



## EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/22/12)

### Título del ensayo

Ensayo de fase I en abierto, de escalado de dosis de BI 1831169 en monoterapia y en combinación con ezabentimab en pacientes con tumores sólidos avanzados o metastásicos, del promotor Boehringer Ingelheim España, S.A

### Organismo modificado genéticamente

El OMG (BI 1831169 o VSV-GP) es un virus de la estomatitis vesicular (VSV) modificado genéticamente que porta la GP del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) en lugar de la glicoproteína nativa.

La glicoproteína del VSV es un determinante crítico del tropismo del VSV y se sabe que media en la infección de una amplia variedad de tipos de células eucariotas de una amplia gama de especies huésped. El pantropismo del VSV se debe a la expresión generalizada del receptor de LDL, que sirve como el principal puerto de entrada celular para el virus. La glicoproteína G del VSV también permite que el virus entre en las neuronas, donde la falta de respuesta del interferón conduce a una replicación viral descontrolada y a neurotoxicidad.

Se eligió la glicoproteína G de LCMV para sustituir a la proteína G del VSV, ya que se ha descrito que no permite la entrada en las neuronas. Se sabe que la glicoproteína de LCMV se une a los receptores de superficie, incluidos, entre otros, el  $\alpha$ -dístroglicano ( $\alpha$ DG), que es un receptor de superficie celular que se expresa de forma ubicua. Las propiedades de unión de la glicoproteína de LCMV y la disponibilidad de múltiples receptores alternativos hacen que exista una amplia gama de células y organismos huésped susceptibles.

### Organismo receptor

El VSV es un virus de ARN monocatenario negativo (ARNmc(-)) que pertenece al género de los vesiculovirus de la familia *Rhabdoviridae*. Al igual que otros virus de esta familia, el VSV tiene un virión con forma de bala que mide aproximadamente 70 por 180 nm, contiene alrededor de 11 kb de ARN genómico y está rodeado por una envoltura de bicapa lipídica que contiene peplómeros antigénicos, responsables de estimular la producción de anticuerpos neutralizantes. El genoma del VSV consta de cinco proteínas principales: nucleocápside o ribonucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), glicoproteína (G) y proteína grande o polimerasa (L). La proteína G forma picos en la envoltura y media en el reconocimiento y la fusión celular, lo que permite la entrada del virus. La proteína M participa en el ensamblaje viral y la gemación de partículas, así como en la prevención de la respuesta inmunitaria innata de la célula huésped. La proteína N interviene en el entorno del núcleo resistente a la ARNasa al respaldar el ensamblaje del genoma viral en el núcleo de la nucleocápside y regular el cambio de la síntesis del ARNm a la replicación del genoma. Las proteínas P y L se combinan para catalizar la reacción del ARN polimerasa dependiente de ARN para producir el patrón de cadena positiva, el ARN genómico y facilitar la transcripción de los ARNm en el orden secuencial de N-P-M-G-L.



Los VSV se clasifican por serotipos, que son similares en tamaño y morfología, pero generan distintos anticuerpos neutralizantes en animales infectados. Los dos serotipos distintos de VSV son Indiana y New Jersey. Los huéspedes naturales del VSV son principalmente el ganado bovino, los caballos y los cerdos domésticos, y raramente las ovejas, las cabras y los camélidos. Tanto en condiciones de laboratorio como de campo, se ha demostrado que la infección por VSV es posible en otras especies animales, como roedores y conejos. En general, debido a la glicoproteína del VSV, el tropismo del virus es amplio y se han notificado propiedades neurotrópicas de los VSV recombinantes en roedores y primates no humanos.

El VSV es un virus transmitido por artrópodos y la transmisión entre huéspedes naturales se produce a través de la picadura de flebótomos. La transmisión entre un huésped infectado y otro no infectado también puede ocurrir a través del contacto directo con una lesión activa que contiene una alta concentración de virus infeccioso ( $\sim 10^6$  TCID<sub>50</sub>), pero es poco probable que esto resulte en una difusión generalizada. En cuanto a la persistencia del virus en la naturaleza, se ha demostrado que se producen anticuerpos neutralizantes del virus no solo en el ganado doméstico sino también en muchas especies de animales salvajes. Sin embargo, aún no está claro cuál es el reservorio huésped natural definitivo, y tampoco se han determinado los ciclos de transmisión entre los vectores y la vida silvestre.

El VSV existe exclusivamente en el hemisferio occidental. Se mantiene en nichos ecológicos estables en América Central y del Sur y México y emerge de áreas tropicales para causar epidemias esporádicas en climas más fríos durante los meses de verano. El VSV no se considera un patógeno humano dado que rara vez induce enfermedades en humanos, con sólo síntomas mínimos y no representa una amenaza para comunidad en general, aunque se ha informado de que los humanos que viven en áreas enzoóticas tienen una alta tasa de seroprevalencia y de que el contacto íntimo con animales infectados puede conducir a la infección de humanos con síntomas similares a los de la gripe. Se cree que la transmisión a humanos se produce a través del contacto directo con lesiones activas o saliva que contiene VSV infeccioso. No se ha notificado que los seres humanos transmitan la infección a otros seres humanos o a los animales, aunque es probable que se produzca la transmisión a través de equipos, manos, guantes y ropa contaminados. Los veterinarios, los técnicos en sanidad animal, los cuidadores de ganado, el personal de laboratorio y otras personas que trabajan en contacto con animales infectados o con virus vivos corren un mayor riesgo. Sin embargo, la mayoría de las personas seropositivas no han tenido la enfermedad clínica o han tenido síntomas de la enfermedad mucho menos graves (por lo general, una enfermedad leve similar a la gripe). Se utilizó la infección por VSV que se produjo en la década de 1980 en el oeste de EE. UU. para examinar los patrones de infección humana y la prevalencia del serotipo de estomatitis vesicular de New Jersey. En este estudio, la prevalencia de anticuerpos neutralizantes fue significativamente mayor entre las personas expuestas con la enfermedad (23 %) que en las personas expuestas sin antecedentes de enfermedad clínica (7 %), y en general, la infectividad de este virus en los humanos durante la epizootia fue baja. Hasta la fecha, no se ha hecho ninguna referencia a la presencia de VSV en Europa.

Dado que la replicación de los rhabdovirus, incluido el VSV, se produce en el citoplasma y no incluye un paso de síntesis de ADN, existe un riesgo insignificante de integración en el genoma de los animales infectados. Además, dado que el VSV tiene un genoma monocatenario y siempre forma una estructura de nucleocápside, la recombinación con otros virus es muy poco probable y la posibilidad de riesgo asociada a la integración cromosómica, la recombinación y los reordenamientos, así como el establecimiento de persistencia, latencia o reactivación es extremadamente baja.



En las infecciones virales, el sistema inmunitario innato del huésped actúa como primera línea de defensa para evitar la invasión o replicación del virus, antes de que el sistema inmunitario adaptativo genere una protección más específica. En la respuesta inmune innata, participan los receptores de reconocimiento de patrones (PRR) para detectar componentes virales específicos, como el ARN o el ADN virales o los productos intermedios virales, y para inducir IFN de tipo I y otras citocinas proinflamatorias en las células infectadas y en otras células inmunitarias. Una vía de respuesta de IFN de tipo I funcional es un determinante clave de la oncoselectividad del VSV. El VSV no puede distinguir las células «normales» no malignas de las células cancerosas basándose en la expresión del receptor diferencial (receptor de LDL) o el estado del ciclo celular. Aunque las células normales pueden resultar infectadas por el VSV, reconocen la infección del virus y producen, secretan y responden a los IFN de tipo I que impiden la replicación del virus mediante la inducción de un estado antiviral en la célula infectada y en las células vecinas.

El VSV se inactiva con la luz solar y no permanece viable durante períodos prolongados en el medio ambiente, excepto en lugares frescos y oscuros. En condiciones de laboratorio, se han notificado infecciones adquiridas con VSV, y las superficies contaminadas con virus pueden representar una fuente potencial de transmisión e infección no deseadas. Se han evaluado las vías de inactivación y supervivencia del virus VSV en condiciones de laboratorio. El virus presentó el mayor potencial de supervivencia a baja temperatura (4 °C), en líquidos y demostró una supervivencia de hasta 48 h en superficies secas. Sin embargo, los agentes desinfectantes más habituales (alcoholes, aldehídos y detergentes) parecen ser muy eficaces para la inactivación del virus, así como la temperatura superior a 55 °C. Además, el VSV se inactiva fácilmente por exposición a formalina al 1 %, hipoclorito de sodio al 10 % y otros disolventes orgánicos (como: dióxido de cloro, etanol al 70 %, glutaraldehído al 2 %, carbonato de sodio al 2 %, hidróxido de sodio al 4 % y desinfectantes yodóforos al 2 %), así como cualquier otro desinfectante de uso común. También se inactivan por exposición a una temperatura de 58 °C durante 30 minutos.

#### Organismo donante

Virus de la coriomeningitis linfocítica (lymphocytic choriomeningitis virus, (LCMV).

El huésped natural del LCMV es el ratón doméstico (*Mus musculus*), pero también se han comunicado infecciones en roedores mascotas y humanos (Coriomeningitis linfocítica).

#### Modificación genética

El VSV-GP se obtuvo mediante la transfección de células HEK293T con un plásmido que contiene el genoma completo de VSV-GP en la que se sustituyó la secuencia de GP de VSV por una secuencia con optimización codónica de la GP de LCMV y el uso de cuatro plásmidos adicionales que contienen la secuencia de las proteínas esenciales para la replicación.

#### **Características del ensayo**

El promotor propone un período para la liberación de octubre 2022 a junio 2025.

Se administrarán distintas dosis del OMG BI 1831169  $5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^8$  y  $5 \times 10^9$  y  $5 \times 10^{10}$  TCID<sub>50</sub>.

La excreción del virus se evaluará en muestras recogidas de todos los pacientes que se hayan tratados (hisopos bucales, hisopos nasales, hisopos del punto de administración y orina) y se evaluarán mediante qPCR y cultivo viral.

En el ensayo participarán START Madrid – Fundación Jiménez Díaz y la Clínica Universidad de Navarra.



## **Evaluación del riesgo para la salud humana, animal y el medio ambiente**

### **-Patogenicidad**

Con respecto al potencial de neurotoxicidad, el riesgo de infección neurológica ya es bajo para el virus original. En 1988 se notificó un caso de encefalitis por VSVwt en un niño de 3 años que vivía en un país donde el VSVwt es endémico (y la mención de un segundo caso en la misma publicación). En el mismo artículo se notifica que los padres presentaban anticuerpos VSVwt y nunca experimentaron signos de infección.

Se ha demostrado experimentalmente que el intercambio de GP conduce a la anulación de la neurotoxicidad. Se inyectaron dosis crecientes de VSV-GP o de VSV directamente en el cerebro de ratones modelos de neurotoxicidad altamente sensibles.

Además, se realizaron análisis histopatológicos de los cerebros de los ratones inyectados intracranalmente con una variante de VSV o VSV-GP que expresaba proteína verde fluorescente (GFP). Como era de esperar, los ratones tratados con VSV-GFP mostraron focos de infección en el cerebro con un número significativo de células apoptóticas y células inflamatorias infiltradas. Por el contrario, los cerebros tratados con VSV-GP-GFP no mostraron células positivas para GFP en ninguna de las dosis probadas.

### **-Estabilidad**

Los datos de estabilidad genética del VSV-GP obtenidos demostraron una homología del 100 % con la secuencia de referencia.

La estabilidad genética del VSV-GP se confirmará mediante la secuenciación de cada lote de fármaco.

### **-Supervivencia, multiplicación y dispersión. Capacidad de colonización**

No hay datos clínicos relacionados con el VSV-GP en este momento. El promotor desarrolló un programa integral de seguridad preclínica para evaluar la seguridad y la biodistribución del VSV-GP. El material infeccioso vivo presente en la muestra se detectó mediante un ensayo basado en células.

No se detectó material infeccioso en distintas muestras de ratones sanos y ratones portadores de tumores a los que se administró el OMG.

En ratones portadores de tumores la excreción de material genómico fue más alta en los hisopos del punto de inyección del tumor 24 horas después de la administración y se mantuvo prevalente en el 40 % de las muestras de hisopos del punto de inyección del tumor analizadas a las 72 horas. La excreción de material genómico a través de los hisopos buconasales, la orina y las heces fue detectable en la mayoría de las muestras recolectadas a las dos horas (solo hisopos) y algunas muestras 24 horas después de la administración, pero fue negativo a las 72 horas. Ninguna muestra de orina o heces ni ningún hisopo buconasal contenía material infeccioso.

En ratones inmunocompetentes e inmunodeprimidos portadores de tumores no se detectó ningún VSV-GP replicativo en las muestras de excreción (heces, orina e hisopos nasales/anales/del punto de inyección) tras una única dosis del OMG. No se observó transmisión a ratones sanos alojados con ratones portadores de tumores a los que se administró el OMG.

No se detectó virus replicativo vivo en distintas muestras analizadas tras la administración del OMG a conejos, perros y cerdos.



Ervebo es un virus VSV Indiana recombinante que expresa la glucoproteína del Ebolavirus y que ha sido aprobado recientemente por la EMA y la FDA. Se confirman la eficacia y la seguridad de Ervebo en los ensayos clínicos, y se han evaluado los posibles impactos ambientales debidos al uso y la eliminación. De acuerdo con la excreción limitada en adultos, los resultados de un estudio de toxicidad en primates no humanos y la falta de transmisión horizontal en cerdos, el riesgo general de Ervebo para la salud humana y el medio ambiente se considera insignificante.

El VSV-IFN $\beta$ -NIS es un VSV oncolítico recombinante diseñado para expresar interferón-beta (IFN $\beta$ ) y el simportador de yoduro de sodio (NIS) y ahora se está evaluando en ensayos clínicos sobre diversos tumores. Recientemente se ha demostrado que este virus oncolítico VSV es seguro para los cuidadores, sin excreción viral, incluso con una mayor duración de la infusión. No se detectó excreción de virus infeccioso en excrementos biológicos de cerdos inoculados o cerdos no expuestos que se mantuvieron en contacto directo durante todo el experimento.

Las condiciones de inactivación del VSV-GP son las mismas que para su progenitor VSV; la pseudotipificación con GP del LCMV cambia el receptor utilizado para la entrada celular y no tiene impacto en la resistencia del virus a tratamientos físicos y químicos, por lo tanto, se aplican las mismas condiciones de inactivación.

El VSV es susceptible a todos los desinfectantes para virus con envoltura y se inactiva con ácido cresílico al 1 %, fenólicos, fenol clorado, fenol al 2,5 %, HCl al 0,4 %, ortofenilfenato 14 de sodio al 2 % e hipoclorito de sodio al 1 %. Se inactivan por calentamiento (60 °C, 30 min) y pueden sobrevivir temporalmente en superficies contaminadas.

Los datos de uso *in vitro* de VSV-GP demostraron que la pérdida de infectividad se produce al secarse; en una hora de condiciones de secado, los valores disminuyeron constantemente en >100 veces y el virus infeccioso ya no era detectable después de 24 horas, y para el virus mezclado en las heces los resultados muestran que la tenacidad del VSV-GP es muy baja. Por lo tanto, el riesgo de transmisión del VSV-GP como resultado de una contaminación no deseada es muy bajo.

### **-Capacidad de transmisión genética**

El VSV-GP es un virus de ARN monocatenario, que no utiliza ADN para replicarse. Dado que la replicación ocurre en el citoplasma, el genoma de ARN y el ADN del huésped humano no entran en contacto estrecho. En consecuencia, el riesgo de que los genes se transfieran del virus a los humanos se considera insignificante.

El genoma del VSV-GP está fuertemente unido por la nucleoproteína a una estructura llamada nucleocápside. Por esta razón, es poco probable que entre en contacto o intercambie información genética con otros virus.

### **Manipulación, control y tratamiento de residuos**

El vector clínico será almacenado en los centros que participan en el ensayo en zona con control de acceso.

La preparación de la solución para su administración se realizará también en zona de acceso controlado, en cabina de seguridad biológica siguiendo las instrucciones del Manual de Farmacia.

Las jeringas se trasladarán al lugar de administración un contenedor de plástico impermeable desechable.

La administración se hará o en una habitación privada de planta con acceso restringido.



Después del alta del paciente, las superficies potencialmente contaminadas (por ejemplo, el baño: grifo, inodoro, lavabo, etc.), los muebles de la habitación (mesa de noche, mesa, silla, suelo, pasamanos, etc.) deben desinfectarse siguiendo los procedimientos de limpieza locales aplicables.

Todos los derrames o el material sucio se tratarán según los procedimientos estándar para el material infeccioso/contaminado. El OMG es susceptible a todos los desinfectantes para virus con envoltura y se inactiva con ácido cresílico al 1 %, fenólicos, fenol clorado, fenol al 2,5 %, HCl al 0,4 %, ortofenilfenato de sodio al 2 % e hipoclorito de sodio al 1 %. Además, BI 1831169 se inactiva mediante autoclave (60 °C, 30 min).

Los residuos se gestionarán como residuos biopeligrosos.

Las muestras recogidas de los pacientes deben ser manipuladas de acuerdo con las normas especificadas de los centros como potencialmente infecciosas aplicando medidas para nivel de bioseguridad 2

Se informará a los pacientes que participan en el ensayo de las medidas que deben adoptar para evitar la diseminación del OMG.

**En el caso de que se produzca cualquier incidencia o accidente se deberá informar de manera inmediata a la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB) y al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG).**

**CONCLUSIÓN:** Se considera que en el estado actual de conocimientos y con las medidas de uso propuestas, este ensayo clínico no supone un riesgo significativo para la salud humana, la salud animal y/o el medio ambiente.

Una vez concluido el ensayo, se remitirá un informe de resultados del mismo al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG) y a la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB), siguiendo el modelo de informe de resultados elaborado por la CNB, que se encuentra disponible en la [web del MITECO](#). En este informe se deberá incluir información sobre las posibles incidencias, si las hubiera. La remisión de esta información será condición indispensable para la concesión de futuras autorizaciones de ensayos con organismos modificados genéticamente.

Madrid, a 22 de septiembre de 2022