



# **Pexastimogene Devacirepvec**

**(Pexa-Vec, anteriormente JX-594)**

**Anexo II**

**AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL**

**Janeiro de 2016**

## ÍNDICE

<b>A.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>4</b>
<b>B.</b>	<b>CARACTERÍSTICAS DO OGM E DA LIBERTAÇÃO .....</b>	<b>4</b>
	B1. Características do OGM .....	4
	B2. Características da libertação .....	6
	B3. Avaliação do risco para a Saúde Pública.....	7
	B4. Avaliação do risco para o meio ambiente .....	11
<b>C.</b>	<b>CONCLUSÕES SOBRE O POTENCIAL IMPACTO AMBIENTAL DA LIBERTAÇÃO OU DA COLOCAÇÃO NO MERCADO DE OGM.....</b>	<b>12</b>
<b>D.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>13</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSL	Nível de segurança biológica
CDC	Centros para o Controlo e Prevenção de Doenças nos EUA
CEE	Comunidade Económica Europeia
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E. coli	Escherichia coli
EPI	Equipamento de proteção individual
EUA	Estados Unidos da América
FCI	Formulário de Consentimento Informado
hGM-CSF	Fator estimulador de colónias de macrófagos e granulócitos humano
IT	Intratumoral
IV	Intravenoso
LacZ	Gene de codificação da beta-galactosidase
ME	Medicamento experimental
NIH	Institutos Nacionais de Saúde (EUA)
NYCBOH	Direção de Saúde da Cidade de Nova Iorque
OGM	Organismo geneticamente modificado
Pexa-Vec, JX-594	VV recombinante
RP2D	Dose recomendada na Fase II
SIDA	Síndrome de imunodeficiência adquirida
TK	Timidina cinase
UE	União Europeia
UFP	Unidade formadora de placas
VIG	Imunoglobulina de Vaccinia
VV	Vírus <i>Vaccinia</i>

## A. INTRODUÇÃO

O medicamento experimental (ME) é uma suspensão viral do vetor recombinante Pexa-Vec ou JX-594 (nome do produto utilizado em submissões anteriores), que é um organismo geneticamente modificado (OGM). Pexa-Vec é um vírus *Vaccinia* (VV) recombinante replicativo oncolítico, da estirpe Wyeth, que é a estirpe da vacina da varíola Dryvax<sup>®</sup>, administrada com sucesso, apenas com raras complicações clínicas, a centenas de milhões de pessoas. Pexa-Vec contém três modificações genéticas comparativamente à estirpe Wyeth de tipo selvagem: 1) disrupção do gene da timidina cinase (TK) através de, 2) inserção do gene do fator estimulador de colónias de macrófagos e granulócitos humano (hGM-CSF) e 3) inserção do gene *LacZ*.

O gene TK de *Vaccinia* foi inativado para melhorar o tropismo *in vivo* do VV para as células cancerígenas e não para as células normais. Foi inserido o transgene terapêutico que codifica o hGM-CSF para aumentar a eficácia anti-cancro do Pexa-Vec localmente e contra metástases tumorais distantes através da estimulação de uma imunidade anti-tumoral sistémica. Foi inserido o gene da *Escherichia coli* para proporcionar um marcador para a replicação viral nos doentes e nos prestadores de cuidados, bem como no exame histopatológico de biópsias de tecido dos doentes tratados.

Pexa-Vec é um OGM desenvolvido como candidato terapêutico para tratar doentes com tumores sólidos, incluindo a sua indicação principal: o carcinoma hepatocelular (CHC). No ensaio clínico proposto, JX594-HEP024, os doentes com carcinoma hepatocelular avançado sem terapêutica sistémica anterior irão receber três (3) injeções IT de Pexa-Vec.

## B. CARACTERÍSTICAS DO OGM E DA LIBERTAÇÃO

### B1. Características do OGM

O vírus parental do Pexa-Vec é o VV, estirpe Wyeth, que foi utilizado pelos Wyeth Laboratories, Inc. para desenvolver a vacina Dryvax<sup>®</sup>. Dryvax<sup>®</sup> é uma vacina de primeira geração contra a varíola, utilizada durante a campanha de erradicação da varíola. Foi administrada a centenas de milhões de pessoas na década de 1960 e até ao início da década de 1980, com uma média de 1,4 mortes por milhão de vacinações (*Kretzschmar M. et al., 2006*). O facto de o VV ter sido utilizado em massa para a campanha de erradicação da varíola significa que houve mais pessoas vacinadas, e portanto deliberadamente infetadas, com o VV do que com qualquer outro agente infeccioso. Em consequência, há uma quantidade de informação sem precedentes sobre o seu comportamento no ser humano, incluindo a identificação de populações em risco de acontecimentos adversos raros e as medidas para responder aos mesmos (*Cono J. et al., 2003*) (*Kretzschmar M. et al., 2006*). Estão disponíveis vários agentes antivirais aprovados ou experimentais para tratar as infeções por poxvírus no caso de uma resposta adversa. A imunoglobulina de *Vaccinia* (VIG) e cidofovir são terapêuticas eficientes recomendadas pelos Centros para o Controlo e Prevenção de Doenças nos EUA (CDC) para reações graves à vacina da varíola.

O VV é um membro da família *Poxviridae* (género *Orthopoxvirus*). O VV é um vírus com cadeia dupla de ácido desoxirribonucleico (DNA), que tem um leque alargado de hospedeiros em condições experimentais mas raramente é isolado a partir de animais fora do laboratório (*Fenner F. et al., 1989*). Existem múltiplas estirpes de VV, que têm diferentes níveis de virulência para o ser humano e para outros animais. A estirpe da Direção de Saúde da Cidade de Nova Iorque (NYCBOH), a partir da qual a vacina Dryvax<sup>®</sup> foi derivada, tem uma baixa patogenicidade no ser humano (*Fenner F. et al., 1988*).

O *Vaccinia* apresenta muitas propriedades biológicas inerentes que o tornam um atrativo vetor de expressão e agente oncolítico. Estas propriedades incluem:

- Replicação citoplasmática exclusiva, o que elimina qualquer risco de integração do DNA viral no genoma do hospedeiro (*Moss B., 2007*), eliminando assim o risco de mutagénese insercional.
- Ciclo de vida rápido e eficiente, formando viriões maduros em cerca de 6 horas após a infeção.
- Capacidade de matar células rapidamente em comparação com outras espécies de vírus.
- Tropismo alargado para os tecidos tumorais.
- Capacidade de se propagar eficientemente de célula para célula, aumentando a eficiência da infeção *in vivo*. O VV, além disso, desloca-se através da corrente sanguínea, propagando-se desta forma para tumores distantes. Estas características permitem uma via de administração IV sistémica.
- Um genoma grande, que consegue aceitar várias quilobases de DNA estranho sem rearranjos no genoma viral (*Jolly D., 1994*) (*Smith G.L. and Moss B., 1983*).
- O VV possui os seus próprios promotores fortes, capazes de atingir níveis muito altos de expressão transgénica.
- O VV recombinante, que transporta os antigénios adequados, é capaz de:
  - o imunizar raposas contra a raiva {Decisão da Comissão (93/572/EEC)},
  - o induzir, em ensaios clínicos, uma resposta imunitária dirigida, específica, contra o cancro da próstata (PROSTVAC<sup>TM</sup>, <http://www.bavarian-nordic.com/cancer/prostate-cancer/prostvac/data/news.aspx>), antigénio carcinoembrionário (*Cole D.J. et al., 1996*) (*McAneny D. et al., 1996*) (*Tsang K.Y. et al., 1995*) (*Conry R.M. et al., 2000*) (*Arlen P. et al., 2000*), antigénios associados ao melanoma (*Spagnoli G.C. et al., 2002*) e ao vírus do papiloma humano (*Davidson E.J. et al., 2003*).
- O VV consegue infetar um leque alargado de tecidos humanos, mas não causa qualquer doença humana conhecida, à exceção de complicações da vacinação (descritas mais adiante neste documento).
- O VV não tem um hospedeiro conhecido na natureza, mas desenvolve-se bem em condições experimentais num leque alargado de hospedeiros.
- O VV tem a história mais longa e extensa de utilização no ser humano. Após a injeção na pele, o vírus tipicamente estabelece apenas uma infeção subcutânea breve e limitada. Dado que o VV contém antigénios que estimulam uma resposta imunitária e que têm reação cruzada com os antigénios da varíola, a vacina confere assim proteção contra a doença da varíola no ser humano. Durante a campanha de vacinação contra a varíola, ocorreram complicações graves em menos de 1 em 4000 indivíduos, sobretudo em indivíduos imunodeprimidos e extremamente jovens. As complicações raras incluíram eczema desencadeado pela vacina (doentes com eczema), exantema disseminado causado por *Vaccinia*, *Vaccinia* progressivo (em indivíduos com deficiência em células T) e encefalite (1-2 por milhão de pessoas vacinadas) (*Fields B.N., 1996*).

## **B2. Características da libertação**

O projeto proposto é o estudo clínico JX594-HEP024. É um estudo multicêntrico, aleatorizado, em regime aberto, de Fase III, de Pexa-Vec seguido de sorafenib *versus* sorafenib em doentes com CHC avançado sem terapêutica sistémica anterior. Os doentes irão receber três (3) injeções IT de Pexa-Vec. Os objetivos deste estudo consistem em determinar a eficácia (através da Sobrevivência Global, Tempo até à Progressão, Sobrevivência Livre de Progressão, Taxa de Resposta Global, Taxa de Controlo da Doença e Tempo até à Progressão Sintomática) e a segurança deste regime de tratamento com Pexa-Vec. Os centros de ensaio clínico na UE estarão localizados em França, na Alemanha, Itália, Polónia, Portugal e outros países. Também irão estar envolvidos centros de ensaio clínico na Austrália, Canadá, China, Israel, (República da) Coreia, Nova Zelândia, Singapura, Taiwan, Tailândia e EUA.

Neste ensaio, serão aleatorizados 600 doentes entre um de dois braços de tratamento, numa proporção de 1:1 (300 em cada braço). Até à data, Pexa-Vec foi administrado a mais de 306 doentes (incluindo 7 doentes em uso compassivo) em 13 ensaios clínicos (Fase I e Fase II). Segundo a Diretiva 2000/54/CE, VV é considerado um agente biológico do Grupo 2. A designação de Grupo 2 aplica-se aos agentes que podem causar doença humana e podem constituir um perigo para os trabalhadores, de propagação improvável para a comunidade e para os quais estão habitualmente disponíveis profilaxia ou tratamento eficazes. Exemplos de outros agentes biológicos do Grupo 2 incluem o vírus do sarampo, as salmonelas e os vírus influenza (tipos A, B e C). O VV é ainda classificado como sendo uma substância infecciosa no Nível 2 de Segurança Biológica (BSL-2) pelos Centros para o Controlo e Prevenção de Doenças nos EUA (CDC, 2009) e como um organismo de risco do Grupo 2 pelas orientações dos Institutos Nacionais de Saúde (NIH) dos EUA. Para os três (3) ensaios clínicos iniciados em França com Pexa-Vec (i.e., JX594-HEP018, de Fase IIb [N.º EudraCT 2011-000051-16], JX594-CRC019, de Fase I/IIa [N.º EudraCT 2011-004676-36], JX594-IV-HEP021, de Fase IIa [N.º EudraCT 2012-000591-42] e o estudo MetromaJX [N.º EudraCT 2014-001078-33]), a autoridade francesa para a segurança biológica, “Haut Conseil des Biotechnologies”, classificou Pexa-Vec para uso terapêutico como sendo um OGM com Nível de Risco I para uso clínico.

### **Manuseamento do VV e preparação do ME**

Durante o manuseamento do Pexa-Vec, terão de usar-se sempre luvas impermeáveis, bata, máscara cirúrgica/de procedimento e óculos de segurança com escudos laterais. Todas as transferências da preparação serão feitas dentro de um saco de plástico para transporte, selado, ou outro recipiente secundário, à prova de fugas, selado, que apresente o símbolo de perigo biológico claramente assinalado. Todos os materiais que entrem em contacto com o Pexa-Vec serão descontaminados e/ou destruídos segundo as instruções descritas abaixo. Os investigadores, farmacêuticos e restante pessoal receberão descrições técnicas detalhadas sobre o manuseamento e preparação de Pexa-Vec.

### **Recomendações para a descontaminação/destruição**

Os vírus com invólucro, como os vírus derivados de *Vaccinia*, como é o caso de Pexa-Vec, são sensíveis à inativação por métodos físicos ou químicos de desinfecção. O calor é o agente antimicrobiano mais eficaz (as contagens viáveis de um *Vaccinia virus* reduzem-se  $10^7$  vezes através da exposição a 60°C, à pressão ambiente, no prazo de uma hora ou menos). O

*Vaccinia* torna-se não infeccioso após o tratamento numa autoclave. Os desinfetantes hospitalares químicos também são eficazes contra os vírus lipofílicos, como é o caso do *Vaccinia*.

Área de trabalho: Após a preparação de Pexa-Vec, a área de trabalho utilizada para a preparação deve ser completamente limpa com:

- Álcool a pelo menos 60%, OU
- Solução de lixívia seguida de álcool a 60%, OU
- Outro agente recomendado na instituição (outros desinfetantes hospitalares incluem: peróxido de hidrogénio a 3%, álcool a  $\geq 60\%$ , hipoclorito (1000 ppm), peróxido de hidrogénio acelerado a 0,5%, compostos quaternários de amónia, iodóforos, compostos fenólicos e glutaraldeído).

Materiais descartáveis: Todo o material e equipamento (por ex., seringas, cateteres, agulhas, tubos, luvas, pensos, frascos para injetáveis utilizados ou não utilizados, recipientes, etc.) que entrem em contacto com o Pexa-Vec deverão ser eliminados num contentor claramente identificado de resíduos biomédicos (por ex., num recipiente à prova de punção ou num saco à prova de fugas de material com perigo biológico) em conformidade com as políticas da instituição.

Todos e quaisquer resíduos devem então ser autoclavados, incinerados ou tratados com solução de hipoclorito de sódio. Os resíduos médicos autoclavados não devem ser eliminados como o lixo normal. Cada instituição terá de cumprir a regulamentação local relativa à eliminação de resíduos.

O material não descartável de tecido como as batas, roupa de cama e toalhas dos doentes, etc. são limpos/tratados em conformidade com o procedimento habitual do hospital para o material infeccioso (i.e., lavagem em água quente  $> 70^{\circ}\text{C}$  com detergente e secagem de ar quente).

Equipamento de cuidados prestados aos doentes e o meio ambiente: Todo o equipamento e dispositivos médicos não críticos de cuidados prestados aos doentes (por ex., arrastadeiras, cadeiras sanitárias, braçadeiras para medição da pressão arterial, oxímetros, aparelhos de medição da glicemia) devem ser limpos com um desinfetante hospitalar antes de serem utilizados noutra doente, segundo as Precauções Universais / Práticas de Rotina. Os desinfetantes hospitalares incluem o peróxido de hidrogénio a 3%, o álcool a  $\geq 60\%$ , hipoclorito (1000 ppm), peróxido de hidrogénio acelerado a 0,5%, compostos quaternários de amónia, iodóforos compostos fenólicos e glutaraldeído. Devem seguir-se as instruções do fabricante para assegurar o tempo de contacto adequado e confirmar a capacidade do equipamento para suportar o desinfetante utilizado.

Loiças, utensílios: A limpeza de artigos como loiças e utensílios com água quente ( $> 70^{\circ}\text{C}$ ) e detergente será adequada para a descontaminação.

### **B3.Avaliação do risco para a Saúde Pública**

O OGM Pexa-Vec é não integrativo (localização citoplasmática), preferencialmente replicativo nas células em divisão ativa (i.e. células tumorais), oncolítico (lise de células tumorais infetadas) e propagativo (capaz de se propagar localmente para as células cancerígenas adjacentes e sistemicamente através da libertação de partículas infecciosas para a corrente sanguínea e para o sistema linfático (*Smith G.L. et al., 2002*)).

Mais de 300 doentes adultos e pediátricos com cancros avançados, refratários ao tratamento, já receberam mais de 1200 doses de até cerca de mil milhões de unidades infecciosas ( $1 \times 10^9$  UFP) de Pexa Vec através de administração IV e/ou IT (desde Janeiro de 2014). O tratamento com doses de Pexa-Vec de cerca de mil milhões de UFP (cerca de 10.000 vezes mais do que a dose de *Vaccinia* [não atenuado] padronizado aplicada com a vacina de *Vaccinia*) foi em geral bem tolerado, sendo os acontecimentos adversos (AA) mais frequentes sintomas transitórios ( $\leq 24$  horas) de tipo gripal (febre, calafrios, fadiga), náusea, hipotensão e dor no local da injeção.

O *Vaccinia* propaga-se tocando no local da vacinação antes de este ter cicatrizado, ou tocando em pensos ou roupas que tenham ficado contaminados com o vírus vivo do local da vacinação. Os doentes são potencialmente infecciosos a partir dos locais infetados (úlceras) de inoculação na pele durante um período de até 3 semanas após a inoculação. Pode ocorrer a inoculação inadvertida de *Vaccinia* nos olhos ou nas mucosas, através das mãos contaminadas. A propagação secundária de *Vaccinia* pode ocorrer através de:

- Contacto direto com os locais de inoculação na pele (úlceras, pústulas acneiformes)
- Contacto direto com pensos contaminados através do contacto com locais de inoculação (úlceras, pústulas acneiformes)
- Contacto indireto através de dispositivos médicos contaminados pelo contacto com locais de inoculação, incluindo úlceras, pústulas acneiformes

As instruções sobre como prevenir a contaminação pelo vírus encontram-se na Brochura do Investigador para Pexastimogene Devacirepvec (Pexa-Vec) e serão facultadas aos investigadores, farmacêuticos e a todo o pessoal envolvido no manuseamento do produto. Será facultado um resumo deste documento aos doentes, em termos leigos, como parte do seu processo de consentimento informado.

O VV não se propaga através do ar (US Department of Health & Human Services, <http://www.smallpox.gov/QuestionsAnswers.html>). Portanto, não é possível a transmissão do vírus por inalação.

A transmissão secundária pós-vacinação com a vacina da varíola é uma ocorrência rara, mas foi descrita em contactos domésticos, contactos sexuais e parceiros na prática de desportos (*MMWR*, 2004) (*Vora S. et al., 2008*) (*MMWR*, 2010) (*Hughes C.M. et al., 2011*) (*Young G.E. et al., 2011*). Numa campanha de vacinação recente, em 2003–2011, que utilizou um subclone (forma purificada) de Dryvax chamado ACAM 2000, em pessoal militar e outros indivíduos na primeira linha de resposta a potencial bioterrorismo, vacinaram-se  $> 2,1$  milhões de militares e 40.000 civis nos EUA (*Wertheimer E.R. et al., 2011*). Com a implementação das precauções de contacto e o evitamento das populações “de risco” segundo as orientações dos CDC dos EUA (ver abaixo), ACAM 2000 mostrou estar associado a uma taxa de transmissão muito baixa, de 0,0054% na população em geral e de 0,0001% nos profissionais de saúde. Dos 115 casos notificados de transmissão, todos estiveram relacionados com a transmissão por contacto físico direto, incluindo contactos íntimos (por ex., membros da família ou parceiros de luta livre). A toxicidade mais frequente após a transmissão por contacto direto foi uma reação cutânea local ligeira, transitória. Só se registou um acontecimento potencialmente fatal pós-transmissão e não houve mortes relacionadas com a transmissão.

Os dados pré-clínicos de PexaVec, que mostram a distribuição de DNA viral e abscessos nos testículos, destacam a importância das precauções relativas ao contacto sexual, que já tinham sido implementadas para os doentes que iriam participar neste ensaio de Fase Ib/II. Será



solicitado aos doentes que utilizem um método barreira de contraceção durante pelo menos 6 semanas após cada tratamento de Pexa-Vec.

Perfil de segurança aceitável de Pexa-Vec: a avaliação toxicológica relacionada com Pexa-Vec não mostrou efeitos tóxicos relacionados com o OGM após três injeções IV semanais em coelhos saudáveis, à exceção de alterações nos parâmetros de hematologia e bioquímica, depleção linfóide do timo, hiperplasia linfóide com expansão da polpa vermelha do baço, anemia ligeira secundária ao aumento do baço e, apenas na dose mais elevada, abscessos nos testículos. Todas as alterações observadas pareceram ser reversíveis (*Christenson J.G., 2008*). O DNA do vetor encontrava-se largamente distribuído no sangue e nos tecidos três dias após uma única administração IV, mas tinha sido quase todo eliminado ao Dia 7, exceto nos testículos, onde Pexa-Vec persistiu até ao Dia 21, mas encontrava-se essencialmente eliminado ao Dia 44 (*Bell J., 2007*).

Recolheram-se dados de segurança nos ensaios clínicos anteriores realizados com Pexa-Vec. Até à data, Pexa-Vec foi administrado por via IV e/ou IT a mais de 250 doentes, com um perfil de segurança aceitável nos doentes com cancros avançados. Os acontecimentos adversos mais frequentes atribuídos ao vetor foram reações ligeiras a moderadas relacionadas com a vacina (febre, calafrios, fadiga), náusea, dor no local da injeção e pústulas cutâneas superficiais. Prevê-se hipotensão aguda, ligeira a moderada, no prazo de 1 hora após o tratamento IV, observando-se depois intermitentemente (com intensidade máxima entre as 8-12 horas) durante as primeiras 24 horas após o tratamento com Pexa-Vec. Prevê-se a ocorrência de febre aguda, moderada a grave, nas 4 a 6 horas pós-tratamento, com uma duração típica de 18-24 horas.

Nos locais do tumor ou da injeção, são possíveis as seguintes toxicidades: dor, necrose, ulceração e inflamação.

Ainda que seja altamente improvável e não tenha sido observado após qualquer tratamento ou exposição a Pexa-Vec, é possível a ocorrência de um exantema disseminado associado a *Vaccinia* (reação generalizada a *Vaccinia*) ou de encefalite; estas complicações foram descritas, respetivamente, em cerca de 1 em 10.000 e de 1-2 em 1.000.000 recetores de vacina da varíola. Foi notificada a ocorrência de eczema desencadeado pela vacina em 1 em 100.000 recetores de vacina da varíola. Além disso, num programa recente de vacinação com a estirpe NYCBOH de *Vaccinia* foi demonstrado um risco acrescido estatisticamente significativo de miocardite (1-2 por 10.000 vacinados) (*Arness M.K. et al., 2004*).

Para mitigar estas toxicidades previstas, os doentes são aconselhados a fazer hidratação por via oral durante 24 horas antes de cada tratamento. Os doentes irão também receber hidratação ao longo de 24 horas pós-tratamento. Para o tratamento da náusea ou vómitos, podem utilizar-se antieméticos ao critério do investigador. Podem utilizar-se analgésicos, antipiréticos, antidepressivos e outras medidas de cuidados de suporte ao critério do investigador. Caso ocorram exantema ou ulceração cutânea, devem aplicar-se os procedimentos de enfermagem adequados (incluindo a limpeza à ferida e a aplicação de pensos estéreis) para prevenir uma infeção bacteriana secundária. No caso extremamente improvável de uma infeção generalizada por VV, encefalite ou outra toxicidade progressiva clinicamente significativa que, no parecer do investigador, possa estar relacionada com Pexa-Vec, deve considerar-se a utilização de VIG e/ou cidofovir.

O desenvolvimento de pústulas cutâneas pequenas (< 1 cm) após o tratamento IV ou IT com Pexa-Vec é um acontecimento adverso frequente. Ocorreu em cerca de 15-20% dos doentes após o tratamento com Pexa-Vec. O início dá-se tipicamente no prazo de 1 semana após a

injeção inicial com Pexa-Vec, com resolução nas 2 a 3 semanas seguintes. A maior parte dos doentes com pústulas cutâneas desenvolveu, no total 1–5 lesões. Em todos os casos, a pele sobre a pústula encontrava-se intacta e não se documentou a libertação de partículas para o meio ambiente nem a transmissão aos prestadores de cuidados ou aos membros da família; Pexa-Vec só foi detetado no fluido depois de ser retirado das pústulas através de uma agulha inserida através da pele, ou através da remoção de uma crosta sobre o local. As pústulas foram cobertas com pensos não oclusivos, em conformidade com as orientações padronizadas dos CDC dos EUA para as vacinações de rotina com *Vaccinia*, que formam pústulas cutâneas. Até à data, todas as pústulas foram autolimitadas e resolveram-se sem complicações e sem a necessidade de um tratamento antiviral específico. O aparecimento e a progressão temporal destas pústulas foram consistentes com os descritos após a vacinação de rotina com *Vaccinia*, com Dryvax®. É de notar que as doses terapêuticas de Pexa-Vec são significativamente mais elevadas do que as doses da vacina; as vias de administração IT e IV levam a níveis mais elevados de exposição sistémica a Pexa-Vec do que é o caso com a vacinação de rotina.

Em conclusão, o perfil de toxicidade de Pexa-Vec é ligeiro em comparação com outras terapêuticas para o cancro. Além disso, devido à baixa disseminação observada de Pexa-Vec, a contaminação dos profissionais de saúde e da família dos doentes é improvável. Caso ocorra, e considerando que apenas uma fração da dose administrada estaria envolvida neste acontecimento, não se prevê que o respetivo efeito fosse tóxico, dada a segurança de um vetor viral deste tipo, já observada na campanha de vacinação contra a varíola e nos estudos clínicos conduzidos em doentes.

Durante a campanha de vacinação contra a varíola, recolheram-se extensos dados de segurança com as vacinas de vírus *Vaccinia* (não atenuado) padronizadas (*Henderson D. and Moss B., 1999*). Os 4 principais acontecimentos adversos com significado clínico identificados foram os seguintes: *Vaccinia* progressivo, eczema desencadeado pela vacina, reação generalizada a *Vaccinia* e encefalite. Mais recentemente, evidenciou-se uma quinta complicação rara, de miopericardite. Foi claramente demonstrado que a grande maioria destes acontecimentos adversos ocorreu em subconjuntos definidos, designados como sendo o dos vacinados “de risco”, incluindo:

1. Crianças de idade < 12 meses;
2. Indivíduos gravemente imunocomprometidos (por ex., recetores de transplante de órgãos, indivíduos VIH-positivos, ou a receber medicação imunossupressora crónica); e
3. Doentes com doenças cutâneas de tipo inflamatório (por ex., eczema que tenha exigido tratamento anterior, dermatite atópica, etc.).

Além disso, a vacinação não é recomendada durante a gravidez (devido ao risco extremamente raro de infeção fetal por *Vaccinia*) nem nas mulheres a amamentar (devido ao risco teórico de transmissão para o bebé).

Por conseguinte, os profissionais de saúde ou o pessoal de limpeza pertencente aos seguintes grupos “de risco” não devem ter contacto físico direto com o *Vaccinia virus* atenuado Pexa-Vec, não devem administrar o agente nem prestar cuidados diretos aos doentes do estudo após o tratamento e não devem entrar em contacto com: locais de injeção cutânea dos doentes tratados, ou pústulas que possam ter-se desenvolvido na pele dos doentes tratados, pensos, vestuário e roupa de cama contaminados pelo contacto com locais de injeção ou pústulas cutâneas, nem com dispositivos médicos contaminados através do contacto com locais de injeção cutânea ou pústulas cutâneas:

- Pessoas com doenças de pele (eczema, dermatite atópica e doenças relacionadas)
- Indivíduos imunocomprometidos (deficiências graves na imunidade celular, incluindo doentes com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), recetores de transplantes de órgãos, neoplasias hematológicas)
- Mulheres grávidas ou a amamentar

Os indivíduos desses grupos “de risco” não serão elegíveis para a entrada no ensaio clínico proposto.

As pessoas a cargo do manuseamento de Pexa-Vec devem tomar as seguintes precauções:

- Estirpes de VV menos atenuadas do que Pexa-Vec levaram a danos oculares permanentes após contacto tóxico com a córnea ou a conjuntiva. Não há evidência de que Pexa-Vec possa induzir lesões semelhantes. Ainda assim, ao conduzir operações com o risco de formação de aerossóis ou salpicos de Pexa-Vec, terão de utilizar-se óculos de segurança com escudos laterais.
- A exposição de pele irritada ao vetor Pexa-Vec pode resultar em contaminação com o vetor. Por conseguinte, ao conduzir operações com o risco de formação de aerossóis ou salpicos de Pexa-Vec, terão de utilizar-se uma bata laboratorial e luvas padronizadas.

#### **B4. Avaliação do risco para o meio ambiente**

Os dados de libertação de partículas virais, recolhidos num estudo clínico com Pexa-Vec administrado por via IT (i.e. ensaio JX-594-IT-HEP001) demonstraram que não há libertação de partículas do vírus para o meio ambiente através da urina. Também não foi possível detetar o vírus em amostras de esfregaço faríngeo.

No presente ensaio clínico, os derrames de fluidos biológicos potencialmente contaminados serão manuseados de acordo com os procedimentos institucionais padronizados para o manuseamento de derrames de material potencialmente infeccioso. Os doentes que tenham desenvolvido uma pústula cutânea terão de evitar o contacto físico direto com pessoas dos grupos “de risco”. Deve seguir-se esta medida até à resolução da pústula. À semelhança das precauções exercidas pelos indivíduos com infeções respiratórias superiores, recomenda-se a utilização de máscaras faciais ou máscaras cirúrgicas pelos indivíduos que tenham desenvolvido pústulas orais até à resolução das pústulas orais.

Conforme referido acima, Pexa-Vec replica-se preferencialmente nas células em divisão ativa. Por conseguinte, prevê-se que o Pexa-Vec se propague sobretudo em células cancerosas.

Não há condições ambientais conhecidas ou previstas que possam afetar a sobrevivência, a multiplicação e a disseminação de Pexa-Vec. Pensa-se em geral que o VV não se encontra naturalmente no meio ambiente. Por conseguinte, não deverão ocorrer acontecimentos de recombinação do VV de tipo selvagem com o OGM. Os atuais estudos de estabilidade genética realizados no Pexa-Vec não detetaram revertidos espontâneos do Pexa-Vec. No entanto, caso se gerassem revertidos, estes revertidos seriam de VV de tipo selvagem, para o qual não surgiu qualquer preocupação ambiental durante a campanha de vacinação contra a varíola.

## C. CONCLUSÕES SOBRE O POTENCIAL IMPACTO AMBIENTAL DA LIBERTAÇÃO OU DA COLOCAÇÃO NO MERCADO DE OGM

A base da análise de risco para este tipo de produto é o facto de o VV ser não integrativo no ser humano. Este fenótipo é preservado no vetor Pexa-Vec. Além disso, as características replicativas e propagativas do VV foram atenuadas no Pexa-Vec, o que faz com que a replicação do vírus fique dependente de células em divisão ativa, como é o caso das células cancerígenas.

A terapêutica com um vírus em replicação pode teoricamente levar à libertação de partículas do vírus para o meio ambiente, e potencialmente para o público, ainda que se utilizem controlos neste ensaio para minimizar esta ocorrência. A informação clínica disponível até à data sugere que Pexa-Vec é seguro na dose clínica de  $1 \times 10^9$  UFP (10.000 vezes mais elevada do que a dose da vacina da varíola) e não se propagou aos prestadores de cuidados em contacto com os doentes tratados. Caso ocorra a libertação de partículas, o nível de exposição previsto seria baixo em comparação com as doses recebidas pelos doentes no ensaio proposto, e extremamente baixo em comparação com as doses de vacinas não atenuadas administradas ao público (por ex., vacina contra a varíola). Além disso, os indivíduos expostos com idade superior a 35 anos provavelmente já foram imunizados anteriormente com *Vaccinia*. Na eventualidade, altamente improvável, de um indivíduo exposto demonstrar toxicidade associada ao vírus, poderia iniciar-se terapêutica com VIG e/ou com cidofovir. Por conseguinte, os riscos para a saúde pública com este vírus são extremamente baixos e, de facto, devem ser mais baixos do que com os procedimentos de vacinação padronizados. Até à data, não foram publicados relatos de transmissão de recetores de *Vaccinia* para profissionais de saúde. Devem utilizar-se as abordagens de barreiras de rotina na enfermagem para os organismos infecciosos (por ex., como para *M. tuberculosis*, *Pseudomonas*).

A informação relativa ao risco para os contactos dos doentes e as orientações para a redução do risco de transmissão viral está contida no formulário de consentimento informado (FCI) e nas *Orientações relativas a Pexastimogene Devacirepvec (Pexa-Vec)* (também facultadas no Anexo B da Brochura do Investigador). O FCI será revisto com os doentes e o consentimento destes será obtido, por escrito, antes de serem submetidos a quaisquer procedimentos específicos do estudo. Será entregue aos doentes uma cópia assinada do FCI para que estes possam consultar novamente as orientações a qualquer altura. As *Orientações relativas a Pexastimogene Devacirepvec (Pexa-Vec)* (facultadas no Anexo B da Brochura do Investigador) serão dadas aos investigadores, farmacêuticos e a todo o pessoal envolvido no manuseamento do produto.

Não se prevê que a modificação genética do vírus resulte em qualquer alteração pós-libertação nas interações biológicas ou no leque de hospedeiros, nem em quaisquer efeitos conhecidos ou previsíveis em organismos não alvo no meio ambiente. Também não se prevê que a libertação do vírus recombinante resulte em qualquer aumento da patogenicidade em comparação com a estirpe de vírus parental e/ou em qualquer aumento na capacidade para se recombinar com outros vírus relacionados.

Por conseguinte, nas condições de utilização no ensaio clínico proposto, não se considera que Pexa-Vec represente um risco para o meio ambiente nem para a saúde pública.

## D. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 93/572/EEC. *Commission Decision 93/572/EC of 19 October 1993 concerning the placing on the market of a product containing genetically modified organisms pursuant to Article 13 of Council Directive 90/220/EEC*
- 2000/54/EC. *Directive 2000/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work*
- Arlen P., Tsang K.Y., Marshall J.L., Chen A., Steinberg S.M., Poole D., Hand P.H., Schlom J. and Hamilton J.M. "The use of a rapid ELISPOT assay to analyze peptide-specific immune responses in carcinoma patients to peptide vs. recombinant poxvirus vaccines." *Cancer Immunol Immunother.* (2000) 49(10): 517-529.
- Arness M.K., Eckart R.E., Love S.S., Atwood J.E., Wells T.S., Engler R.J., Collins L.C., Ludwig S.L., Riddle J.R., Grabenstein J.D. and Tornberg D.N. "Myopericarditis following smallpox vaccination." *Am J Epidemiol.* (2004) 160(7): 642-651.
- Bell J. "Biodistribution Study of Recombinant Vaccinia Virus JX-594 DNA in Rabbits." Study Report (Study Report JXR008. Alternative Study Report Reference: JX-594 QPCR -003A) (2007)
- Buller R., Smith G., Cremer K., Notkins A. and Moss B. "Decreased virulence of recombinant vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype." *Nature.* (1985) 317: 813-815.
- CDC. *US CDC (Biosafety in microbiological and biomedical laboratories (BMBL) 5th Edition, December 2009)* (2009)
- Christenson J.G. "Toxicity and Biodistribution Study of Recombinant Vaccinia Virus JX-594 in Rabbits." Study Report (Study Report CB06-5187-O-TX) San Francisco, (2008)
- Cole D.J., Wilson M.C., Baron P.L., O'Brien P., Reed C., Tsang K.Y. and Schlom J. "Phase I study of recombinant CEA vaccinia virus vaccine with post vaccination CEA peptide challenge." *Hum Gene Ther.* (1996) 7(11): 1381-1394.
- Cono J., Casey C.G. and Bell D.M. "Smallpox vaccination and adverse reactions. Guidance for clinicians." *MMWR Recomm Rep.* (2003) 52(RR-4): 1-28.
- Conry R.M., Allen K.O., Lee S., Moore S.E., Shaw D.R. and LoBuglio A.F. "Human autoantibodies to carcinoembryonic antigen (CEA) induced by a vaccinia-CEA vaccine." *Clin Cancer Res.* (2000) 6(1): 34-41.
- Davidson E.J., Boswell C.M., Sehr P., Pawlita M., Tomlinson A.E., McVey R.J., Dobson J., Roberts J.S., Hickling J., Kitchener H.C. and Stern P.L. "Immunological and clinical responses in women with vulval intraepithelial neoplasia vaccinated with a vaccinia virus encoding human papillomavirus 16/18 oncoproteins." *Cancer Res.* (2003) 63(18): 6032-6041.
- Fenner. "Vaccinia virus: the tool for smallpox eradication." *The Orthopoxviruses, Academic Press, Inc., New York, USA.* (1989): pp. 143-170.
- Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z. and Ladnyi D. *Smallpox and its Eradication.* Geneva, World Health Organization.(1988)
- Fenner F., Wittek R. and Dumbell K.R. *The orthopoxviruses.* San Diego, Calif: Academic Press Inc.(1989)
- Fields B.N. "Poxviruses. In: Fields Virology 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins." (1996): 2679-2689.
- Henderson D. and Moss B. "Smallpox and Vaccinia In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors." *Vaccines.* (1999) (3rd edition Philadelphia: Saunders): Chapter 6.
- Hughes C.M., Blythe D., Li Y., Reddy R., Jordan C., Edwards C., Adams C., Connors H., Rasa C., Wilby S., Russell J., Russo K.S., Somsel P., Wiedbrauk D.L., Dougherty C., Allen C., Frace M., Emerson G., Olson V.A., Smith S.K., Braden Z., Abel J., Davidson W., Reynolds M. and Damon I.K. "Vaccinia virus infections in martial arts gym, Maryland, USA, 2008." *Emerging infectious diseases.* (2011) 17(4): 730-733.
- Jolly D. "Viral vector systems for gene therapy." *Cancer Gene Ther.* (1994) 1(1): 51-64.

- Kretzschmar M., Wallinga J., Teunis P., Xing S. and Mikolajczyk R. "Frequency of adverse events after vaccination with different vaccinia strains." *PLoS Med.* (2006) 3(8): e272.
- Louie AY1, Hüber MM, Ahrens ET, Rothbächer U, Moats R, Jacobs RE, Fraser SE, Meade TJ. In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging. *Nature Biotechnology* (2000) Mar;18(3):321-5.
- McAneny D., Ryan C.A., Beazley R.M. and Kaufman H.L. "Results of a phase I trial of a recombinant vaccinia virus that expresses carcinoembryonic antigen in patients with advanced colorectal cancer." *Ann Surg Oncol.* (1996) 3(5): 495-500.
- MMWR. CDC. *Secondary and tertiary transfer of vaccinia virus among U.S. military personnel - United States and worldwide, 2002-2004. MMWR 2004.* 53.(2004): 103-105.
- MMWR. *Vaccinia virus infection after sexual contact with a military smallpox vaccinee.* Washington, Morb Mortal Wkly Rep.(2010) 59: 773-775.
- Moss B. *Poxviridae: The viruses and their replication.* In *Fields Virology*, D. M. Knipe.(2007)
- NIH. *NIH guidelines for research involving recombinant or synthetic nucleic acid molecules (NIH guidelines) November 2013*
- Parato K.A., Breitbach C.J., Le Boeuf F., Wang J., Storbeck C., Ilkow C., Diallo J.S., Falls T., Burns J., Garcia V., Kanji F., Evgin L., Hu K., Paradis F., Knowles S., Hwang T.H., Vanderhyden B.C., Auer R., Kirn D.H. and Bell J.C. "The Oncolytic Poxvirus JX-594 Selectively Replicates in and Destroys Cancer Cells Driven by Genetic Pathways Commonly Activated in Cancers." *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.* (2011).
- Puhlmann M., Brown C.K., Gnant M., Huang J., Libutti S.K., Alexander H.R. and Bartlett D.L. "Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy: biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant." *Cancer Gene Ther.* (2000) 7(1): 66-73.
- Sandvik T., Tryland M., Hansen H., Mehl R., Moens U., Olsvik O. and Traavik T. "Naturally occurring orthopoxviruses: potential for recombination with vaccine vectors." *J Clin Microbiol.* (1998) 36(9): 2542-2547.
- Smith G.L. and Moss B. "Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA." *Gene.* (1983) 25(1): 21-28.
- Smith G.L., Vanderplasschen A. and Law M. "The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus." *J Gen Virol.* (2002) 83(Pt 12): 2915-2931.
- Spagnoli G.C., Zajac P., Marti W.R., Oertli D., Padovan E., Noppen C., Kocher T., Adamina M. and Heberer M. "Cytotoxic T-cell induction in metastatic melanoma patients undergoing recombinant vaccinia virus-based immuno-gene therapy." *Recent Results Cancer Res.* (2002) 160: 195-201.
- Tsang K.Y., Zaremba S., Nieroda C.A., Zhu M.Z., Hamilton J.M. and Schlom J. "Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine." *J Natl Cancer Inst.* (1995) 87(13): 982-990.
- Vora S., Damon I., Fulginiti V., Weber S.G., Kahana M., Stein S.L., Gerber S.I., Garcia-Houchins S., Lederman E., Hruby D., Collins L., Scott D., Thompson K., Barson J.V., Regnery R., Hughes C., Daum R.S., Li Y., Zhao H., Smith S., Braden Z., Karem K., Olson V., Davidson W., Trindade G., Bolken T., Jordan R., Tien D. and Marcinak J. "Severe eczema vaccinatum in a household contact of a smallpox vaccinee." *Clin Infect Dis.* (2008) 46(10): 1555-1561.
- Wertheimer E.R., Olive D.S., Brundage J.F. and Clark L.L. "Contact transmission of vaccinia virus from smallpox vaccinees in the United States, 2003-2011." *Vaccine.* (2011).
- Young G.E., Hidalgo C.M., Sullivan-Frohman A., Schult C., Davis S., Kelly-Cirino C., Egan C., Wilkins K., Emerson G.L., Noyes K. and Blog D. "Secondary and tertiary transmission of vaccinia virus from US military service member." *Emerging infectious diseases.* (2011) 17(4): 718-721.