

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

A. Información de carácter general:

1. Detalles de la notificación

a) Estado miembro de la notificación:	ESPAÑA
b) Número de la notificación:	B/ES/21/07
c) Fecha del acuse de recibo de la notificación:	29/09/2021
d) Título del proyecto:	Desarrollo clínico y prueba de concepto de la nueva terapia regenerativa VEGF-D para el tratamiento coste-efectivo de la angina refractaria. Un estudio de fase II aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo. (ReGenHeart) EudraCT:2017-000789-31; Autorizado el 13/05/2021; OMG con nº de PEI: 18-015 con la indicación angina de pecho refractaria.
e) Período propuesto para la liberación:	Desde Diciembre de 2021 a Septiembre de 2023.

2. Notificador

Nombre de la institución o empresa:	Kuopio University Hospital. Heart Center
-------------------------------------	---

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 <input type="checkbox"/>
	- insectos <input type="checkbox"/>
	- peces <input type="checkbox"/>

- otro animal especifique el phylum y la clase

Otro, especifíquese (reino, phylum y clase)

b) Identidad del OMG (género y especie):

El OMG es AdVEGF-D^{ANAC}. Adenovirus recombinante defectuoso derivado del Adenovirus Humano Tipo 5; Familia: Adenoviridae; Género: Mastadenovirus; Género: Mastadenovirus.

AdVEGF-D^{ANAC} es un vector genéticamente modificado de Ad5, que contiene deleciones genómicas de las regiones E1 y E3B e inserciones de las secuencias génicas que codifican VEGF^{DANAC} y regulan su expresión. La región E1 consta de dos unidades de transcripción E1A y E1B separadas. Estas regiones codifican proteínas cuyo propósito es llevar la célula infectada al estado que permite la producción de partículas virales y la fuga del virus contra la respuesta inmune del huésped activada por la síntesis de ADN de adenovirus. Dos de las proteínas más abundantes codificadas por el gen E1A se denominan E1A 12S y 13S. Estas proteínas son idénticas en sus secuencias de aminoácidos, con la diferencia de un segmento de 46 aminoácidos de longitud en el medio del polipéptido 13S. Ambas proteínas, 12S y 13S, participan en la regulación de la replicación viral al unirse a múltiples proteínas celulares, lo que permite que el ciclo celular cambie de la fase G0 a la fase S. Por otro lado, el gen E1B produce principalmente dos proteínas llamadas E1B 19K y E1B 55K. La proteína E1B 55K inhibe la función de la proteína tumoral p53 y la apoptosis inducida por ella. Además, de conducir a una mayor degradación de la proteína p53 como un complejo con la proteína E4 ORF6. Por su parte, la proteína E1B 19K también contribuye a la inhibición de la apoptosis al prevenir la inducción de vías de muerte celular mediadas por ligando Fas y TNF α . Las proteínas codificadas por la región E3B contribuyen a la protección del virus de las respuestas inmunitarias del huésped: las proteínas E3 RID α y β forman el complejo RID en la membrana de la célula infectada que inhibe las vías de muerte celular mediadas por el ligando Fas y TNF α . E3 14.7K también participa en la inhibición de la apoptosis causada por TNF α y Fas ligando.

El gen VEGF-D^{ANAC} insertado en el genoma del vector produce la forma madura del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular D, regulado por un promotor de CMV. Además, en el gen que codifica el factor de crecimiento se han insertado secuencias de genes que codifican la etiqueta FLAG y los péptidos señal de IL3. VEGF-D^{ANAC} es un factor de crecimiento normalmente presente en el sistema, que aumenta la angiogénesis, linfangiogénesis y vasodilatación. La producción de VEGF-D^{ANAC} aumenta, por ejemplo, durante el desarrollo embrionario y juega un papel importante en ciertos procesos patógenos, como el cáncer y la retinopatía diabética. El péptido señal de la Interleuquina 3 es necesario para la exocitosis de VEGF-D^{ANAC} y se escinde del factor de crecimiento producido antes de que se secrete por la célula. El octapéptido de etiqueta FLAG se puede usar para localizar inmunológicamente el VEGF-D^{NNAC} producido en el sistema. Además, se ha insertado en el genoma una secuencia de intrón que aumenta el rendimiento de VEGF-D^{ANAC}, así como la cola sv40 poli-A que termina la transcripción.

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

En el caso que nos ocupa, el Ad5 genéticamente modificado es genéticamente estable porque el tamaño del genoma recombinado no supera el 105% del genoma del virus de tipo salvaje. En comparación con los controles, los vectores que tienen un genoma más grande que éste se replicarán a un ritmo más lento y perderán rápidamente sus inserciones de ADN adicionales.

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:	
- Número de la notificación:	
Los países en los que se está utilizando el medicamento (OMG) y en los que se ha solicitado la Liberación voluntaria son:	
*El ensayo está en iniciado y ya reclutando pacientes en:	
- Kuopio University Hospital (KOUPIO, Finland) (nº notificación 041/M/2016)	
- Rigshospitalet (Copenhagen, Dinamarca)	
* Se ha solicitado autorización de Liberación Voluntaria o Etiquetado Voluntario del OMG en Finlandia, Polonia, Dinamarca, y Austria:	
. KUH (KUOPIO UNIVERSITY HOSPITAL, Finland) “ReGenHeart GMO Registration KUH 041/M/2016.	
- SUM (SLASKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W KATOWICACH, Poland)“ (GMO approval from Ministry of Environment).	
- RegionH (REGION HOVEDSTADEN, Denmark) Godkendelse .	
- MUW (MEDIZINISCHE UNIVERSITAET WIEN, Viena, Austria).	

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

<p>En caso de liberación accidental del vector al ambiente, éste no posee una ventaja selectiva sobre otros patógenos, porque dichos vectores contienen delecciones en las regiones cruciales para su replicación. Para la pequeña fracción que ha recuperado la región E1, la capacidad de supervivencia en comparación con los virus de tipo salvaje es inferior y estos vectores eventualmente disminuirán en la competencia mutua.</p> <p>El riesgo de liberación del vector al ambiente es bajo, para evitarlo se han elaborado pautas estandarizadas para el manejo de medicamentos de Terapia Génica. Todo el personal involucrado en el estudio está familiarizado con las pautas para el manejo de medicamentos de Terapia Génica, y cuenta con la capacitación y el equipamiento necesarios para actuar ante eventos adversos</p>

ambientales.

Según la literatura, no se ha detectado liberación de adenovirus por la nariz, garganta u orina después de la administración intramiocárdica de genes usando vectores adenovirales del serotipo 5 con delección E1 y E3. En el estudio Fase 1 KAT301 (Hartikainen et al. European Heart Journal. 2017) hemos analizado la posible eliminación de AdsVEGF-D^{ANAC} y encontramos que los fragmentos de ADN adenoviral se pueden amplificar a partir del plasma dos días después de la transferencia genética, pero no después. Sin embargo, nos gustaría señalar que la PCR amplifica solo un fragmento de ADN genómico adenoviral, y eso no significa que los virus infecciosos estén presentes en circulación. En base a esto, el único riesgo potencial de propagación del virus sería un contacto directo con la sangre del paciente durante 1 o 2 días después de la transferencia genética. En el hospital, el mayor riesgo de contacto con AdsVEGF-D^{ANAC} es durante e inmediatamente después de los procedimientos en el laboratorio de hemodinámica, si se produce un contacto con la sangre del paciente.

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

Para completar esta información tendremos en cuenta lo siguiente:

- Organismo Receptor o Parental: Adenovirus de tipo 5.

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 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

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	<input checked="" type="checkbox"/>
En caso afirmativo, indíquese el tipo de ecosistema en que se encuentra:	
Atlántico	<input checked="" type="checkbox"/>
Mediterráneo	<input checked="" type="checkbox"/>
Boreal	<input checked="" type="checkbox"/>
Alpino	<input checked="" type="checkbox"/>
Continental	<input checked="" type="checkbox"/>
Macaronésico	<input checked="" type="checkbox"/>
ii) No	<input type="checkbox"/>
iii) No se sabe	<input type="checkbox"/>
c) ¿Se usa frecuentemente en el país que notifica?	
Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
d) ¿Es frecuente su tenencia en el país que notifica?	
Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>

4. Hábitat natural del organismo

a) Si es un microorganismo:	
Agua	<input type="checkbox"/>
Suelo, en libertad	<input type="checkbox"/>
Suelo, en simbiosis radiculares de plantas	<input type="checkbox"/>

En simbiosis con sistemas foliares o caulinares de plantas

En simbiosis con animales

Otros, (especifíquense): El Adenovirus Humano de Tipo 5 se replica en células Humanas

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

No Aplica (N.A.)

5. a) Técnicas de detección

La detección de Adenovirus Humanos, incluidos el AD5, en el entorno clínico se realiza en los laboratorios centrales de Virología Clínica, analizando de forma rutinaria muestras de pacientes con el fin de determinar la presencia o no de estos adenovirus. Mediante la técnica PCR detectando las regiones E1 y E3, que deberán dar señal positiva.

5. b) Técnicas de identificación

El adenovirus humano es identificado mediante análisis con enzimas de restricción y PCR.

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

Sí

No

En caso afirmativo, especifíquese: **En la Unión Europea el Adenovirus parental está clasificado como grupo de riesgo 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 Adenovirus humano tipo 5 (Ad5) está clasificado dentro del Grupo de Riesgo 2. La infección por adenovirus normalmente se resuelve por sí sola y suele causar sólo síntomas leves del tracto respiratorio superior y fiebre en individuos inmunocompetentes. La mitad de las infecciones por adenovirus son asintomáticas o sólo causan síntomas muy leves. Las infecciones por adenovirus representan aproximadamente del 5 al 10% de las infecciones febriles en niños y recién nacidos, pero su frecuencia es significativamente menor en la población adulta. Los anticuerpos contra el adenovirus del serotipo 5 se pueden medir en casi el 85% de la población. En el caso que nos ocupa, debemos destacar que los adenovirus pueden producir una fuerte respuesta inmunitaria.

Los recién nacidos y los individuos inmunodeprimidos son los grupos de riesgos más importantes para las infecciones por adenovirus, en ellos los adenovirus pueden causar neumonía grave y enfermedades que afectan a otros órganos distintos del tracto respiratorio, según el nivel de inmunocompetencia.

En individuos con función inmunológica normal, los adenovirus causan una infección local restringida, cuya ubicación depende de la vía de transmisión. Existe una variación en el tropismo tisular entre diferentes serotipos de adenovirus y, en teoría, pueden replicarse localmente en varios órganos diferentes. Las infecciones por adenovirus diseminadas se observan principalmente en pacientes inmunodeprimidos y, por lo general, también están relacionadas con otros síntomas sistémicos graves.

En cerdos, se detectó ADN de Ad5 en los pulmones y el hígado después de una inyección intravenosa de adenovirus de tipo salvaje a una dosis de 2×10^{12} vp. Además, se observó una pequeña biodistribución del ADN de Ad5 en el riñón, el corazón, el músculo esquelético, el cerebro y las gónadas, pero la concentración del ADN viral fue muchos miles de veces menor que en los pulmones. Utilizando métodos de ensayo inmunohistoquímicos y basados en hibridación se ha demostrado que la infección por ciertos serotipos de adenovirus puede permanecer latente en las amígdalas, adenoides y pulmones.

Aunque la eficacia de algunos medicamentos antivirales, que alteran la función de la ADN polimerasa, ya se ha probado en ensayos clínicos, todavía no se ha aprobado ningún medicamento antiviral para uso clínico.

Para prevenir el síndrome de dificultad respiratoria aguda en algunos grupos de riesgo se han utilizado vacunas entéricas que se basan en adenovirus vivos de tipo salvaje, por ejemplo en el personal militar. Se ha demostrado que estas vacunas son seguras y bien toleradas. Después de la administración de una vacuna de adenovirus para los serotipos 4 y 7, se produce la diseminación fecal de adenovirus durante 2 a 3 semanas, pero no se ha demostrado que se produzca la transmisión a personas no vacunadas que utilizan las mismas instalaciones, como los baños. Sin embargo, se ha informado de transmisión a inmunodeprimidos.

La eliminación de adenovirus salvaje de una persona infectada se produce a través de aerosoles respiratorios y materia fecal. La transmisión horizontal puede ocurrir, por ejemplo, si los virus ingresan al sistema respiratorio o la conjuntiva del ojo a través de gotitas. También es posible la transmisión por vía fecal-oral, especialmente en niños. El adenovirus de tipo salvaje no se integra en el genoma del hospedador en las células que permiten la replicación, y la infección de la célula hospedante conduce a su inevitable muerte por citólisis al final de su ciclo de replicación. Se ha descubierto que algunos serotipos de adenovirus son oncogénicos cuando infectan células de roedores con ellos. Los Ad5 son adenovirus no oncogénicos y no se ha demostrado que induzcan tumorigénesis en los tejidos infectados.

8. Información sobre reproducción

a) Tiempo de generación en ecosistemas naturales: No Aplica (N.A.), dado que no se encuentra en ecosistemas naturales.
b) Tiempo de generación en el ecosistema en el que vaya a ser liberado: N.A.
c) Modo de reproducción. N.A. Sexual <input type="checkbox"/> Asexual <input type="checkbox"/>
d) Factores que afectan a la reproducción: N.A.

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): N.A.
b) Factores pertinentes que afectan a la capacidad de supervivencia: La capacidad de supervivencia del Ad5 depende de la capacidad de replicarse en el interior de la célula hospedadora. El Ad5 natural es un virus sin envoltura que, fuera del hospedador, puede inactivarse por medios físicos y químicos. 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 y el tipo 2 entre 3 y 8 semanas en superficies. Siempre dependiendo de factores ambientales como la temperatura, el pH, y el tipo de superficie. También se ha visto que casi todos los serotipos son estables durante varias semanas a temperatura ambiente y durante varios meses a 4°C. Como ya se ha comentado, 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.

La capacidad de diseminación es dependiente de la dosis, la capacidad de 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).

B/ES/98/30; B/ES/99/35; B/ES/99/19; B/ES/00/12; B/ES/01/18; B/ES/03/35; B/ES/09/64; B/ES/11/27; B/ES/11/25; B/ES/12/17; B/ES/13/18; B/ES/13/05; B/ES/13/04; B/ES/15/15; B/ES/16/04; B/ES/16/05; B/ES/18/28; B/ES/18/27; B/ES/18/25; B/ES/18/14; B/ES/18/10; A/ES/19/06; B/ES/20/26; B/ES/20/09; B/ES/20/03

Recogido de la web del MITECO, de los años 1993 al 2021 (Mayo). https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/biotecnologia/organismos-modificados-geneticamente-omg-notificaciones-y-autorizaciones/informacion_sobre_notificaciones.aspx

C. Información sobre la modificación genética

1. Tipo de modificación genética:

i) Inserción de material genético	<input checked="" type="checkbox"/>
ii) Eliminación de material genético	<input type="checkbox"/>
iii) Sustitución de una base	<input type="checkbox"/>
iv) Fusión celular	<input type="checkbox"/>
v) Otro (especifíquese) Deleción de las regiones E1 y E3B	

2. Resultado que se pretende obtener mediante la modificación genética

El gen VEGF-D^{ANAC} insertado en el genoma del vector produce la forma madura del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular D, regulado por un promotor de CMV. Además, en el gen que codifica el factor de crecimiento se han insertado secuencias de genes que codifican la etiqueta FLAG y los péptidos señal de Interleuquina 3. VEGF-D^{ANAC} es un factor de crecimiento normalmente presente en el humano, que aumenta la angiogénesis, linfangiogénesis y vasodilatación. La producción de VEGF-D^{ANAC} aumenta, por ejemplo, durante el desarrollo embrionario y juega un papel en ciertos procesos patógenos, como el cáncer y la retinopatía diabética. El péptido señal de la Interleuquina 3 es necesario para la exocitosis de VEGF-D^{ANAC} y se escinde del factor de crecimiento producido antes de que se secrete por la célula. El octapéptido de etiqueta FLAG se puede usar para localizar inmunológicamente el VEGF-D^{ANAC} producido en el sistema. Además, se ha insertado en el genoma una secuencia de intrón que aumenta el rendimiento de VEGF-D^{ANAC}, así como la cola sv40 poli-A que termina la transcripción.

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	<input type="checkbox"/>
Otros (especifíquense):	
b) Identidad del vector: El virus AdVEGF-D^{ANAC} es producido por la co-transfección de los plasmidos pADAp D^{ANAC} y Ad5 genomic DNA sub360.	
c) Gama de organismos huéspedes del vector: El Plásmido pADApD^{ANAC} se replica en la bacteria E. coli y el Adenovirus es producido en células HEK293 MCB (células embrionarias de riñón humanas).	
d) Presencia en el vector de secuencias que den un fenotipo seleccionable o identificable	
Sí <input checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
Resistencia a los antibióticos	<input type="checkbox"/>
Otras, (especifíquense) El vector codifica por un octapéptido de etiqueta FLAG que se puede usar para localizar inmunológicamente el VEGF-D^{ANAC} producido en el sistema.	
Indique qué gen de resistencia a los antibióticos se inserta: N.A.	

e) Fragmentos constituyentes del vector:

El fragmento de ADN que codifica los aminoácidos 93-201 de VEGF-D humano se insertó en el vector pEFBOSSFLAG corriente abajo de la secuencia de ADN que codifica para el péptido señal IL-3 y el octapéptido FLAG.

La secuencia del transgén de VEGF-D (que codifica el péptido señal de IL-3, el octapéptido FLAG y los aminoácidos 93-201 de VEGF-D) se cortó del vector pEFBOSSFLAG y se ligó al vector pAPEX-3. Este vector se denominó pVDApex Δ NAC. El casete de expresión de este vector contiene el promotor CMV para impulsar la expresión del transgén, una secuencia de intrón, la secuencia del transgén VEGF-D^{ANAC} y la señal de poliadenilación de SV40.

Para generar un plásmido de vector lanzadera adenoviral que codifica VEGF-D Δ NAC, el casete de expresión del plásmido pVDApex Δ NAC se liberó y se ligó a un plásmido de vector lanzadera adenoviral con la región E1 eliminada en el sitio BglIII. Este plásmido se denominó pADAp Δ NAC

Nuestro OMG, AdVEGF-D^{ANAC}, es un vector Ad5 modificado genéticamente que contiene deleciones genómicas de las regiones E1 y E3B e inserciones de las secuencias génicas que codifican VEGF-D^{ANAC} y regulan su expresión. La región E1 consta de dos unidades de transcripción E1A y E1B separadas. Estas regiones codifican proteínas cuyo propósito es llevar la célula infectada al estado que permite la producción de partículas virales y la evasión del virus contra la respuesta inmune del huésped activada por la síntesis de ADN de adenovirus. Dos de las proteínas más abundantes codificadas por el gen E1A se denominan E1A 12S y 13S. Estas proteínas son idénticas en sus secuencias de aminoácidos, aparte de un segmento de 46 aminoácidos de longitud en el medio del polipéptido 13S. 12S y 13S participan en la regulación de la replicación viral al unirse a múltiples proteínas celulares, lo que permite que el ciclo celular cambie de la fase G0 a la fase S. El gen E1B produce principalmente dos proteínas llamadas E1B 19K y E1B 55K. E1B 55K inhibe la función de la proteína tumoral p53 y la apoptosis inducida por ella. Además, E1B 55K conduce a una mayor degradación de la proteína p53 como un complejo con la proteína E4 ORF6. E1B 19K contribuye a la inhibición de la apoptosis también al prevenir la inducción de vías de muerte celular mediadas por ligando Fas y TNF α . Las proteínas codificadas por la región E3B contribuyen a la protección del virus de las respuestas inmunitarias del huésped: las proteínas E3 RID α y β forman el complejo RID en la membrana de la célula infectada que inhibe las vías de muerte celular mediadas por el ligando Fas y TNF α . E3 14.7K también participa en la inhibición de la apoptosis causada por TNF α y Fas ligando.

f) Método de introducción del vector en el organismo receptor

- i) transformación
- ii) electroporación
- iii) macroinyección
- iv) microinyección
- v) infección
- vi) otros, (especifíquense)

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

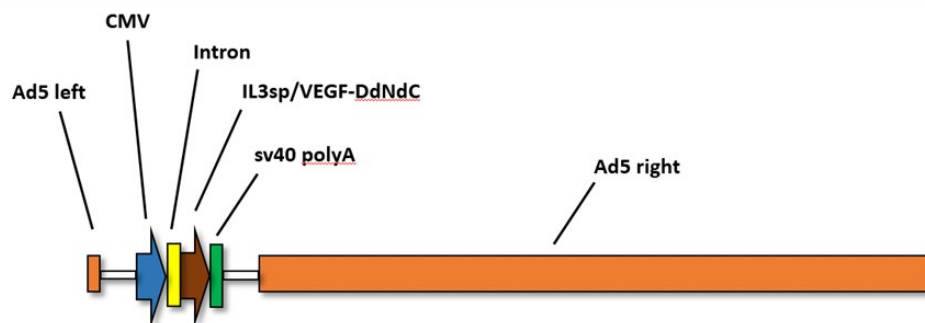
- i) transformación
- ii) microinyección
- iii) macroencapsulación

iv) macroinyección

v) otros, (especifíquense) N.A.

6. Información sobre el fragmento de inserción:

a) Composición del fragmento de inserción:



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

- VEGF-D^{ANAC}, el péptido señal IL-3 y el octapéptido FLAG, son de origen humano.
- El promotor procede de CMV (Cytomegalovirus)
- La secuencia poliA de SV40 (Simian Virus 40)

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

El gen VEGF-D^{ANAC} insertado en el genoma del vector produce la forma madura del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular D, regulado por un promotor de CMV. Además, en el gen que codifica el factor de crecimiento se han insertado secuencias de genes que codifican la etiqueta FLAG y los péptidos señal de Interleuquina 3. VEGF-D^{ANAC} es un factor de crecimiento normalmente presente en el humano, que aumenta la angiogénesis, linfangiogénesis y vasodilatación. La producción de VEGF-D^{ANAC} aumenta, por ejemplo, durante el desarrollo embrionario y juega un papel en ciertos procesos patógenos, como el cáncer y la retinopatía diabética. El péptido señal de la Interleuquina 3 es necesario para la exocitosis de VEGF-D^{ANAC} y se escinde del factor de crecimiento producido antes de que se secrete por la célula. El octapéptido de etiqueta FLAG se puede usar para localizar inmunológicamente el VEGF-D^{ANAC} producido en el sistema. Además, se ha insertado en el genoma una secuencia de intrón que aumenta el rendimiento de VEGF-D^{ANAC}, así como la cola sv40 poli-A que termina la transcripción.

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

- en un plásmido libre
- integrado en el cromosoma
- Otros especifíquense: **Integrado en el genoma del Adenovirus.**

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

Sí

No

En caso afirmativo , especifíquese:

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

1. Indíquese si es:

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

2. Nombre completo

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

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

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

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

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

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

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

E. Información sobre el organismo modificado genéticamente

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 Los adenovirus humanos de tipo5 se puede reproducir en una gran variedad de células humanas, mientras que AdVEGF^{ANAC} se produce solo en la línea celular HEK 293.		
c) ¿Se diferencia en algo el OMG del receptor en lo que respecta a la diseminación?		

Sí No No se sabe

Especifíquese: Puesto que la capacidad de replicación del AdVEGF^{ANAC} está restringida a la línea celular HEK 293, esto limita la capacidad de diseminación de los Adv5 salvaje.

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

Sí No No se sabe

Especifíquese: La incapacidad para la replicación de AdVEGF^{ANAC} 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

El adenovirus wild-type no se integra en el genoma del huésped en las células permisivas a la replicación, y la infección de la célula huésped conduce a su inevitable muerte por citolisis al final de su ciclo de replicación. Los serotipos de adenovirus que coexisten en el mismo individuo pueden recombinarse y formar híbridos causando nuevas infecciones, especialmente en individuos inmunocomprometidos pero también en individuos sanos. Los Ad5 modificados genéticamente, caso que nos ocupa, son estables desde el punto de vista genético porque el tamaño del genoma recombinado no supera el 105 % del genoma del virus de tipo salvaje. En comparación con los controles, los vectores que tienen un genoma más grande que este se replicarán a un ritmo más lento y perderán sus inserciones de ADN adicionales rápidamente. El AdsVEGF-D^{ANAC} es un vector genéticamente estable y no puede integrar su ADN en el genoma del huésped, en la literatura no aparecen casos en los que el AdsVEGF-D^{ANAC} se hubiera transmitido ni horizontal ni verticalmente. Los Ad5 son virus no oncogénicos, y es poco probable que los cambios en el genoma del AdsVEGF-D^{ANAC} afecten a la capacidad del vector para formar células tumorales. Tanto en estudios preclínicos como clínicos en los que se ha realizado un seguimiento a largo plazo, no se ha observado que hubiera incidencia pronunciada de cáncer entre los sujetos expuestos a AdsVEGF-A en comparación con los controles. Desde el punto de vista de la evaluación de riesgos del producto AdsVEGF-D^{ANAC} utilizado en el ensayo para el que solicitamos la autorización de liberación voluntaria, ReGenHeart, la prueba más valiosa de seguridad se obtiene en el anterior ensayo KAT301. El lote de AdsVEGF-D^{ANAC} utilizado en este estudio contenía una concentración significativamente mayor de vectores competentes en replicación (RCA) en comparación con la preparación actual utilizada en ReGenHeart, y no se ha reportado ningún efecto adverso en este sentido. Se debe destacar que el Producto en Investigación (PEI/IMP) utilizado en KAT301 se inyectó exactamente de la misma concentración que se prevé aplicar en el ensayo ReGenHeart.

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 siguientes?
- | | |
|----------|-------------------------------------|
| humanos | <input checked="" type="checkbox"/> |
| animales | <input type="checkbox"/> |
| plantas | <input type="checkbox"/> |
| otros | <input type="checkbox"/> |

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

Los adenovirus pueden producir una fuerte respuesta inmunitaria.

Los adenovirus con delección E1 no pueden replicarse en las células humanas, porque la región génica antes mencionada codifica para factores de transcripción que son esenciales para la replicación del adenovirus. Si algunos de los vectores recuperan la región E1 eliminada por recombinación, no serán capaces de replicarse y diseminarse tan eficazmente como los adenovirus de tipo salvaje. El análisis del OMG, donde se utiliza como muestra de referencia el OMG ya aplicado a los pacientes en el ensayo Fase I (KAT301), y aprobado para su uso por la Agencia de Medicamentos de Finlandia (FIMEA) y la Agencia de Medicamentos de Dinamarca (DKMA) tanto en el ensayo KAT301, ya finalizado, como para el ensayo que nos ocupa, el ReGenHeart, se ha demostrado que el OMG con el que se tratan los pacientes incluidos en el ensayo ReGenHeart, contiene solo una fracción de estos recombinantes E1 en comparación con el producto utilizado de forma segura en el ensayo clínico anterior Fase 1 (KAT301, (Hartikainen et al. European Heart Journal.2017), haciéndolo aún más factible para el uso clínico.

4. Descripción de los métodos de identificación y detección

a) Técnicas utilizadas para detectar el OMG:

Para detectar la proteína VEGF-D^{ANAC} se ha utilizado un kit ELISA VEGF-D comercial, cuyo rango de ensayo es de 125-4000 pg / ml. Tenemos la capacidad de detectar la secuencia de ADN de VEGF-D^{ANAC} mediante métodos modernos basados en PCR con una sensibilidad de varias copias en la muestra de interés. Además, las técnicas de Western Blot son capaces de detectar en muestras de plasma cantidades tan pequeñas como nanogramos.

b) Técnicas utilizadas para identificar el OMG: **mediante técnicas de PCR amplificando dentro de la región IL3sp/VEGF-D^{ANAC}**

F. Información sobre la liberación

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

El propósito del estudio es evaluar la seguridad y eficacia de transferencia genética regenerativa de AdVEGF-D, mediado por catéter, en pacientes con angina refractaria a quienes la revascularización no se puede realizar. Los objetivos principales son probar la eficacia de la terapia para mejorar capacidad funcional mediante prueba de marcha de los 6 minutos después de 6 meses de seguimiento y mejora de los síntomas evaluados siguiendo la guía de la Sociedad Cardiovascular Canadiense (CCS). Los objetivos secundarios son probar la eficacia de la transferencia de genes para mejorar la capacidad funcional usando el test de marcha de 6 minutos y la mejora de los síntomas evaluados por la clase CCS después de 12 meses, así como el aumento en perfusión miocárdica evaluada 6 meses después de la transferencia génica. Además, a los 6 y 12 meses, se valorará la mejora en la calidad de vida

(CV), el uso de medicación para la angina de pecho, aparición de eventos cardíacos adversos importantes relacionados con la enfermedad de las arterias coronarias, muerte, infarto de miocardio, ictus, revascularización e ingreso hospitalario por enfermedad coronaria (arteriopatía) o un criterio de valoración combinado de los anteriores (principales adversos cardíacos y Eventos Cerebrovasculares, MACCE). Además, el resultado a largo plazo en los pacientes se evaluará mediante entrevistas telefónicas 2 y 5 años después de la terapia.

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: Se liberará en humanos que es el huésped habitual del virus.	

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

a) Localización geográfica (región administrativa y coordenadas de referencia cuando proceda): Hospital General Universitario Gregorio Marañón
b) Área del lugar (m ²): i) lugar real de la liberación (m ²): Sala de Producción Celular-GMP ii) área de liberación más amplia (m ²): Laboratorio de Hemodinámica. Servicio de Cardiología.
c) Proximidad a biotipos reconocidos internacionalmente o zonas protegidas (incluidos depósitos de agua potable) que pudieran verse afectados: N.A.
d) Flora y fauna, incluidos cultivos, ganado y especies migratorias que pueden potencialmente interactuar con el OMG: NINGUNA

4. Método y amplitud de la liberación

a. Cantidad de OMG que vaya a liberarse: Se inyectará una dosis total de 1×10^{11} vpu en un volumen total de 2 ml (0,2ml por lugar de inyección, 10 inyecciones).
b. Duración de la operación: Desde Diciembre de 2021 a Septiembre de 2023.
c. Métodos y procedimientos para evitar o reducir al mínimo la propagación de los OMG más allá del lugar de liberación: El OMG se inyecta con el sistema NOGA Myostar®, asegurando que todo el OMG queda en el miocardio de los pacientes incluidos en el Ensayo. Todo el personal involucrado en el estudio está familiarizado con las pautas para el manejo de medicamentos de Terapia Génica, y cuenta con la capacitación y el equipamiento necesarios para actuar ante eventos adversos ambientales.

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

Las condiciones ambientales serán las del Laboratorio de Hemodinámica del Servicio de Cardiología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón de Madrid. España.

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

Con el fin de identificar el mejor candidato de VEGF para la terapia génica en humanos, se compararon los efectos de los diferentes subtipos de VEGF en un modelo de isquemia de las extremidades traseras de conejo. En el estudio, realizado en 2003, se inyectaron 66 conejos blancos de Nueva Zelanda con extremidades traseras isquémicas con VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D (tanto de su forma precursora como madura) y VEGF-C156S. Se encontró que el VEGF-A y la forma madura procesada proteolíticamente del VEGF-D (marcado por los factores de crecimiento ΔNAC en superíndice) inducían efectos angiogénicos superiores en comparación con los otros subtipos de VEGF y el gen control LacZ. Además, el efecto angiogénico del VEGF-D ^{ΔNAC} adenoviral fue más difuso en comparación con los tortuosos neo-vasos inducidos por el VEGF-A. Ambos factores de crecimiento indujeron edema en los tejidos conectivos adyacentes, debido al incremento de la permeabilidad vascular de los microvasos agrandados.

Por otro lado se quiso ver si AdsVEGF-D ^{ΔNAC} era angiogénico también en el miocardio de cerdo normal no isquémico (2004). Comparando además dos niveles de dosis de adenovirus con la administración de plásmido desnudo. En este estudio, los cerdos domésticos (25-30 kg; n = 45) fueron transducidos por vía intraventricular usando un catéter de inyección NOGA Myostar® (Biosense-Webster, Johnson & Johnson). Se compararon dos niveles de dosis de adenovirus (2×10^{11} vp y 2×10^{12} vp) de AdsVEGF-A165 y AdsVEGF-D ^{ΔNAC} con AdsLacZ. Además, se estudiaron plásmidos desnudos (1 mg) que codifican hVEGF-A165, VEGF-D ^{ΔNAC} o lacZ usando dos puntos de tiempo (d 6 y d21). En este estudio, la transferencia del gen AdsVEGF-D ^{ΔNAC} indujo una producción de proteína miocárdica dependiente de la dosis medida por ELISA, lo que resultó en una angiogénesis eficiente 6 días después de las inyecciones. Desde la perspectiva de la seguridad, observamos que la producción miocárdica excesiva de VEGF-A y VEGF-D ^{ΔNAC} provoca un derrame pericárdico después de la administración de adenovirales a dosis altas (2×10^{12} vp), sin embargo, no se observó derrame con las dosis más pequeñas. No se encontraron cambios en la Troponina T plasmática, la Creatincinasa (CK) y la CK-MB entre los grupos de estudio a 6 días y 21 días después de la transferencia génica.

Se evaluó también la eficacia terapéutica de AdsVEGF-D ^{ΔNAC} utilizando un modelo de infarto agudo de miocardio porcino (2013), logrado mediante oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (LAD) mediante la colocación, mediada por catéter, de una bomba de oclusión en los dos tercios distales del vaso. La transferencia génica, mediada por adenovirus, se realizó por vía intramiocárdica 30 minutos después de la confirmación de la oclusión con un catéter de inyección NOGA Myostar® de curva D con el gen marcador LacZ o VEGF- D ^{ΔNAC} en la zona límite del infarto (Tabla 2). En conclusión, AdsVEGF-D ^{ΔNAC} indujo el crecimiento de vasos capilares en el borde de la cicatriz del infarto. Los neo-vasos permanecieron tres semanas después de la transferencia génica, aunque esta se perdió en el d14. Incluso la expresión transitoria del gen terapéutico VEGF-D ^{ΔNAC} condujo a un aumento duradero de la perfusión en el miocardio infartado, lo que sugiere que es un gen viable para futuros estudios clínicos.

Grupo	Dosis	Animales/grupo Tiempo	
		Día 6	Día 21
Control AdLacZ	1 x 10 ¹² vpu/2 mL	7	3
AdVEGF-D ^{dNdC}	1 x 10 ¹² vpu/2 mL	4	4

Tabla 1. Diseño del estudio.

Antes del ensayo Fase 2 ReGenHeart que es el que nos ocupa, el grupo realizó un ensayo de Fase 1, el KAT 301 (Hartikainen et al. European Heart Journal.2017) con exactamente el mismo medicamento en investigación AdsVEGF-D^{ANAC} ahora en evaluación. En el ensayo anterior, no hubo diferencias en la aparición de eventos adversos entre los grupos de estudio. La mortalidad, así como la incidencia de síndrome coronario agudo y episodios de accidente cerebrovascular, coincidieron con los informes recientes sobre el progreso natural y el pronóstico de los pacientes con angina refractaria (activa n = 24, placebo n = 6).

En otro estudio se evaluaron los efectos a largo plazo de los Ad5 que expresan VEGF-A (AdsVEGF-A) fabricados de manera similar a AdsVEGF-D^{ANAC}, se concluyó que no se observó una incidencia elevada de enfermedades graves, como malignidad o retinopatía diabética, en los sujetos que habían recibido AdsVEGF-A en sus arterias coronarias en comparación con los sujetos del grupo de control. En el ensayo Fase 1 KAT301 ya terminado aún está en curso el seguimiento de la seguridad de 5 años, pero los análisis preliminares han demostrado que la incidencia de muertes y enfermedades graves ha sido similar entre los grupos activo y placebo (activo n = 24, placebo n = 6).

Según los estudios preclínicos, las inyecciones miocárdicas AdsVEGF-D^{ANAC} parecen ser bien toleradas cuando se administran en las mismas dosis que se han utilizado en los ensayos clínicos. Se observó una cantidad notable de derrame pericárdico, pero no una elevación de las enzimas cardíacas, en los cerdos (n = 3) que recibieron una inyección intramiocárdica de AdsVEGF-D^{ANAC} a una dosis de 2x10¹² vp.

En el Ensayo Fase 1 anterior, el KAT301, no se observaron reacciones adversas de este tipo, que hubieran cumplido los criterios de Sospecha de Reacción Adversa Grave Inesperada (SUSAR). Si se observaron fiebre transitoria, elevación de la proteína C-reativa y trombocitopenia en los sujetos del grupo AdsVEGF-D^{ANAC}. Los cambios antes mencionados fueron leves y se resolvieron sin más secuelas (ver Tabla 2).

AdsVEGF-D ^{ANAC}	Basal	Día 1	Día 6	Día 14
n	24	24	24	23
Temperatura (°C)	35,8	36,3	N.A.	N.A.
Temperatura >37,5 °C	0	1	N.A.	N.A.
Proteína C-reativa	4	9	13*	4
Leucocitos (x10 ⁹)	6,6	7	7,6	6,1
Plaquetas (x10 ⁹)	214	186***	218	229
Control	Basal	Día 1	Día 6	Día 14
n	6	6	6	6
Temperatura (°C)	36,0	36,1	N.A.	N.A.
Temperatura >37,5 °C	0	0	N.A.	N.A.
Proteína C-reativa	4	6	5	3
Leucocitos (x10 ⁹)	8,4	7,8	7,2	6,9
Plaquetas (x10 ⁹)	274	247	289	269

Tabla 2. Valores sanguíneos de los sujetos del Ensayo KAT301. Significancia: * = p < 0.05; *** = p < 0.001 comparado con el basal.

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:
vi) Cepa:
vii) Cultivar/Línea de reproducción:
viii) Patovar:
ix) Nombre vulgar: Humano

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

Inyección del vector en el miocardio mediante sistema NOGA Myostar®, sistema que permite inyección intramiocárdica, seguido por introducción del transgen en las células cardiacas, modificando su producción de la proteína VEGF, el resultado esperado es la vascularización del tejido dañado, mejorando la perfusión miocárdica, con el objetivo de alcanzar la mejora del flujo sanguíneo.

Otra interacción podría ser una respuesta inmune al adenovirus por parte del humano.

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

Las infecciones por cepas de adenovirus de tipo salvaje son comunes y la mayoría de los adultos son seropositivos a los anticuerpos antiadenovirus tipo 5, lo que indica una infección previa (Chirmule N et al., Gene Ther. 1999 6:1574-83). En este ensayo se utilizará una cepa de adenovirus NON competente para la replicación, por lo que no debería generar nuevos vectores en el organismo receptor.

Sin embargo, se ha demostrado que una fracción muy pequeña de los vectores AdsVEGF-D^{ANAC}, sigue siendo capaz de replicarse en condiciones favorables tras la recombinación de las regiones genéticas deletionadas. En estos casos, es muy probable que la replicación de los vectores AdsVEGF-D^{ANAC} recombinantes E1 siga siendo menos eficiente que la de los virus de tipo salvaje, ya que la mayoría de los vectores recombinantes E1 carecen de la región E3 y, por tanto, su propagación lateral a las células adyacentes es complicada.

En el anterior ensayo realizado por el grupo, Fase 1, el producto AdsVEGF-D^{ANAC} investigado contenía una concentración significativamente mayor de vectores RCA. No obstante, no se observaron reacciones adversas graves relacionadas con el uso de este

producto. Sólo se observó fiebre transitoria, elevación de la proteína C reactiva y trombocitopenia en los sujetos que recibieron el material AdsVEGF-D^{ANAC}. Estos efectos fueron leves y se resolvieron sin más secuelas. Con esta premisa es muy poco probable que la presencia de una cantidad incluso menor o como mucho igual de vectores RCA en el producto actual suponga un riesgo para el sujeto o el personal del hospital.

Si se produjera un derrame del vial que contiene el vector se procederá con los protocolos habituales de desactivación del virus. Utilizando primero toallitas absorbentes para la retirada del producto, inactivándolo/desinfectando después con Hipoclorito sódico al 1% o Virkon al 2%. Al tratarse de un virus defectivo es incapaz de replicarse, por lo que no habrá interacción con otros organismos del medioambiente.

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

Desde el punto de vista de la seguridad, los vectores adenovirales tienen una capacidad muy baja de incorporarse al genoma de las células infectadas, por lo que se consideran vectores extremadamente seguros para su uso en terapia génica. Además el AdsVEGF-D^{ANAC} no es competente para la replicación. El material genético detectable de los vectores adenovirales parece eliminarse del organismo en los dos meses siguientes al tratamiento dado que a partir de ese momento es indetectable. La eliminación se haría vía el reconocimiento del sistema inmune ya que se ha descrito que la mayoría de los adultos son seropositivos a los anticuerpos antiadenovirus tipo 5, debido a infecciones previas con virus salvaje. En la bibliografía existente, no se ha reportado la detección de liberación de adenovirus por la nariz, garganta u orina después de la administración intramiocárdica de genes usando vectores adenovirales del serotipo 5 con delección E1 y E3. En el estudio Fase 1 KAT301 analizamos la posible eliminación de AdsVEGF-D^{ANAC} y encontramos que los fragmentos de ADN adenoviral se pueden amplificar a partir del plasma dos días después de la transferencia genética, pero no después. Sin embargo, nos gustaría señalar que la PCR amplifica solo un fragmento de ADN genómico adenoviral, y eso no significa que los virus infecciosos pudieran estar presentes en circulación. Además podemos decir que en ningún momento del estudio KAT301, el ADN adenoviral pudo detectarse en la orina de los sujetos incluidos en el mismo. En base a esto, el único riesgo potencial de propagación del virus sería un contacto directo con la sangre del paciente durante 1 o 2 días después de la transferencia genética. Por tanto en el hospital, el mayor riesgo de contacto con AdsVEGF-D^{ANAC} es durante e inmediatamente después de los procedimientos en el laboratorio de hemodinámica, si se produjera un contacto con la sangre del paciente. Además, al tratarse de un virus defectivo en su capacidad replicativa es improbable que el AdsVEGF-D^{ANAC} pueda ser liberado al 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

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

7. Probabilidad de intercambio genético en vivo

a) Del OMG a otros organismos del ecosistema de liberación: N.A. Aunque en este ensayo se utilizará una cepa de adenovirus NON competentes para la replicación, se debe hacer constar que los vectores AdsVEGF-DΔNAC pueden ser capaces de replicarse si están en presencia de los adenovirus de tipo salvaje que producen las proteínas codificadas por la región E1. Esta potencial recombinación es muy poco probable ya que el fenómeno dependería de la presencia intracelular simultánea de los virus de tipo salvaje o de los vectores RCA con AdsVEGF-DΔNAC. Además, a menos que se produzca la recombinación, la complementación promueve la replicación de AdsVEGF-ΔNAC sólo durante un ciclo de replicación.
b) De otros organismos al OMG: N.A.
c) Consecuencias probables de la transferencia de genes: N.A.

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.)

N.A.

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

N.A.

H. Información sobre el seguimiento

1. Métodos de seguimiento de los OMG

Para la detección de la proteína VEGF-D Δ NAC utilizamos un kit ELISA VEGF-D comercial, cuyo rango de ensayo es de 125-4000 pg/ml. Además detectamos la secuencia de ADN de VEGF-D Δ NAC mediante métodos basados en PCR con una sensibilidad de varias copias en la

muestra de interés. Más concretamente: Se recogerán muestras de sangre rutinarias a los pacientes en la visita de scrinig, antes de la transferencia génica, a las 4h del tratamiento, 1 día pos-tratamiento, día 14, día 180 y día 360. En todas las tomas de muestra además de las analíticas rutinarias que se harán en el propio hospital, se recogerán muestras de plasma, suero y orina, que serán criopreservadas y almacenadas a -80°C para su envío al laboratorio central A.I. Virtanen Institute, University of Eastern Finland, dentro de la UE, quienes serán los responsables del análisis y futuro guardado de las muestras hasta 10 años después de la finalización del ensayo. Estas muestras se analizarán por PCR y ELISA midiendo: VEGF-D Elisa; Lp(a), OxLDL; Anti-VEGF-D antibody 4; y Anti-adenovirus antibody 4 (AVAb4). Dada la poca capacidad infectiva del medicamento no se requiere ningún tratamiento especial de las muestras, pudiendo procesarlas con las técnicas rutinarias utilizadas por los laboratorios de Hematología, Bioquímica y Microbiología de nuestro hospital. Siempre en cabinas de Bioseguridad de Clase II.

2. Métodos de seguimiento de las repercusiones en el ecosistema

N.A.

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

N.A. El caso de que los vectores AdsVEGF-D^{ANAC} se complementen con los adenovirus de tipo salvaje es muy poco probable. Aunque los dos estén presentes simultáneamente en el sistema, este efecto sería probablemente de corta duración, ya que el fenómeno no podría ir más allá del primer ciclo. Sin embargo, en caso de que se pueda replicar el vector y de que se pudiera transferir el material genético a otro organismo, se podría detectar mediante PCR, amplificando el gen insertado o la secuencia TAG del vector.

4. Tamaño del área de seguimiento (m²)

N.A.

5. Duración del seguimiento

El seguimiento de los pacientes y la toma de muestras se hará hasta un año después de la inclusión.

6. Frecuencia del seguimiento

Se recogerán muestras a los pacientes en la visita de scrinig, antes de la transferencia génica, a las 4h del tratamiento, 1 día pos-tratamiento, día 14, día 180 y día 360.

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

1. Tratamiento del lugar tras la liberación

Se retirará todo el material fungible, jeringas y viales, así como sábanas impregnadas con restos sanguíneos del paciente derivados del cateterismo, y todo ello será desechado, junto con las batas y guantes utilizados por el personal de la Sala de Hemodinámica, a un cubo específico para residuos biológicos altamente contaminantes, bolsa roja, para su posterior destrucción mediante incineración.

2. Tratamiento del OMG tras la liberación

El OMG llega al hospital criopreservado en viales que contienen la cantidad exacta a utilizar en los pacientes, con lo que no se generarán residuos del mismo. Una vez utilizado el vial será eliminado al cubo específico para residuos biológicos altamente contaminantes, bolsa roja, para su posterior destrucción mediante incineración.

3. a) Tipo y cantidad de residuos producidos

Viales, jeringas, agujas, sábanas, gasas, batas, calzas y guantes.

3. (b) Tratamiento de residuos

Se desecharán a cubos de residuos biológicos peligrosos para posterior incineración. Y los objetos punzantes, ej. Agujas, al contenedor amarillo destinado a tal fin, que posteriormente será incinerado.

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 un poco probable derrame del OMG, AdsVEGF-D^{ANAC}, en áreas abiertas, lo primero de todo se advertirá a otras personas cercanas para evitar que entren o toquen el material y, por lo tanto, aumente su propagación. Se procederá a lavar todas las áreas potencialmente contaminadas cubriendo el material derramado con toallas de papel empapadas en un agente virucida apropiado (hipoclorito de sodio al 1% o Virkon al 2%) dejándolas durante al menos 30 minutos. Finalizado este tiempo, estas toallas se tirarán a un recipiente de riesgo biológico, limpiando el área con toallas secas frescas que serán desechadas de la misma manera. Si se sabe o se sospecha que la ropa está contaminada, se retirará con cuidado, doblando el área contaminada hacia adentro y se desechará en una bolsa de residuos biológicos o se autoclavará directamente, dado que el OMG es sensible al calor. Si se mantiene 1 hora a 56°C o se autoclava 15 minutos a 121°C se inactiva.

Si hubiera sospecha de posible contaminación tras la desinfección, procederemos a la realización de una PCR de la superficie posiblemente contaminada.

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

Desinfección con Hipoclorito sódico al 1% o Virkon al 2%.

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

N.A.

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

En caso de un poco probable derrame del OMG, se procederá a la limpieza con Hipoclorito sódico al 1% o Virkon al 2%, logrando su completa desactivación. Si hubiera sospecha de posible contaminación tras la desinfección, procederemos a la realización de una PCR de la superficie posiblemente contaminada.

En el caso de contacto con la piel se realizarán lavados energéticos y posteriormente se

desinfectará con una solución con Yodo al 4%.

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

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

BIBLIOGRAFÍA (en abierto):

- Hartikainen J , Hassinen I , Hedman A, et al. Adenoviral intramyocardial VEGF $\Delta\Delta\Delta$ gene transfer increases myocardial perfusion reserve in refractory angina patients: a phase I/IIa study with 1-year follow-up. Eur Heart J 2017, 38: 2547-55.
<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx352>

- Chirmule N, Propert K, Magosin S, et al . Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. Gene Ther. 1999 Sep;6(9):1574-83. [doi: 10.1038/sj.gt.3300994.](https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300994)