

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

**Nº DE EXPEDIENTE      B/ES/20/09**

**A. Información de carácter general:**

**1. Detalles de la notificación**

Estado miembro de la notificación: España
Número de la notificación: B/ES/20/09
Fecha del acuse de recibo de la notificación: 03/07/2020
Título del proyecto: Ensayo clínico de viabilidad de la combinación de AloCelyvir con quimioterapia y radioterapia para el tratamiento de niños y adolescentes con tumores sólidos extra-craneales en recaída o refractarios
Período propuesto para la liberación: Inclusión primer paciente: Abril 2020 Inclusión último paciente: Diciembre 2022

**2. Notificador**

Nombre de la institución o empresa: Fundación para la Investigación Biomédica Hospital Infantil Universitario Niño Jesús
---

**3. Definición del OMG**

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

- mamíferos
- insectos
- peces
- otro animal  especifique el phylum y la clase

Otro, especifíquese (reino, phylum y clase)

b) Identidad del OMG (género y especie):

ICOVIR-5 es un adenovirus oncolítico que en este estudio va a infectar células mesenquimales (AloCelyvir) para su posterior infusión a pacientes con tumores sólidos refractarios o recidivantes. ICOVIR-5 (HAd5-DM-E2F-K- $\Delta$ 24-RGD) es un adenovirus oncolítico derivado de HAd5. Se ha diseñado para el tratamiento sistémico de tumores diseminados. El genoma de ICOVIR5 contiene diversas modificaciones que le confieren capacidad de replicación selectiva en células tumorales en las que la ruta de retinoblastoma/E2F se encuentra desregulada. ICOVIR5 incluye las siguientes modificaciones:

- 1) La sustitución de parte de promotor endógeno de E1A por el promotor E2F-1 para controlar la expresión de la proteína viral E1A
- 2) La inserción de una secuencia “aislante” (DM) precediendo el promotor
- 3) La inserción de una secuencia kozak en el codón de inicio de E1A (K)
- 4) La presencia de una deleción de 8 aminoácidos en el dominio de unión de E1A con pRb (deleción  $\Delta$  24)
- 5) La inserción del tripéptido RGD en la fibra viral

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

Los adenovirus salvajes son estables. En pacientes inmunodeprimidos, la recombinación entre adenovirus parece que puede jugar un papel en la evolución de nuevas cepas con distintas propiedades inmunogénicas pero nunca se han detectado híbridos con secuencias de HAd5. Los adenovirus genéticamente modificados son genéticamente estables siempre y cuando el tamaño de su genoma no exceda el 105% del tamaño del genoma del adenovirus salvaje. Genomas más grandes hacen que el virus crezca más lentamente, y sufra reordenaciones espontáneas que resultan en la pérdida de secuencias de ADN no esenciales, normalmente los insertos.

El conjunto de alteraciones genéticas introducidas en ICOVIR-5 hacen que el tamaño final de su genoma sea de 36928 bp, lo que representa un 102,76% del tamaño génico del virus nativo HAd5. Consecuentemente la probabilidad de que ICOVIR-5 sea genéticamente inestable es despreciable.

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

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

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

Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
En caso afirmativo:	
- Estado miembro de la notificación: ES	
- Número de la notificación: B/ES/11/27 y B/ES/12/17	

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

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

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

En España se han realizado dos ensayos clínicos en los que se ha administrado ICOVIR-5 a pacientes con cáncer, ambos finalizados, evaluados y sus resultados han sido presentados a la comunidad científica. En el primero se utilizó ICOVIR-5 por administración intravenosa en pacientes con melanoma (B/ES/11/27). En el segundo se usó el medicamento CELYVIR (notificación B/ES/12/17), que es el mismo medicamento que se pretende usar en el ensayo actual, y que consiste en células mesenquimales infectadas con ICOVIR-5. Desde el año 2010 también se han tratados pacientes en un programa de uso compasivo. Esta experiencia ha servido para evaluar el posible impacto de la liberación de este adenovirus modificado al ambiente. No se ha registrado ningún efecto en los pacientes, sus cuidadores o sus familiares que pudiese relacionarse con infección por ICOVIR-5. El hombre es el huésped natural del adenovirus. Las infecciones adenovirales son endémicas y la mayor parte de la población es seropositiva para anticuerpos antiadenovirus neutralizantes. La infección adenoviral es básicamente asintomática, autolimitante y restringida a determinados tejidos permisivos. Creemos que esta es la razón por la que no se han registrado efectos adversos ni ninguna sintomatología clínica en la población expuesta.

**B. Información sobre el organismo receptor o sobre los organismos parentales de los que se deriva el OMG**

**1. Identificación del organismo receptor o parental**

a) Indíquese si el organismo receptor o parental es :	
Viroide	<input type="checkbox"/>
Virus ARN	<input type="checkbox"/>
Virus ADN	<input checked="" type="checkbox"/>
Bacteria	<input type="checkbox"/>
Hongo	<input type="checkbox"/>
Animal	<input type="checkbox"/>
- mamíferos	<input type="checkbox"/>
- insectos	<input type="checkbox"/>
- peces	<input type="checkbox"/>
- otro animal	<input type="checkbox"/>
(especifique el phylum y la clase)	
Otros, (especifíquense):	

**2. Nombre**

i) Orden y taxón superior (animales): Adenoviridae.
ii) Género: Mastadenovirus.
iii) Especie: Adenovirus humano salvaje (Had) del serotipo 5.
iv) Subespecie: Adenovirus del tipo C.
v) Cepa:
vi) Patovar (biotipo, ecotipo, raza, etc.):
vii) Nombre vulgar: HAd5.

**3. Distribución geográfica del organismo**

a) Autóctono del país que notifica o establecido en él:		
Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>

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

---

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

Sí  No

---

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

Sí  No

#### 4. Hábitat natural del organismo

a) Si es un microorganismo:

Agua

Suelo, en libertad

Suelo, en simbiosis radiculares de plantas

En simbiosis con sistemas foliares o caulinares de plantas

En simbiosis con animales

os , (especifíquense): HAd5 no se encuentra en ecosistemas naturales ya que necesita células humanas para activarse. La especificidad del Had5 hace que únicamente sea capaz de replicar en células de humanos. También se ha descrito que en las ratas algodóneras (*Sigmodon hispidus*) y también algunos tipos de hámster (*Mesocricetus auratus*) los adenovirus humanos, como el HAd5, son semi-permisivos para la replicación del adenovirus humano.

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

**5. a) Técnicas de detección**

La detección de ICOVIR5 se efectúa por la técnica de PCR en Tiempo Real (RealTime- PCR) directa a partir del ADN obtenido del tejido/órgano a testar, y usando oligonucleótidos que amplifican una región no codificante del genoma de ICOVIR-5. La sensibilidad de estas técnica es de aproximadamente 10-20 genomas/20 ng de ADN.

El organismo receptor de ICOVIR5 en este ensayo es el paciente. No aplica en este caso la técnica de detección.

**5. b) Técnicas de identificación**

La identidad se analizará a nivel de ADN genómico viral por PCR y análisis de restricción del ADN viral purificado.

**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 HAd5 está clasificado dentro del grupo 2.

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

Sí

No

No se sabe

En caso afirmativo

a) ¿Para cuál de los organismos siguientes?:

humanos

animales

plantas

otros

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

El HAd5 es un virus humano del grupo 2. Las infecciones por HAd5 son mayoritariamente asintomáticas pero pueden causar enfermedades del sistema respiratorio, ocular y gastrointestinal, especialmente en niños.

El periodo de incubación de la enfermedad es de 1 a 10 días. Se ha descrito que los órganos linfoides pueden dar lugar a un shedding persistente, pero esta circunstancia se considera muy poco habitual y sólo se han demostrado efectos de dicha persistencia anecdótica en el caso niños pequeños sometidos a un trasplante de médula ósea. La mayoría de la población es seropositiva para adenovirus, y entre ellos los adenovirus del grupo C son los más ampliamente extendidos lo que provoca que cualquier infección adenoviral sea fácilmente neutralizada.

Los adenovirus entran en su huésped vía el tracto respiratorio o los ojos, mediante aerosoles generados por los individuos afectos (por estornudos o expectoraciones). La transmisión de adenovirus también puede producirse por contacto con la saliva, o por la vía oral-fecal. De acuerdo con la Agencia de Salud Pública de Canadá, el límite inferior para la infección por inhalación es de 150 unidades formadoras de calvas. Las infecciones adenovirales son normalmente auto-limitantes. Los estudios con vacunas vivas basadas en adenovirus han demostrado que después de la administración entérica, se produce transmisión, presumiblemente por la vía oral-fecal, pero dicha transmisión requiere un contacto físico íntimo. La infección por contacto casual después de la administración entérica es altamente improbable, incluso con la forma salvaje/nativa del adenovirus. También se ha visto que dicha transmisión horizontal sólo se produce entre humanos, y no afecta a ninguna otra especie, a excepción hecha del chimpancé.

A diferencia de los retrovirus y los lentivirus, los adenovirus son virus no integrativos. Se ha descrito la persistencia a largo plazo de genomas adenovirales en ciertos tejidos linfoides pero se cree que esta persistencia es episomal y no debida a eventos de integración de muy baja frecuencia. Independientemente del mecanismo no se han descrito nunca efectos adversos asociados a dicha presencia de genomas a largo plazo.

A pesar de los esfuerzos de diversos grupos de investigación, no sido posible crear ratones transgénicos por medio de la inyección directa de adenovirus en los testes.

## 8. Información sobre reproducción

- a) Tiempo de generación en ecosistemas naturales: Irrelevante, porque HAd5 no se encuentra en ecosistemas naturales. Sólo se encuentra en células humanas.

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

c) Modo de reproducción	Sexual <input type="checkbox"/>	Asexual <input checked="" type="checkbox"/>
d) Factores que afectan a la reproducción: Irrelevante		

**9. Capacidad de supervivencia**

a) Capacidad de formar estructuras que favorezcan la supervivencia o el letargo	
i) endosporas	<input type="checkbox"/>
ii) quistes	<input type="checkbox"/>
iii) esclerocios	<input type="checkbox"/>
iv) esporas asexuales(hongos)	<input type="checkbox"/>
v) esporas sexuales (hongos)	<input type="checkbox"/>
vi) huevos	<input type="checkbox"/>
vii) pupas	<input type="checkbox"/>
viii) larvas	<input type="checkbox"/>
ix) otras (especifíquense) Amplificación viral.	
b) Factores pertinentes que afectan a la capacidad de supervivencia	
<p>Los adenovirus pierden rápidamente su bioactividad a temperatura ambiente. Pese a ello esta pérdida es logarítmica y por tanto a tiempos largos tiene una cierta estabilidad, aunque en muchos casos la cantidad de virus remanente está por debajo del umbral de infectividad. Los adenovirus son sólo parcialmente resistentes a agentes químicos y físicos. El AdH5 es susceptible a hipoclorito sódico 1%, glutaraldehido 2% y dodecilsulfato sódico (SDS) 0,25%. También es sensible al calor (&gt;56°C) La inactivación de HAd5 se consigue en autoclave a 121°C durante 15 minutos, con una eliminación 100% eficaz. Se permite el empleo de temperaturas más elevadas, o de una mayor duración del proceso de autoclavado.</p>	

**10. a) Vías de diseminación**

<p>Los adenovirus afectan a numerosos y variados aparatos de nuestro organismo. Los síndromes más frecuentes y conocidos son:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecciones del tracto respiratorio. Son muy frecuentes, sobre todo las infecciones de las vías altas, como las faringoamigdalitis, que se presentan a lo largo de todo el año. Los adenovirus también producen infecciones de las vías bajas, como las tráqueobronquitis, donde la tos es un síntoma característico, hasta el punto de provocar síndromes pertusoides. Más raramente, pueden ser responsables de cuadros de neumonía.</li> </ul>
--



- Infecciones de tracto digestivo. Deben distinguirse las producidas por los serotipos 40 y 41, que cursan con fiebre, gastroenteritis y un tiempo de evolución superior a los 8 días, de las más leves originadas por los otros serotipos.
- Infecciones oculares. Pueden presentarse como una conjuntivitis, a veces acompañando a otros cuadros clínicos, por lo general la faringitis, o como una queratoconjuntivitis, más grave, que comienza por una conjuntivitis folicular y llega a invadir la córnea.
- Infecciones genito-urinarias: la forma más habitual es la cistitis hemorrágica, aunque se han descrito también casos de cervicitis y uretritis como manifestaciones de una enfermedad de transmisión sexual.
- Infecciones en el paciente inmunodeprimido. De forma muy ocasional los adenovirus pueden afectar a estos enfermos, produciendo cuadros graves de neumonía o de infección generalizada en los que el patógeno puede aislarse en diversos órganos como, por ejemplo, en el hígado trasplantado a un paciente.

**10. b) Factores que afectan a la diseminación**

Irrelevante

**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)**

Se ha realizado el ensayo clínico “Ensayo clínico, abierto, de Fase I para evaluar la eficacia y seguridad del tratamiento con células mesenquimales autólogas infectadas con un nuevo adenovirus oncolítico (CELYVIR) en el tratamiento de pacientes pediátricos con tumores sólidos refractarios o recidivantes” para el que se notificó al ministerio de Medio Ambiente con fecha de 23/12/2011, con número de notificación B/ES/12/17. El ministerio aprobó el procedimiento.

Se realizó el ensayo clínico “Administración endovenosa de fase I del adenovirus oncolítico ICOVIR-5 en pacientes con melanoma avanzado o metastásico”, con número de notificación B/ES/11/27. El ministerio aprobó el procedimiento.

**C. Información sobre la modificación genética**

**1. Tipo de modificación genética:**

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

v) Otro (especifíquese) ICOVIR-5 (HAd5-DM-E2F-K- $\Delta$ 24-RGD) es un adenovirus oncolítico derivado de HAd5 diseñado para el tratamiento sistémico de tumores diseminados. Su genoma contiene diversas modificaciones que le confieren capacidad de replicación selectiva en células tumorales en las que la ruta de retinoblastoma/E2F se encuentra desregulada. Las diferentes modificaciones genéticas que contiene ICOVIR-5 son: 1) la sustitución de parte de promotor endógeno de E1A por el promotor de E2F-1 para controlar la expresión de la proteína viral E1A; 2) la inserción de una secuencia "aislante" (DM) precediendo el promotor; 3) la inserción de una secuencia kozak en el codón de inicio de E1A (K); 4) la presencia de una delección de 8 aminoácidos en el dominio de unión de E1A con pRb (delección  $\Delta$ 24); y 5) la inserción del tripéptido RGD en la fibra viral.

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

El conjunto de alteraciones incluidas en el genoma de ICOVIR-5 consiguen que la replicación del virus quede restringida a células tumorales (con niveles de E2F-1 altos). Además consiguen también restringir la expresión de las proteínas virales a las células constituyentes del tumor, con lo cual el virus puede ser administrado sistémicamente sin que dé lugar a toxicidad hepática. La inclusión del péptido 4C-RGD consigue incrementar la eficacia de infección del adenovirus por las células tumorales (que sobreexpresan integrinas). El uso previsto de ICOVIR es como tratamiento antitumoral de tumores infantiles refractarios o recurrentes.

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

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

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

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

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

a) Tipo de vector	
plásmido	<input checked="" type="checkbox"/>
bacteriófago	<input type="checkbox"/>
virus	<input type="checkbox"/>
cósmido	<input type="checkbox"/>

Elemento de transposición

Otros (especifíquense):

b) Identidad del vector: Para generar el virus de replicación condicional ICOVIR-5, se digirió el plásmido pICOVIR-5 con el enzima PacI y se transfeció en células HEK293 (procedentes de la ATCC: American Type Cell Collection). El plásmido pICOVIR-5 proviene de la recombinación del plásmido pShuttle-DME2FK- $\Delta$ 24 (que contiene las modificaciones en el promotor de E1A del adenovirus HAd5, tales como la secuencia aislante DM-1, el promotor E2F-1 humano y la secuencia de Kozak, y también la versión  $\Delta$ 24 de E1A) con el plásmido pVK503 (plasmido que contiene el genoma entero de HAd5 modificado en su fibra en el aminoácido 480, insertando 27 pares de bases que codifican para el péptido RGD-4C: Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys). La identidad del vector pICOVIR-5 se puede confirmar mediante digestión con KpnI, que da lugar a un patrón diferencial.

c) Gama de organismos huéspedes del vector: pICOVIR-5 sólo se replica en bacterias. La transfección de una versión digerida del vector pICOVIR-5 da lugar a una copia completa del genoma adenoviral de ICOVIR-5 con capacidad de replicación en células humanas con niveles elevados de expresión de E2F-1 (tumoraes).

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

En pICOVIR-5

Sí

No

Resistencia a los antibióticos

Otras, (especifíquense)

Indique qué gen de resistencia a los antibióticos se inserta: Ampicilina

En ICOVIR-5

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

Sí

No X

Resistencia a los antibióticos NO

Otras, (especifíquense)

Indique qué gen de resistencia a los antibióticos se inserta:

a) Fragmentos constituyentes del vector: El plásmido pICOVIR-5 proviene de la recombinación del plásmido pShuttle-DM-E2FK- $\Delta$ 24 (que contiene la región 34931-35935 del genoma de HAd5 seguida de la región 1-5790 con las modificaciones en el promotor de E1A del adenovirus HAd5, tales como la secuencia aislante DM-1, el promotor E2F-1 humano y la secuencia de Kozak, y también la versión  $\Delta$ 24 de E1A) con el plásmido pVK503 (plásmido que contiene el genoma entero de HAd5 modificado en su fibra en el aminoácido 480, insertando 27 pares de bases que codifican para el péptido RGD-4C: Cys-Asp-Cys-Arg-Gly-Asp-Cys-Phe-Cys). De esta forma PICOVIR-5 contiene el genoma completo de ICOVIR-5. Además pICOVIR-5 contiene el gen de resistencia a ampicilina y un origen de replicación en bacteria, flanqueado por dianas PacI (de forma que tras la digestión con PacI los elementos que permiten su propagación en bacteria desaparecen).

b) Método de introducción del vector en el organismo receptor

- i) transformación
- ii) electroporación
- iii) macroinyección
- iv) microinyección
- v) infección
- vi) otros, (especifíquense): La transfección de una versión digerida del vector pICOVIR-5 da lugar a una copia completa del genoma adenoviral de ICOVIR-5 con capacidad de replicación en células humanas con niveles elevados de expresión de E2F-1 (tumoraes).

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

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

6. Información sobre el fragmento de inserción:

<p>a) Composición del fragmento de inserción: El genoma de ICOVIR-5 contiene 5 inserciones respecto el genoma de HAd5: - Aislante genético del gen de la distrofia miotónica del genoma humano DM-1: Genbank L08835. - Promotor del gen de E2F1 del genoma humano: Genbank S74230. - Secuencia humana de Kozak : secuencia CCACC. - Secuencia artificial de unión a integrina de la familia <math>\alpha v</math>: secuencia TGTGACTGCCGCGGAGACTGTTTCTGC.</p>
<p>a) Fuente de cada parte constitutiva del fragmento de inserción: - Aislante DM-1 : locus DM1 humano. Se obtuvo por PCR a partir de ADN obtenido de células mononucleares de sangre periférica humana normal, usando oligonucleótidos que amplificaban la región comprendida entre la posición 13006 y la 13474 de la secuencia del locus génico de DM-1 (GenBank accesión number L08835). Aisla el promotor E2F1 en el genoma viral. - Promotor E2F1: Secuencia no codificante de origen humano. Se obtuvo por PCR a partir de ADN obtenido de células mononucleares de sangre periférica humana normal, usando oligonucleótidos que amplificaban la región comprendida entre la posición -218 y la + 51 de la secuencia del gen de la E2F-1. Controla la expresión de genes en dependencia de E2F-1. - secuencia de Kozak. Secuencia no codificante de origen humano generada sintéticamente a partir de oligonucleótidos diseñados para que incluyan la secuencia CCACC y posterior PCR. Facilita el reconocimiento de la maquinaria de traducción de los mARN. - secuencia sintética de unión a integrinas. Secuencia artificial generada sintéticamente como oligonucleótidos diseñados para que incluyan la secuencia TGTGACTGCCGCGGAGACTGTTTCTGC y posterior PCR. Permite que el virus se una a integrinas sobreexpresadas en tumores.</p>
<p>b) Función prevista de cada parte constitutiva del fragmento de inserción en el OMG: Véase la sección anterior.</p>
<p>c) Localización del fragmento de inserción en el organismo receptor:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- en un plásmido libre <input type="checkbox"/></li> <li>- integrado en el cromosoma <input type="checkbox"/></li> <li>- Otros especifíquense): Integrados en el genoma de HAd5.</li> </ul>
<p>d) ¿Contiene el fragmento de inserción partes cuyo producto o función no se conozcan?</p> <p>Sí <input type="checkbox"/> No <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>En caso afirmativo , especifíquese:</p>

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

1. Indíquese si es:

Viroide	<input type="checkbox"/>
Virus ARN	<input type="checkbox"/>
Virus ADN	<input type="checkbox"/>
Bacteria	<input type="checkbox"/>
Hongo	<input type="checkbox"/>
Animal	<input type="checkbox"/>
- mamíferos	<input checked="" type="checkbox"/>
- insectos	<input type="checkbox"/>
- peces	<input type="checkbox"/>
- otro animal	<input type="checkbox"/> (especifique el phylum y la clase):
Otros ( especifíquense)	

2. Nombre completo

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

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

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

En caso afirmativo, especifíquese		
a) ¿para cuál de los organismos siguientes?	humanos	<input type="checkbox"/>
	animales	<input type="checkbox"/>
	plantas	<input type="checkbox"/>
	otros	<input type="checkbox"/>
b) ¿están implicadas de alguna forma las secuencias donadas en las propiedades patógenas o nocivas del organismo?		
Sí	No	No se sabe
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
En caso afirmativo, proporcione la información pertinente de conformidad con la letra d) del punto 11 de la letra A de la sección II del Anexo III A:		

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

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo , especifíquese:	

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

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

**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 <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
Especifíquese		
b) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta al modo o índice de reproducción?		
Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>

Especifíquese: Mientras HAd5 es capaz de replicarse en todas las células humanas, ICOVIR-5 sólo es capaz de replicarse en células humanas tumorales con niveles altos de E2F-1.

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

Sí

No

No se sabe

Especifíquese:

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

Sí

No

No se sabe

Especifíquese: Es defectivo en células normales humanas y por tanto solo afecta a células tumorales humanas. No genera la patogenicidad de vías respiratorias típica del HAd5.

## 2. Estabilidad genética del organismo modificado genéticamente

Estable.

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

Sí

No

No se sabe

En caso afirmativo:

a) ¿Para cuál de los organismos humanos siguientes?

animales

plantas

otros



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

El conjunto de modificaciones genéticas que incluye ICOVIR-5 impiden tanto la expresión de proteínas virales como la replicación misma del virus en las células normales que no presenten alteraciones en la vía de retinoblastoma. Esto ha sido demostrado en experimentos preclínicos ya publicados anteriormente. Los tejidos de ratón y de rata no permiten la replicación eficiente de los adenovirus humanos, por lo que los datos en estos modelos no pueden informar sobre la situación en humanos.

Numerosos datos clínicos y preclínicos con adenovirus oncolíticos similares a ICOVIR5 demuestran que la principal toxicidad es hepática. Se realizó un primer ensayo clínico fase I de escalada de dosis en humanos en IDIBELL para determinar la dosis máxima tolerada (DMT) de la infusión intravenosa (IV) de Icovir-5 en pacientes con melanoma maligno avanzado (NCT01864759) (B/ES/11/27). Los resultados en 12 pacientes tratados con una infusión única de una dosis de hasta  $10^{13}$  partículas virales (vp) mostraron una toxicidad hepática (transaminitis) limitante de la dosis, estableciendo una dosis recomendada de fase II de  $3,3 \times 10^{12}$  vp. La detección de Icovir-5 en biopsias indicó que la vía IV permite llegada de Icovir-5 a lesiones tumorales.

Hemos finalizado el primer ensayo clínico con Celyvir en humanos / primero en niños para pacientes con tumores sólidos recidivantes / refractarios. Celyvir se fabricó a partir de un aspirado de médula ósea y luego se administró por vía intravenosa (B/ES/12/17). Los pacientes recibieron infusiones semanales durante 6 semanas a una dosis de  $2 \times 10^6$  células / Kg (niños) o  $0,5-1 \times 10^6$  células / Kg (adultos),  $2 \times 10^4$  partículas virales por célula. Se reclutaron 15 pacientes pediátricos y 19 adultos, pero 18 no llegaron a recibir Celyvir, principalmente debido a la rápida progresión de la enfermedad antes de que Celyvir estuviera disponible. No se informaron toxicidades de grado 2-5. La replicación adenoviral detectada por PCR se encontró en todos menos 2 pacientes pediátricos y en ninguno de los adultos.

Hemos tratado 34 niños con tumores sólidos avanzados en un programa de uso compasivo con Celyvir desde 2010, de la misma manera que los pacientes del ensayo clínico. No hemos encontrado nunca toxicidades grado 2-5, ni afectación en cuidadores y/o familiares de los pacientes.

#### Descripción de los métodos de identificación y detección

a) Técnicas utilizadas para detectar el OMG: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Real-time-PCR).

b) Técnicas utilizadas para identificar el OMG: La identidad de ICOVIR5 se analizará a nivel de ADN genómico viral por PCR y análisis de restricción del ADN viral purificado.

A) por PCR se amplifica desde bp 321 de ICOVIR5 hasta el bp 2013. Esta región de 1692 flanquea el aislante DM1, el promotor E2F1 y la mutación  $\Delta 24$  de

E1A.

B) En análisis de restricción se realizará cortando el ADN viral genómico con la enzima Kpn I. Esta enzima genera un fragmento de 1284bp y otro de 1738bp característicos de ICOVIR5. El mapa completo es: 6.4 / 5.7 / 5.1 / 4.8 / 3.6 / 2.9 / 2.3 / 1.7 / 1.6 / 1.2 / 1.0 Kb). El HAd5 genera una única banda de 2052bp en lugar de esas dos bandas características. La secuenciación del genoma de ICOVIR-5 se realizará en las regiones diferenciales respecto HAd5. Se usarán los siguientes pares de oligonucleótidos Región DM-1: DM-1-Up (5'-GGGCAGATGGAGGGCCTTTTATTC-3') Región del promotor E2F: E2F-Up (5'-GTGTTACTCATAGCGCGTAA-3') Región de la delección D24: D24-down (5'-CTCCGGTGATAATGACAAG-3') Región de la fibra modificada en su tropismo por RGD: FiberUp (5'-AAACGCTGTTGGATTTATG-3').

## **F. Información sobre la liberación**

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

La finalidad del presente ensayo clínico es determinar la viabilidad de combinar quimioterapia y/o radioterapia con la infusión, mediante células mesenquimales de donante sano del adenovirus oncolítico de replicación condicionada ICOVIR-5 (medicamento de terapia avanzada que denominamos AloCelyvir), en pacientes con tumores sólidos, así como determinar la seguridad, perfil de toxicidad y datos preliminares de eficacia si la hay, en pacientes con tumores sólidos tratados con infusiones de AloCelyvir.

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

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo, especifíquese:	

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

a) Localización geográfica (región administrativa y coordenadas de referencia cuando proceda): Hospital Infantil Universitario Niño Jesús. Avenida Menéndez Pelayo, 65. 28009-Madrid.
b) Área del lugar (m <sup>2</sup> ): i) lugar real de la liberación (m <sup>2</sup> ): 10 ii) área de liberación más amplia (m <sup>2</sup> ): Hospital y vivienda habitual del paciente.
c) Proximidad a biotipos reconocidos internacionalmente o zonas protegidas (incluidos depósitos de agua potable) que pudieran verse afectados: Irrelevante.
d) Flora y fauna, incluidos cultivos, ganado y especies migratorias que pueden potencialmente interactuar con el OMG: Irrelevante.

4. Método y amplitud de la liberación

a. Cantidad de OMG que vaya a liberarse: La dosis elegida para este ensayo es de $0,5 \times 10^6$ células por kilo de peso del paciente y dosis, cada célula contendrá $2 \times 10^4$ partículas virales. Por tanto, un niño de 20 kilos recibirá $10^{11}$ partículas virales por dosis. El número máximo de dosis prevista es de 16. Estas cantidades son menores que las que hemos usado hasta la fecha.
b. Duración de la operación: El número máximo de dosis prevista es de 16. Cada infusión tarda unos 10 - 15 minutos.
c. Métodos y procedimientos para evitar o reducir al mínimo la propagación de los OMG más allá del lugar de liberación: Los elementos físicos usados durante la infusión se desechan en un contenedor de muestras biológicas. Se eliminarán como residuos biopeligrosos.

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

Clima mediterráneo continental y condiciones climáticas controladas dentro del Hospital.
--

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

Numerosos datos clínicos y preclínicos con adenovirus oncolíticos similares a ICOVIR5 demuestran que la principal toxicidad es hepática. Se realizó un primer ensayo clínico fase I de escalada de dosis en humanos en IDIBELL para determinar la dosis máxima tolerada (DMT) de la infusión intravenosa (IV) de Icovir-5 en pacientes con melanoma maligno avanzado (NCT01864759), número de notificación B/ES/11/27. Los resultados en 12 pacientes tratados con una infusión única de una dosis de hasta  $10^{13}$  partículas virales (vp) mostraron una toxicidad hepática (transaminitis) limitante de la dosis, estableciendo una dosis recomendada de fase II de  $3,3 \times 10^{12}$  vp. La detección de Icovir-5 en biopsias indicó que la vía IV permite llegada de Icovir-5 a lesiones tumorales.

Hemos finalizado el primer ensayo clínico con Celyvir en humanos / primero en niños para pacientes con tumores sólidos recidivantes / refractarios, B/ES/12/17. Celyvir se fabricó a partir de un aspirado de médula ósea y luego se administró por vía intravenosa. Los pacientes recibieron infusiones semanales durante 6 semanas a una dosis de  $2 \times 10^6$  células / Kg (niños) o  $0,5-1 \times 10^6$  células / Kg (adultos),  $2 \times 10^4$  partículas virales por célula. Se reclutaron 15 pacientes pediátricos y 19 adultos, pero 18 no llegaron a recibir Celyvir, principalmente debido a la rápida progresión de la enfermedad antes de que Celyvir estuviera disponible. No se informaron toxicidades de grado 2-5. La replicación adenoviral detectada por PCR se encontró en todos menos 2 pacientes pediátricos y en ninguno de los adultos.

Hemos tratado 34 niños con tumores sólidos avanzados en un programa de uso compasivo con Celyvir desde 2010, de la misma manera que los pacientes del ensayo clínico. No hemos encontrado nunca toxicidades grado 2-5. No hemos encontrado ningún episodio entre los cuidadores y familiares de los pacientes que han recibido este OMG sugerente de transmisión del mismo a la comunidad.

La diferencia entre Celyvir y AloCelyvir es que las células mesenquimales provienen del propio paciente en el caso de Celyvir, mientras que provienen de un donante sano en el caso de AloCelyvir.

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

**1. Nombre del organismo diana (si procede)**

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

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

<p>El objetivo de la administración de ICOVIR-5 es el tratamiento antitumoral de tumores humanos sólidos refractarios o recidivantes. En base a las características de las células tumorales (que tienen niveles elevados de E2F-1) y de las modificaciones introducidas en el genoma de ICOVIR-5, se espera la replicación selectiva de ICOVIR-5 en las células tumorales lo que provocará la eliminación selectiva de las células malignas y la amplificación de la dosis inicial de ICOVIR-5 dentro de la masa tumoral. Al llegar a los márgenes del tumor, ICOVIR-5 entrará en las células no tumorales, pero allí es incapaz de expresar las proteínas del adenovirus y no puede activar su replicación, con lo cual no se propaga. De esta forma se consigue la eliminación de los tumores de los pacientes con tumores sólidos. El conjunto de alteraciones introducidas hacen que ICOVIR-5 pueda además ser administrado tanto localmente como sistémicamente en el torrente sanguíneo. Así:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- En astrocitos normales humanos primarios, ICOVIR-5 es incapaz de expresar niveles detectables de E1A, ni de proteínas tardías (fibra), su replicación está bloqueada (título de virus producido 5 logaritmos menor que para el virus salvaje HAd5), y no es citotóxico.</li><li>- en hígado normal tanto humano como de ratón, ICOVIR-5 no es capaz de expresar niveles detectables de E1A. En muestras primarias de hígado humano, el virus tampoco es capaz de replicarse.</li><li>- en fibroblastos humanos normales, ICOVIR-5 no es capaz de expresar E1A.</li></ul>
---

- en células tumorales humanas (con alteraciones en la ruta de retinoblastoma) donde la funcionalidad de la ruta pRb se restaura por sobreexpresión de pRb o el regulador negativo p21), ICOVIR-5 no es capaz de expresar niveles detectables de E1A or proteínas tardías (fibra) y su replicación es inactivada (título viral 7 logs por debajo de la misma línea celular antes de la restoración de la ruta pRb).

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

El HAd5 tiene una especie-selectividad muy restringida. Pese a que las células no humanas pueden ser infectadas con HAd5, estas infecciones son abortivas. Las modificaciones introducidas en ICOVIR-5 no modifican sustancialmente la selectividad de especie (humana) del virus con respecto a HAd5. Por tanto la posibilidad que la selectividad de especie se amplíe es despreciable para ICOVIR-5.

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

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

Especifíquese:

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

No está previsto que ICOVIR-5 interactúe con organismos distintos del objetivo, porque tiene una selección de huéspedes muy limitada y por la forma propuesta para la difusión. Debido al hecho que el hombre es el huésped exclusivo de HAd5, y que las modificaciones genéticas introducidas en ICOVIR-5 no modifican la especificidad del virus, la probabilidad de transmisión productiva de ICOVIR-5 a animales es prácticamente nula. Y, en el caso improbable de que se produzca la administración involuntaria a organismos distintos del objetivo, la propia selectividad del virus impediría su diseminación entre células no tumorales.

**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**

i) Orden y taxón superior (animales): No aplica
ii) Familia (plantas): NA
iii) Género: NA
iv) Especie: NA
v) Subespecie: NA

vi) Cepa: NA
vii) Cultivar/línea de reproducción: NA
viii) Patovar: NA
ix) Nombre vulgar: NA

**7. Probabilidad de intercambio genético en vivo**

a) Del OMG a otros organismos del ecosistema de liberación: No procede.
b) De otros organismos al OMG: No procede.
c) Consecuencias probables de la transferencia de genes: No procede.

**8. Referencias de los resultados pertinentes (si los hay) de estudios sobre el comportamiento y las características del OMG sobre su repercusión ecológica llevados a cabo en ambientes naturales simulados (por ejemplo, microcosmos, etc.)**

No procede.
-------------

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

No procede.
-------------

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

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

El control de los efectos directos e indirectos del OGM en los pacientes (efecto antitumoral + toxicidad), se hará con las evaluaciones clínicas habituales: exploración física, ECG, constantes vitales (frecuencia cardíaca y presión arterial), notificación de acontecimientos adversos, evaluación de reacciones en el punto de inyección, histología y evaluaciones inmunitarias. Se hará todo lo posible para hacer un seguimiento de los pacientes en los 2 años siguientes a la administración de las infusiones. Además se obtendrán muestras de sangre para determinar títulos de ICOVIR-5 en plasma, su replicación y la presencia de anticuerpos antiadenovirus, coincidiendo con cada administración.

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

Dada la poca probabilidad de infectar sujetos no tratados intencionalmente, y la nula replicación de ICOVIR-5 en células de sujetos no afectados de cáncer, se considera despreciable la posibilidad que haya diseminación de ICOVIR-5 al medio a partir de terceras partes.

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

El adenovirus oncolítico carece de la capacidad de integrarse en el genoma de otros organismos.

### **4. Tamaño del área de seguimiento (m2)**

Hospital y vivienda habitual del pacientes

### **5. Duración del seguimiento**

El ensayo está previsto que dure 4 años. Los pacientes están previsto que se traten durante 6 meses. Si existen respuestas mantenidas, el paciente se seguirá hasta que se produzca la progresión de la enfermedad.

### **6. Frecuencia del seguimiento**

Los pacientes se evaluarán cada semana durante la fase de tratamiento, y al mes de la última dosis.

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

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

Los elementos físicos usados durante la infusión se desechan en un contenedor de muestras biológicas. Se eliminarán como residuos biopeligrosos.



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

Ninguno

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

Sistema cerrado para la infusión (bolsa de infusión y conexiones). El producto no se libera en viales sino en bolsa de infusión directamente.

**3. (b) Tratamiento de residuos**

Los elementos físicos usados durante la infusión se desechan en un contenedor de muestras biológicas, que luego se eliminarán como residuos biopeligrosos.

**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**

No procede, los pacientes tratados hasta la fecha han liberado OMG sin causar efectos en la población.

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

No procede, desde el momento de su liberación por la Sala Blanca, a su infusión en los pacientes, AloCelyvir se encuentra en un sistema cerrado.

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

No procede.

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

Después de haber administrado unas 600 dosis a más de 50 pacientes (en ensayos clínicos y en uso compasivo), no hemos encontrado ningún efecto adverso en los manipuladores del OMG, en los cuidadores o en los familiares de los pacientes.