKIRLRPGGKKKYKPKHI
6	Gag	p17	ASRELERFAVNPGLL
7	Gag	p17	ERFAVNPGLLETSEGCR
10	Gag	p17	QLQPSLQTGSEELRSLY
12	Gag	p17	SLYNTVATLYCVHQRIEV
23	Gag	p24	AFSPEVPMFSALSEGA
31	Gag	p24	IAPGQMREPRGSDIA
34	Gag	p24	STLQEIQGWMNTNPPPIV
48	Gag	p24	ACQGVGGPGHKARVLAEA
60	Gag	p15	GKIWPSHKGRPGNFLQSR
75	Nef	-	WLEAQEEEEVGFVVRPQV
159	Pol	Prt	KMIGGIGGFIKVRQYDQI
160	Pol	Prt	FIKVRQYDQILIEICGHK
161	Pol	Prt	QILIEICGHKAIGTVLV
163	Pol	Prt	LVGPTPVNIIGRNLLTQI
171	Pol	RT	LVEICTEMEKEGKISKI
195	Pol	RT	LRWGFTTPDKKHQKEPPF
196	Pol	RT	DKKHQKEPPFLWMGYELH
210	Pol	RT	EIQKQGQGWYTYQIY
269	Pol	Int	TKELQKQITKIQNFRVYY
270	Pol	Int	TKIQNFRVYYRDSRDPLW
271	Pol	Int	YYRDSRDPLWKGPAKLLW
276	Pol	Int	KIIRDYKQKQKAGDDCVA
405	Vif	-	VKHHMYISGKAKGWFYRH
406	Vif	-	GKAKGWFYRHHYESTHPR
424	Vif	-	TKLTEDRWKPKQKTKGHR

El gen (codón-optimizado) HTI se sintetizó químicamente por GeneArt (Alemania).

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

El fragmento HTI tiene una longitud total de 529 aminoácidos, incluyendo una alta densidad de ambos epítomos de células T CD4 y CD8 en todas las subunidades de proteínas restringidas por 42 alelos diferentes de HLA (n = 55 epítomos de CTL bien caracterizados, y las 6 dianas de Gag más comunes para células CD4 T helper).

Por lo tanto, la función del inmunógeno HTI es la inducción de una respuesta inmunitaria de células T VIH-1 específicas, dirigidas contra las regiones incluidas en el inserto HTI, que pueden ayudar a controlar la infección por VIH-1 de forma eficaz.

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

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

MVA.HTI
HTI ha sido integrado en el genoma del MVA en el locus de la quinasa timidínica del genoma del MVA bajo el control del promotor H5 modificado.

ChAdOx1.HTI
HTI ha sido integrado en el genoma del ChAdOx1 bajo el control del promotor H5 modificado.

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

Sí No

En caso afirmativo , especifíquese: -

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

La siguiente información está relacionada con el organismo de procedencia del transgén insertado (HTI): el virus de la inmunodeficiencia humana o VIH-1, por lo que aplica de igual forma a los dos OMGs (ChAdOx1.HTI y MVA.HTI).

1. Indíquese si es:

Viroide	<input type="checkbox"/>
Virus ARN	<input checked="" type="checkbox"/>
Virus ADN	<input type="checkbox"/>
Bacteria	<input type="checkbox"/>

Hongo	<input type="checkbox"/>
Animal	<input type="checkbox"/>
- mamíferos	<input type="checkbox"/>
- insectos	<input type="checkbox"/>
- peces	<input type="checkbox"/>
- otro animal	<input type="checkbox"/> (especifique el phylum y la clase):
Otros (especifíquense): HTI es una secuencia de 16 fragmentos del genoma del VIH-1 (virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1) de entre 11 y 78 aminoácidos cada uno.	

2. Nombre completo

i) Orden y taxón superior (animales):
ii) Familia (plantas): Retroviridae
iii) Género: Lentivirus
iv) Especie: Human
v) Subespecie: VIH tipo 1. El fragmento HTI está constituido por fragmentos del genoma del virus VIH-1 subtipo B
vi) Cepa: -
vii) Cultivar/línea de reproducción: -
viii) Patovar: -
ix) Nombre vulgar: VIH-1, virus de la inmunodeficiencia humana.

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

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo, especifíquese		
(a) ¿para cuál de los organismos siguientes?	humanos	<input checked="" type="checkbox"/>

animales	<input type="checkbox"/>
plantas	<input type="checkbox"/>
otros	<input type="checkbox"/>
(b) ¿están implicadas de alguna forma las secuencias donadas en las propiedades patógenas o nocivas del organismo?	
Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
No se sabe <input type="checkbox"/>	
En caso afirmativo, proporcione la información pertinente de conformidad con la letra d) del punto 11 de la letra A de la sección II del Anexo III A:	
<p>El VIH-1 infecta y destruye directamente las células que son críticas para una respuesta inmunitaria efectiva, explicando las manifestaciones clínicas derivadas de la progresiva inmunodepresión. El VIH-1 es un virus ARN, cuyas principales células diana son los linfocitos CD4+ T-helper, macrófagos y algunas poblaciones de células dendríticas. Tras la entrada, se inicia en el citoplasma celular la retrotranscripción del genoma viral (ARN). El ADN de doble cadena producto de esta retrotranscripción se transporta al núcleo celular donde se integra en el ADN cromosómico de la célula infectada, un paso necesario para la síntesis eficiente de ARN viral y consecuente producción de nuevas partículas virales infecciosas. Los lentivirus como el VIH-1, son los únicos entre los retrovirus, capaces de generar productos de pre-integración que pueden ser transportados a la interfase del núcleo de células secuestradas en la fase G1 del ciclo celular.</p> <p>Las infecciones <i>in vivo</i> por VIH-1 se limitan a humanos y chimpancés y su transmisión es por contacto con sangre, relaciones sexuales o por transmisión vertical de madre-hijo durante el embarazo y el parto. El curso de la enfermedad en humanos varía enormemente entre las personas infectadas. El tiempo entre la infección y el desarrollo del SIDA –definido por la reducción de los niveles de CD4 por debajo de 200 células/μl o la aparición de enfermedades oportunistas o cánceres relacionados con el SIDA, puede ir desde los 6 meses hasta más de 25 años.</p> <p>Los lentivirus se limitan típicamente en su rango de huésped, aunque infecciones cruzadas entre especies de forma natural –o experimental- han sido documentadas. Sin embargo, en los chimpancés -el único primate no humano capaz de infectarse con el VIH-1- no presenta inmunodeficiencia ni enfermedad a largo plazo. Durante la primoinfección por VIH-1 puede aislarse durante algunas semanas el virus circulando de forma intermitente, pero es luego resuelta de forma asintomática en la mayoría de los casos.</p> <p>Los fragmentos o secuencias incluidos en el inmunogéno HTI no participan en las propiedades patógenas del virus.</p>	

4. **¿Está clasificado el organismo donante con arreglo a normas comunitarias vigentes en relación con la protección de la salud humana y el medio ambiente como, por ejemplo, la Directiva 90/679/ CEE sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo?**

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
<p>En caso afirmativo , especifíquese: El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) está clasificado como nivel de bioseguridad de clase 3*D. El gen HTI sin embargo se produce por síntesis química, no por replicación del VIH-1, por lo que no tiene clasificación sobre seguridad.</p>	

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

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

E. Información sobre el organismo modificado genéticamente

MVA.HTI y ChAdOx1.HTI

1. **Rasgos genéticos y características fenotípicas del organismo receptor o parental que hayan sufrido algún cambio como resultado de la modificación genética**

MVA.HTI

<p>a) ¿Se diferencia el OMG del receptor en lo que a capacidad de supervivencia se refiere?</p> <p>Sí <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/></p> <p>Especifíquese:</p> <p>El MVA.HTI, al igual que el MVA, es un virus de la viruela vacunoide (virus vaccinia) vivo recombinante, atenuado con limitada habilidad para replicar en células humanas.</p>
<p>b) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta al modo o índice de reproducción?</p> <p>Sí <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/></p> <p>Especifíquese:</p> <p>El MVA.HTI, al igual que el MVA, es un virus de la viruela vacunoide (virus vaccinia) vivo recombinante, atenuado con limitada habilidad para replicar en células humanas.</p>
<p>c) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta a la diseminación?</p> <p>Sí <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/></p>

Especifíquese:

El MVA tiene extremadamente limitada su capacidad de diseminación, puesto que permanece localizado en el citoplasma celular hasta la destrucción de la célula. Según datos de estudios clínicos con OMG usando el virus MVA como organismo vector, no se ha observado diseminación de dicho vector, por lo que se supone que se localiza en el punto de inyección.

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

Sí

No

No se sabe

Especifíquese:

El MVA fue utilizado como una vacuna contra la viruela en la década de 1970 hacia el final de la campaña de erradicación en 120.000 personas no produjo ningún evento adverso grave. MVA.HTI mantiene las mismas características de patogenicidad. Los efectos se limitan a los derivados de la infección inicial de células receptoras (local).

ChAdOx1.HTI

a) ¿Se diferencia el OMG del receptor en lo que a capacidad de supervivencia se refiere?

Sí

No

No se sabe

Especifíquese:

Aunque la supervivencia y estabilidad del ChAdOx1.HTI es similar al virus original ChAdY25, ChAdOx1.HTI no tiene capacidad de replicación en células que no expresen la región E1 del adenovirus.

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

Sí

No

No se sabe

Especifíquese:

ChAdOx1.HTI es un virus recombinante, completamente deficiente para replicación debido a que la región E1 han sido reemplazada por el casete de expresión para antígenos HTI.

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

Sí

No

No se sabe

Especifíquese:

Al ser ChAdOx1.HTI deficiente para la replicación, su diseminación está limitada al momento de su administración a pacientes.

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

Sí

No

No se sabe

Especifíquese:

ChAdOx1.HTI no se puede replicar, por lo tanto, no es patogénico. La imposibilidad de replicar desde las células originalmente infectadas evita que se propague a otras células, lo que cambia completamente la patogenicidad.

2. Estabilidad genética del organismo modificado genéticamente

MVA.HTI

MVA es un virus genéticamente estable incapaz de integrar su DNA en el genoma del huésped y que permanece localizado en el citoplasma celular hasta la destrucción de la célula.

El OMG MVA.HTI se genera en fibroblastos de embrión de pollo (CEFs) y se purifica por gradiente de densidad de sacarosa. El vector MVA para la vacuna propuesta, es un virus vivo recombinante atenuado mediante pases seriados en CEF que contiene seis grandes deleciones genómicas en relación con el virus parental. El tamaño del genoma MVA tras la inserción de la secuencia codificante HTI se estima ser aproximadamente 179.6 kb. Las modificaciones genéticas del OMG MVA.HTI son estables y se mantienen tras pases sucesivos en CEFs.

La producción del virus recombinante MVA.HTI se realiza por la empresa alemana IDT Biologika y se basa en un sistema de lote semilla, en el que se prepara un lote semilla maestro y un lote semilla de trabajo. Toda la preparación, la verificación de la estabilidad genética y el almacenamiento del lote semilla maestro y el lote semilla trabajo se realiza en IDT Biologika bajo condiciones cGMP y según la normativa de la UE.

La estabilidad genética se verifica en distintos pasos del proceso de producción, mediante análisis de integridad del vector y del inserto (patrón de restricción y secuenciación del transgén), pureza, potencia biológica y seguridad (análisis de ausencia de virus parental), tanto del inóculo inicial fabricado por el Dr. Tomas Hanke, del MSV, del WSV así como del producto final. La estabilidad estándar (Shelf life) asignada a las vacunas derivadas de MVA producidas por IDT bajo condiciones cGMP es de 24 meses cuando se almacenan a -70°C y se repiten las pruebas de estabilidad MVA.HTI de forma anual.

Existe una gran experiencia con la estabilidad de poxvirus recombinantes y MVA recombinantes en particular, no sólo por parte de IDT. Hasta el momento actual, se ha construido en la Universidad de Oxford siete MVA recombinantes que han entrado en ensayos clínicos, dos de ellos transgenes derivados de VIH-1 (HIVA y HIVconsv). Los datos de estabilidad de dos de los productos estrechamente relacionados (MVA85A y MVA.HIVA), que habían pasado por el mismo proceso de fabricación, mostraron estabilidad durante un periodo de 6 años. Los transgenes de HIVA y 85A son 1584 pb y 1107 pb de tamaño respectivamente, y por lo tanto similar al tamaño del gen HTI (1587 pb).

Dentro de los tests de identificación y validación para confirmar la integridad global del genoma del MVA.HTI (por lo tanto de su estabilidad genética) incluye:

a) Identidad por PCR, utilizando los cebadores J1312 y J1205, que producen un producto de 331 pb y confirma la presencia específica del producto HTI.

b) Pureza por PCR: ausencia de producto de PCR específico de la cepa MVA no recombinante. La ausencia de la cepa salvaje de MVA (no recombinante) se comprueba por reacción de PCR utilizando unos cebadores específicos, que producen una banda de 688 pb RPF-específica. El plásmido pRFP sirve como control positivo en la PCR.

c) Identidad por secuenciación del ORF entero del HTI idéntico a la secuencia master.

La monitorización de la estabilidad de los lotes clínicos, tal como se indica en el Expediente de medicamento en Investigación, se realiza de forma periódica usando ensayos de infectividad en CEFs. El título del virus se expresa en unidades formadoras de placa por mililitro (pfu/ml). Se realizan pruebas para testar la estabilidad genética en diferentes puntos de la producción del lote final. La amplificación por PCR y su posterior secuenciación sirve para confirmar la presencia del inserto que codifica para el antígeno HTI así como para descartar la producción de mutaciones o deleciones.

Los tests de estabilidad (titulación) se complementan con ensayos de potencia de inmunogenicidad *in vivo* en ratones.

ChAdOx1.HTI

Una vez administrado, ChAdOx1.HTI se dirige y localiza en el núcleo de la célula huésped, sin embargo, no integra su ADN en el genoma de esta (Rauschhuber *et al.*, 2012; Athanasopoulos *et al.*, 2017).. La integración del ADN de adenovirus en el genoma es un evento extremadamente raro que solo se ha observado en algunos cultivos de líneas celulares primarias humanas (Hogg, 2000). Según las guías de la EMA, los vectores adenovirales se consideran vectores no integradores (EMEA/273974/2005, 2006).

ChAdOx1.HTI es un virus genéticamente estable incapaz de integrar su ADN en el genoma del huésped y que permanece localizado en el citoplasma celular hasta la destrucción de la célula (Rauschhuber *et al.*, 2012; Athanasopoulos *et al.*, 2017).

La estabilidad genética se verifica en distintos pasos del proceso de producción. Durante la fabricación de ChAdOx1.HTI diferentes estudios se realizan en cada uno de los pasos de producción:

- Western blot para confirmar tamaño correcto de la proteína del transgén.
- Secuenciación completa del transgén.
- Secuenciación completa del vector.
- qPCR para confirmar presencia del hexón.
- Análisis del vector con encimas de restricción

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

MVA.HTI y ChAdOx1.HTI

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.

MVA.HTI

Lo mismo que lo mencionado anteriormente para el MVA. La patogenicidad de MVA.HTI no difiere de la de MVA.

La respuesta inmune generada a partir de la infección por el virus vaccinia parental protege a la persona contra la viruela, por este motivo se utilizó como vacuna. La infección por el virus vaccinia es muy leve y normalmente asintomática en individuos sanos, pero puede causar una leve erupción y fiebre. Sin embargo, se producen a veces algunas complicaciones y efectos secundarios, y la probabilidad de que esto ocurra es significativamente mayor en las personas inmunocomprometidas. El MVA sin embargo, que fue utilizado como una vacuna contra la viruela en la década de 1970 hacia el final de la campaña de erradicación en 120.000 personas no produjo ningún evento adverso grave.

Con la erradicación mundial de la viruela, la vacunación de rutina con el virus vaccinia ya no se realiza. Sin embargo, después del ataque de bioterrorismo con ántrax en octubre de 2001, el gobierno de Estados Unidos ha hecho todo lo posible para mejorar la preparación para la liberación intencional o accidental de virus vaccinia. Inicialmente, este comenzó con los intentos de vacunar a un gran número de posibles emergencias y trabajadores de la salud. También ha habido fondos para el desarrollo y la producción de una nueva vacuna contra la viruela, así como el desarrollo de terapias antipoxvirus. Algunos investigadores de laboratorio, trabajadores de la salud, primeros auxilios, y personal militar están siendo todavía vacunados. La vacuna con el virus vaccinia está solamente disponible en los Estados Unidos a través del “Center for Disease Control and Prevention”.

MVA no presenta ningún riesgo de integración o activación de provirus latentes, puesto que el vector se encuentra exclusivamente en el citoplasma y es altamente improbable que se produzca una diseminación significativa de las partículas infecciosas fuera del punto de inyección.

ChAdOx1.HTI

Como ya mencionado anteriormente en los apartados B.7. (b) y D.3.(b) y según la Directiva 2000/54/CE (Directiva 2000/54/EC, 2000), los adenovirus se clasifican como agentes biológicos de tipo 2 debido a su limitada patogenicidad.

Los adenovirus humanos comúnmente causan infección asintomática en humanos, aunque también pueden causar infecciones del tracto respiratorio, gastrointestinales, incomodidad o infecciones oculares de severidad variable. Son más comunes en niños y en la población inmunocomprometida. El período de incubación varía de 1 a 10 días. La mayoría de la población es seropositiva para más de una subespecie de adenovirus y puede producir rápidamente anticuerpos neutralizantes.

Normalmente, el virus se infecta a través del tracto respiratorio o los ojos a través de aerosoles producidos por personas infectadas. La mayoría de las infecciones son de naturaleza leve. Los adenovirus raramente se integran en el genoma de las células huésped y no persisten en los tejidos linfoides.

Las infecciones por adenovirus en primates no humanos (NHP) también son predominantemente leves.
Adenovirus inhabilitados para la replicación se han utilizado ampliamente en ensayos clínicos.
Los adenovirus que carecen de la región E1 se clasificaron como agentes biológicos de nivel de bioseguridad de clase 1.
Los fragmentos o secuencias incluidos en el inmunogéno HTI no participan en las propiedades patógenas del virus.

4. Descripción de los métodos de identificación y detección

a) Técnicas utilizadas para detectar el OMG en el medio ambiente:
No hay previstas técnicas de detección e identificación en el medio ambiente.

b) Técnicas utilizadas para identificar el OMG:

MVA.HTI

La mayoría de los métodos que se usan en la caracterización final del MVA.HTI durante el desarrollo, procesos de control durante la producción y test de liberación, son métodos estandarizados, previamente usados y validados (de forma apropiada para el uso del material en fases clínicas tempranas) para diferentes MVAs.

Dentro de los ensayos de identificación del genoma del MVA.HTI se incluye:

- (a) Identidad por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los cebadores J1312 y J1205, que producen un producto de 331 pb y confirma la presencia específica del producto HTI.
- (b) La Identidad por secuenciación del ORF entero del HTI idéntico a la secuencia master
- (c) La identidad del MVA se puede confirmar por PCR. Está basada en la ausencia de genes deleccionados del virus vaccinia wildtype, características de la cepa MVA. La ausencia de la cepa parental de MVA (no recombinante), MVA.RFP, se comprueba por reacción de PCR utilizando los cebadores específicos que producen una banda de 688 pb RFP-específica. El plásmido pRFP sirve como control positivo en la PCR.

Tras la recombinación con el plásmido de transferencia del inserto HTI, el ADN se extrae de la muestra de virus. Mediante PCR, se amplifican secuencias concretas de ADN. Los cebadores de PCR están diseñados de tal forma que son únicos para la detección del inserto HTI y la detección de virus MVA parental. La amplificación del fragmento de ADN del tamaño adecuado confirma la pureza del MVA.HTI.

La inmunogenicidad del MVA.HTI se demuestra en ratones C57BL/6 y macacos reshus.

ChAdOx1.HTI

Los adenovirus se detectan mediante PCR según secuencias genéricas de adenovirus de chimpancé o específicas para ChAdOx1.HTI. También pueden detectarse con

ensayos de inmunocitoquímica utilizando anticuerpos específicos anti-hexón de ChAdY25.

Durante la fabricación de ChAdOx1.HTI diferentes estudios se realizan en cada uno de los pasos de producción:

- Western blot para confirmar tamaño correcto de la proteína del transgén.
- Secuenciación completa del transgén.
- Secuenciación completa del vector.
- qPCR para confirmar presencia del hexón.
- Análisis del vector con enzimas de restricción.

F. Información sobre la liberación

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

Ambos OMGs, MVA.HTI y ChAdOx1, se han desarrollado como candidatos a vacunas terapéutica para el VIH- 1. La liberación de estos OMGs es necesaria para la realización del propuesto ensayo clínico en España (fase I), administrado en combinación con el plásmido DNA.HTI en personas no infectadas por VIH-1.

El ensayo propuesto, ‘Estudio de seguridad y respuesta inmunológica a la combinación de las vacunas DNA.HTI y MVA.HTI para el VIH-1 en pacientes VIH-1 positivos tratados de forma precoz’, con código AELIX-002, es un ensayo fase I, que incluirá 45 sujetos. El ensayo propuesto, tiene por finalidad testar la seguridad e inmunogenicidad, y la capacidad de los OMGs (MVA.HTI y ChAdOx1.HTI) administrado en secuencia con un plásmido que contiene el mismo transgén (DNA.HTI) para reducir el reservorio viral. En las primeras dos partes de AELIX-002 (denominado A y B y cubierto por el expediente B/ES/16/11) la pauta de vacunación consistía en una dosis de 4 mg de DNA-HTI durante las semanas 0, 4 y 8, seguida de la administración de 2×10^8 pfu MVA.HTI las semanas 12 y 20. La Administración ser realizo por vía intramuscular. En la tercera parte del estudio (AELIX-002C, cubierto exclusivamente por este expediente) la pauta de vacunación consiste en una dosis de 5.0×10^{10} Vp de ChAdOx1.HTI en las semanas 0 y 12 y una dosis de MVA.HTI en semana 24. Un criterio de inclusión importante es que para la transición de AELIX-002A y B a AELIX-2C (son los mismos sujetos), los participantes deben haber recibido la última dosis de MVA.HTI del régimen DDDMM al menos 180 días antes de comenzar CCM en AELI-002C.

Ensayos clínicos con candidatos altamente similares, como el MVA.HIVconsv o el MVA.HIVA, han sido usados en diferentes ensayos clínicos fase I/IIa completados (NCT01712425, NCT02099994, NCT01151319, NCT00982579 and NCT01371175) junto con otros candidatos como ChAdV63.HIVconsv, pSG2.HIVconsv ADN y pTHr.HIVA ADN.

No se espera ningún impacto ambiental significativo de la liberación del OMG durante la realización del ensayo clínico.

Los detalles del diseño del ensayo y de sus objetivos se encuentran en el protocolo adjunto.

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

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo, especifíquese: No aplica. El ChAdOx1 o MVA no existe de forma natural en nuestro ecosistema. El anfitrión natural del adenovirus ChAdY25 de tipo salvaje es el chimpancé. El adenovirus parental no se encuentra en el ecosistema natural fuera de su huésped natural. El organismo parental se aisló de las heces de un chimpancé y se modificó genéticamente.	

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

a) Localización geográfica (región administrativa y coordenadas de referencia cuando proceda): La preparación y las vacunaciones con MVA.HTI y ChAdOx1.HTI se realizarán en la Unidad Polivalente de Investigación Clínica (UPIC), localizada en la planta 2 del edificio maternal del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, situado en la Ctra. Canyet, s/n, 08916 Badalona. Primero se usará la sala de preparación de medicación, de tipo BSL-1 (4.4 m ²). La administración a los pacientes se realizará en las consultas contiguas.
b) Área del lugar (m ²): (i) lugar real de la liberación (m ²): consulta de la UPIC del centro (Unidad Polivalente de Investigación Clínica) 22 m ² (ii) área de liberación más amplia (m ²): la misma y nunca superior a 22 m ²
c) Proximidad a biotipos reconocidos internacionalmente o zonas protegidas (incluidos depósitos de agua potable) que pudieran verse afectados: No aplica, la afectación a estas áreas no es posible.
d) Flora y fauna, incluidos cultivos, ganado y especies migratorias que pueden potencialmente interactuar con el OMG: No aplica, la afectación a estas áreas no es posible.

4. Método y amplitud de la liberación

a) Cantidad de OMG que vaya a liberarse:
--

Se incluirán un máximo de 45 personas (30 sujetos recibirán el tratamiento y 15 recibirán placebo) que cumplan los criterios de inclusión y exclusión, que recibirán dos dosis de ChAdOx1.HTI (5.0×10^{10} Vp de ChAdOx1.HTI en las semanas 0 y 12) y una dosis de MVA.HTI (2×10^8 pfu MVA.HTI en la semana 24).

b) Duración de la operación:

Cada vacunación dura unos minutos.

Todos los pacientes serán seguidos 68 semanas después de la vacunación inicial (desde el inicio hasta 44 semanas después de la última vacuna). Se permitirá un período de 8 semanas desde la evaluación hasta la visita inicial (primera vacuna).

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

El OMG se libera únicamente para uso clínico.

El personal implicado en la preparación del producto trabaja según las condiciones especificadas en la normas de Buenas Practicas Clínicas y de Buenas Prácticas de Fabricación. Los laboratorios de fabricación de MVA.HTI y ChAdOx1, IDT Biologika GmbH (Alemania) y ReiThera/Advent (Italia), preparan y envasan los producto en viales sellados herméticamente y etiquetados en forma adecuada. Los viales serán enviados mantenidos a -80°C y almacenados hasta su uso en el Servicio de Farmacia del Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona. La administración se realiza bajo responsabilidad del investigador, de acuerdo con un protocolo clínico y respetando las Normas de Buena Práctica Clínica.

El personal que preparará las vacunas utilizará técnicas estériles (guantes, mascarillas y batas desechables). El producto se preparará en condiciones asépticas, en cumplimiento adecuado a la preparación de inyectables en una sala cerrada con características BSL-1. La solución se transferirá a una jeringa de 1 ml de insulina en condiciones asépticas mediante un dispositivo de transferencia de sistema cerrado validado (CSTD). El área utilizada para la preparación para su inyección debe descontaminarse antes y después de la manipulación con jabón desinfectante Safe Seft® y alcohol de 70°C .

Después de la preparación, las vacunas se administrarán en una habitación contigua en el UPIC. El personal que administrará el producto a los pacientes utilizará 'precauciones universales'. Las bateas en las que se colocan las jeringas con el producto hasta su administración se limpian con jabón antiséptico que contiene un 4% de digluconato de clorhexidina antes y después de su uso. El lugar de inoculación de la vacuna de los pacientes (zona deltoidea) se limpia con clorhexidina digluconato al 2% hasta su evaporación antes de la inyección y se cubre apropiadamente tras la administración. El material utilizado durante la preparación y administración se considera residuo sanitario Grupo III y se gestionará como tal. Concretamente, las tallas, guantes, mascarilla, bata, agujas se desecharán en en contenedores herméticos amarillos específicos para residuos sanitarios de grupo III disponibles tanto en la sala de preparación como consulta de administración de la UPIC. Los viales utilizados se devolverán al servicio de farmacia en contenedores

cerrados para su destrucción al finalizar el estudio siguiendo los protocolos del servicio de farmacia.

Todas las transferencias del producto (desde el Servicio de Farmacia a UPIC, dentro de la UPIC y la devolución de los viales usados) se realizan utilizando un contenedor cerrado. La transferencia de la solución a las jeringas se realiza usando un sistema de transferencia cerrado validado (CSTD). Más aún, los empleados seguirán la política hospitalaria o clínica estándar recomendada para la manipulación de vacunas con virus vivos.

En caso de contaminación accidental, cada superficie contaminada deberá tratarse de acuerdo con los procedimientos establecidos por el promotor del ensayo clínico. Todo el personal implicado en la manipulación del producto debe ser informado de que en caso de contaminación cutánea hay que lavar inmediatamente la piel profusamente con agua y desinfectar localmente con yodo al 4% y, en caso de contaminación ocular, se recomienda lavar y enjuagar únicamente con agua. Se debe realizar asimismo una evaluación por el oftalmólogo tan pronto como sea posible. No está proyectado ningún análisis biológico específico para el personal que maneje el producto.

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

No aplica. Todas las preparaciones y vacunaciones se realizarán en las consultas de la UPIC del Hospital Germans Trias i Pujol de Badalona.

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

MVA.HTI

MVA.HTI obtuvo permiso de liberación (**expediente B/ES/16/11**) y ha sido utilizado en las dos primeras fases del ensayo clínico AELIX-002.

ChAdOx1.HTI

No existen liberaciones anteriores de ChAdOx1.HTI.

No obstante, existen liberaciones previas de OMG con insertos altamente similares (B/ES/12/10 y B/ES/15/12).

Vectores de chimpancé similares también han sido ya utilizados en dos notificaciones previas para la liberación voluntaria de adenovirus recombinantes en ensayos clínicos (B/ES/12/09 y B/ES/16/07).

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

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

i) Orden y taxón superior (animales): Primates
ii) Familia (plantas): Hominidae
iii) Género: Homo
iv) Especie: sapiens
v) Subespecies: sapiens
vi) Cepa: no aplica
vii) Cultivar/Línea de reproducción: no aplica
viii) Patovar:
ix) Nombre vulgar: humano

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

[Desarrollo de respuestas celulares T VIH-1 específicas dirigidas contra las regiones incluidas en el inmunógeno HTI.](#)

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

[La posibilidad de transferencia génica a otras especies es mínima en las condiciones de liberación propuestas para los OMG. Ambos OMG se administrarán en las unidades hospitalarias mencionadas anteriormente y es improbable que entren en contacto con otras especies animales.](#)

[MVA.HTI](#)

[Para que el gen codificado HTI se transfiera al genoma de otras especies de poxvirus, las células propensas tendrían que ser infectadas por un poxvirus y a la vez ser transducidas por el vector, lo que resulta extremadamente improbable.](#)

[ChAdOx1.HTI](#)

[Al ser ChAdOx1.HTI inoculado a sujetos que también serán inoculados con MVA.HTI posteriormente a ChAdOx1.HTI, cabe la posibilidad que el gen codificado HTI se transfiera del genoma de uno a otro por recombinación homóloga, sea deletado de uno de ellos o duplicado en el otro. La consecuencia de este](#)

improbable suceso sería inocua, ya que primero, ninguno de los dos adenovirus tiene capacidad de replicación y segundo, los fragmentos o secuencias incluidos en el inmunógeno HTI no participan en las propiedades patógenas del virus.

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: En el caso del OMG (ChAdOx1.HTI) es un adenovirus recombinado de chimpancé, vivo sin capacidad de replicación debido a deleciones y modificaciones genómicas. Por lo tanto, ChAdOx1.HTI debería tener competitividad e invasividad reducidas en comparación con el virus de la ChAdY25.		

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

No es probable que los OMG puedan ser liberados al ecosistema así como su diseminación desde el lugar de liberación, porque tienen una selección de huéspedes muy limitada y por la forma propuesta para su liberación.

Dadas las características de la atenuación y/o modificaciones que afecta la capacidad de replicación, así como por las modalidades de liberación que se prevén en este estudio, no es probable que los OMG puedan ser liberados al ecosistema ni puedan ser diseminados desde el lugar de liberación. En el caso de los MVAs, estos han sido utilizados ampliamente en ensayos clínicos, tanto en administración directa como en estrategias de terapia celular (contenidos en el interior de células).

En el caso improbable de que se produzca la administración involuntaria a organismos distintos del objetivo, la posterior diseminación sería improbable debido a la incapacidad de ambos de replicarse.

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.

No aplica.

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: Altamente improbable</p>
<p>b) De otros organismos al OMG: Altamente improbable. Como ha sido mencionado previamente en la sección G.3, al ser ChAdOx1.HTI inoculado a sujetos que también serán inoculados con MVA.HTI, cabe la posibilidad que la región HTI se transfiera del genoma de uno a otro por recombinación homóloga, sea deletado de uno de ellos o duplicado en el otro.</p> <p>La posibilidad de recombinación con otros virus no puede ser excluida ya que ChAdOx1.HTI podría, teóricamente, intercambiar su material genético con un adenovirus silvestre si la misma célula fuese coinfectada por ambos. En este caso, ChAdOx1.HTI podría readquirir su capacidad de replicación. La probabilidad de que ocurra esto es extremadamente baja debido a que ChAdOx1.HTI es incapaz de replicarse, por lo que la infección involucraría a un número muy limitado de partículas virales, que además serían rápidamente eliminadas por el sistema inmune. Por todo esto, en el hipotético caso de que una posible transmisión horizontal ocurra, no tendrían ningún efecto sobre la salud de las personas en contacto con el sujeto vacunado. Además, individuos que han estado expuestos naturalmente a adenovirus de tipo silvestre desarrollan anticuerpos neutralizantes que constituyen una barrera adicional que protege contra la posible transmisión horizontal de vectores adenovirales.</p> <p>De la misma manera, en caso de co-infección con un adenovirus silvestre, podría darse el caso en que el gen HTI sea transferido al adenovirus silvestre, competente en replicación. Requeriría co-localización / co-infección de las mismas células en el mismo huésped, lo que es muy poco probable, especialmente en humanos, porque ChAdOx1.HTI es un adenovirus de chimpancé y la homología es menor.</p>
<p>c) Consecuencias probables de la transferencia de genes: Ninguna, dado que el HTI es una secuencia diseñada exclusivamente para la inducción de respuesta celular T específica a través de 26 péptidos superpuestos del genoma del VIH, por lo que no es patogénica.</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.)**

No existen.

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

No aplica.

H. Información sobre el seguimiento

1. Métodos de seguimiento de los OMG

MVA.HTI

Los MVA han sido utilizados ampliamente en ensayos clínicos, tanto en administración directa como en estrategias de terapia celular (contenidos en el interior de células). Debido pues al conocimiento adquirido en estos ensayos clínicos y otras estrategias en terapia celular, no se ha planificado llevar a cabo ninguna detección viral específica relacionada con el MVA.HTI en líquidos biológicos ni en sangre durante el ensayo clínico propuesto.

ChAdOx1.HTI

Los adenovirus de chimpancé son cada vez más utilizados en ensayos clínicos como una alternativa ventajosa con respecto a los adenovirus humanos debido a su gran capacidad para generar respuesta inmune, la posibilidad de insertar secuencias más largas y la falta de inmunidad contra el vector debido a la no exposición previa. No se espera ninguna supervivencia del ChAdOx1.HTI dado que se encuentra exclusivamente en el citoplasma de la célula y es incapaz de producir partículas de vector en células humanas fuera del lugar de inoculación. La posibilidad de transferencia génica a otras especies es mínima en las condiciones de liberación propuestas.

Debido pues al conocimiento adquirido en ensayos clínicos previos y a otras estrategias en terapia celular, no se ha planificado llevar a cabo ninguna detección viral específica relacionada con el ChAdOx1.HTI en líquidos biológicos ni en sangre durante el ensayo clínico propuesto.

MVA.HTI y ChAdOx1.HTI

Se realizará monitorización de efectos secundarios del tratamiento en ensayo mediante exploración física, analíticas de sangre y comunicación de eventos adversos. La evaluación de la seguridad se realizará a lo largo de la participación de los pacientes en el ensayo clínicos y hasta 12 semanas después de la última inyección en el estudio (ver detalle en protocolo adjunto).

2. Métodos de seguimiento de las repercusiones en el ecosistema

No se ha planificado llevar a cabo ningún método de seguimiento sobre las repercusiones en el ecosistema dado que el OMG no se encuentra de manera natural en el medio ambiente y no tiene una capacidad replicativa, por lo que se considera que no hay posibilidades de que haya repercusiones en el ecosistema ya que el OMG en cuestión no tiene capacidad infecciosa. Se monitorizarán de forma clínica a los pacientes.

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

No planificados dado que este suceso es altamente improbable (ver apartados anteriores).

4. Tamaño del área de seguimiento (m²)

No aplicable. Los OMG se administran a los pacientes mediante inyección intramuscular en consultas hospitalarias, como se ha descrito en la sección F.

5. Duración del seguimiento

La evaluación de la seguridad se realizará a lo largo de la participación de los pacientes en el ensayo clínico, incluidas las fases de extensión en el caso de que las hubiera.

6. Frecuencia del seguimiento

No aplica

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

1. Tratamiento del lugar tras la liberación

La suspensión de virus se transferirá a una jeringa de 1 ml de insulina en condiciones asépticas mediante un dispositivo de transferencia de sistema cerrado validado (CSTD). El lugar de preparación se limpiará con Safe Seft® y alcohol 70° (desinfectantes aprobados por uso GMP) antes y después de la liberación. Las bateas en las que se colocan las jeringas con el producto hasta su administración se limpian con jabón antiséptico que contiene un 4% de digluconato de clorhexidina antes y después de su uso.

El lugar de inoculación de la vacuna de los pacientes (zona deltoidea) se limpia con clorhexidina digluconato al 2% hasta su evaporación antes de la inyección y se cubre apropiadamente tras la administración con una tirta.

2. Tratamiento del OMG tras la liberación

El traslado del material utilizado para la preparación e inyección del OMG se realizará en contenedor amarillo herméticamente sellado especial etiquetada mediante la pegatina de RESIDUOS SANITARIOS – GRUPO III disponible tanto en la sala de preparación como de administración y descontaminarse antes de desecharlo.

3(a) Tipo y cantidad de residuos producidos

Se prevé generar los siguientes residuos: Viales de vacuna, tallas, jeringas, agujas, sistemas cerrados (CSTD), guantes, batas, mascarilla, tiritas/esparadrapo (45 personas en total reclutado, 30 tratados con MVA.HTI dos veces cada uno).

3(b) Tratamiento de residuos

Se introducirán en los siguientes recipientes herméticamente sellados:

Residuos Infecciosos Sólidos:

Deben ir siempre en contenedores de tapa amarilla de cierre hermético etiquetados específicamente para Residuos Sanitarios de Grupo III.

Residuos de Objetos Cortantes o Punzantes:

Se depositarán en contenedores específicos, rígidos y estancos, color amarillo, adecuados en tamaño y forma al uso que se les va a dar. La jeringa de administración adherida al sistema CSTD y aguja se deposita en estos contenedores sin desmontar.

El vial de vacuna usado adherido al adaptador sistema CSTD se devolverá al servicio de farmacia en un contenedor cerrado para su destrucción a la finalización del estudio siguiendo los protocolos específicos del estudio.

La retirada y el cierre final de los contenedores, se llevará a cabo por personal adecuadamente formado y siguiendo las medidas de protección adecuadas.

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 contaminación el personal involucrado en la preparación, envasado o administración del producto se notificará al investigador principal y al Servicio de Prevención de Riesgos Laborales.

Todo el personal recibirá instrucciones sobre los procedimientos a actuar en caso de liberación accidental.

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

El lugar en el que se produzca la liberación se limpiará con hipoclorito sódico diluido al 1%.

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.

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

En el caso de contacto con la piel se realizarán lavados enérgicos y posteriormente se desinfectará con una solución con Yodo al 4%. En caso de contacto con los ojos se realizarán lavados con suero salino por un tiempo no inferior a los 15 minutos. El sujeto tendrá que ser valorado por un oftalmólogo en el menor tiempo posible.

En caso de pinchazo accidental se realizará inmediatamente abundante lavado con agua y jabón y posteriormente la zona de punción será desinfectada con solución de Yodo al 9-12% durante al menos 5 minutos.

Los voluntarios incluidos en el ensayo clínico serán monitorizados como está previsto por el protocolo según normas de buenas prácticas clínicas. Se registrarán y notificarán los acontecimientos adversos según los procedimientos detallados en el protocolo. Debido a las modalidades de administración el riesgo de liberación ambiental accidental es muy bajo. Además, al tratarse de un virus sin capacidad replicativa, el riesgo ambiental consecuente a liberación accidental puede considerarse mínimo.

References

- Athanasopoulos, T, Munye, MM and Yanez-Munoz, RJ (2017). "Nonintegrating Gene Therapy Vectors." Hematol Oncol Clin North Am **31**(5): 753-770.
- Dicks, MD, Spencer, AJ, Edwards, NJ, Wadell, G, Bojang, K, Gilbert, SC, Hill, AV and Cottingham, MG (2012). "A novel chimpanzee adenovirus vector with low human seroprevalence: improved systems for vector derivation and comparative immunogenicity." PLoS One **7**(7): e40385.
- Directiva 2000/54/EC (2000). "Protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo."
- Drexler, I, Staib, C and Sutter, G (2004). "Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential?" Curr Opin Biotechnol **15**(6): 506-512.
- Edmund Wee (2015). Assessment of shedding of the ChAdV63.HIVconsV and MVA.HIVconsV vaccines after immunization in the urine of vaccine recipients in clinical trial BCN 01. UK, University of Oxford.
- EMA/273974/2005. "Guideline on non-clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors" (Last Updated 16/11/2006). European Medicines Agency (EMA), London, UK. Retrieved 02/06/2015 from http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500003982.pdf.
- Ferreira, TB, Alves, PM, Aunins, JG and Carrondo, MJ (2005). "Use of adenoviral vectors as veterinary vaccines." Gene Ther **12 Suppl 1**: S73-83.
- Gilbert, SC (2013). "Clinical development of Modified Vaccinia virus Ankara vaccines." Vaccine **31**(39): 4241-4246.
- Hillis, WD and Goodman, R (1969). "Serologic classification of chimpanzee adenoviruses by hemagglutination and hemagglutination inhibition." J Immunol **103**(5): 1089-1095.
- Hogg, JC (2000). "Latent adenoviral infection in the pathogenesis of emphysema: the Parker B. Francis Lectureship." Chest **117**(5 Suppl 1): 282S-285S.
- Im, EJ and Hanke, T (2004). "MVA as a vector for vaccines against HIV-1." Expert Rev Vaccines **3**(4 Suppl): S89-97.
- Kovesdi, I and Hedley, SJ (2010). "Adenoviral producer cells." Viruses **2**(8): 1681-1703.
- Le Gall, S, Stamegna, P and Walker, BD (2007). "Portable flanking sequences modulate CTL epitope processing." J Clin Invest **117**(11): 3563-3575.

Mayr, A, Stickl, H, Muller, HK, Danner, K and Singer, H (1978). "[The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]." Zentralbl Bakteriol B **167**(5-6): 375-390.

Meisinger-Henschel, C, Schmidt, M, Lukassen, S, Linke, B, Krause, L, Konietzny, S, Goesmann, A, Howley, P, Chaplin, P, Suter, M and Hausmann, J (2007). "Genomic sequence of chorioallantois vaccinia virus Ankara, the ancestor of modified vaccinia virus Ankara." J Gen Virol **88**(Pt 12): 3249-3259.

Meisinger-Henschel, C, Spath, M, Lukassen, S, Wolferstatter, M, Kachelriess, H, Baur, K, Dirmeier, U, Wagner, M, Chaplin, P, Suter, M and Hausmann, J (2010). "Introduction of the six major genomic deletions of modified vaccinia virus Ankara (MVA) into the parental vaccinia virus is not sufficient to reproduce an MVA-like phenotype in cell culture and in mice." J Virol **84**(19): 9907-9919.

Mothe, B, Hu, X, Llano, A, Rosati, M, Olvera, A, Kulkarni, V, Valentin, A, Alicea, C, Pilkington, GR, Sardesai, NY, Rocafort, M, Crespo, M, Carrillo, J, Marco, A, Mullins, JI, Dorrell, L, Hanke, T, Clotet, B, Pavlakis, GN, Felber, BK and Brander, C (2015). "A human immune data-informed vaccine concept elicits strong and broad T-cell specificities associated with HIV-1 control in mice and macaques." J Transl Med **13**(1): 60.

Mothe, B, Llano, A, Ibarondo, J, Daniels, M, Miranda, C, Zamarreno, J, Bach, V, Zuniga, R, Perez-Alvarez, S, Berger, CT, Puertas, MC, Martinez-Picado, J, Rolland, M, Farfan, M, Szinger, JJ, Hildebrand, WH, Yang, OO, Sanchez-Merino, V, Brumme, CJ, Brumme, ZL, Heckerman, D, Allen, TM, Mullins, JI, Gomez, G, Goulder, PJ, Walker, BD, Gatell, JM, Clotet, B, Korber, BT, Sanchez, J and Brander, C (2011). "Definition of the viral targets of protective HIV-1-specific T cell responses." J Transl Med **9**: 208.

Rauschhuber, C, Noske, N and Ehrhardt, A (2012). "New insights into stability of recombinant adenovirus vector genomes in mammalian cells." Eur J Cell Biol **91**(1): 2-9.

Shizuya, H, Birren, B, Kim, UJ, Mancino, V, Slepak, T, Tachiiri, Y and Simon, M (1992). "Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(18): 8794-8797.

Wold, WS and Toth, K (2013). "Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy." Curr Gene Ther **13**(6): 421-433.

Zhang, SC, Martin, E, Shimada, M, Godfrey, SB, Fricke, J, Locastro, S, Lai, NY, Liebesny, P, Carlson, JM, Brumme, CJ, Ogbechie, OA, Chen, H, Walker, BD, Brumme, ZL, Kavanagh, DG and Le Gall, S (2012). "Aminopeptidase substrate preference affects HIV epitope presentation and predicts immune escape patterns in HIV-infected individuals." J Immunol **188**(12): 5924-5934.