

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/20/18
c) Fecha del acuse de recibo de la notificación: 16/12/2020
d) Título del proyecto: Ensayo clínico V938-001 titulado: <i>Estudio clínico de fase I/1b abierto de la administración intratumoral/intralesional de V938 en combinación con pembrolizumab (MK-3475) en participantes con neoplasias malignas avanzadas/metastásicas o recurrentes.</i>
e) Período propuesto para la liberación: Desde el 02-Abril-2021 hasta el 15-Abril-2024

2. Notificador

Nombre de la institución o empresa: Merck Sharp & Dohme Corp., a subsidiary of Merck & Co., Inc.

3. Definición del OMG

El nombre del organismo modificado genéticamente (OMG) es **V938**.

A continuación, se expone la nomenclatura a utilizar en este documento:

- El organismo donante: el organismo del cual derivan las secuencias que codifica el **OMG**.
- El organismo receptor: **Virus de la Enfermedad de Newcastle (VEN), cepa lentogénica no patógena LaSota L289A**

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

Hongo

Animal

- mamíferos

- insectos

- peces

- otro animal especifique el phylum y la clase

Otro, especifíquese (reino, phylum y clase)

b) Identidad del OMG (género y especie)

Orden: Mononegavirales

Familia: Paramyxoviridae

Género: Orthoavulavirus

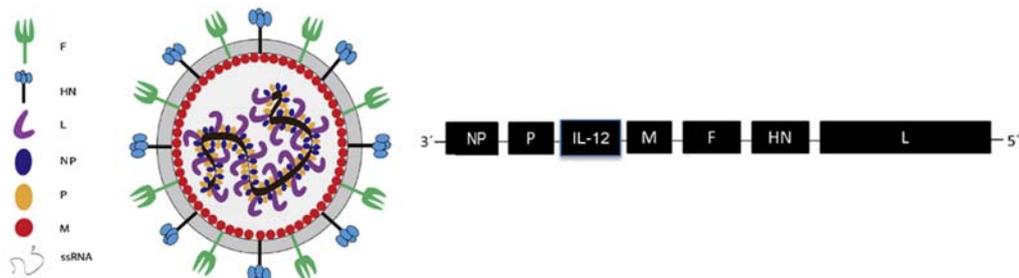
Especie: Orthoavulavirus aviar tipo 1

Cepa: Cepa lentogénica no patógena LaSota L289A

El OMG es el virus de la enfermedad de Newcastle (VEN) recombinante de la cepa lentogénica LaSota modificado para codificar la interleucina (IL)-12 humana y la mutación L289A en la proteína de fusión (F).

El OMG está orientado a fines terapéuticos para tratar tumores mediante un doble mecanismo de acción: actividad oncolítica (replicación y lisis selectiva de tumores) y actividad inmunoestimuladora (la inducción de la secreción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas de las células tumorales puede convertir al tumor inmunológicamente frío en un tumor caliente, al reclutar células NK, linfocitos y macrófagos).

El genoma del VEN está compuesto por una cadena de ARN monocatenario negativo (ARNmc-). El genoma ARN del OMG contiene marcos abiertos de lectura que codifican para 6 proteínas virales diferentes: nucleocápside (NP), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), proteína F con la mutación L289A, hemaglutinina-neuraminidasa (HN), polimerasa viral grande (L) y el transgén con la IL-12 humana compuesto por la subunidad p40 de la IL-12, un conector GGGGGGS y la subunidad p35 de la IL-12 humana, el transgén se inserta entre los genes P y M.



Esquema de la estructura de VEN

(Ganar K et al. 2014, Virus Research 184:71–81.)

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

La estabilidad genética del OMG se evalúa mediante secuenciación masiva (next generation sequencing, NGS) de tres pases de virus (virus passages, VP) en huevos embrionados durante su fabricación: desde la semilla de virus pre-maestra (VP1) a la semilla de virus maestra (VP2) al lote de producción del medicamento (VP3). Se secuenciaron 2 lotes de medicamento, así como la semilla de virus maestra (Master Virus Seed, MVS) empleada como semilla viral para la producción de los lotes de medicamento. Con el ARN viral extraído de las muestras, se prepararon las bibliotecas de *paired-end* (secuenciación realizada desde ambos extremos de las moléculas) utilizando el kit de TruSeq RNA de Illumina, cada librería se indexa de manera dual y única. Las librerías se secuencian con el kit MiSeq de Illumina y

posteriormente se realiza la detección del adaptador o recorte de bases con baja calidad, siguiendo el criterio estándar de $\geq 80\%$ de bases con una puntuación de calidad $\geq Q30$. La profundidad de cobertura obtenida fue >10.000 para la pre-MVS y >100.000 para el conjunto de los lotes de las MVS fabricadas bajo GMPs.

Las secuencias consenso del todo el genoma en todos los lotes evaluados fueron idénticas a la de la semilla del virus pre-maestra de referencia. Tal como cabe esperar de un virus ARN, mediante secuenciación masiva (NGS) se detectaron algunas variantes menores que fueron analizadas. No se observaron coincidencias con las variantes menores del NCBI GenBank. Además, ninguna de estas variantes tuvo lugar en la proteína F, la principal determinante de la virulencia del VEN (Dortmans JC et al., 2011).

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

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

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

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

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

Sí <input 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

El VEN es un paramixovirus aviar y, en función de la severidad de la enfermedad en aves, las cepas se clasifican en 3 patotipos: lentogénica, mesogénica y velogénica. Las cepas lentogénicas producen infecciones subclínicas con efectos respiratorios o entéricos leves, por lo que muestran una baja virulencia. Las cepas mesogénicas muestran una virulencia intermedia con una mortalidad moderada ($<10\%$), mientras que las cepas velogénicas son muy virulentas, con una mortalidad de hasta un 100% . No hay datos disponibles sobre el impacto ambiental de la liberación de V938, dado que el estudio propuesto es el primer estudio en humanos (FTIH, *first time in human*).

no se espera que la liberación voluntaria del OMG sea perjudicial para otros seres humanos, flora o fauna que se encuentre lejos o cerca del área de liberación.

La probabilidad de que V938 sea persistente e invasivo en hábitats naturales es baja por las siguientes razones:

- *Cepa no patógena*: La cepa lentogénica LaSota L289A no es patógena para su huésped natural (especies de aves) ni para humanos, esto limita la producción de progenie de virus infecciosos a los pacientes tratados. La virulencia en aves está relacionada con la activación de la proteína F. Es necesaria la escisión de esta proteína para la infección de células. Los virus lentogénicos tienen un aminoácido monobásico en el sitio de corte de la proteína F, y se corta extracelularmente por proteínas de tipo tripsina presentes en los tractos respiratorio e intestinal en las aves. La proteína F del OMG contiene un sitio de corte monobásico, por lo que su dispersión es limitada y no produce infecciones sistémicas en las aves debido a la incapacidad de las proteasas intracelulares para activar la proteína F. Aunque los virus se replicarán en las células tumorales del huésped, los nuevos viriones producidos no son infecciosos debido a que los humanos carecen de las proteasas necesarias para activar la proteína F de los viriones.
- *El OMG no es virulento*: la virulencia de las cepas del VEN se mide mediante el índice de patogenicidad intracerebral (intracerebral pathogenicity index, ICPI) en pollos de 1 día de vida (Alexander 2000). En el test ICPI, el virus diluido se inyecta por vía intracerebral en cada uno de los 10 pollos de un día de vida nacidos de una parvada libre de patógenos específicos (SPF, *specific-pathogen free*) y estos animales se examinan cada 2-4 horas durante 8 días. En cada observación, las aves reciben una puntuación según su estado: 0 si es normal, 1 si está enferma y 2 si está muerta. El ICPI es la puntuación media por ave y por observación durante los 8 días. Dependiendo del país, las cepas lentogénicas muestran un ICPI < 0,4 o 0,7. El OMG tiene un ICPI = 0,00 (USDA Report No. 17-040061), lo que confirma que es una cepa lentogénica. El OMG deriva de la cepa LaSota, aislada de una granja de gallinas en Nueva Jersey. Desde 1950, la cepa LaSota se usa globalmente como vacuna, incluyendo su administración masiva mediante aerosoles a aves de corral para protegerlas de cepas virulentas del VEN.
- *Alta estabilidad genética*: El OMG V938 es un VEN recombinante que tras su administración en el organismo diana se localiza en el citoplasma de la célula huésped. El VEN es un virus ARN que se replica en el citoplasma. Carece de cualquier forma intermediaria de ADN, por tanto, no hay posibilidad de integración del virus en el genoma del huésped. Este hecho elimina cualquier riesgo de mutagénesis insercional.
- *Replicación selectiva*: El OMG es un VEN recombinante que se replica selectivamente en células tumorales. **El VEN se une a los receptores que contienen ácido siálico, presentes en las células normales y tumorales. La replicación de VEN es sensible a la inhibición de la replicación mediada por interferón (IFN). La permisividad del VEN (tanto el LaSota parental como el vector clínico) para replicarse en las células tumorales se debe a los defectos o hiporreactividad en las vías de señalización antiviral y de señalización del interferón tipo 1 (IFN-1) y resistencia a la apoptosis en las células tumorales (revisada en Fournier P y Schirmacher V, 2013), por lo**

tanto, es menos probable que el VEN se replique de manera permisiva en las células o tejidos no tumorales del huésped.

- *Proceso de fabricación controlado:* Para minimizar la liberación del virus recombinante en el medio ambiente, cada OMG se produce en condiciones de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP, *Good Manufacturing Practice*) con el manejo del material vivo en las instalaciones de laboratorio apropiadas. De esta manera se asegura que cualquier liberación de OMG es contenida e inactivada, utilizando equipos de un solo uso tanto como sea posible para evitar la liberación del material genético modificado al medio ambiente. Además, la administración del OMG se llevará a cabo en una estancia con acceso restringido donde cualquier desecho o material utilizado para la administración del OMG se esterilizará por autoclave o se incinerará.
- *Gestión del ensayo clínico:* la liberación del OMG tendrá lugar durante el transcurso del ensayo clínico donde la administración del OMG ocurrirá en una instalación hospitalaria. El personal del estudio será entrenado en la preparación, administración y limpieza de residuos del OMG para minimizar la diseminación y transmisión accidental. Los materiales usados durante la administración del OMG serán tratados como desechos biopeligrosos y eliminados según los procedimientos de los centros participantes en el estudio.
- *Ruta de administración en el estudio clínico:* ya que la liberación está planeada en el contexto de un ensayo clínico y el OMG será administrado intratumoralmente/intralesionalmente a los pacientes, es altamente improbable que el OMG entre en contacto con el medioambiente.
- *Falta de toxicidad:* Se han llevado a cabo varios estudios de toxicidad en ratones en condiciones GLP (Good Laboratory Practices). Los estudios se llevaron a cabo con NDV-muIL-12, un análogo de V938 que produce la misma respuesta farmacodinámica *in vivo* en *in vitro*, cuyo transgén codifica para la proteína IL-12 murina, reconocida por los receptores de IL-12 de los ratones. En los estudios toxicológicos en ratones CD-1, mediante administración de NDV-muIL-12 vía subcutánea 1 vez por semana durante 3 semanas o por vía intravenosa 1 ó 2 veces por semana durante 4 semanas, se demostró que NDV-muIL-12 es bien tolerado y no produce efectos toxicológicos, el único hallazgo fue una mínima inflamación crónica en el sitio de la inyección. Otros dos estudios toxicológicos llevados a cabo en ratones C57BI/6 con tumores a los que NDV-muIL-12 se les administró por vía intratumoral, se demostró que era bien tolerado, y únicamente se detectó una infiltración linfocitaria mínima en el sitio de la inyección e hiperplasia mínima en el drenaje de los ganglios linfáticos. El OMG no produce toxinas y no tiene toxicidad conocida como resultados de los productos de degradación ni es un patógeno obligado u oportunista.

En el presente estudio, ninguna planta o animal es sensible de ser expuesta al OMG, y es muy poco probable que se infecten plantas o animales. En conclusión, el potencial para un impacto perjudicial al medioambiente debido a la liberación del OMG es insignificante.

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 checked="" 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 type="checkbox"/>
(especifique el phylum y la clase)	
Otros, (especifíquense):	

2. Nombre

i) Orden y taxón superior (animales): Mononegavirales
ii) Género: Orthoavulavirus
iii) Especie: Orthoavulavirus aviar tipo 1
iv) Subespecie: NA
v) Cepa: Cepa lentogénica no patógena LaSota L289A
vi) Patovar (biotipo, ecotipo, raza, etc.): Clase II, genotipo II
vii) Nombre vulgar: virus de la enfermedad de Newcastle (VEN)

3. Distribución geográfica del organismo

[Las cepas lentogénicas de VEN tienen distribución mundial.](#)

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

Otros, (especifíquense): Aves

El huésped natural del VEN son las especies aviares. La cepa LaSota es poco virulenta de forma natural y se usa globalmente como vacuna desde 1950, incluyendo su administración masiva mediante aerosoles. Esta cepa se aisló de bandadas no vacunadas de regiones en las que LaSota era usada de forma predominante para vacunar a las aves de corral (Ayala AJ et al., 2016).

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

No aplica.

5. a) Técnicas de detección

El organismo receptor puede ser detectado mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR, *quantitative polymerase chain reaction*) de ARN viral.

5. b) Técnicas de identificación

La Q-PCR de ARN viral mencionada en B.5 (a) también permite la identificación del organismo receptor. E

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 términos de clasificación de riesgo, el virus de la enfermedad de Newcastle es considerado como un agente biológico del grupo 2, según la clasificación de la Comunidad Económica Europea para la protección de los trabajadores frente a los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos (Directiva 2000/54/CE). La designación del grupo de riesgo 2 aplica a agentes que pueden causar enfermedades humanas y pueden constituir un riesgo para los trabajadores, aunque es poco probable que se propague a la comunidad y para los cuales la profilaxis y los tratamientos disponibles son normalmente efectivos.

No obstante, el organismo receptor (cepa LaSota L289A), no está específicamente clasificado por la directiva de la Comunidad Económica Europea, que detalla que las cepas clasificadas como no patógenas para los trabajadores, quedan excluidas de esta clasificación. Debido a que la cepa LaSota no es patógena para su huésped natural (especies de aves) ni para el humano, el OMG no supondría un riesgo para la salud humana.

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

LaSota es una cepa lentogénica del VEN que puede producir síntomas respiratorios leves en las especies aviares.

En humanos, el VEN puede producir conjuntivitis autolimitada y síntomas no específicos similares a los de una gripe (Nelson et al., 1952; Evans AS, 1955). Estos casos se dan entre personas que trabajaban con aves de corral donde se producen brotes de la enfermedad de Newcastle, o bien en aquellos trabajadores expuestos a VEN lentogénicos en las industrias de fabricación de vacunas.

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.

8. Información sobre reproducción

a) Tiempo de generación en ecosistemas naturales: N/A

b) Tiempo de generación en el ecosistema en el que vaya a ser liberado: N/A

c) Modo de reproducción Sexual Asexual
N/A

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 N/A

i) Endosporas

ii) Quistes

iii) Esclerocios

iv) esporas asexuales(hongos)

v) esporas sexuales (hongos)

vi) huevos

- vii) pupas
- viii) larvas
- ix) otras (especifíquense)

b) Factores pertinentes que afectan a la capacidad de supervivencia

La cepa LaSota se usa globalmente como una vacuna en aves de corral, es por ello que la supervivencia de LaSota presente en los excrementos de dichas aves se ha evaluado en distintas instalaciones. Frölich et al. publicaron que “el tiempo de supervivencia del virus VEN (LaSota) en los excrementos de aves fue en verano (invierno) de 22 y 18 días (26 y 36 días) en 2 jaulas, de 14 y 18 días (36 y 33 días) en 2 corrales, y de 8 días (54 y 68 días) en 2 sistemas de almacenamiento por caída. A la semana de permanencia en las jaulas en batería tras el almacenamiento en los sistemas de almacenamiento por caída, después de 47 o 50 días, el VEN (LaSota) no pudo aislarse. Con respecto a los factores ambientales, el pH y el contenido en materia seca influyeron significativamente en el efecto térmico atribuible al proceso de inactivación” (Frölich et al., 1992). Afirmaron que las temperaturas más frías del invierno aumentaban el tiempo de supervivencia del VEN (LaSota) en hasta 18 días. En verano, las heces frías y secas bajaban el pH y el virus sobrevivía 3 semanas.

Al evaluar la estabilidad del VEN LaSolta, Rani et al. (Rani et al., 2014) comprobaron que dicha cepa no es infectiva por encima de los 42°C y que es inestable por encima de los 72°C. Sin embargo, el efecto del pH es mínimo, siendo estable incluso a un pH 2.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) proporciona una guía de desinfectantes para inactivar el VEN para todos sus patotipos (OIE, 2013).

Temperatura:	Inactivado a 56°C/3 horas o 60°C/30 minutos.
pH:	Inactivado a pH ácido ≤ 2 .
Químicos/Desinfectantes:	Sensible al éter; inactivado por formalina, fenoles y agentes oxidantes (e.g. Virkon®); clorhexidina, hipoclorito de sodio (6%).
Supervivencia:	Sobrevive durante largos períodos a temperatura ambiente, especialmente en heces.

Estos factores aplican, por tanto, al organismo receptor y al OMG.

10. a) Vías de diseminación

El virus de la enfermedad de Newcastle puede diseminarse por aerosoles y se ha demostrado que se transmite de manera efectiva por contacto directo con las secreciones de las aves infectadas y por el equipamiento agrícola contaminado.

La transmisión entre humanos no ha sido demostrada. Además, la cepa LaSota tiene una proteína F lentogénica que sólo puede activarse por escisión extracelular realizada por proteasas como la

tripsina presentes en el tracto respiratorio e intestinal en aves de corral. Por tanto, la diseminación o propagación de la cepa LaSota es limitada y no desencadena en infección sistémica en las especies aviares debido a la imposibilidad de las proteasas intracelulares de activar la proteína F.

10. b) Factores que afectan a la diseminación

La proteína F es el factor clave en la diseminación o propagación del virus. Como la proteína F del OMG es lentogénica, su propagación es limitada. El OMG se produce en el líquido alantoideo de huevos SPF y las proteasas de tipo tripsina presentes en el líquido pueden activar la proteína F lentogénica. Sin embargo, la replicación del OMG en las células infectadas por el mismo produce una progenie de OMG con la proteína F lentogénica, que no se activa por las proteasas intracelulares. En caso de un derrame del OMG, su diseminación es limitada.

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

No hay modificaciones previas.

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 checked="" type="checkbox"/> |
| iv) Fusión celular | <input type="checkbox"/> |
| v) Otro (especifíquese) | |

2. Resultado que se pretende obtener mediante la modificación genética

El OMG es una cepa recombinante de VEN, modificada genéticamente para expresar la proteína IL-12 humana y la mutación L289A en la proteína F. La mutación L289A, localizada en la proteína F, se introdujo para aumentar la fusión entre las células tumorales para mejorar la capacidad citolítica del virus en estas células mediante la formación de grandes células multinucleadas llamadas sincitios (Altomonte J, 2010). La cepa LaSota L289A recombinante fue modificada para codificar un transgén entre los genes P y M compuesto por la subunidad p40 de la IL-12, un conector GGGGGS y la subunidad IL-12p35. Cuando se administra el OMG mediante inyección intratumoral, las células infectadas expresan y secretan la IL-12 al microambiente tumoral. La IL-12 humana es una citocina proinflamatoria que produce la activación potencial de las células inmunitarias residentes en la región tumoral y reclutará células inmunitarias adicionales en el área de la lesión tumoral.

Como el VEN es un virus ARN, para la generación del GMO se utilizó la reversión genética (Kim S-H and Samal SK, 2018) desde estos 5 plásmidos:

1. Un plásmido de ADNc con los marcos de lectura abiertos (ORF, *open reading frame*) correspondientes a los 6 genes virales (NP, P, M, F con la mutación L289A, HN y L) y con el transgén de la IL-12 insertada entre los genes P y M.
2. Plásmido que expresa la NP viral bajo el control del promotor T7.
3. Plásmido que expresa la P viral bajo el control del promotor T7.
4. Plásmido que expresa la L viral bajo el control del promotor T7.
5. Plásmido codificante de la polimerasa de ARN T7 con codón optimizado.

Se transfectaron células de riñón de crías de hámster (BHK) que expresan la polimerasa T7 BSR-T7 con los 5 plásmidos de ADNc. Se recogió el sobrenadante del cultivo celular y se inyectó en las cavidades alantoideas de huevos de gallina embrionados, y se recogió el virus de la progenie tras 2 días de incubación.

El líquido alantoideo que se recoge se utilizó para generar la semilla del virus pre-maestra del OMG.

El líquido recogido se pasó 4 veces en células Vero de epitelio de riñón de mono, seguido de 2 pases en huevos embrionados para la amplificación viral.

El líquido alantoideo del segundo pase en huevos se recogió y se clarificó mediante centrifugación a baja velocidad. Posteriormente se distribuyó en alícuotas que se designaron como semilla pre-maestra del virus. A partir de este paso, solamente se utilizaron huevos SPF (sin líneas celulares) para propagar el OMG.

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 type="checkbox"/>	No <input checked="" 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 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:
c) Gama de organismos huéspedes del vector:
d) Presencia en el vector de secuencias que den un fenotipo seleccionable o identificable <p>Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/></p> <p>Resistencia a los antibióticos <input type="checkbox"/></p> <p>Otras, (especifíquense)</p> <p>Indique qué gen de resistencia a los antibióticos se inserta:</p>
e) Fragmentos constituyentes del vector
f) Método de introducción del vector en el organismo receptor <p>i) Transformación <input type="checkbox"/></p> <p>ii) Electroporación <input type="checkbox"/></p> <p>iii) Macroinyección <input type="checkbox"/></p> <p>iv) Microinyección <input type="checkbox"/></p> <p>v) Infección <input type="checkbox"/></p> <p>vi) otros, (especifíquense)</p>

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

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

6. Información sobre el fragmento de inserción:

<p>a) Composición del fragmento de inserción:</p> <p>El transgén huIL-12 está constituido por la subunidad p40 de la IL-12, el conector GGGGGGS y la subunidad p35 de la IL-12.</p>
<p>b) Fuente de cada parte constitutiva del fragmento de inserción:</p> <p>La construcción 4H11-28z que contiene la proteína de fusión de la IL-12 humana (la subunidad p40 de la IL-12 unida a la subunidad p35 de la IL-12 mediante el conector polipéptido GGGGGGS) se describe en Koneru et al. El transgén de la IL-12 contenido en el vector 4H11-28z se sintetizó basándose en las secuencias públicas disponibles de la IL12B humana (NM_002187.3) y la IL12A (NM_000882.4).</p>
<p>c) Función prevista de cada parte constitutiva del fragmento de inserción en el OMG</p> <p>La IL-12 es una citocina pro-inflamatoria que activa las células NK, los linfocitos T CD8+ citotóxicos, linfocitos T productores de citocinas de tipo 1 y células B (Trinchieri G et al, 2003).</p> <p>La mutación L289A, localizada en la proteína F, se introdujo para aumentar la fusión entre las células tumorales para mejorar la capacidad citolítica del virus en estas células mediante la formación de grandes células multinucleadas llamadas sincitios.</p>
<p>d) Localización del fragmento de inserción en el organismo receptor:</p> <p>- en un plásmido libre <input type="checkbox"/></p> <p>- integrado en el cromosoma <input type="checkbox"/></p> <p>- Otros especifíquense): El transgén con la IL-12 humana se inserta entre los genes P y M del RNA genómico del VEN.</p>
<p>e) ¿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"/> humano: secuencias conocidas de IL-12p40 o de IL-12B (NM_002187.3) y de IL-12p35 o IL-12A (NM_000882.4).
- 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): <i>Primates</i>
ii) Familia (plantas): <i>Hominidae</i>
iii) Género: <i>Homo</i>
iv) Especie: <i>sapiens</i>
v) Subespecie: <i>N/A</i>
vi) Cepa: <i>N/A</i>
vii) Cultivar/línea de reproducción: <i>N/A</i>
viii) Patovar: <i>N/A</i>
ix) Nombre vulgar: <i>humano</i>

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

Especifíquese:

El OMG contiene el ARN genómico que codifica los 6 genes virales (NP, P, M, F, HN y L) del VEN LaSota parental. El OMG tiene la proteína F lentogénica. La inserción del gen IL-12 no cambia la genética viral y no debería afectar a la tasa de replicación. Sin embargo, se ha observado que la mayoría de los virus rescatados son menos virulentos que el virus parental de tipo salvaje del que derivan (Dortmans JC et al., 2011). Esta observación se atribuyó a cuellos de botella genómicos durante el proceso de clonación que tienen como resultado la pérdida de variabilidad genómica y viral.

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

Sí

No

No se sabe

Especifíquese:

El VEN se une al receptor que contiene ácido siálico a través de la proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN). El OMG, como el VEN parental, contiene la proteína F lentogénica. Por lo tanto, el OMG no difiere en cuanto a la diseminación en comparación con las cepas parentales LaSota del VEN.

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

Sí

No

No se sabe

Especifíquese:

Las cepas de la vacuna LaSota tienen un ICPI que varía entre 0.02 y 0.37 (Orsi MA et al., 2009). Con un ICPI=0.00, el vector clínico no tiene una patogenicidad aumentada en comparación con las cepas parentales LaSota.

2. Estabilidad genética del organismo modificado genéticamente

La estabilidad genética del OMG se evalúa mediante secuenciación masiva (next generation sequencing, NGS) de tres pases de virus (virus passages, VP) en huevos embrionados durante su fabricación: desde la semilla pre-maestra del virus (VP1) a la semilla de virus maestra (VP2) al lote de producción del medicamento (VP3). Se secuenciaron 2 lotes de medicamento, así como la semilla de virus maestra (Master Virus Seed, MVS) empleada como semilla viral para la producción de los lotes de medicamento. Con el ARN viral extraído de las muestras, se prepararon las bibliotecas de *paired-end* (secuenciación realizada desde ambos extremos de las moléculas) utilizando el kit de TruSeq RNA de Illumina, cada librería se indexa de manera dual y única. Las librerías se secuencian con el kit MiSeq de Illumina y posteriormente se realiza la detección del adaptador o recorte de bases con baja calidad, siguiendo el criterio estándar de $\geq 80\%$ de bases con una puntuación de calidad $\geq Q30$. La profundidad de cobertura obtenida fue >10.000 para la pre-MVS y >100.000 para el conjunto de los lotes de las MVS fabricadas bajo GMPs.

Las secuencias consenso de todo el genoma en todos los lotes evaluados fueron idénticas a la de la semilla del virus pre-maestra de referencia. Tal como cabe esperar

para un virus ARN, mediante secuenciación masiva (NGS), se detectaron algunas variantes menores que no fueron analizadas. No se observaron coincidencias con las variantes menores del NCBI GenBank. Además, ninguna de estas variantes tuvo lugar en la proteína F, la principal determinante de la virulencia del VEN (Dortmans JC et al., 2011).

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

Sí <input type="checkbox"/>	No <input checked="" type="checkbox"/>	No se sabe <input type="checkbox"/>
El OMG deriva de una cepa lentogénica no patógena para su huésped natural (especies de aves) ni patógena para el humano.		
En caso afirmativo:		
a) ¿Para cuál de los organismos Humanos siguientes?		<input type="checkbox"/>
	Animales	<input type="checkbox"/>
	Plantas	<input type="checkbox"/>
	Otros	<input type="checkbox"/>

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

Para información relevante especificada en Anexo III A, punto II(A)(11)(d), referirse a la sección B.7(b).

No se espera que el OMG tenga ningún efecto tóxico ni alogénico.

La toxicología y la biodistribución de V938 o NDV-muIL-12 (el análogo murino) se evaluaron en varios estudios no clínicos en ratones CD-1 y C57BL/6 con tumores. No se vieron efectos toxicológicos clínicamente significativos debido al OMG o su análogo en ninguno de los estudios. Se observaron algunos efectos transitorios en el lugar de la inyección como inflamación crónica mínima o infiltración linfocitaria mínima.

Los estudios de biodistribución fueron llevados a cabo con V938 y NDV-muIL-12, y mostraron que tanto el ARN viral como el ARNm del transgén se distribuyen en sangre, cerebro, pulmón, corazón, riñón, bazo, hígado y gónadas, así como en el sitio de la inyección, con una exposición máxima de 2 horas a 4 días tras la administración. A partir del día 84 tras la inyección, solamente se detectan restos de ARN viral y ARNm del transgén en pulmón, bazo y riñón, que se van eliminado de manera lineal con una vida media de 10 días el ARN viral de VEN y 8 días el ARNm. Los resultados de infectividad mostraron que ninguno de los ARN víricos detectados en los momentos posteriores eran infecciosos. No hubo hallazgos histológico adverso en ningún tejido hasta un nivel de dosis de 3×10^8 UFP (unidades formadoras de placa).

La cepa de VEN utilizada para la fabricación del OMG es una cepa no patógena para su huésped natural (especies de aves) y no patógena para humanos, por tanto, exhibe una seguridad alta al limitar la producción de progenie de virus infecciosos a los pacientes tratados. Aunque los virus se replicarán en las células tumorales del huésped, los nuevos viriones producidos no son infecciosos debido a que los humanos carecen de las proteasas necesarias para activar la proteína F de los viriones.

El estudio propuesto es un estudio de primera vez en humanos, por tanto, la seguridad y eficacia del OMG se desconoce. Sin embargo, debido a su incapacidad para producir enfermedades y los resultados que demuestran su seguridad y tolerabilidad, el OMG no supone un riesgo para la salud humana.

4. Descripción de los métodos de identificación y detección

a) Técnicas utilizadas para detectar el OMG:

Dado que el riesgo del OMG para el medio ambiente se considera mínimo, no se han planificado métodos para detectar e identificar el OMG en el medio ambiente en el contexto de ensayo clínico propuesto.

Para la evaluación de la diseminación viral en los pacientes, se utilizará una estrategia de ensayo escalonada para poder cuantificar dicha diseminación del OMG

en la cavidad oral, en la garganta, en la orina, en el lugar de inyección, en muestras de hisopos anales, y si estuviese presente, para determinar si es contagioso.

Para detectar y cuantificar el ARN viral, se llevará a cabo un ensayo PCT que amplifique específicamente la región L conservada del genoma de VEN. Para cuantificar las partículas del virus infecciosas, se utilizará un ensayo de infectividad basado en células.

b) Técnicas utilizadas para identificar el OMG:

En el presente ensayo clínico, la sangre que se recolecta antes de la administración de la dosis de V938 y en varios momentos posteriores a la administración de dicha dosis, se evaluará para la identificación del OMG mediante transcripción inversa (RT-PCR).

Para la evaluación de la diseminación viral en los pacientes, se utilizará una estrategia de ensayo escalonada para cuantificar la diseminación del OMG en la cavidad oral/garganta, en la orina, en el lugar de inyección y en las muestras de hisopos anales. Si está presente se determinará si es contagioso.

Para detectar y cuantificar el ARN viral del VEN, se utilizará un ensayo de PCR que amplifique específicamente la región L conservada del genoma de VEN.

Para cuantificar las partículas infecciosas del virus VEN, se llevará cabo un estudio de infectividad basado en células.

F. Información sobre la liberación

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

El propósito de la liberación es llevar a cabo un ensayo clínico multicéntrico para determinar la seguridad y tolerabilidad de la administración del OMG V938 en combinación con Pembrolizumab (MK-3475) en pacientes con neoplasias malignas avanzadas/metastásicas o recurrentes.

El presente ensayo clínico es la primera administración en humanos de este OMG. El OMG está siendo actualmente estudiado en un estudio de Fase 1/1b V938-001 en Israel, Canadá y EEUU. Otros 4 países de la Unión Europea, además de España, tienen previsto unirse a este estudio, incluidos Dinamarca, Francia, Alemania y Reino Unido. El OMG se ha desarrollado como terapia contra el cáncer para tratar cánceres humanos, y no tiene ningún otro uso previsto.

El OMG se liberará en el contexto de un ensayo clínico, en hospitales identificados bajo la responsabilidad de Investigadores Principales, como parte de un ensayo clínico multicéntrico internacional. La liberación actual implica la administración el OMG por vía intratumoral/intrelesional. La administración el OMG tendrá lugar en instalaciones hospitalarias específicas, y será llevada a cabo por personal especializado y entrenado. Además, tampoco se contempla una liberación accidental por parte de los pacientes. No se conoce transmisión del VEN entre humanos, por lo que el riesgo para los individuos no tratados es bajo. Además, como el OMG deriva de la cepa lentogénica LaSota, que se utiliza de forma generalizada como

vacuna en las aves de corral y tiene un ICPI=0,00, el riesgo para las especies aviares se considera bajo.

No se esperan beneficios ambientales significativos tras la liberación del OMG durante el ensayo.

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 checked="" type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>
<p>En caso afirmativo, especifíquese: El VEN no se encuentra de forma natural en el entorno de las ubicaciones geográficas que rodean los centros del estudio clínico donde se realizará la administración del OMG.</p> <p>El OMG se administrará a pacientes con cáncer en el contexto de un ensayo clínico. El OMG se suministra con su etiqueta visible y se almacenará en un área de acceso restringido en un congelador a -70°C con control de la temperatura.</p>	

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

a) Localización geográfica (región administrativa y coordenadas de referencia cuando proceda): El OMG se administrará durante el ensayo clínico propuesto en los siguientes centros:

Centros del Estudio Clínico	Lugar de Preparación	Lugar de Administración
Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz Avenida de los Reyes Católicos, 2 28040-Madrid	Farmacia de la Unidad de Ensayos Clínicos Fase I de Oncología Edificio Principal. Primera planta	Hospital de Día de la Unidad de Ensayos Clínicos Fase I de Oncología Edificio principal. Primera planta
Hospital Universitario Vall de Hebrón Passeig de la Vall d'Hebron, 119 08035-Barcelona	Instituto de Oncología-VHIO Servicio de Farmacia Edificio General. Planta baja	Instituto de Oncología-VHIO Servicio de Radiología Intervencionista Edificio general. Planta baja

b) Área del lugar (m²):

i) lugar real de la liberación (m²): No aplica

ii) área de liberación más amplia (m²): No aplica

La administración se va a llevar a cabo en una estancia hospitalaria, con acceso restringido.

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

No aplica debido a que la liberación ocurrirá durante un ensayo clínico en instalaciones hospitalarias/clínicas específicas.

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

No aplica debido a que la liberación ocurrirá durante un ensayo clínico en instalaciones hospitalarias/clínicas específicas. La liberación al medio ambiente sólo sería posible por liberación accidental por los pacientes. Además, los pacientes con cáncer que

trabajen en una granja o en otras profesiones con exposición a aves están excluidos de participar en este ensayo. Por tanto, la interacción potencial de la flora y fauna con el OMG será muy limitada.

4. Método y amplitud de la liberación

a. Cantidad de OMG que vaya a liberarse:

El OMG se administra por inyección intratumoral en las lesiones tumorales cutáneas, subcutáneas y/o nodales de los pacientes reclutados. El OMG se suministra en un único vial de vidrio de 2 mL con un título entre $2.0E+08$ ufp/mL y $2.0E+09$ ufp/mL. La dosis apropiada para cada participante se preparará según el nivel de dosis asignado.

El ensayo clínico en el que se va a liberar el OMG es un ensayo con una etapa inicial de escalado de dosis, por tanto, se conoce la dosis clínica inicial segura con la que se va a tratar a los pacientes de la cohorte 1 del escalado de dosis, pero no se conoce de antemano la dosis máxima que finalmente se aplicará ni la dosis que se aplicará en la segunda etapa del estudio (fase 1b). La dosis clínica inicial segura que se va a administrar a los pacientes es 1×10^7 UFP por paciente (1×10^7 UFP por dosis).

La dosis máxima administrada será de 5×10^8 UFP por paciente (5×10^8 UFP por dosis), en caso de que se llegue a administrar la dosis máxima estimada para la cohorte 4 de escalado de dosis.

Cada paciente recibirá un máximo de 10 dosis del OMG en un periodo de 21 semanas (es decir, 7 ciclos de tratamiento)

b. Duración de la operación:

La administración del OMG por lesión durará aproximadamente 30 minutos.

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

El OMG está clasificado como grupo de riesgo 2, por lo tanto, debe manejarse según los procedimientos del centro para el manejo de los agentes del grupo de riesgo 2. Para minimizar el riesgo de liberación involuntaria, el OMG se contendrá y etiquetará adecuadamente durante el transporte. La persona que maneja el OMG y las muestras que potencialmente podrían contener el OMG, seguirá los procedimientos operativos institucionales estandarizados sobre el manejo de agentes de riesgo tipo 2.

La liberación del OMG se realizará dentro del contexto de un ensayo clínico, según lo dispuesto en el protocolo clínico. El producto se deberá preparar en cumplimiento con las condiciones que aplican a la preparación de medicamentos inyectables. La cantidad de OMG que se administrará a los sujetos por centro en cada inyección individual estará sujeta a las necesidades de la administración por paciente y el acceso al producto, que está restringido sólo a personal autorizado. La ruta de administración seleccionada (intratumoral/intralesional) minimizará la diseminación potencial del OMG desde el paciente.

El OMG será entregado a los centros en viales sellados, correctamente etiquetados y envasados. Se suministrará congelado en hielo seco y será

almacenado en un área de acceso restringido en un congelador de -70°C con control de la temperatura. El nivel de contención del OMG será BSL-2. La contención BSL-2 es adecuada para trabajos en los que intervengan agentes de riesgo potencial moderado para el personal y el medio ambiente.

La preparación y administración del producto se realizará por personal debidamente entrenado, bajo la responsabilidad del investigador principal y según el protocolo del estudio y Buenas Prácticas Clínica (GCP). Antes de su administración y siguiendo los procedimientos locales de BSL-2, el vial que contiene el OMG se sacará de la caja de almacenamiento y se colocará en un espacio de trabajo despejado para descongelarse a temperatura ambiente. El tiempo mínimo de descongelación se determina por la desaparición visible de hielo (aproximadamente 10-15 minutos). Se mezclará el contenido mediante 3 inversiones suaves del vial. Tras la dilución con salino, la solución debería utilizarse inmediatamente. Si no fuera el caso, dicha dilución puede mantenerse a temperatura ambiente hasta 4 horas y/o refrigerada ($2-8^{\circ}\text{C}$) hasta un máximo de 8 horas. Los viales que se hayan almacenado refrigerados tendrán que atemperarse a temperatura ambiente antes de ser administrados. Cada paciente asignado a su cohorte recibirá la dosis de OMG prescrita diluida en un volumen de inyectable basado en el número de lesiones en las que se inyectará.

El área para preparar el OMG y administrarlo al sujeto se descontaminará antes y después de la manipulación del OMG con lejía al 10% recién hecha. Todos los movimientos o transportes de OMG después de su preparación se deberán realizar usando un recipiente cerrado. Además, el personal del estudio clínico seguirá los procedimientos establecidos en el centro hospitalario para el manejo del OMG.

En caso de derrame accidental, la superficie contaminada será tratada con desinfectantes apropiados (lejía al 10% recién hecha, vesfeno o LpH). El procedimiento estándar para cualquier derrame en una superficie amplia y abierta es abandonar la estancia durante 30 minutos y posteriormente regresar para desinfectarla. El personal usará guantes, gafas de seguridad, mascarilla quirúrgica o respirador (según la normativa nacional), traje de protección y cubrezapatos. Los materiales contaminados serán retirados de la habitación y permanecerán en envases sellados o en bolsas especiales que estén claramente etiquetadas como desechos médicos de riesgo biológico.

En caso de derrame accidental, el personal seguirá los procedimientos del hospital para la limpieza del derrame. La lejía, el vesfeno y el pH bajo son capaces de destruir el virus. Una solución de lejía al 10% recién hecha inactivará el virus pero puede dañar el acero inoxidable.

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

No aplica. Todas las administraciones del OMG se realizan en instalaciones hospitalarias convencionales en las instituciones clínicas citadas.

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

Este será el primer ensayo clínico en humanos con el OMG V938, por tanto, no hay datos disponibles aún en cuanto a la liberación del OMG propuesto.

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: sapiens
v) Subespecies: N/A
vi) Cepa: N/A
vii) Cultivar/Línea de reproducción: N/A
viii) Patovar: N/A
ix) Nombre vulgar: Humano

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

El OMG se administrará vía intratumoral/intralesional a pacientes con neoplasias malignas avanzadas/metastásicas o recurrentes. El OMG V938 está desarrollado como una terapia contra el cáncer para tratar cánceres humanos y no tiene ningún otro uso previsto.

V938 es una nueva terapia viral oncolítica que emplea el VEN recombinante diseñado para codificar la IL-12 humana (huIL-12). El genoma del OMG es ARN monocatenario de sentido negativo no segmentado (ARN mc-), y contiene 6 marcos abiertos de lectura (ORF) que codifican: proteína de la nucleocápside (NP), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), proteína F con la mutación L289A, hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y polimerasa (L). El transgén huIL-12 se inserta entre los genes P y M, y está compuesto por la subunidad IL-12p40, un conector GGGGGGS y la subunidad IL-12p35.

El OMG está orientado a fines terapéuticos para tratar tumores mediante un doble mecanismo de acción: actividad oncolítica (replicación y lisis selectiva de tumores) y actividad inmunoestimuladora (inducción de la secreción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas de células tumorales que potencialmente pueden convertir un tumor frío en un tumor caliente mediante el reclutamiento de células NK, linfocitos y macrófagos en el tumor).

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

La posibilidad de transferencia génica a otras especies es mínima bajo las condiciones de liberación propuesta del OMG. El OMG se administrará a los sujetos

en instalaciones hospitalarias y es improbable que esté en contacto con otras especies animales. Además, las características fenotípicas del OMG limitan cualquier posibilidad de transferencia genética.

El OMG se administra mediante una inyección en las lesiones tumorales de los pacientes con cáncer en el contexto de un ensayo clínico. La propagación al medio sólo sería posible por accidente por los pacientes. Además, los pacientes con cáncer que trabajen en una granja o en otras profesiones con exposición a aves están excluidos de este ensayo. La interacción del OMG con otros organismos del medio es poco probable.

Por otro lado, el OMG replica su material genético en el citoplasma de la célula huésped. Carece de cualquier forma intermediaria de ADN, por tanto, no hay posibilidad de integración del virus en el genoma del huésped.

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
<p>Especifíquese: El OMG proviene de una cepa lentogénica no patógena que no es endémica en la población humana. No hay base para esperar que la adición del transgén huIL-12 al OMG promueva un incremento en su capacidad invasiva después de la liberación del OMG.</p> <p>Los métodos de genética inversa han permitido el rescate del VEN recombinante infecciosos a partir de plásmidos de ADNc. Se ha determinado que la inserción de un transgén entre los genes P y M es óptima, tanto para la expresión del transgén insertado como para el rescate exitosos del VEN recombinante.</p> <p>Sin embargo, la inserción del transgén puede disminuir la virulencia del VEN LaSota recombinante en comparación el VEN LaSota de origen natural. Se ha comprobado que los virus rescatados son menos virulentos que los virus originales de tipo silvestre de los que derivan (Dortmans JC et al., 2011). Esta observación se atribuye a la generación de un cuello de botella genómico durante el proceso de clonación que resulta en una pérdida de variabilidad genética y de la aptitud de la población viral. Las vacunas elaboradas a partir de la cepa LaSota tienen un ICPI que varía entre 0,02 y 0,37 (Orsi MA et al. 2009). Con un ICPI=0,00, el OMG no tiene una ventaja competitiva respecto a las cepas LaSota.</p>		

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

<p>Debido al contexto propuesto en el estudio para la liberación del OMG, en el cual el OMG es administrado a los sujetos en instalaciones hospitalarias específicas, es muy improbable que el OMG entre en contacto con cualquier organismo no diana en el ecosistema.</p> <p>La cepa LaSota de VEN utilizada para la fabricación del OMG es una cepa lentogénica no patógena para su huésped natural (especies de aves), ni para humanos, por lo tanto, el OMG es seguro ya que la producción de la progenie de virus infecciosos está limitada a los pacientes tratados.</p>

La capacidad replicativa de VEN depende de la conversión proteolítica de la proteína de prefusión F0 a F (forma activa). La proteína F0 tiene una secuencia de aminoácidos determinada que constituye el sitio de escisión. La secuencia de aminoácidos de la proteína F0 de LaSota hace que no sea reconocido como sitio de escisión por proteasas celulares humanas, y por lo tanto se producen viriones que no son infecciosos.

Por otro lado, el OMG se replica selectivamente en células tumorales. La replicación del VEN es sensible a la inhibición mediada por interferón de tipo 1 (INF-1), por tanto, tiene una probabilidad muy baja de replicarse en células no tumorales del organismo huésped.

Incluso en caso de diseminación accidental del OMG en las aguas residuales, no es posible el establecimiento del mismo en este sistema debido al bajo volumen liberado y a que sería destruido por las técnicas de tratamiento del agua (como la temperatura, la cloración, etc....)

En conclusión, en caso de exposición involuntaria de organismos no diana, la diseminación del OMG es improbable debido a que es no patógeno y los viriones que producen no son infecciosos, además la infectividad de este OMG es selectiva de células 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

No aplica. Existe la posibilidad de que el personal del estudio clínico quede expuesto al OMG accidentalmente. Como la administración del OMG se llevará a cabo por personal médico especializado y entrenado, esta posibilidad y el riesgo inherente asociado se considera mínimo. La transmisión secundaria a familiares de los pacientes también se considera improbable.

i) Orden y taxón superior (animales): NA
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: El intercambio de material genético entre el OMG y otros organismos es muy improbable (ver sección G.3)

b) De otros organismos al OMG: El intercambio de material genético entre otros organismos y el OMG es muy improbable (ver sección G.3)

c) Consecuencias probables de la transferencia de genes: no se dispone de datos. Sin embargo, los estudios de toxicidad descartaron cualquier toxicidad o efecto patogénico del OMG.

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 hay datos disponibles.

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

No aplica.

H. Información sobre el seguimiento

1. Métodos de seguimiento de los OMG

El seguimiento de los efectos del OMG en los pacientes se realizará mediante las evaluaciones clínicas (p.ej. exámenes físicos, signos vitales, pruebas de imagen, marcadores moleculares, seguimiento de la supervivencia y notificación de efectos adversos), resultados de parámetros bioquímicos, inmunológicos y genéticos, tal como se describe en el protocolo clínico.

En el ensayo clínico, las muestras de sangre que se recogen antes de la dosis y en varios momentos posteriores a la administración de la dosis en varias visitas desde el ciclo 1 día 1 (C1D1) hasta C10D1 se evaluarán para el OMG mediante transcripción inversa (RT-PCR).

Se ha incorporado al protocolo del ensayo un plan de estudio para la evaluación de la diseminación del OMG por los pacientes consistente en la toma de muestras de orina de los pacientes, frotis de la cavidad oral/garganta, frotis anales y frotis de el/los sitio/s de inyección desde C1D1 hasta C10D1 (aproximadamente 189 días) para su análisis. Para la evaluación de la diseminación del OMG por los pacientes, se seguirá una estrategia de análisis escalonados para cuantificación dicha diseminación en la cavidad oral/garganta, en la orina, en el/los sitio/s de inyección y en frotis anales y, si está presente, se evaluará si es infeccioso. Se detectará y cuantificará el ARN viral del VEN mediante la amplificación específica mediante PCR de la región conservada L del genoma del VEN. Para cuantificar la infectividad de las partículas vírica se usarán test de infección de células.

La evaluación de seguridad, para todos los sujetos participantes en el ensayo clínico se realizará durante el periodo propuesto de liberación del OMG y continuará 120 días tras la última inyección.

No está previsto hacer una monitorización medioambiental o del personal del estudio durante el desarrollo del estudio clínico.

2. Métodos de seguimiento de las repercusiones en el ecosistema

No hay riesgo de diseminación del OMG al ecosistema ya que el OMG se inyecta intratumoralmente/intralesionalmente. Si el OMG se liberara al medio ambiente, dado que se trata de un VEN lentogénico, el riesgo para las especies aviares es bajo. Por lo tanto, no se ha planeado un seguimiento del ecosistema ni se considera necesario.

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

La probabilidad de una transferencia del material genético donado a otros organismos es insignificante (consulte la sección G.7).

No se implementarán métodos adicionales para detectar cualquier transferencia de material genético desde el OMG a otros organismos durante la liberación propuesta.

4. Tamaño del área de seguimiento (m2)

No aplica. EL OMG es administrado sólo a los sujetos del estudio por inyección intratumoral/intralesional en instalaciones hospitalarias específicas, dentro de cada centro clínico participante.

5. Duración del seguimiento

Ver sección H1. Se realizarán evaluaciones de seguridad durante el estudio, durante la participación de los pacientes en el ensayo clínico y hasta la finalización del mismo.

Se estima unos 5 años para completar el estudio, comenzando con la obtención del consentimiento informado firmado por el paciente y terminando con la última llamada telefónica o la última visita relacionada con el estudio del último paciente. El período de liberación propuesto es desde el 15/Enero/2021 hasta el 15/Abril/2024. Los pacientes dosificados se seguirán hasta 10 ciclos.

6. Frecuencia del seguimiento

En la fase de escalado de dosis, los dos primeros pacientes de cada nivel de dosis deben tener un periodo de observación de 24 horas para las dos primeras dosis del OMG. Queda a discreción del investigador para el resto de los pacientes en ese mismo nivel de dosis. Se controlará la seguridad de los pacientes inscritos en cada ciclo y según sea clínicamente necesario.

En el estudio, la presencia del OMG se detectará en las muestras de sangre mediante transcripción inversa (RT)-PCR. Estas muestras se obtendrán antes de la administración de V938 y a distintos tiempos tras su administración en varias visitas desde C1D1 hasta C10D1.

1. Muestras tomadas de 0-24 horas antes de la administración del OMG: 3 días en el ciclo 1, 1 día en los ciclos 3 y 5. También se toman muestras en los ciclos 8, 9 y 10, tras la última dosis de OMG en el ciclo 7.
2. Las muestras obtenidas tras la administración del OMG en el C1D1, serán tomadas 2, 4 y 6 horas tras la administración.
3. La obtención de muestras adicionales después de la administración del OMG se tomarán al terminar el tratamiento del estudio y el seguimiento de seguridad del paciente.

Se ha incorporado al protocolo del ensayo un plan de estudio para la evaluación de la eliminación del OMG por los pacientes consistente en la toma de muestras de orina de los pacientes, frotis de la cavidad oral/garganta, frotis anales y frotis de el/los sitio/s de inyección desde C1D1 hasta C10D1 (aproximadamente 189 días) para su análisis.

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

1. Tratamiento del lugar tras la liberación

El área de trabajo en el que V938 será preparado para su inyección será una cabina de bioseguridad clase 2 que se limpiará antes y después de la manipulación con una

solución antiséptica (6% de hipoclorito de sodio o lejía diluida 1:10), efectiva contra VEN.

La estancia en la que tendrá lugar la administración del OMG se limpiará de manera estándar usando una solución desinfectante estándar para limpiar superficies y suelos según las pautas locales para BSL-2. Cualquier otro instrumento desechable u otros materiales utilizados durante el proceso de preparación de la dosis se desecharán según las prácticas estándar de la institución para materiales biológicos.

En caso de derrame accidental o contaminación, cada superficie contaminada deberá tratarse siguiendo los procedimientos institucionales pertinentes para productos biológicos con los desinfectantes apropiados (lejía al 10% recién hecha, vesfeno o LpH). El personal usará guantes, gafas de seguridad, mascarilla quirúrgica o respirador, traje de protección y cubrezapatos. Los materiales contaminados se retirarán de la habitación y se mantendrán en contenedores sellados o bolsas especiales que estén claramente etiquetadas como residuos biológicos.

2. Tratamiento del OMG tras la liberación

Todo material en contacto con el OMG deberá ser considerado contaminado y deberá ser descontaminado con hipoclorito de sodio al 6% (lejía, dilución máxima 1:10), vesfeno o LpH o mediante incineración. En caso de que la incineración no sea posible, la esterilización se realizará mediante autoclave.

Todo el equipo utilizado durante el procedimiento se eliminará según los procedimientos de residuos biopeligrosos o descontaminados con agentes viricidas tal y como dicte la guía local de manejo de residuos biopeligrosos para BSL-2.

3. a) Tipo y cantidad de residuos producidos

El OMG es suministrado en un vial de vidrio de 2 mL, con una cantidad de 0.8mL de rNDV-huII-12. El nivel y volumen de dosis requerido para cada inyección, se preparará mezclando el vial de OMG con solución salina estéril.

Cada dosis se prepara en un vial de 10 mL vacío y estéril, proporcionado por el promotor. Se necesitan jeringas y agujas de 10 mL para extraer el OMG del vial, de 2 y 10 mL para extraer la solución salina y jeringas de polipropileno y agujas de acero inoxidable o titanio de 21 o 26 g. Por tanto, el tipo de residuos producidos incluye viales vacíos y usados y utensilios de administración (agujas de inyección y jeringas), gasas, equipo de protección personal (por ejemplo: gafas, guantes y batas) y componentes utilizados para recolectar las muestras de los fluidos corporales tras la administración del OMG.

La cantidad de residuos producidos dependerá del número de dosis que se administre a los pacientes de cada cohorte, y del número de cohortes en las que finalmente se lleve a cabo la administración del OMG.

3. (b) Tratamiento de residuos

Los utensilios de administración (agujas de inyección y jeringas) se eliminarán como residuos biopeligrosos. Además, cualquier instrumento quirúrgico desechable o cualquier otro material utilizado durante el procedimiento de administración o la

recolección de fluidos corporales se eliminarán según las prácticas de bioseguridad del centro para la eliminación de residuos biopeligrosos..

Todo el material o equipamiento no desechable se limpiará con desinfectantes químicos con actividad viricida probada y después será esterilizado mediante autoclave según la práctica estándar del centro.

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 el caso de una contaminación/liberación accidental del OMG (por ejemplo: lesión por pinchazo con la aguja, viales rotos, derrames, etc.), el personal clínico del estudio se lo notificará al investigador principal y otras personas tal y como se requieran según los protocolos específicos del centro. El personal será instruido en los procedimientos a seguir en caso de una liberación del OMG debido a un derrame u otros accidentes.

En caso de derrame accidental durante la administración, se aplicará la desinfección apropiada para evitar la liberación del OMG al medio.

La dispersión del OMG podría darse únicamente al ser liberado de forma accidental por los pacientes. Esta liberación accidental sería muy baja según se ha reportado para otros VEN evaluados en ensayos clínicos (Pecora AL et al., 2002, Laurie SA et al., 2006, and Hotte SJ et al., 2007). Además, los pacientes con cáncer que trabajen en una granja o en otras profesiones con contacto con aves están excluidos de este ensayo. Por tanto, como el riesgo de exposición del OMG a especies aviares en el medio es baja, no se considera necesario un plan de emergencia para especies aviares.

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

Ver sección J.1

En caso de derrame accidental, el personal del centro seguirá las normas del centro. El virus puede ser eliminado con lejía, vesfeno y pH bajo. Una solución de lejía al 10% recién hecha es capaz de inactivar el virus, pero puede dañar el acero inoxidable. En caso de que el derrame sea en una superficie amplia y abierta, se debe abandonar la estancia durante 30 minutos y posteriormente regresar para desinfectarla. El personal debe llevar guantes, gafas de seguridad, mascarillas quirúrgicas o respiratorias (según estipule la regulación local), trajes de protección y calzas para limpiar el derrame.

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 aplica ya que no se espera exposición a plantas o animales.

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

Ver sección J.1

Se controlará a los pacientes incluidos en el estudio para detectar la aparición de efectos adversos y de efectos adversos graves de acuerdo con el protocolo del estudio. Cada evento adverso grave será registrado y evaluado por el personal del hospital y el promotor del estudio, y se notificará a las autoridades sanitarias cuando corresponda. No se consideran necesarios planes específicos de protección del medio ambiente, por las razones expuestas anteriormente.

Debido a los controles exhaustivos en el transporte, almacenamiento, administración, eliminación y monitorización de la administración del OMG, el riesgo de liberación accidental de los OMG de referencia al medioambiente, o un efecto indeseable debido a esa liberación accidental se considera extremadamente bajo.

El nivel de contención del OMG es BSL-2. Se considera que el riesgo de exposición al OMG para los trabajadores sanitarios sanos es bajo. Todas las áreas e instalaciones que se utilizarán para administrar el OMG serán limpiadas y descontaminadas con agentes viricidas.

BIBLIOGRAFÍA

Alexander, DJ. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 2000; 19(2):44103-462

Altomonte, J., S. Marozin, R. M. Schmid, and O. Ebert. "Engineered Newcastle Disease Virus as an Improved Oncolytic Agent against Hepatocellular Carcinoma." *Mol Ther* 18, no. 2 (Feb 2010): 275-84.

Ayala, A. J., K. M. Dimitrov, C. R. Becker, I. V. Goraichuk, C. W. Arns, V. I. Bolotin, H. L. Ferreira, A. P. Gerilovych, G. V. Goujgoulova, M. C. Martini, D. V. Muzyka, M. A. Orsi, G. P. Scagion, R. K. Silva, O. S. Solodiankin, B. T. Stegny, P. J. Miller, and C. L. Afonso. "Presence of Vaccine-Derived Newcastle Disease Viruses in Wild Birds." *PLoS One* 11, no. 9 (2016): e0162484.

Dortmans, J. C., G. Koch, P. J. Rottier, and B. P. Peeters. "A Comparative Infection Study of Pigeon and Avian Paramyxovirus Type 1 Viruses in Pigeons: Evaluation of Clinical Signs, Virus Shedding and Seroconversion." *Avian Pathol* 40, no. 2 (Apr 2011): 125-30.

Evans, A. S. "Pathogenicity and Immunology of Newcastle Disease Virus (Nvd) in Man." *Am J Public Health Nations Health* 45, no. 6 (Jun 1955): 742-5.

Fournier P, Schirmmayer V. Oncolytic Newcastle disease virus as cutting edge between tumor and host. *Biology (Basel)*. 2013; 2(3):936-75

Frolich, M., S. Cortez de Jackel, and T. Selhorst. "[the Tenacity of Newcastle Disease Virus (Lasota) in the Excrement of Laying Hens in Different Housing Systems]." *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 99, no. 12 (Dec 1992): 494-9.

Ganar K, Das M, Sinha Ganar K, Das M, Sinha S, Kumar S. "Newcastle disease virus: Current status and our understanding". *Virus Research* 2014, 184:71–81

Hotte, S. J., R. M. Lorence, H. W. Hirte, S. R. Polawski, M. K. Bamat, J. D. O'Neil, M. S. Roberts, W. S. Groene, and P. P. Major. "An Optimized Clinical Regimen for the Oncolytic Virus Pv701." *Clin Cancer Res* 13, no. 3 (Feb 1 2007): 977-85.

Kim, S. H. and S. K. Samal. "Reverse Genetics for Newcastle Disease Virus as a Vaccine Vector." *Curr Protoc Microbiol* 48 (Feb 22 2018): 18 5 1-18 5 12.

Koneru, M., T. J. Purdon, D. Spriggs, S. Koneru, and R. J. Brentjens. "Il-12 Secreting Tumor-Targeted Chimeric Antigen Receptor T Cells Eradicate Ovarian Tumors in Vivo." *Oncoimmunology* 4, no. 3 (Mar 2015): e994446.

Laurie, S. A., J. C. Bell, H. L. Atkins, J. Roach, M. K. Bamat, J. D. O'Neil, M. S. Roberts, W. S. Groene, and R. M. Lorence. "A Phase 1 Clinical Study of Intravenous Administration of Pv701, an Oncolytic Virus, Using Two-Step Desensitization." *Clin Cancer Res* 12, no. 8 (Apr 15 2006): 2555-62.

Nelson, C. B., B. S. Pomeroy, K. Schroll, W. E. Park, and R. J. Lindeman. "An Outbreak of Conjunctivitis Due to Newcastle Disease Virus (Ndv) Occurring in Poultry Workers." *Am J Public Health Nations Health* 42, no. 6 (Jun 1952): 672-8.

OIE, 2013 OIE Technical Disease Card. Newcastle Disease

Orsi, M.A., Doretto Junior, L., Reischak, D., da Silva, L. H. A., Spilki, F. R., Buzinaro, M. G. and Arns, C. W. "Newcastle Disease Virus Vaccine Strains: Immunogenicity is not Influenced by ICPI". *Brazilian Journal of Poultry Science* 11, no 2 (Mar 2009): 129-133.

Pecora, A. L., N. Rizvi, G. I. Cohen, N. J. Meropol, D. Serman, J. L. Marshall, S. Goldberg, P. Gross, J. D. O'Neil, W. S. Groene, M. S. Roberts, H. Rabin, M. K. Bamat, and R. M. Lorence. "Phase I Trial of Intravenous Administration of Pv701, an Oncolytic Virus, in Patients with Advanced Solid Cancers." *J Clin Oncol* 20, no. 9 (May 1 2002): 2251-66.

Rani, S., P. Gogoi, and S. Kumar. "Spectrum of Newcastle Disease Virus Stability in Gradients of Temperature and Ph." *Biologicals* 42, no. 6 (Nov 2014): 351-4.

Sharma, B., M. Pokhriyal, G. K. Rai, M. Saxena, B. Ratta, M. Chaurasia, B. S. Yadav, A. Sen, and B. Mondal. "Isolation of Newcastle Disease Virus from a Non-Avian Host (Sheep) and Its Implications." *Arch Virol* 157, no. 8 (Aug 2012): 1565-7.

Trinchieri, G. "Interleukin-12 and the Regulation of Innate Resistance and Adaptive Immunity." *Nat Rev Immunol* 3, no. 2 (Feb 2003): 133-46.

USDA Report No. 17-040061. Laboratory Test Report ICPI Value

Yates, V. J., D. E. Fry, and B. W. Henderson, Jr. "Isolation of Newcastle Disease Virus from a Calf." *J Am Vet Med Assoc* 120, no. 900 (Mar 1952): 149-50.