

## 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/11/25
c) Fecha del acuse de recibo de la notificación:
d) Título del proyecto: “Ensayo clínico en fase I-II de vacunación terapéutica de pacientes con hepatitis crónica C mediante la administración de células dendríticas autólogas transducidas con un vector adenoviral que codifica la proteína NS3”
e) Periodo propuesto para la liberación: 2011-2013

##### 2. Notificador

Clínica Universidad de Navarra

##### 3. Definición del OMG

a) Indíquese si el OMG es:

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

b) Identidad del OMG (género y especie):

AdNS3 es un adenovirus recombinante defectivo derivado del adenovirus humano tipo 5, Familia Adenoviridae, Género Mastadenovirus

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

AdNS3 es un adenovirus genéticamente estable. Dicha estabilidad genética se verifica en distintos pasos del proceso de producción, mediante análisis de identidad (secuenciación genómica), pureza, potencia biológica y seguridad (análisis de

adenovirus replicativos competentes), tanto del lisado celular inicial como del producto final envasado.

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

Sí (.)

No (x)

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

Sí (.)

No (x)

En caso afirmativo:

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

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

Sí (.)

No (x)

En caso afirmativo:

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

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

No existen datos relativos al impacto ambiental de AdNS3 al medio ambiente puesto que es la primera vez que se utiliza. Sin embargo, no hay razones científicas para suponer que el empleo de NS3 como transgén en este vector viral modifique las características de distribución, shedding o capacidad replicativa con respecto a otros transgenes utilizados en el mismo vector adenoviral, por lo que resultan aplicables todas las consideraciones relativas a vectores adenovirales de primera generación que se comentan a continuación. Adenovirus recombinantes defectivos han sido utilizados ampliamente en ensayos clínicos, tanto en administración directa como en estrategias de terapia celular (contenidos en el interior de células). Se ha determinado la posibilidad de liberación a través de la orina o saliva, que suele desaparecer a los pocos días de la administración. En algunos casos se ha detectado hasta dos semanas después de la administración, principalmente en aquellos grupos de pacientes que recibieron dosis altas de virus y estaban parcialmente inmunocomprometidos, como ocurre en algunos casos de cáncer, donde hay una menor respuesta inmunitaria adaptativa, responsable de la eliminación viral. Como muestra, la experiencia con un vector adenoviral p53 revela que, en los ensayos fase I, II y III realizados en más de 200 pacientes, se detectó positividad de un ELISA para antígenos del hexón en 4 pacientes en esputo u orina. De ellos, sólo en uno se confirmó la existencia de adenovirus con capacidad infectiva mediante FACS. Es importante resaltar que en ningún caso se detectaron adenovirus con capacidad de replicación que indicaran la ocurrencia de fenómenos de recombinación *in vivo* (Grace, 2000). Asimismo, la experiencia de un centro que trató 21 pacientes con cáncer de pulmón es que no se detectaron partículas con capacidad

infecciosa en secreciones corporales más allá del segundo día, que no se detectaron en orina en ningún caso y que no se detectaron indicios de transmisión a los familiares y el equipo médico (presencia del vector por PCR e elevación del nivel de anticuerpos preexistente) (Escudier, 2000). Estudios previos de terapia génica, realizados por el mismo grupo de investigación, en la Clínica Universidad de Navarra, no han detectado liberación viral en muestras biológicas (esputo, saliva, orina, heces) en pacientes tratados con células dendríticas transducidas con adenovirus que codifican otro transgén (IL-12). La única excepción es la posibilidad de detectar en suero mínimas cantidades de virus, que nunca han persistido más allá de los 120 minutos.

Puesto que el hombre es el huésped natural de este vector, y hay un gran porcentaje de la población que ha estado en contacto con este microorganismo, lo que ha llevado a la inducción de inmunidad anti-adenoviral, no es esperable que AdNS3 tuviera un impacto medioambiental superior al que tienen los adenovirus salvajes.

## **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 (x)
- bacteria (.)
- hongo (.)
- animal:
  - mamíferos (.)
  - insectos (.)
  - peces (.)
  - otro animal (.)
- otro, especifíquese (reino, *phylum* y clase): ...

### *2. Nombre*

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

### *3. Distribución geográfica del organismo*

<p>a) Autóctono del país que notifica o establecido en él:</p> <p style="text-align: center;">Sí (x) No (.) No se sabe (.)</p>
<p>b) Autóctono de otros países de la Comunidad o establecido en ellos:</p> <p>i) Sí (x)</p> <p>En caso afirmativo, indíquese el tipo de ecosistema en que se encuentra: Atlántico: .x. Mediterráneo: .x. Boreal: .. Alpino: .x. Continental: .x. Macaronésico: x..</p> <p>ii) No (.)</p> <p>iii) No se sabe (.)</p>

#### 4. Hábitat natural del organismo

a) Si es un microorganismo:

- Agua (.)
- Suelo, en libertad (.)
- Suelo, en simbiosis con sistemas radiculares de plantas (.)
- En simbiosis con sistemas foliares o caulinares de plantas (.)
- En simbiosis con animales (.)
- Otros especifíquense :

El adenovirus humano tipo 5 se replica en células humanas.

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

No aplica

5. a) Técnicas de detección:

El adenovirus humano tipo 5 se detecta mediante PCR a tiempo real a partir de muestras de tejidos, cultivos, fluidos u otro tipo de muestras biológicas, utilizando cebadores correspondientes a la región E1. La sensibilidad de esta técnica es de 100 copias de DNA-genomas.

5. b) Técnicas de identificación:

La identificación se hace mediante PCR del DNA viral, y se utiliza la región E1 porque no se encuentra en adenovirus recombinantes defectivos.

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

Sí (x)

No (.)

En caso afirmativo, especifíquese:

El adenovirus humano tipo 5 está clasificado como nivel de bioseguridad de clase II.

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

Sí (x)	No (.)	No se sabe (.)
En caso afirmativo:		
a) ¿Para cuál de los organismos siguientes?		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Humanos (x)</li> <li>- Animales (.)</li> <li>- Plantas (.)</li> <li>- Otros (.)</li> </ul>		
b) Aporte la información pertinente especificada en la letra d) del punto 11 de la letra A de la sección II del anexo III A de la Directiva 2001/18/CE:		
<p>El adenovirus humano tipo 5 está clasificado como de nivel de bioseguridad de clase II. La infección aguda en humanos se caracteriza por originar enfermedad respiratoria aguda, fiebre faringoconjuntival, cuya patogenicidad varía en perfil clínico y severidad. Los síntomas incluyen fiebre, rinitis, faringitis, tos y conjuntivitis, y es causa frecuente de faringitis exudativa no estreptocócica en niños menores de 3 años. Los cuadros más serios comprenden laringitis, crup, bronquiolitis o neumonía graves y puede aparecer un síndrome faringo-conjuntival. En cuanto a su epidemiología, posee una distribución mundial, estacional en las regiones templadas, siendo la incidencia máxima en otoño, invierno y comienzos de la primavera. En las áreas tropicales es frecuente en las temporadas húmedas y frías. El principal huésped es el hombre y la dosis infecciosa mínima es de 150 unidades formadoras de placas por vía intranasal. Se transmite directamente por contacto oral o gotitas de Pflügge; indirectamente por pañuelos, utensilios de comida y otros artículos contaminados recientemente con secreciones respiratorias de una persona infectada; se han relacionado brotes con piscinas; posibilidad de diseminación por vía fecal-oral. Posee un periodo de incubación de 1 a 10 días y la comunicabilidad es inmediatamente antes y durante la enfermedad activa.</p>		

8. *Información sobre reproducción.*

a) Tiempo de generación en ecosistemas naturales: No es aplicable, puesto que no se encuentra en ecosistemas naturales
b) Tiempo de generación en el ecosistema en el que vaya a ser liberado: No es aplicable

c) Modo de reproducción: No es aplicable
d) Factores que afectan a la reproducción: No es aplicable

### 9. Capacidad de supervivencia

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

- i) endosporas (.)
- ii) quistes (.)
- iii) esclerocios (.)
- iv) esporas asexuales (hongos) (.)
- v) esporas sexuales (hongos) (.)
- vi) huevos (.)
- vii) pupas (.)
- viii) larvas (.)
- ix) otras (especifíquense):  
No aplica

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

La capacidad infecciosa del adenovirus decae a temperatura ambiente, aunque fuera del huésped se ha demostrado que el adenovirus tipo 3 sobrevive hasta 10 días en papel a condiciones ambientes y el tipo 2 sobrevive entre 3 y 8 semanas en superficies ambientales a temperatura ambiente. Los adenovirus son susceptibles a diferentes agentes químicos como hipoclorito sódico al 1% y glutaraldehído al 2%, utilizados como desinfectantes, y se ha demostrado sensibilidad al calor como método de inactivación física. Así, una eliminación completamente eficaz se consigue mediante autoclavado a 121 °C durante 15 minutos.

10. a) Vías de diseminación:

Con respecto a su diseminación, su reservorio es el hombre y no se han descrito zoonosis ni vectores. De este modo, la dosis infecciosa mínima es de 150 unidades formadoras de placas por vía intranasal. Se transmite directamente por contacto oral o gotitas de Pflügge; indirectamente por pañuelos, utensilios de comida y otros artículos contaminados recientemente con secreciones respiratorias de una persona infectada; se han relacionado brotes con piscinas; posibilidad de diseminación por vía fecal-oral.

10. b) Factores que afectan a la diseminación: Ver punto 10 a.

La capacidad de diseminación es dependiente de la dosis, la formación de aerosoles y la proximidad del contacto.

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).*

A/ES/97/04, A/ES/99/04, A/ES/99/08, A/ES/02/08, A/ES/00/17, A/ES/01/17,  
A/ES/05/14

### C. Información sobre la modificación genética

#### 1. Tipo de modificación genética:

- i) Inserción de material genético (x)
- ii) Eliminación de material genético (x)
- iii) Sustitución de una base (.)
- iv) Fusión celular (.)
- v) Otro (especifíquese): ...

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

AdNS3 es un adenovirus recombinante defectivo no replicativo. El genoma de AdNS3 carece de los genes adenovirales E1 y E3, por lo que no es competente para replicarse en células, a excepción de la línea celular HEK293 que transcomplementa la deficiencia en E1. Por otro lado, en su genoma se ha insertado secuencias exógenas correspondientes a un cassette de expresión de la proteína NS3 del virus de la hepatitis C, que comprende el promotor del citomegalovirus, la secuencia de la proteína NS3 y una región de poliadenilación del virus SV40. Con todas estas modificaciones se pretende que en aquellas células que se infecten por AdNS3 pueda expresarse la proteína NS3 del VHC, pero no exista la replicación viral. Si, como en el caso que se trata en la presente memoria, AdNS3 infecta células dendríticas, estas pueden presentar fragmentos antigénicos de NS3 a los linfocitos, para la activación de respuestas inmunitarias frente al virus de la hepatitis C.

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

Sí (x)

No (.)

En caso negativo, pase a la pregunta 5.

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

Sí (x)

No (.)

En caso negativo, pase a la pregunta 5.

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

##### a) Tipo de vector:

- Plásmido (x)
- Bacteriófago (.)
- Virus (.)
- Cósmido (.)
- Elemento de transposición (.)

- Otros (especifíquese): ...

b) Identidad del vector:

Se trata del plásmido pAdNS3 obtenido por recombinación homóloga de los siguientes plásmidos: a) pShuttle/CMV/NS3 previamente construido mediante inserción de la secuencia NS3 del VHC entre los nucleótidos 4889 y 4923 del plásmido pShuttle/CMV (obtenido de la casa comercial Agilent), y b) pAdEasy-1 (también obtenido comercialmente de Agilent).

c) Gama de organismos huéspedes del vector:

pAdNS3 se replica en bacterias BJ5183 *E. coli*. La versión de pAdNS3 digerida con Pac I da lugar a una secuencia linearizada, que cuando se transfecta en células HEK293 permite la producción de partículas adenovirales de AdNS3.

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

Sí (x)

No (.)

- Resistencia a los antibióticos (x)

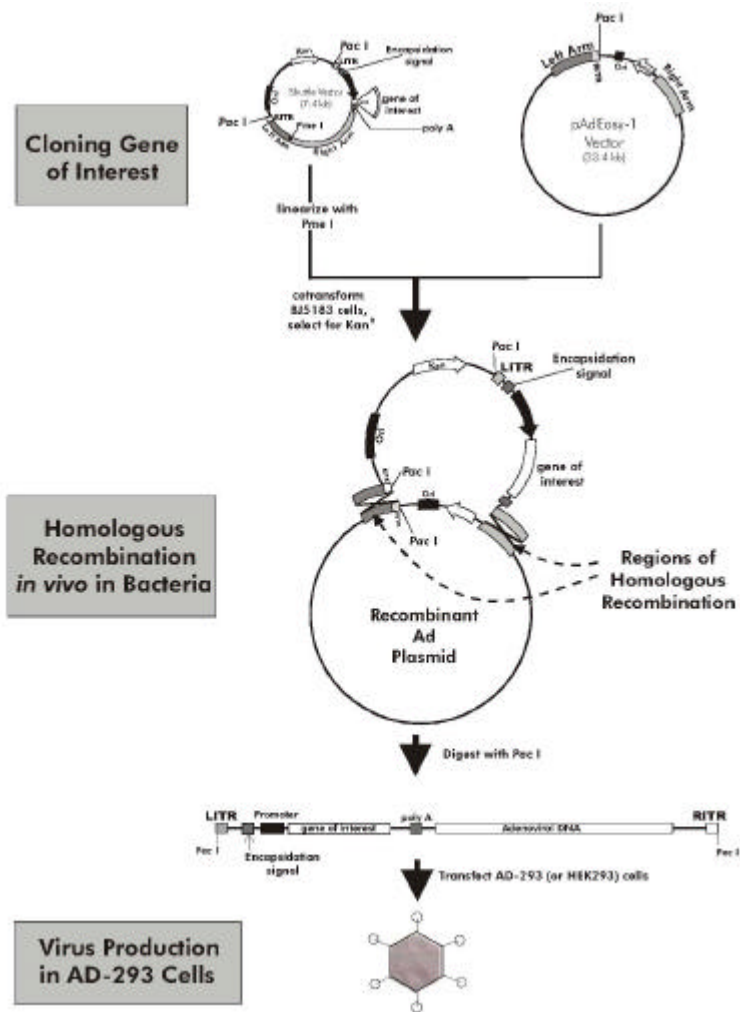
- Otras (especifíquese):

- Indique qué gen de resistencia a los antibióticos se inserta: kanamicina. Sin embargo, el gen de resistencia a kanamicina, presente en pAdNS3, ya no se encuentra en la secuencia del adenovirus AdNS3

e) Fragmentos constituyentes del vector:

Se trata del plásmido pAdNS3 obtenido por recombinación homóloga de los siguientes plásmidos: a) pShuttle/CMV/NS3 previamente construido mediante inserción de la secuencia NS3 del VHC entre los nucleótidos 4889 y 4923 del plásmido pShuttle/CMV, y b) pAdEasy-1. pAdNS3 contiene los elementos mostrados en la siguiente figura, donde el gen de interés es NS3.





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

- i) Transformación (.)
- ii) Electroporación (.)
- iii) Macroinyección (.)
- iv) Microinyección (.)
- v) Infección (.)
- vi) Otros

La transfección de la versión digerida y linearizada de pAdNS3 en células HEK293 da lugar a partículas adenovirales AdNS3.

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

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

6. Información sobre el fragmento de inserción:

- a) Composición del fragmento de inserción: El fragmento de inserción contiene los elementos del plásmido pShuttle/CMV/NS3 que se recombinan con pAdEasy, concretamente el promotor de CMV, la secuencia correspondiente a la proteína NS3 del VHC y la secuencia de poliadenilación de SV40.
- b) Fuente de cada parte constitutiva del fragmento de inserción:  
Tanto el promotor de CMV como la secuencia de poliadenilación de SV40 se encuentran en el plásmido comercial pShuttle/CMV de la casa Agilent, utilizado para la construcción de los plásmidos subsiguientes.  
La región codificante de la proteína NS3 del VHC correspondiente al genotipo 1b (aislado japonés HCV-J; GenBank D90208) se sintetizó por ([www.genscript.com](http://www.genscript.com)), utilizando la optimización de secuencia para incrementar los codones más frecuentemente usados en células humanas. La optimización adicional estaba relacionada con el contenido GC, estructura secundaria del mRNA, sitios de splicing críticos, sitios internos chi y sitios de entrada del ribosoma, motivos de inestabilidad del RNA, sitios de inhibición y secuencias de repetición, así como las secuencias Kozak apropiadas. Las modificaciones se verificaron por parte de Genscript mediante secuenciación parcial del inserto.
- c) Función prevista de cada parte constitutiva del fragmento de inserción en el OMG:  
Tanto el promotor CMV como la secuencia de poliadenilación de SV40 están dedicados a favorecer la expresión del gen de interés, permitiendo por un lado el reconocimiento por parte de la RNA polimerasa para la transcripción y por otro aumentando la estabilidad de las moléculas de mRNA sintetizadas.  
El fragmento correspondiente a NS3 es el gen que se va a expresar, y constituye una proteína antigénica frente a la cual se pretende inducir una respuesta inmunitaria
- d) Localización del fragmento de inserción en el organismo receptor:  
- En un plásmido libre (.)  
- Integrado en el cromosoma (.)  
- Otros (especifíquense):  
Integrados en el genoma del adenovirus.
- e) ¿Contiene el fragmento de inserción partes cuyo producto o funciones no se conozcan?
- Sí (.)  
No (x)

En caso afirmativo, especifíquese: ...

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

1. *Indíquese si es:*

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

2. Nombre completo:

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

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

Sí (x) No (.)
En caso afirmativo, especifíquese: a) ¿Para cuál de los organismos siguientes? <ul style="list-style-type: none"> <li>- Humanos (x)</li> <li>- Animales (x)</li> <li>- Plantas (.)</li> <li>- Otros ...</li> </ul>
b) ¿Están implicadas de alguna forma las secuencias donadas en las propiedades patógenas o nocivas del organismo? <p style="text-align: center;">           Sí (.)            No (x)            No se sabe (.)         </p>
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 de la hepatitis C está clasificado como nivel de bioseguridad de clase 3\*. Sin embargo, dentro de este nivel 3, el nivel 3\* pertenece a un grupo especial de microorganismos que presentan un riesgo limitado de infección, puesto que no poseen riesgo de infección por vía aérea.

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

Sí (.)

No (x)

No se sabe (.)

#### **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:

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

Sí (x)

No (.)

No se sabe (.)

Especifíquese: Los adenovirus humanos tipo 5 se pueden reproducir en una gran variedad de células humanas, mientras que AdNS3 sólo se puede reproducir en la línea celular HEK293.

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

Sí (x)

No (.)

No se sabe (.)

Especifíquese: Puesto que la capacidad de replicación de AdNS3 está restringida a la línea celular HEK293, esto limita enormemente su capacidad de diseminación, puesto

que al contrario de los adenovirus humanos tipo 5 salvajes, la infección no puede transmitirse a través de su hospedador natural, que es el hombre.

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

Sí (x)

No (.)

No se sabe (.)

Especifíquese:

La incapacidad para la replicación de AdNS3 impide que a partir de las células originalmente infectadas se transmita a otras, lo que modifica por completo la patogenicidad de forma que los efectos se limitan a los derivados de la infección inicial de células receptoras. Por ello, no se han descrito formas de enfermedad adenoviral en pacientes tratados con vectores adenovirales en el marco de ensayos clínicos. Los efectos secundarios descritos reflejan fundamentalmente la producción de citoquinas previsiblemente relacionada con la infección adenoviral inicial.

2. *Estabilidad genética del organismo modificado genéticamente:*

AdNS3 es genéticamente estable.

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

Sí (x)

No (.)

No se sabe (.)

En caso afirmativo:

a) ¿Para cuál de los organismos siguientes?

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

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

Como se ha mencionado en la sección correspondiente al organismo receptor, el adenovirus humano tipo 5 está clasificado como de nivel de bioseguridad de clase II. Se caracteriza por originar enfermedad respiratoria aguda, fiebre faringoconjuntival, cuya patogenicidad varía en perfil clínico y severidad. Los síntomas incluyen fiebre, rinitis, faringitis, tos y conjuntivitis, y es causa frecuente de faringitis exudativa no estreptocócica en niños menores de 3 años. Los cuadros más serios comprenden laringitis, crup, bronquiolitis o neumonía graves y puede aparecer un síndrome faringoconjuntival. El OMG AdNS3 se trata de un adenovirus recombinante defectivo, que posee capacidad infectiva, pero que debido a la falta del gen E1 no posee capacidad replicativa. Esto supone que AdNS3 podría infectar a diferentes poblaciones celulares en una infección primaria, pero a diferencia del adenovirus salvaje, su incapacidad para replicarse convierte a ésta en una infección abortiva, que no puede transmitirse a otras células. Por otro lado, debido a que la administración de AdNS3 no va a consistir en partículas adenovirales, sino en células dendríticas previamente transducidas con

AdNS3, que posteriormente serán lavadas exhaustivamente, la cantidad de partículas con capacidad infectiva es mínima. De este modo, aunque no cabe descartar absolutamente en algún caso concreto la aparición de fenómenos patogénicos, los efectos deberían ser mucho menores a los esperables con una administración directa de partículas adenovirales y por supuesto a la infección producida por el virus salvaje replicativo. En la experiencia con la administración in vivo de células dendríticas autólogas transfectadas in vitro con un adenovirus que codifica para los genes de la interleuquina 12, no se observaron acontecimientos adversos potencialmente relacionados con infección viral.

#### 4. Descripción de los métodos de identificación y detección:

- a) Técnicas utilizadas para detectar el OMG en el medio ambiente:  
Reacción en cadena de polimerasa (PCR) cuantitativa a tiempo real
- b) Técnicas utilizadas para identificar el OMG:  
PCR de la región del inserto con cebadores correspondientes a CMV y NS3, puesto que estas regiones sólo aparecen en AdNS3, pero no en los adenovirus salvajes ni en el VHC.

## F. Información sobre la liberación

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

La finalidad de la utilización de AdNS3 es la realización de un ensayo clínico (vacunación en fase I/II en pacientes con hepatitis crónica C genotipo 1b sin respuesta al tratamiento antiviral convencional) mediante la administración de células dendríticas autólogas derivadas de monocitos que se transducen con AdNS3. El objetivo del presente ensayo es la valoración de la seguridad de la administración de células dendríticas transducidas con AdNS3 a este tipo de pacientes.

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

Sí (.)

No (x)

En caso afirmativo, especifíquese:

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

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

Clínica Universidad de Navarra, Av. Pío XII 36, 31008, Pamplona (Navarra)

b) Área del lugar (m<sup>2</sup>):

<p>i) Lugar real de la liberación (m<sup>2</sup>): habitación de hospital de día y Laboratorio de Terapia Genica del Laboratorio GMP del Area de Terapia Celular de la Clínica Universidad de Navarra</p> <p>ii) Área de liberación más amplia (m<sup>2</sup>): la misma que en el punto anterior, y nunca superior a los 12 m<sup>2</sup></p>
<p>c) Proximidad a biotopos reconocidos internacionalmente o zonas protegidas (incluidos depósitos de agua potable) que pudieran verse afectados:</p> <p>No es aplicable</p>
<p>d) Flora y fauna, incluidos cultivos, ganado y especies migratorias que pueden potencialmente interactuar con el OMG:</p> <p>No es aplicable</p>

#### 4. Método y amplitud de la liberación:

<p>a) Cantidad de OMG que vaya a liberarse:</p> <p>No se prevé una administración directa del OMG a los pacientes, sino la administración de un producto celular autólogo (células dendríticas) previamente transducido con AdNS3. Se va a tratar tres grupos de pacientes en diferentes escalones de dosis en función del número de células administradas, <math>5 \times 10^6</math>, <math>10^7</math> y <math>2 \times 10^7</math>. Cada célula se transduce con 30 unidades infecciosas de virus, lo que supone <math>1,5 \times 10^8</math>-<math>3 \times 10^8</math>-<math>6 \times 10^8</math> unidades infecciosas en cada una de las administraciones. Cada paciente recibirá tres administraciones de células dendríticas así transducidas. Antes de ser administrado, el producto celular será lavado numerosas veces de modo que la cantidad de virus extracelular en el producto final se puede considerar irrelevante. Además, estudios previamente realizados en pacientes tratados con células dendríticas transducidas con el mismo adenovirus, que codifica IL-12, no han detectado liberación viral por heces, orina, saliva y esputo, en ninguno de los pacientes tratados. Únicamente a los 60 y 120 minutos tras la administración de células se ha detectado en suero la presencia de baja cantidades de RNA viral que nunca ha llegado a ser detectada tras 24 horas de la administración. Por estas razones el riesgo estimado de liberación del OMG en el ambiente puede considerarse mínimo.</p>
<p>b) Duración de la operación:</p> <p>El estudio tiene una duración de dos años.</p>
<p>c) Métodos y procedimientos para evitar o reducir al mínimo la propagación de los OMG más allá del lugar de liberación:</p>

El personal implicado en la preparación del producto celular trabajará según las condiciones especificadas en la normas de Buenas Practicas Clínicas y de Buenas Prácticas de Fabricación. El Laboratorio GMP de Terapia Celular donde se preparará y envasará el producto es un laboratorio de contención tipo 2. El producto celular, destinado solo a uso clínico será envasado en viales sellados herméticamente y etiquetado en forma adecuada.

El personal que administrará el producto celular utilizará guantes, mascarillas y batas desechables. Los lugares de administración del producto (Hospital de día) se limpiarán con hipoclorito sódico diluido al 1%, inmediatamente después de la administración. El traslado del material contaminado se realizará en contenedor amarillo herméticamente sellado o en una bolsa roja de grosor especial etiquetada mediante la pegatina de RESIDUOS SANITARIOS – GRUPO III.

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

No aplica

*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:*

Esto es el primer ensayo clínico que utiliza AdNS3.

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

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

i) Orden y taxón superior (animales): Primates
ii) Familia: Hominidae
iii) Género: Homo
iv) Especie: Homo sapiens
v) Subespecie:
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 objetivo del ensayo es analizar la seguridad de la administración de células dendríticas transducidas con AdNS3 para potenciar la respuesta inmune frente el virus de la hepatitis C. Por tanto, el resultado de la interacción sería la expresión del transgen en las células dendríticas y la posterior activación de los linfocitos T específicos de la



proteína NS3 del virus de la hepatitis C. El OMG se utiliza en primer lugar in vitro, para transducir a las células dendríticas, éstas se lavan exhaustivamente para eliminar las partículas adenovirales que no hayan transducido a las células dendríticas y finalmente las células se administran al paciente. Esto supone que la práctica totalidad del OMG se encuentra en el interior de las células, donde no tiene capacidad replicativa, por lo que no son previsibles otras interacciones entre el OMG y el organismo diana.

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

Al tratarse de un virus defectivo incapaz de replicarse, no se prevé ninguna interacción con otros organismos del medio ambiente.

*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:

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

AdNS3 es un virus defectivo que no posee capacidad replicativa. Por las modalidades de liberación que se prevén en este estudio es improbable que el AdNS3 pueda ser liberado en el ecosistema.

*6. Nombre completo de los organismos que no son el organismo diana, pero que (teniendo en cuenta la naturaleza del medio ambiente receptor) pueden sufrir accidentalmente daños importantes por la liberación del OMG:*

No aplica

i) Orden y taxón superior (animales): ...
ii) Familia: ...
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:  
No aplica

b) De otros organismos al OMG: No aplica
c) Consecuencias probables de la transferencia de genes: No aplica

8. *Referencias de los resultados pertinentes (si los hay) de estudios sobre el comportamiento y las características del OMG; y sobre su repercusión ecológica llevados a cabo en ambientes naturales simulados (por ejemplo, microcosmos, etc.):*  
No aplica

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

No aplica

## **H. Información sobre el seguimiento**

### *1. Métodos de seguimiento de los OMG:*

Estudios previos, realizados por el mismo grupo de investigación, no han detectado liberación viral en fluidos biológicos en pacientes tratados con células dendríticas transducidas con adenovirus que codifican otro transgen (IL-12). La única excepción es la posibilidad de detectar en suero mínimas cantidades de virus, que nunca han persistido más allá de los 120 minutos. Por lo tanto en este ensayo no se realizarán análisis de liberación viral en líquidos biológicos ni en sangre.

Se realizará monitorización de efectos secundarios del tratamiento en ensayo mediante exploración física, analíticas de sangre y orina y comunicación de eventos adversos.

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

Puesto que el OMG se administrará en el interior de células dendríticas y tiene carácter no replicativo se considera que no hay posibilidades de que haya repercusiones en el ecosistema de OMG con capacidad infecciosa.

### *3. Tamaño del área de seguimiento (m<sup>2</sup>):*

No Aplica.

### *4. Duración del seguimiento:*

Ver punto 1

### *5. Frecuencia de seguimiento:*

Ver punto 1.

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

### *1. Tratamiento del lugar tras la liberación:*

El lugar de liberación se limpiará con hipoclorito sódico diluido al 1%, y con desinfectantes aprobados por uso GMP, inmediatamente después de la liberación.

### *2. Tratamiento del OMG tras la liberación:*

El traslado del material contaminado se realizará en contenedor amarillo herméticamente sellado o en una bolsa roja de espesor especial etiquetada mediante la pegatina de RESIDUOS SANITARIOS – GRUPO III (INFECCIOSOS).

### 3. a) Tipo y cantidad de residuos producidos

Los residuos del material restante del procesamiento con microorganismos modificados genéticamente, así como los materiales en contacto con los anteriores, se consideran residuos sanitarios específicos (Grupo III), y se gestionarán como tal. Se introducirán en los siguientes recipientes:

#### **A. Residuos Infecciosos Sólidos.**

Deben ir siempre en bolsa roja como Residuos Sanitarios de Grupo III.

#### **B. Residuos de Objetos Cortantes o Punzantes.**

Se depositarán en contenedores específicos, rígidos y estancos, color amarillo, adecuados en tamaño y forma al uso que se les va a dar.

Se ha estimado que en los procesos de preparación, envasado y administración del producto de terapia celular se generarán residuos equivalentes a contenedor de 30 L por cada paciente.

### 3. b) Tratamiento de los residuos

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

El transporte intracentro de las bolsas o contenedores de residuos se realizará utilizando medios de transporte (carros con ruedas) dispuestos a tal fin, utilizando circuitos de circulación destinados para ello. Los residuos serán almacenados en una área específica del almacén de la Clínica Universidad de Navarra y retirados por una empresa contratada que los trasladará en contenedores idóneos y siguiendo las medidas de protección adecuadas, a sus instalaciones de tratamiento con periodicidad menor a 72 horas. Los lugares destinados al almacenamiento de los residuos, se mantendrán en condiciones adecuadas en cuanto a limpieza y seguridad.

## **J. Información sobre planes de actuación en caso de emergencia**

*1. Métodos y procedimientos de control de la diseminación del OMG o de los OMG en caso de dispersión imprevista:*

En caso de contaminación el personal involucrado en la preparación, envasado o administración del producto celular se notificará al investigador principal y al Servicio de Prevención de Riesgos Laborales. Todo el personal recibirá instrucciones sobre los procedimientos a actuar en caso de liberación accidental.

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

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

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

No aplica

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

En el caso de contacto con la piel se realizarán lavados enérgicos y posteriormente se desinfectará con una solución con Yodo al 4%.

En caso de contacto con los ojos se realizaran lavados con suero salino por un tiempo no inferior a los 15 minutos. El sujeto tendrá que ser valorado por un oftalmólogo en el menor tiempo posible.

En caso de pinchazo accidental se realizara inmediatamente abundante lavado con agua y jabón y posteriormente la zona de punción será desinfectada con solución de Yodo al 9-12% durante al menos 5 minutos o con solución con hipoclorito sódico de 10 g/l .

Los pacientes incluidos en el ensayo clínico serán monitorizados como está previsto por el protocolo según normas de buenas prácticas clínicas. Cada evento adverso será notificado al investigador principal y a las agencias reguladoras.

Debido a las modalidades de administración el riesgo de liberación ambiental accidental es muy bajo. Además al tratarse de un virus sin capacidad replicativa, el riesgo ambiental consecuente a liberación accidental puede considerarse mínimo.