

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/EC

A. Información de carácter general:

1. Detalles de la notificación

a) Estado miembro de la notificación:	España
b) Número de la notificación:	
c) Fecha del acuse de recibo de la notificación:	
d) Título del proyecto:	Estudio multicéntrico, doble ciego, controlado con placebo y aleatorizado de TroVax [®] frente a placebo en el tratamiento de primera línea de pacientes con cáncer colorrectal metastásico que reciben el tratamiento antineoplásico – EFC10528.
e) Período propuesto para la liberación:	Se prevé que el ensayo comience en Octubre de 2008 y se extienda hasta 4 años

2. Notificador

Nombre de la institución o empresa:	Sanofi-Aventis Recherche et Développement 1, Avenue Pierre Brossolette 91385 Chilly-Mazarín France
Contacto:	Mrs Marie-Caroline Smadja Regulatory Development
Teléfono:	+33 (1) 01 60 49 52 85

3. Definición de la OMG

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

Poxviridae, Vaccinia

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

El genoma del MVA es aproximadamente 30 kb menor que el parental Ankara aislado (208 kb). Existen seis regiones principales de delección cuyo tamaño oscila entre 1 y 6 kb, denominadas del I a del VI. Debido a que estas regiones contienen genes no funcionales a causa de su interrupción genética, la recombinación se dirige hacia ellas. En teoría, esto evitará más interrupciones génicas y alteraciones fenotípicas.

Debido al tamaño del genoma del MVA, 180 kb, no ha sido posible asignar una función inequívoca a todos los marcos abiertos de lectura. No obstante, se conocen bastante bien los factores que contribuyen a la patogenicidad. Los estudios sobre marcadores del MVA indican que la atenuación del MVA en células de mamíferos se debe a defectos en al menos tres genes. Por lo tanto es muy improbable que una futura inestabilidad genética provoque la reversión del MVA en un virus de replicación competente. Las características de atenuación se han conservado a lo largo de los estudios donde se han utilizado estos vectores.

Además, al administrar el MVA a aproximadamente 120.000 pacientes no hubo indicios que mostraran una reversión del MVA a su estado virulento (*Mayr A and Danner K. Significance of animal pox for man following elimination of compulsory vaccination against smallpox. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift 1979; 92:251-256*).

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: BE, CZ, DE, FR, GB, HU, IT, NL, PL	

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: Bélgica, República Checa, Alemania, Francia, Gran Bretaña, Hungría, Italia, Holanda y Polonia - Número de la notificación: .../.../....	

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

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

En caso afirmativo:

- Estado miembro de la notificación: Argentina, Chile, China, Hong Kong, Japón, República de Corea, Malasia, Filipinas, Federación Rusa, Singapur, Sudafrica, Taiwán, Tailandia, Turquía y Estados Unidos.
- Número de la notificación: .../.../.....

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

El impacto medioambiental previsible es bajo por los siguientes motivos:

7.1 Características que afectan a la multiplicación y diseminación

7.1.1 Características biológicas que afectan a la supervivencia, multiplicación y dispersión:

El OMG (TroVax[®]) está basado en MVA. El MVA ha sido incapaz de replicarse en todas las células de mamíferos probadas excepto en las células de riñón de hámster neonato (BHK-21). El MVA no es patógeno en animales incluidos ratones, conejos y primates lactantes. Es improbable que sobreviva en el medio ambiente. En estudios donde se ha retirado el apósito dos horas después de la administración y se ha frotado el lugar de inyección para recoger cualquier resto de TroVax[®], se ha observado que la cantidad de vector restante es menor de 1/10.000 parte de la dosis original. Es improbable que esta concentración constituya un riesgo para el medio ambiente.

7.1.2. Condiciones ambientales, conocidas o previstas, que puedan afectar a la supervivencia, multiplicación y diseminación (viento, agua, suelo, temperatura, pH, etc.)

No procede.

7.1.3 Sensibilidad a factores específicos

Por lo general, los poxvirus (como el MVA) son muy sensibles a todos los sistemas de desinfección habituales autorizados y las técnicas de esterilización habituales (térmica, química y/o por radiación) suelen ser eficaces.

7.2 Interacciones con el medio ambiente

7.2.1 Hábitat predicho de los OMG

Los poxvirus son muy estables bajo condiciones ambientales normales (párrafo 19 ACDP & ACGM “Vaccination of laboratory workers handling vaccinia and related poxviruses infectious for humans”: 1990).

En el caso de los virus vaccinia de replicación competente, se sabe que permanecen en la escara de vacunación tras la escarificación (Anexo III, parte 2B, párrafo 69 de ACGM ‘Compendium of Guidance from the Health and Safety Commissions Advisory Committee on the genetic modification’). En el caso de vectores de MVA, no se da la replicación, por lo tanto no hay escaras en el lugar de inoculación.

En ensayos clínicos realizados anteriormente, se muestra, que tras la administración de TroVax[®], el paciente no presenta ningún riesgo para el personal sanitario o para el medio ambiente. El lugar de administración se frota

con alcohol. Se aplica, como precaución adicional, un vendaje oclusivo. Tras frotar con alcohol el lugar de inyección, no se detecta el vector. En estudios donde se ha retirado el apósito dos horas después de la administración y se ha hisopado el lugar de inyección para recoger cualquier resto de TroVax[®], se ha observado que la cantidad de vector restante es menor de 1/10.000 parte de la dosis original. Es improbable que esta concentración constituya un riesgo para el medio ambiente.

7.2.2 Capacidad de transferencia génica

7.2.2.1 Transferencia de material génico después de la liberación del OMG a organismos de los ecosistemas afectados

La recombinación entre poxvirus estrechamente relacionados es posible en condiciones naturales. Aunque el MVA puede infectar a la mayoría de las especies de mamíferos, no es capaz de replicarse en las células humanas primarias y, además, las células infectadas mueren a causa de la infección. Durante la infección, salvo en células permisivas para la replicación del virus (p.ej. células CEF o BHK-21), no se producen partículas infecciosas. Dada la breve duración de la infección, es muy improbable que se produzca la recombinación en condiciones naturales entre el MVA y otros poxvirus y por lo tanto, que se transfiera material génico a otros organismos.

7.2.2.2 Transferencia de material génico después de la liberación de organismos endógenos al OMG

Dado que no se considera que los virus vaccinia como el MVA tengan un reservorio natural, no se espera que se produzca transferencia. El MVA se ha utilizado mucho y no se ha observado transferencia de material génico.

7.2.3 Probabilidad de selección posliberación que lleve a la expresión de rasgos inesperados y/o no deseados en el organismo modificado

La presencia del gen 5T4 no es un rasgo propicio de selección bajo condiciones naturales. No aporta ninguna función en particular al MVA o a las células humanas que hospedan al MVA.

7.2.4 Medidas empleadas para garantizar y verificar la estabilidad genética. Descripción de las características genéticas que pudieran evitar o minimizar la dispersión del material génico. Métodos de verificación de la estabilidad genética

Para evaluar la estabilidad genética, se emplearon las siguientes medidas: secuenciación y análisis por PCR de los lotes clínicos finales.

Puesto que el MVA solamente se puede replicar en células permisivas (CEF y BHK), la dispersión quedará limitada al primer organismo infectado.

Los análisis de secuenciación y Southern de los cultivos de reserva de cepa madre vírica y de los lotes clínicos finales (TroVax[®]), producidos hasta 8 pases más tarde, utilizando condiciones similares a las usadas en la elaboración de virus normales, han demostrado que el transgén es genéticamente estable tras múltiples pases. Con la técnica de doble inmunotinción del mismo virus p8, se demostró que, en más del 99% de las placas donde se cultivó MVA, las

proteínas 5T4 se expresaron en los CEF. De manera similar, el análisis Western indicó que no existían cambios detectables en la expresión de la proteína transgénica entre el cultivo de reserva de cepa madre del virus y los lotes clínicos finales.

7.2.5 Vías de dispersión biológica, tipos de interacción, posibles o conocidos, con el agente de diseminación, tales como la inhalación, ingestión, contacto de superficies, etc.

Los poxvirus son muy estables bajo condiciones ambientales normales (párrafo 19 ACDP & ACGM “Vaccination of laboratory workers handling vaccinia and related poxviruses infectious for humans”: 1990). En el caso de los virus vaccinia de replicación competente, se sabe que permanecen en la escara de vacunación tras la escarificación (Anexo III, parte 2B, párrafo 69 de ACGM ‘Compendium of Guidance from the Health and Safety Commissions Advisory Committee on the genetic modification’). En el caso de vectores de MVA, no se da la replicación, por lo tanto no hay escaras en el lugar de inoculación.

En ensayos clínicos realizados anteriormente, se muestra que tras la administración de TroVax[®], el paciente no presenta ningún riesgo para el personal sanitario o para el entorno. El lugar de administración se frota con alcohol. Se aplica, como precaución adicional, un vendaje oclusivo. En estudios donde se ha retirado el vendaje dos horas después de la administración y se ha frotado el lugar para recoger cualquier resto de TroVax[®], se ha observado que la cantidad de vector restante es menor de 1/10.000 parte de la dosis original. Es improbable que esta concentración constituya un riesgo para el medio ambiente.

En el estudio en fase I/II sobre el agente único, se detectó el vector en seis de 22 pacientes, en una muestra de sangre cada vez. En estos seis pacientes, salvo en dos de ellos, el vector desapareció a las 24 horas. En los dos pacientes donde se detectó el vector tras 24 horas, su concentración estaba por debajo del umbral del ensayo por lo que se consideró insignificante. Las concentraciones del vector detectadas en la circulación sanguínea del paciente fueron insignificantes.

No se evaluará la biodistribución en el estudio EFC10528. En un subgrupo de pacientes se evaluará la respuesta inmunitaria obtenida.

7.2.6 Descripción de ecosistemas donde se pueden diseminar los OMG

El OMG (TroVax[®]) quedará confinado al área de examen hospitalario como es, la farmacia del hospital, el laboratorio de análisis clínico y la zona de autoclave e incineración.

7.2.7 Posibilidad de un aumento excesivo de su población en el medio ambiente

Puesto que el MVA solamente se puede replicar en células permisivas (CEF y BHK), la dispersión quedará limitada al primer organismo infectado. Por lo tanto es improbable que sobreviva en el medio ambiente, luego no existe posibilidad de un aumento de la población.

7.2.8 Ventaja competitiva de los OMG con respecto al receptor no modificado o al organismo parental

El MVA no presenta ventajas por la producción de proteína 5T4. Se ha creado para lograr un efecto terapéutico inductor de la respuesta inmunitaria en pacientes con cáncer.

7.2.9 Identificación y descripción de los organismos diana, si procede

No existe organismo diana específico. Los sistemas de vectores se han creado para lograr un efecto transitorio en humanos y una actividad terapéutica como vacuna contra el cáncer.

7.2.10 Mecanismo previsto y resultado de la interacción entre los OMG liberados y el organismo diana, si procede

El OMG será inyectado en los pacientes. Con ello se prevé un aumento de la respuesta inmunitaria frente a la proteína 5T4 expresada.

7.2.11 Identificación y descripción de los organismos no diana que pueden verse afectados negativamente por la liberación del OMG. Mecanismo previsto de toda interacción adversa identificada

Puesto que el MVA solamente se puede replicar en células permisivas (CEF y BHK), la dispersión quedará limitada al primer organismo infectado. Es posible que el personal médico se inyecte el OMG accidentalmente, en ese caso no se prevén efectos nocivos. No es probable que se inyecten otro tipo de organismos. Las trabajadoras sanitarias embarazadas no deben administrar el OMG. Se debe informar a las trabajadoras sanitarias en edad de procrear del riesgo que supone.

7.2.12 Probabilidad de desviaciones posteriores a la liberación en las interacciones biológicas o en los posibles huéspedes

No muy probable, puesto que el MVA solamente se puede replicar en células permisivas (CEF y BHK), la dispersión quedará limitada al primer organismo infectado.

7.2.13 Interacciones, conocidas o previstas, con organismos no diana localizados en el medio ambiente, tales como competidores, presas, simbioses, depredadores, parásitos y patógenos

Ninguna.

7.2.14 Implicación, conocida o prevista, en los procesos biogeoquímicos

Ninguna.

7.2.15 Otras interacciones posibles con el medio ambiente

Ninguna.

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"/> X Virus Vaccinia Ankara modificado
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"/>
Otros, (especifíquense):	<input type="checkbox"/> (especifique el phylum y la clase)

2. Nombre

i) Orden y taxón superior (animales): Poxviridae
ii) Género: Orthopoxvirus
iii) Especie:
iv) Subespecie:
v) Cepa:
vi) Patovar (biotipo, ecotipo, raza, etc.):

vii) Nombre vulgar:
Virus Vaccinia Ankara modificado (MVA, en sus siglas en inglés)

3. Distribución geográfica del organismo

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

Sí

No

No se sabe

Vaccinia y sus derivados como MVA han sido ampliamente utilizados como vacunas en la erradicación de la viruela a nivel mundial. No se considera que los virus vaccinia, como el MVA, tenga un reservorio natural.

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

Vaccinia y sus derivados como MVA han sido ampliamente utilizados como vacunas en la erradicación de la viruela a nivel mundial. No se considera que los virus vaccinia, como el MVA, tenga un reservorio natural.

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

Sí

No

d) ¿Es frecuente su tenencia en el país que notifica?

Sí

No

4. Hábitat natural del organismo

a) Si es un microorganismo:	
Agua	<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): No se considera que los virus vaccinia, como el MVA, tenga un reservorio natural. El MVA es una variedad producida artificialmente en el laboratorio que se replica bien en células de aves como las CEF, pero es incapaz de replicarse en la mayoría de las células de mamíferos. El MVA se replica bien en células de riñón de hámster neonato (BHK-21), en cambio, ha mostrado ser incapaz de replicarse en las demás células de mamífero probadas.	
b) Si es un animal , hábitat natural o ecosistema agrícola habitual:	
No procede	

5.a) Técnicas de detección

<p>En ensayos clínicos previos que utilizaron un MVA recombinante, se ha estudiado la diseminación viral mediante el seguimiento de la sangre de los pacientes utilizando una PCR cuantitativa. MVA puede ser detectado en cultivos celulares utilizando anticuerpos específicos.</p> <p>El análisis de detección basado en la PCR cuantitativa, que se utiliza para controlar a los pacientes, es sensible a 10 copias de genoma vírico en 1 µg de ADN genómico aislado de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) del paciente.</p>

5.b) Técnicas de identificación

El MVA se detecta e identifica mediante el análisis Southern, utilizando sondas de ADN de MVA completas marcadas radiactivamente y también, mediante PCR utilizando cebadores específicos para el MVA. La especificidad de las técnicas genéticas utilizadas para detectar e identificar el MVA viene determinada por la secuencia de nucleótidos de las sondas del análisis Southern y de los cebadores de la PCR.

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"/>
En caso afirmativo, especifíquese: Las cepas de replicación competente del virus vaccinia (VV) se manipulan con un nivel de bioseguridad II. No obstante, al MVA (con una deficiencia de replicación), el comité de bioseguridad interno de los National Institutes of Health (NIH) en EE.UU., las autoridades de bioseguridad francesa y alemana y el Health and Safety Executive en el RU, le asignan un nivel de bioseguridad I.	

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

El vector MVA se ha elegido por motivos de seguridad y porque los datos preclínicos con 5T4 y otros antígenos demuestran que tiene la capacidad de inducir una respuesta inmunitaria eficaz frente a los antígenos expresados.

El MVA es un virus vaccinia miembro de la familia de virus de ADN *Poxviridae*, género *Orthopoxvirus* donde se encuentran también el virus de la viruela, de la viruela bovina, de la viruela símica, de la viruela aviar y otros. Estos virus se replican en el citoplasma de las células hospedadoras, lo que les diferencia de otros virus de ADN que se replican en el interior del núcleo celular. Los virus vaccinia inducen tanto la respuesta inmunitaria humoral como la celular y las técnicas de inmunización de estos virus están bien demostradas. El MVA deriva de la cepa de la vacuna para la viruela Ankara mediante más de 500 pases en fibroblastos de embrión de pollo (CEF), tras lo cual mostraron tener una deficiencia de replicación en un amplio espectro de células de mamíferos. Además, se ha observado que el MVA no es virulento en muchos tipos de animales como ratones y primates lactantes. Más recientemente, se han inoculado $>10^7$ ufp (unidades formadoras de placas) de MVA en ratones inmunodeficientes sin producir su muerte (Wyatt, Carroll and Moss, NIH, EEUU, datos no publicados). Por el contrario, 10^1 ufp de virus vaccinia de replicación competente pueden ser mortales en ratones atímicos (inmunodeficientes).

El MVA es un virus altamente atenuado con una deficiencia de replicación, no se replica en ninguno de los tipos de células humanas primarias probados. Por lo tanto, la infección de las células humanas primarias por TroVax[®] es transitoria y, mientras que permite la expresión del producto proteico 5T4 del gen insertado para fines inmunológicos, la infección por TroVax[®] no permanece ni se extiende debido a su incapacidad para replicarse. Finalmente, las células infectadas por TroVax[®] mueren y son eliminadas por el organismo. Los resultados obtenidos en diversos estudios de biodistribución en los se utilizaron la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como método de detección de las secuencias de nucleótidos virales, indican que TroVax[®] no persiste en los individuos tratados.

El MVA se replica bien en células de aves como las CEF, pero es incapaz de replicarse en la mayoría de las células de mamíferos. El MVA se replica bien en células de riñón de hámster neonato (BHK-21), en cambio, ha mostrado ser incapaz de replicarse en las demás células de mamífero probadas.

Durante la campaña de erradicación de la viruela, se inoculó el MVA en aproximadamente 120 000 humanos. Se le administró a personas con riesgo de padecer complicaciones con la vacuna vaccinia de replicación competente, es decir, a los más jóvenes y ancianos y a las personas inmunodeprimidas. No se han notificado casos de complicaciones debido a la inoculación del MVA en humanos cuando se inoculó por vía intramuscular o por escarificación cutánea.

8. Información sobre reproducción

Los poxvirus son muy estables bajo condiciones ambientales normales (párrafo 19 ACDP & ACGM “Vaccination of laboratory workers handling vaccinia and related poxviruses infectious for humans”: 1990). No obstante, el MVA presenta un defecto de replicación en todas las células de mamíferos probadas excepto en las células de riñón de hámster neonato (BHK-21). El MVA no es patógeno en animales, incluidos ratones, conejos y primates lactantes. Es improbable que sobreviva en el medio ambiente.

a) Tiempo de generación en ecosistemas naturales: El vector no se replica en ecosistemas naturales.
b) Tiempo de generación en el ecosistema en el que vaya a ser liberado: No procede
c) Modo de reproducción Véase punto 8 Sexual <input type="checkbox"/> Asexual X
d) Factores que afectan a la reproducción: Véase punto 8

9. Capacidad de supervivencia

a) Capacidad de formar estructuras que favorezcan la supervivencia o el letargo
(i) endosporas <input type="checkbox"/>
(ii) quistes <input type="checkbox"/>
(iii) esclerocios <input type="checkbox"/>
(iv) esporas asexuales(hongos) <input type="checkbox"/>
(v) esporas sexuales (hongos) <input type="checkbox"/>
(vi) huevos <input type="checkbox"/>
(vii) pupas <input type="checkbox"/>
(viii) larvas <input type="checkbox"/>
(ix) otras (especificuense) <input type="checkbox"/>

b) Factores pertinentes que afectan a la capacidad de supervivencia

El MVA presenta un defecto de replicación (la replicación solo sucede en células primarias de embrión de pollo o en células BHK-21) y por lo tanto es improbable que sobreviva en el medio ambiente por su incapacidad de replicarse. Aunque los poxvirus son muy estables en condiciones normales medioambientales (Párrafo 19 del documento del ACDP & ACGM '*Vaccination of laboratory workers handling vaccinia and related poxviruses infectious for humans*': 1990). En la ausencia de replicación la inactivación de Tro Vax ocurrirá por radiación UV o con desinfectantes hospitalarios estándar. Ejemplo Virkon. Ya se ha utilizado en un amplio programa de vacunación (Mayr and Danner, 1979. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift 92, p251-256) y no ha habido informes de supervivencia en el medio ambiente.

10.a) Vías de diseminación

La vía de infección por replicación competente de vaccinia es normalmente por lesión cutánea, inyección accidental o a través del sistema respiratorio.

Las principales vías de exposición son:

- contacto con la solución a través de un vial abierto
- contacto con la solución a través de la jeringuilla
- contacto con material en el lugar de inyección y
- contacto con apósitos que han estado en contacto con la solución.

Sin embargo, puesto que el MVA solamente se puede replicar en células permisivas (CEF y BHK), la dispersión quedará limitada al primer organismo infectado. Es posible que el personal médico se inyecte el OMG accidentalmente, en ese caso no se prevén efectos nocivos. No es probable que se inyecten otro tipo de organismos. Las trabajadoras sanitarias embarazadas no deben administrar el OMG. Se debe informar a las trabajadoras sanitarias en edad de procrear del riesgo que supone.

10.b) Factores que afectan a la diseminación

Puesto que el MVA solamente se puede replicar en células permisivas (CEF y BHK), la dispersión quedará limitada al primer organismo infectado. Por lo tanto es improbable que sobreviva en el medio ambiente, luego no existe posibilidad de un aumento de la población.

11. Modificaciones genéticas previas del organismo receptor o parental de las que ya se ha notificado la liberación en el país notificador (se darán los números de la notificación)

No aplica

C. Información sobre la modificación genética

1. Tipo de modificación genética:

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

2. Resultado que se pretende obtener mediante la modificación genética

TroVax[®] es una vacuna contra el cáncer diseñada específicamente para estimular una respuesta inmunitaria frente a esta enfermedad. El principio activo de la vacuna TroVax[®] (el OMG) consiste en un virus vaccinia recombinante altamente atenuado (Vaccinia Ankara Modificado - MVA) que contiene un gen que codifica para el antígeno oncofetal 5T4 humano. El antígeno 5T4 se expresa mucho en un amplio rango de tumores sólidos, en cambio, su expresión es muy baja (excepto en los trofoblastos) en los tejidos adultos sanos y está presente en muy pocos de ellos. El antígeno 5T4 se expresa en más del 80% de los carcinomas colorrectales y se asocia con un mal pronóstico. La vacuna se administra por vía intramuscular lo que resulta en la transcripción y traducción del gen 5T4 para producir la proteína 5T4 in vivo. Este proceso induce una respuesta inmunitaria específica frente a la proteína 5T4. Se piensa que las células tumorales que muestran el antígeno 5T4 son dianas específicas para la respuesta inmunitaria desencadenada por la vacuna TroVax[®].

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

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
En caso negativo, pase a la pregunta 5.	

3.b) En caso afirmativo, ¿está presente el vector, total o parcialmente, en el organismo modificado?

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
En caso negativo, pase a la pregunta 5	

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

a) Tipo de vector	
plásmido	X
bacteriófago	<input type="checkbox"/>
virus	<input type="checkbox"/>
cósmido	<input type="checkbox"/>
Elemento de transposición	<input type="checkbox"/>
Otros (especifiquense):	<input type="checkbox"/>

b) Identidad del vector:

El vector está formado por las siguientes partes: cDNA de h5T4, secuencia plasmídica, promotor mH5 y secuencia plasmídica 2. Flank 1 y Flank 2 son parte del MVA.

Construcción del vector de transferencia pTRV-1b de TroVax®:

Este vector fue construido utilizando PCR para amplificar las regiones de flaqueo alrededor de III de detección a partir de un molde de MVA y de su vinculación al promotor H5 modificado que se obtuvo en forma de oligonucleótido sintético. Estos fragmentos han sido insertados dentro del vector de clonificación pNEB 193 (obtenido en BioLabs New England). La región de codificación 5T4 se insertó en situación anterógrada al promotor mH5.

- Las regiones de flaqueo 1 y 2 en el vector plasmídico son homólogas a las secuencias del vector MVA, que permiten al virus MVA producir mediante recombinación homóloga TroVax® recombinante.
- La secuencia h5T4 del ADNc codifica a la proteína humana 5T4. 5T4 es una glicoproteína oncofetal de 72kDa que se expresa mucho en un amplio rango de tumores sólidos, en cambio, su expresión es muy baja (excepto en los trofoblastos) en los tejidos adultos sanos y está presente en muy pocos de ellos. El antígeno 5T4 se expresa en más del 80% de los carcinomas colorrectales y se asocia con un mal pronóstico.

- Plásmido bacteriano. En la preparación del plásmido de transferencia se utilizó el plásmido bacteriano pNEB 193 (New England Biolabs), propagado en E coli strain XL1-Gold (Stratagene). Todos los ADN plásmidos utilizados en este estudio se prepararon como se indica a continuación. E Coli strain XL1-gold (Stratagene) se transformó con ADN plasmídico y los transformantes se identificaron por análisis de restricción de digestión de preparaciones de ADN crudo (mini prep.) Los clones recombinantes se hicieron crecer por la noche y el ADN plásmido se aisló utilizando un Kit QIAGEN Endofree plasmid Maxi Kit (Cat No 12362) (Crawley, Surrey, UK) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN purificado se analizó para formas contaminantes e integridad por restricción de digestión y electroforesis en gel. La configuración plasmídica se confirmó por secuenciación del ADN.

- Promotor mH5: Dirige la expresión del gen 5T4 humano en ambas fases temprana y tardía del ciclo de replicación viral recombinante.

La construcción contiene un promotor regulador H5. El promotor H5 dirige la expresión tanto en las fases iniciales como tardías del ciclo de replicación viral. En el contexto del MVA donde la replicación está bloqueada en fases tardías esto maximizará la expresión del gen a través de un ciclo de infección abortiva en la mayoría de células. El promotor H5 que se utiliza es un derivado sintético que se ha modificado mediante la incorporación de un cambio de bases que ha mostrado estimular una actividad precoz del promotor. (Wyatt et al). El promotor mH5 tiene una longitud de solo 70 nucleótidos. No se espera que exista ninguna recombinación entre el vector de transferencia y el MVA en este lugar.

Vector MVA:

El vector MVA expresará ahora la proteína 5T4 humana. La modificación del vector MVA no afectará a sus características de tropismo, supervivencia o infectividad, ya que el gen humano se ha insertado en una región no codificadora del genoma. Se ha comparado la replicación del virus MVA frente a la replicación del MVA-5T4 (TroVax) en células de FEP permisivas, hallándose que la cinética de replicación de ambas es semejante.

c) Gama de organismos huéspedes del vector:

Vector plásmido: se replicará en E.coli

MVA: se replicará en células fibroblásticas embrionarias de pollo y en células BH21.

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

Sí

No

No presenta genes que confieran resistencia

Resistencia a los antibióticos

Otras, (especifíquense)

Indique qué gen de resistencia a los antibióticos se inserta:

e) Fragmentos constituyentes del vector

El vector está formado por las siguientes partes: cDNA de h5T4, secuencia plasmídica, promotor mH5 y secuencia plasmídica 2. Flank 1 y Flank 2 son parte del MVA.

f) Método de introducción del vector en el organismo receptor

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

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

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

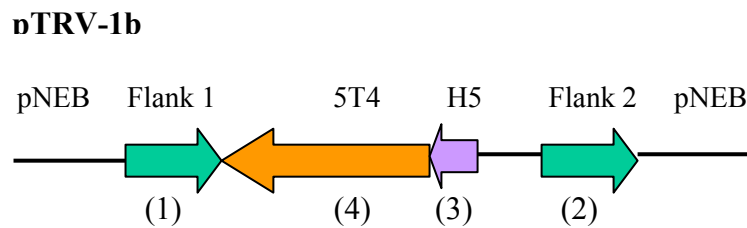
TroVax[®] se produce a partir de células de fibroblasto de embrión de pollo (FEP).

Después de la transfección e infección de las células FEP, el ADN genómico del virus y el ADN plásmido transferido se recombinan en los sitios de homología denominados como Flank ADN. Esto lleva a la inserción del gen 5T4 y del promotor asociado mH5 dentro del genoma de MVA para producir un MVA recombinante 5T4. El vector recombinante forma placas en las monocapas celulares como resultado de la replicación en las células, que se identifica mediante inmunotinción con anticuerpos específicos 5T4. El virus no recombinante también produce placas que se pueden diferenciar mediante inmunotinción. La recombinación se purifica mediante siembra repetitiva de una placa y resemebrando en baja densidad hasta que se obtienen únicamente placas recombinantes. Se prepara entonces un stock de semillas por infección de células y sembrado de lisato, el stock se analiza para la homogeneidad genética y expresión de 5T4. El stock de semillas de vector se utiliza entonces en la producción de TroVax[®] a partir de las células FEP infectadas.

6. Información sobre el fragmento de inserción:

a) Composición del fragmento de inserción:

Figura 1. Mapa de la región de expresión de 5T4 en el vector de transferencia TRV-1b (vector de transferencia TRV) utilizado para obtener TroVax[®]:



Los detalles de la construcción se dan a continuación. Para todos los primers de la PCR, las letras en mayúsculas representan las bases homólogas a la secuencia de AND Diana mientras que las letras en minúscula representan bases adicionales utilizadas para crear los sitios de restricción del enzima y 5' "clamps".

(1) El Flanco 1 se amplificó desde MVA ADN utilizando primers

MVA F1ds

ggccaagcttGATAAAGCGTGTGCGTGTATAGAG

MVA F1PXus

ccggctgcagctcgagTACCAGCCACCGAAAGAG

Digeridos con Pst I y Hind III y unido a PNEB 193 (New England BioLabs), previamente digerido con la mismas enzimas, para dar pNF1.

(2) El Flanco 2 se amplificó desde MVA ADN utilizando primers

MVA F2ds

gcgcggtaccgctagcggcgcgccTTTGGAAAGTTTATAGGTAGTTG

MVA F2us

CcgaattcAACTAGTTTCCGGTGAATGTG

Digerido con Eco RI y Kpn I y unido a pNF1, previamente digerido con los mismos enzimas, para dar pNF12.

(3) El promotor mH5 se produjo por elongación de los dos siguientes oligonucleótidos

MVA H5bs

tcgacTATTTATGATTATTTCTCGCTTCAATTAAACACAACCCTCAAGAACC
TTTGTATTTATTTTCAATTTTaat

MVA H5t

tAAAAATTGAAAATAAATAACAAAGGTTCTTGAGGGTTGTGTAAATTGAAA
GCGAGAAATAATCATAAATAg

Y este se unió luego a pNF12 previamente digerido con Pac I y Sal I para dar NF12H5.

(4) Un fragmento de ADN constituido por la region codificante 5T4 se amplificó a partir del ADNc clonado utilizando los siguientes primers

HuMo U1-Not

ttaagcggccgcAACCGCGAGCCGCGATG

5T4 StopX

ccggctcgagTCAGACATCCGAGTTAGAAC,

Digerido con Not I y Xho I y clonado en pNEBKAM (digerido con los mismos enzimas) para dar pNKh5T4.6. (pNEBKAM es pNEB 193 con sitios adicionales Not I, Sfi I y Xho I insertados a través de un *linker* entre los sitios Pst I y Hind III del MCS). Después, el ADNc 5T4 cDNA se eliminó con Pme I y Xho I y se unió a pNF12H5, digerido previamente con los mismos enzimas para dar pNF12_H5_h5T4.6, designado como pTRV-1b.

Después de cada paso de clonación en la construcción del vector de transferencia pTRV-1b, el inserto se secuenció tanto por Oswel DNA Services Ltd como Lark Technologies Inc. El inserto completo (junto con algunas de las regiones flanco) se secuenció a partir del ADN extraído del primer stock de vector por Lark Technologies.

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

Véase apartado 4 c)

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

- Las regiones de flaqueo en el vector plasmídico son homólogas a las secuencias del vector en el MVA, éstas permiten que el virus MVA produzca TroVax[®] recombinante por recombinación homóloga.
- El promotor H5 modificado dirige la expresión del gen 5T4 humano en ambas fases temprana y tardía del ciclo de replicación viral recombinante.
- La secuencia h5T4 del ADNc codifica a la proteína humana 5T4. 5T4 es una glicoproteína oncofetal de 72kDa que se expresa mucho en un amplio rango de tumores sólidos, en cambio, su expresión es muy baja (excepto en los trofoblastos) en los tejidos adultos sanos y está presente en muy pocos de ellos. El antígeno 5T4 se expresa en más del 80% de los carcinomas colorrectales y se asocia con un mal pronóstico.

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

- en un plásmido libre
El plásmido de transferencia de TroVax[®], pTRV-1b
- integrado en el cromosoma
- Otros especifíquense):

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

Sí No

En caso afirmativo , especifíquese:

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

1. Indíquese si es:

Viroide	<input type="checkbox"/>
Virus ARN	<input type="checkbox"/>
Virus ADN	<input type="checkbox"/>
Bacteria	<input type="checkbox"/>
Hongo	<input type="checkbox"/>
Animal	<input checked="" type="checkbox"/>
- mamíferos	<input checked="" type="checkbox"/> <i>X Homo Sapiens</i>
- 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): Homo
ii) Familia (plantas):
iii) Género:
iv) Especie: Sapiens
v) Subespecie:
vi) Cepa:
vii) Cultivar/línea de reproducción:
viii) Patovar:
ix) Nombre vulgar: 5T4 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"/>
El gen 5T4 codifica un antígeno oncofetal humano que se expresa como una proteína transmembrana de 72 kD. La glucoproteína 5T4 es un antígeno asociado a tumor (TAA), que puede desempeñar un papel en la metástasis del tumor. No se considera una toxina.		
En caso afirmativo, especifíquese		
(a) ¿para cuál de los organismos siguientes?	humanos	<input type="checkbox"/>
	animales	<input type="checkbox"/>
	plantas	<input type="checkbox"/>
	otros	<input type="checkbox"/>
(b) ¿están implicadas de alguna forma las secuencias donadas en las propiedades patógenas o nocivas del organismo?		

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo, proporcione la información pertinente de conformidad con la letra d) del punto 11 de la letra A de la sección II del Anexo III A:		

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

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo , especifíquese: Las cepas de replicación competente del virus vaccinia (VV) se manipulan con un nivel de bioseguridad II. No obstante, al MVA (con una deficiencia de replicación, el comité de bioseguridad interno de los National Institutes of Health (NIH) en EE.UU., las autoridades de bioseguridad francesa y alemana y el Health and Safety Executive en el Reino Unido le asignan un nivel de bioseguridad I. Los 70 nucleótidos de la secuencia de virus vaccinia que están presentes, no están asociados a la patogenicidad.	

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

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
<ol style="list-style-type: none"> 1. Gen 5T4 oncofetal humano: No procede 2. MVA: Es posible que se produzca la recombinación entre poxvirus estrechamente relacionados bajo condiciones naturales. No obstante, aunque el MVA puede infectar a la mayoría de las especies de mamífero, no es capaz de replicarse en las células primarias de mamífero y, además, las células infectadas mueren a causa de la infección. Durante la infección, salvo en células permisivas para la replicación del virus (p.ej. células CEF o BHK-21), no se producen partículas infecciosas. Dada la breve duración de la infección, es muy improbable que se produzca la recombinación bajo condiciones naturales entre el MVA y otros poxvirus. 		

E. Información sobre el organismo modificado genéticamente

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

<p>a) ¿Se diferencia el OMG del receptor en lo que a capacidad de supervivencia se refiere? Sí <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/></p> <p>Especifíquese</p> <p>El MVA ha sido incapaz de replicarse en todas las células de mamíferos probadas excepto en las células de riñón de hámster neonato (BHK-21). El MVA no es patógeno en animales incluidos ratones, conejos y primates lactantes. Es improbable que sobreviva en el medio ambiente. En estudios donde se ha retirado el apósito dos horas después de la administración y se ha frotado el lugar de inyección para recoger cualquier resto de TroVax[®], se ha observado que la cantidad de vector restante es menor de 1/10 000 parte de la dosis original. Es improbable que esta concentración constituya un riesgo para el medio ambiente.</p> <p>Por lo general, los poxvirus (como el MVA) son muy sensibles a todos los sistemas de desinfección habituales autorizados y las técnicas de esterilización habituales (térmica, química y/o por radiación) suelen ser eficaces.</p>
<p>b) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta al modo o índice de reproducción? Sí <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/></p> <p>Especifíquese:</p> <p>Puesto que el MVA solamente se puede replicar en células permisivas (CEF y BHK), la dispersión quedará limitada al primer organismo infectado. Por lo tanto es improbable que sobreviva en el medio ambiente, luego no existe posibilidad de un aumento de la población.</p>
<p>c) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta a la diseminación? Sí <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/></p> <p>Especifíquese:</p> <p>La expresión del gen humano 5T4 en células infectadas con vectores de MVA no tendrá efecto de diseminación</p>
<p>d) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta a la patogenicidad? Sí <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/> No se sabe <input type="checkbox"/></p>

Especifíquese:

Los poxvirus son muy estables bajo condiciones ambientales normales (párrafo 19 ACDP & ACGM “Vaccination of laboratory workers handling vaccinia and related poxviruses infectious for humans”: 1990).

En el caso de los virus vaccinia de replicación competente, se sabe que permanecen en la escara de vacunación tras la escarificación (Anexo III, parte 2B, párrafo 69 de ACGM ‘Compendium of Guidance from the Health and Safety Commissions Advisory Committee on the genetic modification’). En el caso de vectores de MVA, no se da la replicación, por lo tanto no hay escaras en el lugar de inoculación.

En ensayos clínicos realizados anteriormente, se muestra, que tras la administración de TroVax[®], el paciente no presenta ningún riesgo para el personal sanitario o para el medio ambiente. El lugar de administración se frota con alcohol. Se aplica, como precaución adicional, un vendaje oclusivo. Tras frotar con alcohol el lugar de inyección, no se detecta el vector. En estudios donde se ha retirado el apósito dos horas después de la administración y se ha hisopado el lugar de inyección para recoger cualquier resto de TroVax[®], se ha observado que la cantidad de vector restante es menor de 1/10 000 parte de la dosis original. Es improbable que esta concentración constituya un riesgo para el medio ambiente.

La proteína 5T4 no es tóxica o es probable que no afecte al huésped del MVA. El único efecto potencial puede darse en mujeres embarazadas ya que la proteína 5T4 se expresa en la placenta. Por tanto durante el ensayo las mujeres embarazadas que sean profesionales sanitarias no administrarán el OMG. No obstante los estudios preclínicos toxicológicos en ratones preñados han puesto de manifiesto que el uso de la versión murina de la proteína 5T4 no ha indicado riesgo alguno ni en el feto ni en la madre. No se prevé la inyección de otros organismos.

2. Estabilidad genética del organismo modificado genéticamente

Para evaluar la estabilidad genética, se emplearon las siguientes medidas: secuenciación y análisis por PCR de los lotes clínicos finales.

Puesto que el MVA solamente se puede replicar en células permisivas (CEF y BHK), la dispersión quedará limitada al primer organismo infectado.

Los análisis de secuenciación y Southern de los cultivos de reserva de cepa madre vírica y de los lotes clínicos finales (TroVax[®]), producidos hasta 8 pases más tarde, utilizando condiciones similares a las usadas en la elaboración de virus normales, han demostrado que el transgén es genéticamente estable tras múltiples pases. Con la técnica de doble inmunotinción del mismo virus p8, se demostró que, en más del 99% de las placas donde se cultivó MVA, las proteínas 5T4 se expresaron en los CEF. De manera similar, el análisis Western indicó que no existían cambios detectables en la expresión de la proteína transgénica entre el cultivo de reserva de cepa madre del virus y los lotes clínicos finales.

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		

4. Descripción de los métodos de identificación y detección

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

En estudios clínicos anteriores, se monitorizaron todos los pacientes por seguridad y se determinó la persistencia y biodistribución del vector a los 30 min, 1h, 3h, 6h, 24h y dos semanas después de la inyección. Se evaluó también la respuesta inmunitaria después de la inyección, con intervalos de dos semanas hasta un máximo de 24 semanas. Además, se realizaron extracciones de sangre para la detección y medición de las concentraciones de vector circulante mediante análisis por PCR (a los 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 24 h y dos semanas después de la inyección).

Los resultados de los análisis de sangre mediante PCR cuantitativa en tiempo real, mostraron un paciente positivo a los 30 min, dos pacientes positivos a la hora, un paciente positivo a las seis horas, dos pacientes positivos a las 24 horas. Los 17 pacientes dieron resultado negativo a las dos semanas.

Se analizaron las gasas tras frotar la piel del lugar de inyección previa limpieza con etanol y dos horas después de la inyección, mediante un ensayo de infectividad. En las muestras donde se detectó el vector (10/53 muestras analizadas) éste se encontraba a una concentración menor de 1/10 000 de la dosis administrada. Esto muestra que el procedimiento de desinfección del lugar de inyección, frotar con etanol, funciona adecuadamente.

No está previsto realizar una detección ni un control de rutina del OMG. Los efectos clínicos del tratamiento se estudiarán para verificar su seguridad (notificación de AA y AAG), su eficacia (evaluación radiológica del tumor) y su inmunogenicidad (en un subgrupo de pacientes se determinará la respuesta humoral y celular).

El OMG (TroVax[®]) no se replicará en condiciones naturales excepto en un número muy limitado de líneas celulares de cultivos titulares, por lo que no se requiere una monitorización del medioambiente a gran escala.

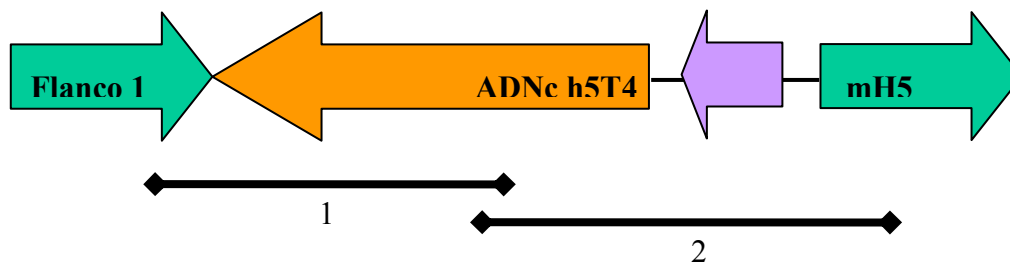
b) Técnicas utilizadas para identificar el OMG:

Se dispone de un ensayo de PCR cuantitativa para detectar TroVax[®], este ensayo es sensible a 10 copias presentes en 1 µg de ADN genómico. El ensayo no detecta el MVA ni las secuencias de 5T4 sin las regiones flanqueantes del MVA

Se dispone también de un diagnóstico mediante PCR para detectar TroVax[®]. El método confirma que la secuencia completa de ADNc de h5T4 y el promotor H5 modificado están presentes en el lote clínico de TroVax[®]. Para aislar el ADN del lote de TroVax[®] se utiliza la técnica SOP065 (extracción con fenol y cloroformo para aislar el ADN del MVA para la PCR). A continuación, se utilizan dos grupos de cebadores para amplificar las secciones de la región que codifican el gen 5T4 (Figura 2) del ADN purificado. El primer grupo amplifica un fragmento de 851 pb que empieza en el extremo 3' de la región flanqueante 1 hasta el ADNc del 5T4, el segundo grupo amplifica un fragmento de 952 pb que se solapa con el primer fragmento y empieza aproximadamente en el centro del ADNc del 5T4, pasa a través del promotor H5m y termina en el extremo 5' de la región flanqueante 2. A continuación, se separan los productos de la PCR mediante electroforesis en gel y se visualizan con luz UV.

Criterio de admisión: Una banda principal a ~850 pb con el par de cebadores 1 y ~950 pb con el par de cebadores 2, indica una identidad correcta. Otras bandas menores no indican la presencia de virus recombinante aberrante si se encuentran presentes también en la muestra de plásmido de transferencia pTrV1b control. Los productos de 851 pb y 952 pb no deben amplificarse del ADN del MVA natural de control.

Figura 2 – posición de las regiones del virus TroVax[®] que se amplifican.



El gen 5T4 humano se detecta e identifica mediante la técnica de transferencia Southern, utilizando sondas de ADNc específicas para 5T4 marcadas radiactivamente, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos para 5T4 y también, mediante análisis de la secuencia de nucleótidos. La glucoproteína producida por el gen 5T4 humano se detecta e identifica mediante el análisis Western y las técnicas de inmunotinción utilizando un anticuerpo monoclonal (H8) que reconoce el 5T4 humano en su conformación natural.

F. Información sobre la liberación

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

Estudio multicéntrico, doble ciego, controlado con placebo y aleatorizado de TroVax[®] frente a placebo en el tratamiento de primera línea de pacientes con cáncer colorrectal metastásico que reciben el tratamiento antineoplásico – EFC10528. Este es un estudio internacional en fase III, aleatorizado, doble ciego, controlado y de grupos paralelos en pacientes con cáncer colorrectal metastásico diseñado para comparar la supervivencia global (SG) con TroVax[®] frente a placebo en pacientes que reciben quimioterapia como tratamiento de primera línea.

En el estudio participarán aproximadamente 1312 pacientes (656 pacientes por grupo), cada uno recibirá uno de los tratamientos antineoplásicos indicados (Folfox o Folfiri, +/- bevacizumab) e inyecciones intramusculares de TroVax[®] o placebo. Las dos primeras inyecciones de TroVax[®]/placebo se administrarán solas con un intervalo de una semana entre ellas (día 1, día 8). Se iniciará la quimioterapia una semana después, cuando se administre la tercera inyección de TroVax[®]/placebo (día 15). A continuación, se administrarán las vacunas de refuerzo de TroVax[®]/placebo cada mes (o cada dos ciclos de quimioterapia). A todos los pacientes se les realizará un seguimiento para evaluar su supervivencia.

Se realizará un primer análisis provisional basado en la SLP, cuando se presenten 152 casos de SLP. Se prevé la realización de un segundo análisis provisional de la eficacia en función de la SG, cuando aproximadamente se produzcan 512 muertes (el 60% de la información de mortalidad).

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 type="checkbox"/>
En caso afirmativo, especifíquese: No aplica. No se considera que los virus vaccinia, como el MVA, tenga un reservorio natural.	

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

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

El ensayo se va a llevar a cabo en numerosos centros de Europa (Bélgica, República Checa, Alemania, Francia, Gran Bretaña, Hungría, Italia, Holanda y Polonia) y el resto del Mundo (Argentina, Chile, China, Hong Kong, Japón, República de Corea, Malasia, Filipinas, Federación Rusa, Singapur, Surafrica, Taiwán, Tailandia, Turquía y Estados Unidos).

<p>b) Área del lugar (m²):</p> <p>El OMG (TroVax[®]) quedará confinado al área de examen hospitalario como es, la farmacia del hospital, el laboratorio de análisis clínico y la zona de autoclave e incineración.</p> <p>Los centros son habitaciones separadas de los hospitales o áreas alejadas de las salas de pacientes. No puede identificarse de forma general la dimensión de las habitaciones hasta que todos los centros hayan sido identificados finalmente.</p> <p>(i) lugar real de la liberación (m²):</p> <p>(ii) área de liberación más amplia (m²):</p>
<p>c) Proximidad a biotipos reconocidos internacionalmente o zonas protegidas (incluidos depósitos de agua potable) que pudieran verse afectados:</p> <p>No procede</p>
<p>d) Flora y fauna, incluidos cultivos, ganado y especies migratorias que pueden potencialmente interactuar con el OMG:</p> <p>No procede</p>

4. Método y amplitud de la liberación

<p>a) Cantidad de OMG que vaya a liberarse:</p> <p>La dosis de TroVax[®]/placebo administrada en cada inyección intramuscular será de 1 ml (1 x 10⁹ DICT50/ml, con un rango de 1,55 x 10⁸ – 3,16 x 10⁹ DICT50/ml), ésta se aplicará en el músculo deltoides del antebrazo. La pauta de dosis será de 9 inyecciones, administradas a lo largo de un periodo de 29 semanas.</p> <p>Las inyecciones de inducción se administrarán cada semana:</p> <p>La primera inyección de TroVax[®]/placebo i.m. se administrará sola (D1).</p> <p>La segunda inyección de TroVax[®]/placebo i.m. se administrará sola una semana más tarde (D8).</p> <p>La tercera inyección de TroVax[®]/Placebo i.m. se administrará una semana más tarde (D15), en el día 1 del ciclo de quimioterapia y una hora antes de la quimioterapia.</p> <p>Las inyecciones de refuerzo se administrarán por vía i.m. cada mes (o cada dos ciclos de quimioterapia), una hora antes de la quimioterapia. La primera inyección de refuerzo (es decir, la cuarta inyección de TroVax[®]/placebo) se administrará el día 1 del ciclo 3 de quimioterapia.</p> <p>Los pacientes recibirán TroVax[®] o placebo hasta que se produzca la progresión de la enfermedad, aparezca toxicidad inaceptable debido a TroVax[®]/placebo o el paciente desee abandonar. Si se interrumpe la quimioterapia debido a otro motivo distinto a la progresión de la enfermedad, se seguirá administrando TroVax[®]/placebo solo.</p> <p>Se le proporcionará al farmacéutico la información necesaria para la reconstitución. TroVax[®]/placebo se debe volver a suspender mediante la adición de 1,2 ml de agua para inyección. La solución obtenida se debe mezclar poco a poco mediante rotación hasta lograr una tonalidad opalescente. A continuación, se extrae 1 ml de la solución con una jeringuilla y se aplica antes de que transcurran cinco minutos. La persona</p>
--

responsable de administrar la inyección la extraerá junto al paciente y ésta será revisada por segunda vez por otra persona responsable (bien una enfermera titulada, bien un farmacéutico).

No se prevé otra liberación.

b) Duración de la operación:

29 semanas

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

Medidas de protección laboral adoptadas durante la liberación

Aparte del paciente, el personal médico del ensayo es el colectivo que está más expuesto a los sistemas de vectores, aunque la probabilidad de dicha exposición es extremadamente baja.

Las principales vías de exposición son:

- contacto con la solución a través de un vial abierto
- contacto con la solución a través de la jeringuilla
- contacto con material en el lugar de inyección y
- contacto con apósitos que han estado en contacto con la solución.

Además, se puede producir contacto accidental a través de

- un vial roto
- un pinchazo de aguja

Bajo condiciones normales, es muy improbable la formación de aerosoles.

Incluso si se produce la exposición, no se espera que ésta active alguna reacción de importancia. El MVA se ha utilizado mucho como vacuna contra la viruela. No se puede replicar en humanos por lo que no representaría un riesgo especial para el personal médico infectado.

A pesar de ello, se tomarán medidas para proteger al personal implicado. El personal médico recibirá instrucciones sobre la naturaleza del material y las precauciones especiales necesarias para su manipulación.

Los procedimientos estándar son:

- uso de bata desechable
- uso de guantes, mascarilla y gafas protectoras desechables
- procedimientos estándar de conservación, transporte, preparación y administración del producto
- inactivación del OMG
- medidas de actuación frente a vertidos y accidentes

Tratamiento posliberación del centro

Todos los materiales que hayan podido quedar contaminados por TroVax®/placebo (p.ej. jeringuillas, gasas y apósitos) se deben eliminar mediante incineración según las normas del hospital sobre materiales modificados genéticamente.

Técnicas previstas para la eliminación o inactivación de los OMG una vez finalizado el experimento

No se ha previsto una técnica de eliminación o inactivación específica para el material inyectado en el paciente. La presencia y expresión de TroVax[®] es transitoria y la eliminación se realiza en el organismo del paciente.

Todos los materiales que hayan podido quedar contaminados por TroVax[®]/placebo (p.ej. jeringuillas, gasas y apósitos) se deben eliminar mediante incineración según las normas del hospital sobre materiales modificados genéticamente.

El comité de bioseguridad interno de los National Institutes of Health (NIH) en EEUU, las autoridades de bioseguridad francesa y alemana y el Health and Safety Executive en el RU asignan al MVA un nivel de bioseguridad I.

Todos los desechos sólidos se desactivan por autoclave y, a continuación, se incineran.

Los líquidos derramados sobre superficies se deben tratar con productos que inactiven el virus, autorizados en el centro según indican las instrucciones para los virus vaccinia y los parapoxvirus vacunos.

Los demás desechos (apósitos, gasas, etc.) se incinerarán en el hospital igual que los desechos clínicos habituales.

Todo el material sólido no desechable, p. ej. delantales, gafas, se desactivan por autoclave o incineración.

En los centros donde las directrices sean más estrictas que las medidas descritas aquí, deben prevalecer las primeras (p. ej. sistema de esclusa de aire antes de acceder a las salas de inyección).

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

No procede

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

Hasta la fecha de 31 de julio de 2007, se ha administrado TroVax[®] a unos 350 pacientes con cáncer colorrectal metastásico o renal. Los investigadores o el promotor no han observado acontecimientos adversos graves producidos por TroVax[®] excepto un caso de fiebre de grado 1 en el estudio en fase II FOLFOX. Se observaron reacciones leves en el lugar de inyección en la mayoría de los pacientes, junto con fiebre transitoria leve. En los estudio sobre TroVax[®] como único agente, no se han notificado otros acontecimientos adversos graves, frecuentes o notables en pacientes multitratados previamente, o en estudios que combinan TroVax[®] con quimioterapia (5FU y leucovorina junto con oxiplatino o irinotecán) e IL-2 (tratamiento con altas dosis por vía intravenosa o bajas dosis de inyecciones subcutáneas). En todos los estudios, TroVax[®] indujo una respuesta inmunitaria

frente al antígeno 5T4 en > 90% de los pacientes que finalizaron el estudio. Tras la segunda o tercera inyección de TroVax[®] se observan anticuerpos o respuesta celular. La respuesta celular de los linfocitos T CD8+ ve fue por lo general mayor que la generada por otras vacunas contra el cáncer notificadas en las publicaciones. (véase el apartado 2.3.2.9 de la documentación adjunta que hacen referencia los estudios no-clínicos en animales y estudios de seguridad en humanos).

Además, se han llevado a cabo diversos ensayos a nivel internacional con MVA modificado en los que se ha utilizado el MVA como vector. Todos los resultados confirman que el MVA es un vector seguro y prometedor para aplicaciones médicas.

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): Homo
ii) Familia (plantas):
iii) Género:
iv) Especie: Sapiens
v) Subespecies:
vi) Cepa:
vii) Cultivar/Línea de reproducción:
viii) Patovar:
ix) Nombre vulgar:

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

El OMG (TroVax[®]) se ha diseñado para expresar la proteína 5T4. 5T4 es una glucoproteína oncofetal de 72 kDa que se expresa en más del 70% de los carcinomas de mama, tracto gastrointestinal, colon y ovario. A diferencia de otros autoantígenos propios asociados a tumor, TAAs, como por ejemplo, el antígeno carcinoembrionario, CEA, la expresión de 5T4 muestra ser específica de tumor, habiéndose señalado solamente un bajo nivel de expresión en el intestino. El análisis Inmunohistoquímico indica que la expresión 5T4 es indicativa de un mal pronóstico en el cancer colorectal.

Además, cuando las células tumorales se transfectan con el ADNc que codifica a la expresión del gen 5T4, muestran un aumento de su motilidad, lo que sugiere que la expresión de esta molécula puede inducir propiedades metastásicas en el pulmón.

El OMG será inyectado a los pacientes. Las células de los pacientes inyectados con el OMG expresarán la proteína 5T4. Esto dará resultado en los pacientes que elevarán su respuesta inmune contra la proteína 5T4 y será potencialmente un tratamiento para su cáncer.

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

No procede

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

Sí	No X	No se sabe
Especifíquese: El OMG presenta un defecto de replicación por lo que es muy improbable que se de una competencia mayor o un carácter más invasivo. No existe evidencia de una selección posterior a la liberación en ensayos clínicos previos con el OMG.		

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

El OMG (TroVax[®]) quedará confinado al área de examen hospitalario como es, la farmacia del hospital, el laboratorio de análisis clínico y la zona de autoclave e incineración. El OMG presenta un defecto de replicación por lo que es muy improbable que sobreviva en el medioambiente.

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

Aparte del paciente, el personal médico del ensayo es el colectivo que está más expuesto a los sistemas de vectores, aunque la probabilidad de dicha exposición es extremadamente baja. Incluso si se produce la exposición, no se espera que ésta active alguna reacción de importancia. El MVA se ha utilizado mucho como vacuna contra la viruela. No se puede replicar en humanos por lo que no representaría un riesgo especial para el personal médico infectado. Las trabajadoras sanitarias embarazadas no deben administrar el OMG. Se debe informar a las trabajadoras sanitarias en edad de procrear del riesgo que supone.

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 recombinación entre poxvirus estrechamente relacionados es posible en condiciones naturales. Aunque el MVA puede infectar a la mayoría de las especies de mamíferos, no es capaz de replicarse en las células humanas primarias y, además, las células infectadas mueren a causa de la infección. Durante la infección, salvo en células permisivas para la replicación del virus (p.ej. células CEF o BHK-21), no se producen partículas infecciosas. Dada la breve duración de la infección, es muy improbable que se produzca la recombinación en condiciones naturales entre el MVA y otros poxvirus y por lo tanto, que se transfiera material genético a otros organismos.</p> <p>Dado que no se considera que los virus vaccinia como el MVA tengan un reservorio natural, no se espera que se produzca transferencia. El MVA se ha utilizado mucho y no se ha observado transferencia de material genético.</p>
<p>b) De otros organismos al OMG:</p> <p>Improbable</p>
<p>c) Consecuencias probables de la transferencia de genes:</p> <p>La presencia del gen 5T4 no es un rasgo propicio de selección bajo condiciones naturales. No aporta ninguna función en particular al MVA o a las células humanas que hospedan al MVA.</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 procede

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

Ninguna

H. Información sobre el seguimiento

1. Métodos de seguimiento de los OMG

Como se ha mencionado previamente en el apartado E.4.a, en ensayos clínicos previos con MVA, la carga viral de los pacientes tratados se monitorizó utilizando PCR cuantitativa. MVA se puede detectar en tejidos mediante un medio de cultivo utilizando anticuerpos específicos.

2. Métodos de seguimiento de las repercusiones en el ecosistema

PCR cuantitativa (Véase apartados E.4.a y E.4.b)

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

PCR cuantitativa (Véase apartados E.4.a y E.4.b)

4. Tamaño del área de seguimiento (m²)

No se ha establecido el seguimiento de los pacientes o el área de tratamiento del hospital, según los resultados de monitorización de ensayos clínicos anteriores.

5. Duración del seguimiento

Véase apartado F.4.b

6. Frecuencia del seguimiento

Véase apartado F.4.c

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

1. Tratamiento del lugar tras la liberación

En el caso de los vectores de MVA, no se da la replicación, por lo tanto no hay escaras en el lugar de inoculación. En ensayos clínicos realizados anteriormente, se muestra que tras la administración de TroVax[®], el paciente no supone ningún riesgo para el personal sanitario o el medio ambiente. El lugar de administración se frota con alcohol. Se aplica, como precaución adicional, un vendaje oclusivo. En estudios donde se ha retirado el vendaje dos horas después de la administración y se ha hisopado el lugar para recoger cualquier resto de TroVax[®], se ha observado que la cantidad de vector restante es menor de 1/10 000 parte de la dosis original. Es improbable que esta concentración constituya un riesgo para el medio ambiente.

2. Tratamiento del OMG tras la liberación

La única fuente de OMG serán los residuos clínicos, ya que el OMG tiene un defecto de replicación. Véase punto 3 b).

3(a) Tipo y cantidad de residuos producidos

Tipo de residuo generado: Agujas, jeringuillas, viales, gasas, vendas de los pacientes, delantales de un solo uso, guantes, gafas de un solo uso (si procede).

Cantidad de residuos previstos: Poca (solamente el material que haya estado en contacto directo con TroVax[®] necesitará ser esterilizado por autoclave y/o incineración).

3(b) Tratamiento de residuos

Autoclavado – para elementos sólidos con residuos

Los residuos pueden desactivarse mediante autoclavado, y después incinerarse convencionalmente tras el autoclavado, o serán tratados de acuerdo a la regulación local de dicho hospital de tratamiento de residuos para OMG.

Desinfectante – para los vertidos líquidos y desinfección de las superficies

Virkon u otro producto equivalente aprobado localmente para la desinfección de superficies frente a virus vaccinia & paravacuna, de acuerdo a las instrucciones de su fabricante. Virkon lleva incorporado un indicador de color que facilita el control de la eficacia desactivadora de la solución que se está utilizando. Las soluciones de Virkon se sustituyen de rutina de acuerdo al Procedimiento Normalizado de Trabajo en el área de tratamiento.

Se adjuntan a este dossier 3 guías de procedimiento para Diseminación general, Exposición accidental y/o Diseminación accidental.

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

Al tratarse de un OMG con un defecto en la replicación (requiere un limitado rango de cultivos celulares titulares para su crecimiento), su diseminación en el medio ambiente es muy improbable. Los métodos de tratamiento de vertidos de OMG en caso de dispersión imprevista durante el transporte o en el hospital de detallan en el punto J2.

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

El centro del estudio clínico recibirá un pack de seguridad donde se explicará cómo manejar los vertidos y la correcta eliminación de los OMG, y que incluye lo siguiente.

2.1 Métodos y procedimientos para controlar los OMG en caso de diseminación imprevista

Procedimiento de limpieza de vertidos

- **VERTIDOS LEVES**
 - ✓ Limpiar la superficie con IMS al 70% o peróxido de hidrógeno al 2%.
 - ✓ Descontaminar los instrumentos mediante su inmersión en la solución desinfectante durante 30 min.
- **VERTIDOS MODERADOS**
 - ✓ Limpiar el vertido con toallitas de papel empapadas en solución desinfectante recién preparada.
 - ✓ Dejar transcurrir 10 min.
 - ✓ Desechar las toallitas para la esterilización en autoclave.
 - ✓ Llevar los productos destinados a autoclave al laboratorio para su esterilización.
- **GRANDES VERTIDOS**
 - ***Fuera de la campana de seguridad biológica***
 - ✓ Interrumpa su labor inmediatamente.
 - ✓ Contenga el vertido utilizando los kits de vertido disponibles.
 - ✓ Informe al jefe del laboratorio.
 - ✓ Vuelva al vertido.

- ✓ Además de la bata, póngase un delantal desechable, gafas, protectores de zapatos y guantes Marigold (o equivalentes).
- ✓ Vierta sobre el vertido una solución desinfectante.
- ✓ Cubra el vertido con toallitas o con el material absorbente del kit para vertidos.
- ✓ Dejar transcurrir al menos 30 min.
- ✓ Llevar el material que ha entrado en contacto con el vertido para autoclave y transportarlo al laboratorio de esterilización.
- ✓ Lavar la zona afectada con detergente y dejar secar.

- ***En el interior de la campana de seguridad biológica***
- ✓ Deje su labor inmediatamente.
- ✓ Cierre el marco delantero y señálcelo adecuadamente.
- ✓ Informe al jefe de laboratorio.
- ✓ Fumigue el marco tal y como se indica en el protocolo de fumigación.
- ✓ Después de la fumigación, limpie el vertido.

2.2 Métodos de descontaminación de las zonas afectadas, por ejemplo erradicación de los OMG

Puesto que TroVax[®] sólo se puede replicar en células permisivas (CEF o BHK), no se replicará en el medio ambiente. La desinfección del lugar donde se produjo el vertido se explica en el apartado 2.1.

2.3 Métodos de eliminación o saneamiento de plantas, animales, suelos, etc., expuestos durante o después del vertido

Los procedimientos de desinfección empleados en el hospital figuran en el apartado 2.1.

2.4 Métodos de aislamiento para la zona afectada por el vertido

(Véase el apartado 2.5).

2.5 Planes de protección de la salud y del medio ambiente en caso de aparición de efectos indeseables

Puesto que TroVax[®] sólo se puede replicar en células permisivas (CEF o BHK), no se replicará en el medio ambiente. La desinfección del lugar donde se produjo el vertido se explica en el apartado 2.1

Se adjuntan a este dossier 3 guías de procedimiento para Diseminación general, Exposición accidental y/o Diseminación accidental.

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

Véase apartatado J2

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

Puesto que TroVax[®] solamente se puede replicar en células permisivas (CEF o BHK), no se replicará en el medio ambiente, ni en los pacientes (etc). En el caso altamente improbable que se produjera una replicación de vaccinia, existe la posibilidad de una vacunación utilizando MVA en el área afectada. No obstante, por el momento no ha ocurrido ninguna incidencia cuando se ha estado utilizando MVA o MVA recombinante, incluso teniendo en cuenta que se ha realizado un amplio uso de estos materiales en ensayos clínicos y en investigación en laboratorios.