

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

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

A. Información de carácter general

1. Detalles de la notificación

- a) Estado miembro de la notificación: [España](#)
- b) Número de la notificación: [B/ES/06/42](#)
- c) Fecha del acuse de recibo de la notificación:
- d) Título del proyecto: [Estudio Internacional aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo y de grupos paralelos, para investigar si Tro Vax, añadido al tratamiento estándar de primera línea prolonga la supervivencia de pacientes con adenocarcinoma renal de células claras localmente avanzado o metastático. \(TV3/001/06\)](#)
- e) Periodo propuesto para la liberación: [un máximo de 3,5 años](#)

2. Notificador

Nombre de la institución o empresa:

[Oxford Biomédica UK Ltd,](#)
[Medawar Centre,](#)
[Robert Robinson Avenue,](#)
[The Oxford Science Park,](#)
[Oxford](#)
[OX4 4GA, United Kingdom](#)
Contacts: [Mrs Julia Sutton \(Biological Safety Officer\)](#)
[Dr Fiona Ellard \(Deputy Biological Safety Officer\)](#)
Telephone: [+ 44 \(0\) 1865783000](#)

3. Definición del OMG

a) Indíquese si el OMG es:

- viroide (.)
- virus ARN (.)
- virus ADN (×) [Virus Vaccinia Ankara modificado](#)

- bacteria (.)
- hongo (.)
- animal:
 - mamíferos (.)
 - insectos (.)
 - peces (.)
 - otro animal (.)
- 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:

No se ha hallado evidencia de reversión del MVA a un estado de virulencia en la administración del virus a más de 120.000 receptores muchos de ellos en riesgo de complicaciones vacunales (Mayr and Danner, 1979. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift 92, p 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 (x)

No (.)

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

Sí (x)

No (.)

En caso afirmativo:

- Estado miembro de la notificación: Reino Unido, Francia, Holanda, Alemania, Polonia.
- Número de la notificación: B/ES/06/...

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

Sí (x)

No (.)

En caso afirmativo:

- Estado miembro de la notificación: Federación Rusa, Rumania, Ucrania, Israel, Estados Unidos
- Número de la notificación: .././../...

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

El impacto medioambiental es previsible que sea bajo por las siguientes razones:

El OMG (Tro Vax) está basado en MVA que no es patógeno en el animal, incluidos ratones, conejos y primates lactantes. Tro Vax presenta un defecto de replicación (la replicación solo sucede en células de embrión de pollo primarias o células BHK-21) y por ello que es improbable que sobreviva en el medio ambiente. Los poxvirus son muy estables en condiciones medioambientales normales (Párrafo 19 del documento del ACDP & ACGM ‘*Vaccination of laboratory workers handling vaccinia and related poxviruses infectious for humans*’: 1990), en ausencia de replicación la inactivación de Tro Vax ocurrirá mediante irradiación UV o con desinfectantes hospitalarios estándar, como, por ejemplo, Virkon.

La falta de persistencia puede ser implícita por la siguiente información basada en MVA. En el caso de los virus vaccinia de replicación competente, se sabe que persisten en la escara de la vacunación tras la escarificación (párrafo 69 de la parte 2B, Anexo 3 del ‘*Compendium of Guidance from the Health and Safety Commissions Advisory Committee on the genetic modification*’ del ACGM). En el caso de los vectores basados en el MVA, no hay replicación y tampoco escara en el punto de inoculación. Además ya se ha utilizado en un amplio programa de vacunación (Mayr and Danner, 1979. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 92, p251-256) sin que hubiera informes de propagación al medio ambiente. El centro Norteamericano de Control y Protección de Enfermedades (CDC) indica que aunque no se ha establecido un sistema oficial de vigilancia a los trabajadores del laboratorio, no se han reportado en la literatura científica o a CDC ninguna infección adquirida de laboratorio como resultado de la alta exposición a variedades altamente atenuados o vacunas recombinantes derivados de estas variantes (MVA, NYVAC, ALVAC, or TROVAC). También se ha establecido que aunque el riesgo de transmisión de los virus vaccinia recombinante a profesionales sanitarios expuestos es desconocido, no se ha publicado ningún informe sobre transmisiones de recipientes con vaccinia al personal en contacto.

Cuando se utiliza Tro Vax el punto de administración se limpia con una torunda con alcohol. Como precaución adicional, se utiliza también un apósito oclusivo. Tras la limpieza con la torunda con alcohol, no se detecta el vector en el punto de inyección. Los estudios han demostrado que no se produce diseminación de TroVax y que no se halla TroVax en la circulación que pueda suponer un riesgo para nada o para nadie.

7.1. Capacidad de transferencia genética:

- (a) transferencia de material genético posliberación del OMG a organismos de los ecosistemas afectados

Durante la replicación de virus bajo condiciones naturales puede producirse un fenómeno de recombinación entre poxvirus estrechamente relacionados. Aunque el MVA puede infectar a la mayoría de las especies de mamífero, las células que infecta mueren como resultado de infección. Durante dicha infección, salvo que las células sean permisivas para el virus (células de embrión de pollo primarias o células BHK-21), no se producen partículas infecciosas (Sancho et al. 2002 J. Virology 76 (16) p.8318-8334). Dada la breve duración de esta infección, es extremadamente improbable que se produzca una recombinación bajo condiciones naturales entre el MVA y otros poxvirus y que, por ello, pueda producirse la transferencia de material genético a otros organismos.

(b) transferencia posliberación de material genético de organismos endógenos al OMG

Improbable, por las razones señaladas en (a)

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

Puesto que el OMG (TroVax) no se replicará en los pacientes, lo señalado es muy improbable. Este hecho se soporta puesto que no hay evidencia que esta selección ocurre en el parental MVA.

7.3. Respecto a la descripción de los rasgos genéticos que pudieran prevenir o minimizar la dispersión de material genético y los métodos para verificar la estabilidad genética cabe decir lo siguiente:

En la evaluación de la estabilidad genética se utilizaron las siguientes medidas: secuenciación, southern blot y análisis por PCR de los lotes clínicos finales. La secuenciación y el análisis mediante southern blot del stock maestro de semilla viral y de los lotes clínicos finales producidos 10 pases más tarde han demostrado que el transgen es genéticamente estable tras múltiples pases. Medidas del porcentaje de focos que expresa 5T4 en fibroblastos de embrión de pollo no han detectado cambios tras múltiples pases. Así mismo, el análisis mediante western blot también evidencia que no hay cambios detectables en el nivel de expresión proteica del transgen tras múltiples pases.

Puesto que TroVax solamente se puede replicar en células permisivas (FEP o BHK), esa replicación será limitada al primer organismo infectado y prevendrá o minimizará la dispersión al medio ambiente.

7.4 Vía de dispersión biológica, modos conocidos o potenciales de interacción con el agente diseminante, tales como inhalación, ingestión, contactos en superficies, excavación, etc.

La vía de infección por replicación competente de vaccinia es normalmente por lesión cutánea, inyección accidental o a través del sistema respiratorio. En los ajustes clínicos con virus vaccinia se ha reportado que la persistencia en escara de la vacunación tras la escarificación (párrafo 69 de la parte 2B, Anexo 3 del “*Compendium of Guidance from the Health and Safety Commissions Advisory Committee on the genetic modification*” del ACGM) que puede llevar a un riesgo de dispersión. Sin embargo desde que MVA no se replica en mamíferos (no hay replicación ni escara en el lugar de inoculación) es improbable que con Tro Vax haya dispersión biológica. Los estudios han demostrado que no se produce diseminación de TroVax y que no se halla TroVax en la circulación que pueda suponer un riesgo para nada o para nadie

7.5 descripción de los ecosistemas a los que pudiera diseminarse el OMG

El OMG (TroVax) se confinará en el área de examen hospitalaria, lo que incluye la farmacia del hospital, el laboratorio y el área de autoclavado/incineración.

7.6 potencial para un aumento excesivo de su población en el medio ambiente

El OMG (TroVax) presenta un defecto de replicación en organismos, puede ser encontrado en tests hospitalarios y de ahí que sea improbable que sobreviva en el medio ambiente; en consecuencia, carece de potencial para un aumento de su población en el medio ambiente.

7.7 ventaja competitiva del OMG en relación con el receptor no modificado o con el organismo(s) parental

Dado que tanto el MVA como el OMG (TroVax) presentan un defecto de replicación (salvo en un abanico muy pequeño de líneas celulares permisivas), no poseen ninguna ventaja competitiva sobre los poxvirus naturales.

7.8 Identificación y descripción de los organismos diana, si procede

El OMG se va a utilizar en pacientes tumorales participantes en ensayos clínicos.

7.9 Mecanismo previsto y resultado de la interacción entre el OMG liberado y el organismo(s) diana, si procede,

El OMG (Tro Vax) esta diseñado para expresar la proteína 5T4. 5T4 es una glicoproteína oncofetal 72 kDa que se expresan en el 70% de los carcinomas de pecho, tracto gastrointestinal, colon y ovarios. A diferencia de otros autos antígenos TAA ejemplo CEA, se expresan los 5T4 como específicos tumorales solo con bajos niveles de expresión reportados en el intestino. Análisis inmuno histo-químicos indican que la expresión del 5T4 es un indicador de mala prognosis en el cancer colorectal. Además cuando las células tumorales sufren una transfección con el cDNA codificado para 5T4, muestran un incremento en la motilidad, sugiriendo que la expresión de esta molécula puede inducir

propiedades metastásicas en el tumor. El OMG puede ser inyectado a los pacientes. Las células del paciente inyectadas con el OMG expresarán la proteína 5T4. Esto debería resultar en que los pacientes alcancen una respuesta inmunitaria en contra de la proteína 5T4 y potencialmente un tratamiento para su cáncer.

7.10 Identificación y descripción de los organismos no diana que pudieran verse afectados adversamente por la liberación del OMG, y mecanismos previstos de toda interacción adversa identificada

El OMG presenta un defecto de replicación. Aunque cabe en lo posible que el personal del hospital pueda inyectarse por accidente, no es probable que ello conlleve ningún efecto nocivo. No es probable que se inyecten otros organismos. En Estados Unidos no ha habido notificación al US CDC sobre infecciones por MVA en trabajadores sanitarios que manejan MVA. Como la proteína 5T4 se expresa en la placenta, durante los ensayos las trabajadoras sanitarias embarazadas no deberán administrar el OMG. Aunque los estudios toxicológicos pre-clínicos en ratones gestantes, utilizando la versión de la familia muridae de la proteína 5T4 no ha indicado ningún riesgo ni para el feto ni para la madre. Ningún otro organismo se espera sea inyectado.

7.11 Probabilidad de desviaciones posliberación en las interacciones biológicas o en los posibles huéspedes

Dado que el OMG presenta un defecto de replicación, es extremadamente improbable.

7.12 Interacciones conocidas o previstas con organismos no diana en el medioambiente, incluidos competidores, presas, huéspedes, simbiosis, depredadores, parásitos y patógenos

Ninguna.

7.13 Afectación conocida o predicha de procesos bioquímicos

Ninguna.

7.14 otras posibles interacciones 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 (.)
- virus ARN (.)
- virus ADN (×) **Virus Vaccinia Ankara modificado**
- bacteria (.)
- hongo (.)
- animal:
 - mamíferos (.)
 - insectos (.)
 - peces (.)
 - otro animal (.)
- otro, especifíquese (reino, *phylum* y 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)**

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. Aunque su huésped natural es desconocido.**

- 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. Aunque su huésped natural es desconocido.

- c) Es utilizado frecuentemente en el país donde se hace la notificación?

Si (X) No (.)

- d) Es almacenado frecuentemente en el país donde se hace la notificación?

Si (X) No (.)

4. Hábitat natural del organismo

- a) Si es un microorganismo:

- Agua

(.)

- Suelo, en libertad

(.)

- Suelo, en simbiosis con sistemas radicales de plantas

(.)

- En simbiosis con sistemas foliares o caulinares de plantas

(.)

- En simbiosis con animales

(.)

- Otros especifíquense: El huésped natural del virus vaccina es desconocido. El virus MVA es una variedad producida artificialmente en el laboratorio que ha sido replicado en células renales de embrión de hámster (BHK21) o en fibroblastos de embrión de pollo primarios.

(×)

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

No aplicable

5. a) Técnicas de detección:

En ensayos clínicos previos que utilizaron un MVA recombinante, hemos 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

5. b) Técnicas de identificación:

MVA puede ser identificado utilizando PCR o técnicas con anticuerpos. OMG Tro Vax puede ser identificado por el MVA parental utilizando anticuerpos o PCR específica para la proteína 5T4

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

Sí (×)

No (.)

En caso afirmativo, especifíquese:

El organismo *Health and Safety Executive* del Reino Unido ha asignado al MVA la calificación de nivel I de Bioseguridad.

Las autoridades de bioseguridad de Alemania asignan un nivel BL1 para el uso del MVA si el gen no altera el rango del huésped del MVA o incrementa el riesgo.

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 (.)

- iii) esclerocios
(.)
- iv) esporas asexuales (hongos)
(.)
- v) esporas sexuales (hongos)
(.)
- vi) huevos
(.)
- vii) pupas
(.)
- viii) larvas
(.)
- ix) otras (especifíquense):
(.)

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. No hay razones para sugerir que la entrada del MVA en el organismo pueda ocurrir por una vía distinta. Sin embargo como MVA no se replica en mamíferos, la diseminación de organismo a organismo no ocurrirá. No es probable que sobreviva en el medio ambiente.

10. b) Factores que afectan a la diseminación:

Como MVA sólo se replica en un rango limitado de cultivos tisulares celulares es improbable que sobreviva en el medio ambiente. Por lo tanto es difícil identificar un factor que pueda causar una diseminación.

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 aplicable en España.

C. Información sobre la modificación genética

1. Tipo de modificación genética:

i) Inserción de material genético

(X)

ii) Eliminación de material genético

(.)

iii) Sustitución de una base

(.)

iv) Fusión celular

(.)

v) Otro (especifíquese):

(.)

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

El OMG (Tro Vax) está diseñado para expresar la proteína 5T4. 5T4 es una glicoproteína oncofetal 72 kDa que se expresan en el 70% de los carcinomas de pecho, tracto gastrointestinal, colon y ovarios. A diferencia de otros auto antígenos TAA ejemplo CEA, se expresan los 5T4 como específicos tumorales solo con bajos niveles de expresión reportados en el intestino. Análisis inmuno histo-químicos indican que la expresión del 5T4 es un indicador de mala prognosis en el cancer colorectal. Además cuando las células tumorales sufren una transfección con el cDNA codificado para 5T4, muestran un incremento en la motilidad, sugiriendo que la expresión de esta molécula puede inducir propiedades metastásicas en el tumor. El OMG puede ser inyectado a los pacientes. Las células del paciente inyectadas con el OMG expresarán la proteína 5T4. Esto debería resultar en que los pacientes alcancen una respuesta inmunitaria en contra de la proteína 5T4 y potencialmente un tratamiento para su cáncer.

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

Sí (X)

No (.)

En caso negativo, pase a la pregunta 5.

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

Sí (X)

No (.)

En caso negativo, pase a la pregunta 5.

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

a) Tipo de vector:

- Plásmido

- Bacteriófago

- Virus

- Cósmido

- Elemento de transposición

- Otros (especifíquese):

El vector está formado por las partes siguientes: cDNA de h5T4, secuencia plasmídica, promotor h5 y secuencia plasmídica 2. Flank 1 y Flank 2 son parte del MVA.

b) Identidad del vector:

Descripción del rasgo(s) genético o de las características fenotípicas y, en particular, de todo rasgo y características nuevos que puedan expresarse o dejarse de expresar

El vector del plásmido:

Construcción del vector de transferencia pTRV-1b de Tro Vax:

Este vector fue construido utilizando PCR para amplificar las regiones de flanqueo alrededor de III de delección a partir de un molde 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 básico pNEB 193 (obtenido en BioLabs New England). La región de codificación 5T4 se insertó en situación anterógrada al promotor H5. El promotor H5 dirige la expresión tanto en las fases iniciales como tardías del ciclo de replicación viral. 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. El promotor mH5 tiene una longitud de 70 nucleótidos. El plásmido pNEB posee el gen selectivo del anticuerpo para ampicilina. Como la inserción es anterógrada de promotor eucariota es poco probable su expresión en E.coli. La inserción es clonada en partes por el gen β -galactosidasa y la actividad para este gen se perderá

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 5T4 humano se ha insertado en una región no codificadora del genoma. Se ha comparado la replicación del virus MVA frente a la replicación de MVA-5T4 (TroVax) en células de FEP permisivas, hallándose que la cinética de replicación de ambas es semejante.

c) Rango del Huésped del vector:

- Vector plásmido
El vector plásmido se replicará en E.coli
- MVA
MVA se replicará en células fibroblásticas embrionarias de pollo y en células BH21.

d) Presencia en el vector de secuencias que dan un fenotipo específico identificable

Si (X)

No (.)

Resistencia a antibióticos (X): el vector plásmido contiene un marcador antibióticos resistente (ampicilina). La inserción se clona en partes del gen de β -galactosidasa de esta manera la actividad de este gen se perderá.

Otras (especifique): MVA no contiene un marcador selectivo.

Indique qué gen de resistencia a los antibióticos se inserta

e) Fragmentos constituyentes del vector:

El vector plasmídico: es el vector básico de clonación pNEB 193 (obtenido por New England BioLabs) un derivado de pUC.. El plásmido pNEB 193 posee un gen de anticuerpo selectivo para ampicilina.

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

i) Transformación

(X)

ii) Electroporación

(.)

iii) Macroinyección

(.)

iv) Microinyección

(.)

v) Infección

(X)

vi) Otros

El vector plasmídico se replica mediante la transformación en E.coli.

Construcción del OMG (TroVax):

Monocapas de células de fibroblasto de embrión de pollo (FEP) primarios se infectaron con p581 del MVA. Tras una hora a 37°C, se eliminó el virus y las células se transfectaron con el plásmido de transferencia (pTRV-1b), incubándose después a 37°C. Cuarenta y ocho horas después de la transfección se recogieron las células, se congelaron en nieve carbónica y se descongelaron a 37°C tres veces, con agitación vigorosa con vórtex entre los ciclos de congelación-descongelación, se sometieron a diluciones seriadas y se inocularon en células de FEP. Tras adsorción durante 1 hora, se lavaron las células y se incubaron en MEM que contenía un 2% de suero bovino fetal a 37°C. Dos días después, se visualizaron los focos positivos de h5T4 recombinante mediante inmunotinción en vivo de los FEP sobre placas de 6 pocillos recubiertos con concanavalina A, de forma similar a la descrita por Earl et al. 1998. (Earl P, Wyatt LS, Moss B *et al.* Generation of vaccinia virus recombinant viruses. En: Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons Inc, 1998; Suppl 43: Units 16.17.1-16.17.19.). Se purificaron las placas seis veces.

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

i) Transformación

(.)

ii) Microinyección

(.)

iii) Macroencapsulación

(.)

iv) Macroinyección

(.)

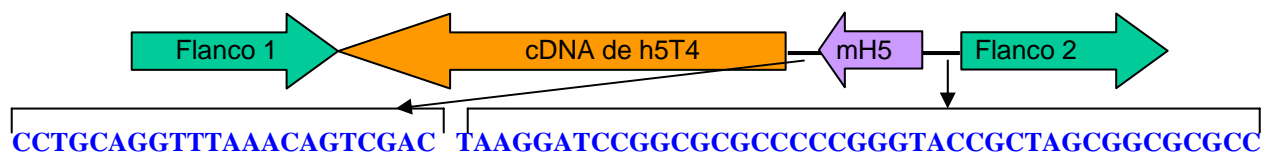
v) Otros

...

6. Información sobre el fragmento de inserción:

a) Composición del fragmento de inserción:

En la figura 1 se observa la inserción como se presenta en el plásmido bacterial



- En el OMG (TroVax) persisten dos regiones cortas de secuencias plasmídicas en el insertado que son transferidas en el OMG (Tro Vax) (ver figura 1)
- Regiones de flaqueo 1 y 2 alrededor de III de delección del MVA
La región marcada mH5 es un promotor vaccinia H5 modificado (Wyatt et al. 1996. Vaccine 14, 1451-1458). El promotor H5 dirige la expresión tanto en las fases iniciales como tardías del ciclo de replicación viral. 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. El promotor mH5 tiene una longitud de 70 nucleótidos. La secuencia es la siguiente:

ATTAAAAATTGAAAATAAATACAAAGGTTCTTGAGGGTTG
TGTTAAATTGAAAGCGAGAAATAATCATAAATA

- La región marcada h5T4 cDNA es la secuencia codificante para la glicoproteína oncofetal 5T4 72 kDa humana que se expresa en cerca del 70% de los carcinomas de pecho, tracto gastrointestinal, colon y ovarios.
- La secuencia del aminoácido es :

MPGGCSRGAAGDGRLLRLALVLLGWVSSSSPTSSASSFSSSAPFLASAVSAQPP
LPDQCPALCECSEAARTVKCVNRNLTEVPTDLPAYVRNFLTGNQLAVLPAGAFAR
RPPLAELAALNLSGSRLDEVRAFAFEHLPSLRQLDLSHNPLADLSPFAFSGSNASVS
APSPLVELILNHIVPPEDERQNRSEFGMVVAALLAGRALQGLRRLELASNHFLYLPR
DVLAQLPSLRHLDLSNNSLVSLTYVSFRNLTHLES LHLEDNALKVLHNGTLAELQG
LPHIRVFLDNNPWVCDCHMADMVTWLKETEVVQGKDARLTCAYPEKMRNRVLL
LNSADLDCDPPSLQTSYVFLGIVLALIGAIPLLVLVYLNKGIKKWMHNIRDACRD
HMEGYHYRYEINADPRLTNLSSNSDV

- La secuencia del nucleótido es la siguiente:

CTGTCTAAACGCGTTAGTAAACATGGCGAGGAAATAAATCATATAAAAAATGATTTTCATG
ATTAACCATGTTGTGAAAAAGTCAAGAACGTTACATTGGCGGACAATCTAAAAACAATA
CAGTGATTGCAGATTTGCCATATATGGATAATGCGGTATCCGATGTATGCAATTCATGTGA
TAAAAAGAATGTATCAAGAATATCCAGATTTGCTAATTTGATAAAGATAGATGACGATGAC
AAGACTCCTACTGGTGTATATAATTTTTAAACCTAAAGATGCCATTCTGTTATTATATC
CATAGGAAAGGATAGAGATGTTTGTGAACATTAATCTCATCTGATAAAGCGTGTGCGTG
TATAGAGTTAAATTCATATAAAGTAGCCATTCTCCCATGGATGTTTCCTTTTTACCAAAG
GAAATGCATCATTGATTATTCTCTGTTTGTATTCTCTATCGATGCGGCACCTCTCTTAAG
AAGTGTAAACCGATAATAATGTTATTATATCTAGACACCAGCGTCTACATGACGAGCTTCCG
AGTTCCAATTGGTTCAAGTTTTACATAAAGTAAAGTCCGACTATTGTTCTATATTATATAT
GGTTGTTGATGGATCTGTGATGCATGCAATAGCTGATAATAGAAGTACGCAAATATTAGC
AAAAATATATTAGACAATACTACAATTAACGATGAGTGTAGATGCTGTTAATTTGAACCACA
GATTAGGATTCTTGATAGAGATGAGATGCTCAATGGATCATCGTGTGATATGAACAGACA
TTGTATTATGATGAATTTACCTGATGTAGGCGAATTTGGATCTAGTATGTTGGGGAAATAT
GAACCTGACATGATTAAGATTGCTCTTTCGGTGGCTGGTACTCGAGTCAGACATCCGAGT
TAGAACGAGGTTTGTAACTGCGGTCGCCATTGATTTTCATATGATTAATGATACCAATTT
CATGTGATCCCTGCAGGCATCTCTGATGTTATGCATCCACTTTTTATCCCCTTGCGGTTC
AAATACAAAACCAGGAGGAAAAATAGCGCCTATCAGGGCTAAAACAATACCCAGGAAGACA
TAAGAGGTTTGAGGGATGGGGGAAGAATCGGGTCACAGTCCAGGTCAGCACTGTTGAG
TTCCAAGAGGACCCGATTCCCTCAATTTTTCCGGATATGCACAGGTGAGCCGGTCTTTGCC
CTGCACTACCTCTGTTTCTTGAGCCAGGTCACCATGTCTGCCATGTGGCAGTGCAGACA
CCCAGGGATTGTTGTCCAGGAAAAACCTAATGTGGGGTAGACCTTGAACCTAGCCAGG
GTGCCATTGTGAAGGACCTTGAGGGCATTGTCTCCAGGTGGAGGCTTTCTAGATGTGT
CAGGTTGCGGAAGGACAGTAGGTCAGGCTCAGGCTCACCAGCGAATTATTA
CTTAAGTCCAGGTGCCTGAGGCTGGGCAGTTGGGCCAGCACATCCCAGGCGAGGTA
GGAAGTGGTTGCTGGCCAGCTCCAAGCGGGCGGAGCCCTGCAGTGCACGGCCCGCCA
GCAGGGCCGCCACCACCATGCCCTCGAAGCTCCGGTCTGCCGCTCATCTTCAGGGGG
CACGATGTGGTTCAGGATCAGTTCACAAGGGGACTGGGGCCGAGACGCTGGCATTG
CTGCCCCGAGAAAGCGAAGGGACTGAGGTCGGCCAGTGGGTTGTGGCTGAGGTCGAGCT
GGCGCAGGCTGGGCAGATGCTCGAAGGCGCCCGCGGCACCTCGTCCAGGCGGCTGC
CGCTGAGGTTGAGCGCGGCCAGCTCCGCCAGCGGCGGCGGCGGCGGCGAAGGCGCCG
GCAGGGAGCACGGCCAGCTGGTTGCCGTAAGGAAGAGGTTGCGCACGTAGGCGGGC
AGGTCCTGGGCACCTCGGTGAGATTGCGGTTAACGCACCTGACTGTGCGCGCTGCCTC
GGAGCACTCGCACAGCGCGGGGCACTGGTCCGGCAGCGGGGGCTGGGCGGACACGG
CGGAAGCCAGGAACGGCGCCGAGGAGGAGAAGGAGGATGCCGAGGAGGTGGGAGAAG
ACGAGGAGACCCAGCCAGGAGTACCAGCGCTAGTCGCGCCAGCCGAGACGCCCCGT
CCCGGCGGCGGGGCCCCGGGAGCACCCCCAGGCATCGCGGCTCGCGGTTGCGGCC
GCCTGCAGGTTTAAACAGTCGACTATTTATGATTATTTCTCGCTTCAATTTAACACAACC
CTCAAGAACCTTTGTATTTATTTCAATTTTAAATTAAGGATCCGGCGCGCCCCGGGTAC
CGCTAGCGGCGCGCCTTTGGAAAGTTTTATAGGTAGTTGATAGAACAAAATACATAATTT
GTAATAAATCACTTTTTATACTAATATGACACGATTACCAATACTTTTGTACTAATATC
ATTAGTATACGCTACACCTTTTCCCTCAGACATCTAAAAAATAGGTGATGATGCAACTT
TCATGTAATCGAAATAATACAAATGACTACGTTGTTATGAGTGTGGTATAAGGAGCCCA
ATTCCATTATTCTTTAGCTGCTAAAAGCGACGCTTTGATTTTGTATAATTACCAAGGAT
AAAATATCTTACGACTCTCCATACGATGATCaTAGTTACAACATACAAATTAATCATTGA
CTGCTAGAGATGCCGGTACTTATGATGTGCATTCTTTATGACATCGCCTACAAAATGACAC
TGATAAAGTAGATTATGAAGAATACTCCACAGAGTTGATTGTAATACAGATAGTGAATCG
ACTATAGACATAATACTATCTGGATCTACACATTCACCGGAAACTAGTTCTGAGAAACCTG
ATTATATAGATAATTTCTAATTGCTCGTGGTATTCGAAATCGCGACTCCGGAACCAATTAC
TGATAATGTAGAAGATCATACAGACACCGTCACATACACTAGTATAGCATTAAATACAGTA
AGTGCATCATCTGGAGAATCCACAACAGACGAGACTCCGGAACCAATTACTGATAAAGAA
GAAGATCATACAGTTACAGACACTGTCTCATACACTACAGTAAGTACATCATCTGGAATTG
TCACTACTAAATCAACCACCGATGATGCGGATCTTTATGATACGTACAATGATAATGATAC
AGTACCATCAACTACTGTAGGCGGTAGTACAACCTCTATTAGCAATTATAAAACCAAGGA
CTTTGTAGAAA

- b) Fuente de cada parte constitutiva del fragmento de inserción:
 Las regiones de flanco 1 y 2 y la región promotora H5 provienen del Virus Vaccinia.
 Las secuencias de DNA del plásmido bacteriano se detallan en la figura 1. La región marcada h5T4 del ADNc es la secuencia que codifica a la glicoproteína oncofetal humana 5T4 de 72 kDa.
- c) Función prevista de cada parte constitutiva del fragmento de inserción en el OMG:
 Las regiones de flanco en el vector plasmídico son homólogas a las secuencias del vector en el VAM, que permiten al Virus VAM producir mediante recombinación homóloga TroVax recombinante.
 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 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 cancer.
- d) Localización del fragmento de inserción en el organismo receptor:
 - En un plásmido libre (X) El plásmido de transferencia de Trovax, pTRV-1b
 - Integrado en el cromosoma (.)
 - Otros (especifíquense): ...
 La inserción se localiza entorno a la región III en el vector VAM. El vector VAM es un virus.
- e) ¿Contiene el fragmento de inserción partes cuyo producto o funciones se conozcan?
 Sí (.) No (X)
 En caso afirmativo, especifíquense: ...
 La expresión del gen humano 5T4 en células infectadas con el vector MVA no tendrá efecto de diseminación.

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

1. Indíquese si es:

- viroide (.)
- virus ARN (.)
- virus ADN (X) Virus Vaccinia Ankara modificado (MVA)
- bacteria (.)
- hongo (.)
- animal:
 - mamíferos (X)
 - insectos (.)
 - peces (.)
 - otro animal (.) Homo sapiens...
- otro, especifíquese (reino, *phylum* y clase):

El inserto presente en el vector plasmídico contiene secuencias del VVAM, vaccinia y humano.

2. Nombre completo:

	MVA/vaccinia	Gen humano 5T4
i) Orden y taxón superior (animales):	Poxviridae	Homo
ii) Familia:		
iii) Género:	Orthopoxvirus	
iv) Especie: ...		Sapiens
v) Subespecie: ...		
vi) Cepa:		
vii) Cultivar/línea de reproducción: ...		
viii) Patovar: ...		
ix) Nombre vulgar:	Virus Vaccinia Ankara modificado (MVA)	Humano

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

Sí (X)	No (X)
<p>En caso afirmativo, especifíquese: Si: El promotor H5 se deriva de la vacuna que es patogénica, sin embargo la secuencia tiene solamente 70 nucleóticos que no codifican a ningún gen perjudicial. No: El gen 5T4 es humano.</p> <p>a) ¿Para cuál de los organismos siguientes? - Humanos (X)</p>	

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

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

Sí (.)

No (X)

No se sabe (.)

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

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

Sí (X)

No (.)

En caso afirmativo, especifíquese: ...

El Virus Vaccinia es un organismo de nivel 2 de bioseguridad, sin embargo como se ha declarado anteriormente solo contiene 70 nucleóticos de la secuencia y estos no están asociados a la patogenicidad.

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

Sí (X)

No (.)

No se sabe (.)

El MVA es una forma atenuada de vaccinia. Durante la replicación de virus bajo condiciones naturales puede producirse un fenómeno de recombinación entre poxvirus estrechamente relacionados. Sin embargo, solamente están presentes 70 nucleótidos de la secuencia de vaccinia y la secuencia nucleotídica se produjo de forma sintética utilizando oligonucleótidos de síntesis.

El intercambio de secuencias entre el MVA y humanos es muy improbable.

E. Información sobre el organismo modificado genéticamente

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

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

Sí (.)

No (X)

No se sabe (.)

Especifíquese:

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 5T4 humano se ha insertado en una región no codificadora del genoma. Se ha comparado la replicación del virus MVA frente a la replicación de MVA-5T4 (TroVax) en células de FEP permisivas, hallándose que la cinética de replicación de ambas es semejante.

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

Sí (.)

No (X)

No se sabe (.)

Especifíquese: en lo que concierne a estudios de multiplicidad en cultivos celulares, ambas cepas se comportan de manera similar.

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

Sí (.)

No (X)

No se sabe (.)

Especifíquese:

La expresión del gen humano 5T4 en células infectadas con vectores de VAM células infectadas no tendrá efecto de diseminación.

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

Sí (.)

No (X)

No se sabe (.)

Especifíquese:

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:*

El análisis mediante secuenciación y *southern blot* del stock maestro de siembra viral y los lotes clínicos finales producidos 10 pases más tarde han demostrado que el trasgen es genéticamente estable tras múltiples pases. Medidas del porcentaje de focos que expresa 5T4 en fibroblastos de embrión de pollo no han detectado cambios tras múltiples pases. Así mismo, el análisis mediante *western blot* también evidencia que no hay cambios detectables en el nivel de expresión proteica del trasgen tras múltiple pases.

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

Sí (.)

No (X)

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 II y el inciso i) del punto 2 de la letra E 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:

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

La detección de la carga viral de los pacientes tratados se ha cumplido utilizando OMG específicos primarios y PCR.

b) Técnicas utilizadas para identificar el OMG:

- (i) El OMG será caracterizado mediante su secuenciación, *Southern blotting* o mediante PCR diagnóstica.
- (ii) La expresión del gen donante (5T4) se detecta utilizando un *western blotting* o una inmunotinción de las células infectadas con el OMG (TroVax). El anticuerpo primario utilizado para la detección es H8, un anticuerpo monoclonal dirigido frente a la proteína 5T4 que se obtiene mediante purificación a partir de placenta humana (Hole and Stern. 1988. Br. J. Cancer 57, p239-246). Este anticuerpo solamente reconoce a 5T4 humana en su forma natural correctamente glucosilada.

F. Información sobre la liberación

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

La finalidad de la liberación es un estudio clínico en fase III, dirigido a investigar la eficacia de un tratamiento para el cáncer renal. El título exacto del ensayo es “*Estudio internacional, aleatorizado, en doble ciego, controlado con placebo y de grupos paralelos, diseñado para evaluar si TroVax®, añadido al tratamiento de primera línea del cáncer, prolonga la supervivencia de pacientes con adenocarcinoma renal de células claras localmente avanzado o metastático.* (TV3/001/06)”

Se trata de un estudio internacional de fase III, aleatorizado, en doble ciego, controlado con placebo y de grupos paralelos, en pacientes con cáncer de células claras renal localmente avanzado o metastático, diseñado para evaluar si TroVax®, añadidas al tratamiento de primera línea del cáncer, prolonga la supervivencia de los pacientes.

En dicho estudio se van a reclutar 700 pacientes, cada uno de los cuales recibirá uno de tres tratamientos antitumorales estándar previamente definidos (IL-2 inyectable a dosis bajas, IFN- α inyectable por vía subcutánea o sunitinib en comprimidos) y 13 inyecciones intramusculares de TroVax®. Todos los pacientes serán sometidos a seguimiento en cuanto a su supervivencia.

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

Sí (.)

No (.)

En caso afirmativo, especifíquese:

El hábitat natural del virus vaccinia es desconocido, MVA es una especie de laboratorio.

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 hospitalarios Europeos (España, Francia, Alemania, Reino Unido, Holanda, Polonia) y en Estados Unidos. Los centros donde va a ser realizado no han terminado de decidirse.

b) Área del lugar (m²):

Los centros son habitaciones separadas de los hospitales o áreas alejadas de las salas de pacientes. No puede definirse de forma general la dimensión de las habitaciones hasta que todos los centros hayan sido identificados finalmente.

- i) Lugar real de la liberación (m²): ...
- ii) Área de liberación más amplia (m²): ...

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

No aplicable

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

No aplicable

4. Método y amplitud de la liberación:

a) Cantidad de OMG que vaya a liberarse:

La pauta de dosis será de 13 inyecciones, administradas a lo largo de un período de 65 semanas. Cada inyección consistirá en 1 ml por vía intramuscular. Habrá un solo nivel de dosis, 5×10^9 TCID₅₀/ml por inyección.

b) Duración de la operación:
65 semanas.

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

1. medidas de protección laboral adoptadas durante la liberación

El personal sanitario en los centros de estudio, todo el personal de farmacia, y de laboratorio involucrado en el ensayo recibirá instrucciones detalladas del manejo de TroVax. Los centros tienen lugares adecuados para el manejo y almacenaje de TroVax, antes de recibir algún ejemplar. Todo el personal sanitario que maneje TroVax o materiales contaminados por él debe llevar mandil, guantes, mascarilla y gafas protectoras.

2. tratamiento del punto después de la administración

El punto de la inyección debe limpiarse con una torunda con alcohol, tras lo que se practicará la inyección por vía intramuscular. A continuación, el punto de inyección se limpiará de nuevo con una torunda con alcohol y se cubrirá después con un vendaje oclusivo, que se levantará y eliminará antes del alta del paciente.

3. técnicas previstas para la eliminación o inactivación del OMG al término del experimento

Todos los residuos sólidos se desactivarán mediante autoclavado, tras lo que se incinerarán mediante métodos habituales o de acuerdo a las regulaciones locales para OGM del hospital.

Todos los vertidos líquidos constituyen superficies a tratar con Virkon (Antec Int) u otro producto para inactivación viral aprobado localmente para los virus vaccinia & paravacuna, de acuerdo a las instrucciones de su fabricante.

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

Todo el material sólido de uso repetido, por ejemplo, mandiles, gafas, se desactivará en autoclave o se incinerará.

Si las normas locales fueran más estrictas que las medidas aquí descritas, prevalecerán las primeras (por ejemplo, sistema de esclusa de aire antes de la sala auxiliar para las inyecciones).

*5. Descripción resumida de las condiciones ambientales medias (clima, temperatura, etc.):
No aplicable*

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

TroVax® se ha administrado a más de 100 pacientes con cáncer colorrectal o renal metastático, lo que ha supuesto más de 350 dosis. No se han observado acontecimientos adversos graves atribuidos a TroVax® por los investigadores o el promotor. La mayoría de los pacientes señalaron reacciones pasajeras leves en el punto de inyección, junto con febrícula pasajera. No se ha comunicado ningún otro acontecimiento adverso notable, frecuente o grave en los estudios con administración de TroVax® como monoterapia en

pacientes profusamente pretratados o en estudios de combinación de TroVax® con quimioterapia (5FU y leucovorin en combinación con oxaliplatino [1] o irinotecan [2]) o con IL-2 (régimen intravenoso a dosis altas [3] o inyecciones subcutáneas a dosis bajas [4]).

En todos los estudios, TroVax® indujo una respuesta inmunitaria frente al antígeno 5T4 en más del 90% de los pacientes tratados. Se observó una respuesta de anticuerpos o de la inmunidad celular en prácticamente todos los pacientes tras la segunda o tercera inyección de TroVax®. Las respuestas de células CD8+ fueron por lo común mayores que las observadas con otras vacunas frente al cáncer señaladas en la literatura. De los tres estudios de fase I o II llevados a cabo en el cáncer colorrectal, dos han demostrado una correlación entre la respuesta del tumor y la respuesta inmunitaria frente a 5T4. Es de destacar que esta correlación fue específica para la respuesta inmunitaria frente a 5T4, sin que se observase correlación con otros marcadores de la inmunocompetencia general [5] [6].

[1] Datos del ensayo clínico de fase II de Oxford BioMedica Clinical en curso titulado Trial Phase II “An open label study of TroVax® given in conjunction with 5-fluorouracil/Leukovorin/Oxaliplatin: Safety and immunogenicity before during and after chemotherapy”

[2] Datos del ensayo clínico de fase II de Oxford BioMedica en curso titulado Trial Phase II “An Open Label Study Of TroVax® Given In Conjunction With 5-Fluorouracil/Leukovorin (De Gramont Regimen) Plus Irinotecan: Safety And Immunogenicity Before During And After Chemotherapy”

[3] Datos del ensayo clínico de fase II de Oxford BioMedica en curso titulado Trial Phase II “A preliminary study of the safety, immunogenicity and clinical efficacy of TroVax® given in conjunction with interleukin 2 (IL-2) in the treatment of stage IV renal cell cancer”

[4] Datos del ensayo clínico de fase II de Oxford BioMedica en curso titulado Trial Phase II “Safety, immunology and biological activity evaluation of TroVax® in treatment of patients with locally advanced or metastatic renal carcinoma”

[5] Harrop R, et al. Póster presentado en AACR 2005. Phase II studies in metastatic CRC with the Cancer Vaccine TroVax® in combination with chemotherapy: A productive partnership.

[6] Harrop R, et al. “Vaccination of Colorectal Cancer Patients with modified Vaccinia Ankara Delivering the Tumor Antigen 5T4 (TroVax) Induces Immune Responses which Correlate with Disease Control: A Phase I/II Trial” Submitted to Clinical Cancer Research Dec 2005

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

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

i) Orden y taxón superior (animales): ...Homo sapiens
ii) Familia: ...
iii) Género: ...
iv) Especie: ...
v) Subespecie: ...
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 cancer.

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

No aplicable

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) se confinará en el área de examen hospitalaria, lo que incluye la farmacia del hospital, el laboratorio y el área de autoclavado/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:

Es posible que el personal del hospital se inyecte por accidente, pero es muy improbable que esta inyección tenga algún efecto infeccioso. El único efecto potencial puede darse en mujeres embarazadas dado que la proteína 5T4 se expresa en células placentarias. Por tanto durante el ensayo las profesionales sanitarias embarazadas no deberán administrar el OMG. No obstante estudios preclínicos toxicológicos han demostrado en ratones preñados utilizando la versión murina de la proteína 5T4 no se ha indicado ningún riesgo ni para el feto, ni para la madre. No es probable que se inyecten otros organismos.

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

7. Probabilidad de intercambio genético in vivo:

a) Del OMG a otros organismos del ecosistema de liberación:
Improbable debido al defecto en la replicación del OMG

b) De otros organismos al OMG:

Improbable

c) Consecuencias probables de la transferencia de genes:
El gen insertado no es patógeno, ni virulento, por tanto no hay posibilidad de consecuencias.

8. *Referencias de los resultados pertinentes (si los hay) de estudios sobre el comportamiento y las características del OMG; y sobre su repercusión ecológica llevados a cabo en ambientes naturales simulados (por ejemplo, microcosmos, etc.):*
Debido a la atenuación y naturaleza del OMG, no es aplicable a este estudio.

9. *Posibles interacciones ambientalmente significativas con procesos biogeoquímicos (si son diferentes del organismo receptor o parental):*
No aplicable

H. Información sobre el seguimiento

1. Métodos de seguimiento de los OMG:

En ensayos clínicos previos utilizando MVA, la carga viral de los pacientes tratados ha sido monitorizada 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.

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

PCR cuantitativa.

4. Tamaño del área de seguimiento (m²):

El seguimiento de los pacientes o el área de tratamiento del hospital no ha sido establecida, a la luz de los resultados de monitorización obtenidos en ensayos clínicos anteriores.

5. Duración del seguimiento:

Véase la sección 4 anterior.

6. Frecuencia de seguimiento:

Véase la sección 4 anterior.

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

1. Tratamiento del lugar tras la liberación:

El punto de la inyección debe limpiarse con una torunda con alcohol, tras lo que se practicará la inyección por vía intramuscular. A continuación, el punto de inyección se limpiará de nuevo con una torunda con alcohol y se cubrirá después con un vendaje oclusivo, que se levantará y eliminará antes del alta del paciente. El resto de residuos se tratarán según se describe en el punto 3b.

2. Tratamiento del OMG tras la liberación:

Como el OMG tiene un defecto de replicación, la única fuente de OMG serán los residuos clínicos, que serán tratados según se describe en el punto 3b.

3. a) Tipo y cantidad de residuos producidos

Tipo: Agujas, jeringas, viales, torundas, vendas de los pacientes, batas de un solo uso, gafas de un solo uso (si procede) y material de limpieza.

Cantidad: Baja (solamente precisará autoclavado/incineración el material en contacto directo con TroVax).

3. b) Tratamiento de los residuos

Información sobre cómo se van a desactivar los 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 (Antec Int) u otro producto equivalente aprobado localmente para la desinfección de superficies frente a virus vaccinia & paravacuna, de acuerdo a las instrucciones de su fabricante.

En los estudios de validación se han testado dos ejemplos representativos de poxviridae, a saber, los virus vaccinia (el origen de TroVax) y paravacuna bovina. En el caso del virus vaccinia, la exposición durante 10 minutos a unas soluciones al 0,5% o al 1% de Virkon resultaron en una reducción del título infeccioso de 1.000 veces, demostrándose la inactivación completa a los 30 minutos. En el caso del virus paravacuna se examinó un abanico de dilución mayor, demostrándose la inactivación completa tras la exposición durante 30 minutos a una solución 1:300 p/v.

Se utiliza el desinfectante Virkon o equivalente 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.

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 se detallan en la sección J2.

2. Métodos de eliminación del OMG o de los OMG de las áreas potencialmente afectadas:
Se seguirán los siguientes métodos y procedimientos para el control del OMG en caso de diseminación inesperada

VERTIDOS MENORES

- (i) Limpiar la superficie con IMS al 70% o peróxido de hidrógeno al 2%, como Virkon.
- (ii) Descontaminar los instrumentos mediante su inmersión en la solución desinfectante (por ejemplo, solución de Virkon al 2%) durante 30 minutos.

VERTIDOS MEDIANOS

- (a) Recoger el vertido con toallitas de papel empapadas en solución de Virkon al 2% (o equivalente) recién preparada.
- (b) Dejar transcurrir 10 minutos
- (c) Eliminar las toallitas en una bolsa de autoclave.
- (d) Llevar la bolsa de autoclave al laboratorio para su autoclavado

GRANDES VERTIDOS

- (i) *Gran vertido fuera de la cabina de seguridad biológica*
 - (a) Suspender inmediatamente lo que se esté haciendo
 - (b) Contener el vertido utilizando los kits para vertido disponibles
 - (c) Informar al jefe del laboratorio
 - (d) Volver al vertido
 - (e) Además de la bata de laboratorio, llevar mandil, protección ocular, calzas y guantes Marigold (o equivalente) desechables.
 - (f) Echar sobre el vertido una solución de Virkon al 2% (o equivalente)
 - (g) Cubrir el vertido con toallitas de papel o con el material absorbente del kit para vertidos
 - (h) Dejar transcurrir un mínimo de 30 minutos
 - (i) Echar el material para la recogida del vertido a una bolsa de autoclave y enviarla al laboratorio para su autoclavado
 - (j) Lavar el área del vertido con un detergente y dejar secar.

Nota: Virkon desarrolla una actividad antimicrobiana de amplio espectro, aunque se reduce ante la materia orgánica. Se utiliza para la desinfección de laboratorio de rutina.

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

En el caso de que exista un vertido en el interior del hospital se seguirá el procedimiento arriba descrito (J2). Si ocurriese un vertido durante el transporte, el área contaminada será fumigada con un desinfectante adecuado y cualquier material que pudiera estar contaminado será llevado a autoclavar. No obstante los envíos serán de un número muy reducido de muestras (menos de 50 viales de 2 ml), dicho envío será realizado en contenedores autorizados EU, el área que pudiera contaminarse sería muy pequeña.

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 (FEP 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.