



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

		Número notificação	
		Data entrada	
		Data da autorização	
Taxa aplicável	Valor (euros)	Data Emissão	Data pagamento
<i>(a preencher pela Agência Portuguesa do Ambiente)</i>			

Formulário de Notificação

para Libertação Deliberada no Ambiente de OGM com exceção das plantas superiores

A apresentar à APA, para efeitos de cumprimento do artigo 5.º do Decreto-Lei n.º 72/2003, de 10 de abril, o qual deverá ser acompanhado da respetiva avaliação dos riscos ambientais (de acordo com anexo II do referido Decreto-Lei) e do resumo da notificação (de acordo com a Decisão do Conselho n.º 2002/813/CE, de 3 de outubro).

I) Informações gerais

Nome do notificador

Diana Ferreira
PPD Global Ltd – Sucursal em Portugal

em representação de:
SillaJen Inc.,
450 Sansome St, Suite 650
São Francisco,
CA 94111
EUA

NIPC

980374626

Endereço

Avenida da Liberdade, 180 A, 4.º Dto.
1250-146 Lisboa, Portugal

Telefone

21 356 91 10

Fax

21 356 91 11

E-mail

diana.ferreira@ppdi.com

**Nome do(s) cientista(s)
responsável(eis)**

Em Portugal, os cientistas responsáveis (Investigadores Principais) serão:
- Dra. Maria Fragoso – Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, EPE
- Dr. Filipe Calinas – Centro Hospitalar de Lisboa Central, EPE, Hospital de Santo António dos Capuchos
- Dr. Nuno Bonito – Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil Centro Regional de Coimbra, EPE
- Dr. Armando Carvalho – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, EPE, Hospitais da Universidade de Coimbra
- Dra. Ana Castro – Centro Hospitalar do Porto, Hospital de Santo António



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

		Número notificação	
		Data entrada	
		Data da autorização	
Taxa aplicável	Valor (euros)	Data Emissão	Data pagamento
<i>(a preencher pela Agência Portuguesa do Ambiente)</i>			

**Qualificações do(s)
cientista(s)
responsável(eis)**

- Dra. Maria Fragoso – médica especialista em oncologia
- Dr. Filipe Calinas – médico especialista em gastroenterologia
- Dr. Nuno Bonito – médico especialista em oncologia
- Dr. Armando Carvalho – médico especialista de medicina interna
- Dra. Ana Castro - médica especialista em oncologia

**Experiência do(s)
cientista(s)
responsável(eis)**

Por favor consultar os CVs em anexo.

Título do projeto

“Ensaio de fase 3 Aleatorizado, em Regime Aberto, de Comparação de Pexa-Vec (vírus Vaccinia com GM-CSF / Timidina Cinase Desativada) Seguido de Sorafenib Versus Sorafenib em Doentes com Carcinoma Hepatocelular (CHC) Avançado sem Terapêutica Sistémica Prévia”



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

II) Informações relativas ao OGM

O material do ensaio clínico ou medicamento experimental (ME) é uma suspensão viral do vírus recombinante Pexa-Vec (anteriormente designado como JX-594), que é um organismo geneticamente modificado (OGM). O Pexa-Vec é um vírus de Vaccinia (VV) oncolítico replicativo, derivado da estirpe da vacina comercial habitualmente utilizada, da Wyeth. O Pexa-Vec contém três modificações genéticas comparativamente à estirpe Wyeth selvagem: 1) disrupção do gene da timidina cinase (TK) vírica através de 2) inserção do gene do fator estimulador de colónias de macrófagos e granulócitos humano (hGM-CSF) e 3) inserção do gene LacZ.

A) Características do a) dador, b) recetor, ou c) se pertinente, organismo parental

II. A. a) Do Dador

Há duas sequências de interesse (i.e. os genes hGM-CSF e LacZ) inseridas no gene TK do VV. A informação indicada abaixo é relativa aos organismos dadores e às sequências de interesse.

Nome científico	Dador de hGM-CSF: <i>Homo sapiens</i> Dador de LacZ: <i>Escherichia coli</i>
Taxonomia	Dador de hGM-CSF: Não aplicável Dador de LacZ: Bacteria, filo: Proteobacteria, família: Enterobacteriaceae
Outros nomes (designação comum, nome da estirpe, etc.)	Dador de hGM-CSF: Não aplicável Dador de LacZ: Bacteria, filo: Proteobacteria, família: Enterobacteriaceae.
Marcadores fenotípicos e genéticos	Informação confidencial
Grau de parentesco entre o dador e o recetor ou entre os organismos parentais	Não há nenhum grau de parentesco entre os dadores e o recetor
Descrição das técnicas de identificação e deteção	Informação confidencial.
Sensibilidade, fiabilidade (em termos quantitativos) e especificidade das técnicas de deteção e identificação	O método de sequenciação é um método qualitativo de identificação dos genes de interesse.
Descrição da distribuição geográfica e do habitat natural do organismo, incluindo informação sobre os seus predadores, presas, parasitas e concorrentes, simbioses e hospedeiros naturais	Dador de hGM-CSF: <i>Homo sapiens</i> Dador de LacZ: <i>E. coli</i> é uma bactéria Gram-negativa que está habitualmente presente nos intestinos de seres humanos e de outros animais. A maioria das estirpes de <i>E. coli</i> é inofensiva, mas há exceções, com estirpes que causam diarreia grave. Os sintomas mais frequentes de infeção por <i>E. coli</i> são cólicas abdominais e diarreia. Num caso não complicado, a doença deverá recuperar em cerca de 5 a 10 dias sem qualquer tratamento antibiótico. Na prática de rotina, o tratamento antibiótico terá de ser iniciado empiricamente com base no local e gravidade da infeção e posteriormente modificado com base nos testes de suscetibilidade aos antibióticos.



Organismos em relação aos quais se sabe da ocorrência de transferência de material genético em condições naturais

Desconhece-se.

Verificação da estabilidade genética do organismo e dos fatores que a afetam

A estabilidade genética das sequências hGM-CSF e LacZ foi determinada no contexto do OGM Pexa-Vec (ver secção "Pureza da sequência inserida, em termos de ausência de sequências desconhecidas, e informação que indique em que medida a sequência inserida se limita ao DNA necessário para executar a função pretendida").

Características patológicas, ecológicas e fisiológicas:

Classificação do risco de acordo com as regras comunitárias em vigor para a proteção da saúde humana e ou do ambiente

Dador de hGM-CSF: Não aplicável

A citocina hGM-CSF foi escolhida por ser o estimulador mais potente da imunidade anti-tumoral sistémica entre muitos testados (Dranoff G. et al., 1993), provavelmente devido à sua capacidade única para promover a diferenciação de precursores hematopoiéticos em células dendríticas (Pardoll D.M., 1995). As células dendríticas são células apresentadoras de antígeno profissionais, que conseguem captar e apresentar antígenos libertados pelo tumor à medida que as células tumorais são mortas pelo VV.

Foi demonstrado que a expressão de hGM-CSF por um VV oncolítico com o gene TK inativado aumenta a eficácia do hGM-CSF contra os tumores primários de grande dimensão e contra as metástases pulmonares difusas num modelo tumoral em coelhos (Kim J.H. et al., 2006) (Lee J.H. et al., 2010) (Thorne S.H. et al., 2007).

Desta forma, o gene hGM-CSF é considerado um componente crítico da construção de Pexa-Vec para estimular a resposta imunitária contra as células cancerígenas.

Dador de LacZ: E. coli foi classificado como sendo um agente biológico do Grupo 2, na classificação da União Europeia (UE) para a protecção dos trabalhadores contra agentes biológicos (2000/54/CE) e como sendo um organismo do grupo de risco 2 segundo as orientações dos Institutos Nacionais de Saúde (NIH) dos EUA.

O gene LacZ codifica a β -galactosidase, que é uma enzima hidrolase que catalisa a hidrólise dos β -galactosídeos em monossacarídeos.

Por último, a literatura (Louie A.Y. et al., 2000) refere uma nova classe de agentes de contraste para ressonância magnética (RM) como sendo promissora, tendo por base o marcador genético β -galactosidase, frequentemente utilizado. A incorporação deste gene na construção do Pexa-Vec irá ainda permitir aos médicos obter imagens mais exatas do tumor e monitorizar a eficácia da terapêutica, bem como aumentar o potencial para detetar tumores distais infetados pelo Pexa-Vec.

Tempo de geração em ecossistemas naturais, ciclo de reprodução sexuada e assexuada

Não aplicável

Informação sobre a sobrevivência, incluindo a sazonalidade e a capacidade para formar estruturas de sobrevivência

Não aplicável.



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

Patogenicidade: inafetividade, toxigenicidade, virulência, alergenicidade, vetor de agentes patogénicos, vetores possíveis, gama de hospedeiros, incluindo organismos que não o organismo alvo.

Possibilidade de ativação de vírus latentes (provírus). Capacidade para colonizar outros organismos

Resistência aos antibióticos e potencial utilização destes no ser humano e nos organismos domésticos para fins profiláticos e terapêuticos

Participação em processos ambientais: produção primária, utilização de nutrientes, decomposição de matéria orgânica, respiração, etc.

Natureza dos vetores nativos:

Sequência

Não aplicável.

Frequência de mobilização

Não aplicável.

Especificidade

Não aplicável.

Presença de genes que conferem resistência

Não aplicável.

Historial de modificações genéticas anteriores

Não há história de modificações genéticas anteriores relativamente à sequência de codificação do hGM-CSF e ao gene LacZ.

II. A. b) Do Recetor

Nome científico

Virus de Vaccinia (VV).

Taxonomia

Orthopoxvirus.

Outros nomes (designação comum, nome da estirpe, etc.)

Estirpe Wyeth (i.e. estirpe da vacina Dryvax® contra a varíola).



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

Marcadores fenotípicos e genéticos

O VV é um membro da família Poxviridae (género Orthopoxvirus). As suas principais características são: um virião complexo, grande, que codifica os muitos genes necessários para a replicação e transcrição virais; um genoma composto por uma única molécula de DNA linear, de cadeia dupla; e a transcrição e replicação que ocorrem dentro no compartimento citoplasmático da célula (Moss B., 1990). O VV tem uma gama alargada 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® foi derivada, tem uma baixa patogenicidade no ser humano (Fenner F. et al., 1988).

Grau de parentesco entre o dador e o recetor ou entre os organismos parentais

Não há nenhum grau de parentesco entre os dadores e o recetor.

Descrição das técnicas de identificação e deteção

Não aplicável. O vírus recombinante é purificado através de placas. As placas selecionadas são as que aparecem coloridas, uma vez que contêm exclusivamente os recombinantes que expressam β -galactosidase (ver secção "Métodos utilizados para a construção e introdução da(s) sequência(s) no recetor ou para a deleção de uma sequência").

Sensibilidade, fiabilidade (em termos quantitativos) e especificidade das técnicas de deteção e identificação

Não aplicável (ver secção anterior).

Descrição da distribuição geográfica e do habitat natural do organismo, incluindo informação sobre os seus predadores, presas, parasitas e concorrentes, simbioses e hospedeiros naturais

Desconhece-se a ecologia do VV. Pensa-se em geral que o VV não se encontra naturalmente no meio ambiente.

Organismos em relação aos quais se sabe da ocorrência de transferência de material genético em condições naturais

Uma vez que o VV não se encontra no meio ambiente, não há nenhum perigo óbvio de recombinação com o vírus de tipo selvagem. O VV é capaz de recombinação com sequências homólogas de DNA; no entanto, não surgiu nenhuma preocupação especial durante a campanha de vacinação contra a varíola, durante a qual se administrou o vírus de tipo selvagem a centenas de milhões de pessoas.

Verificação da estabilidade genética do organismo e dos fatores que a afetam

Os vírus DNA de cadeia dupla, como o VV, apresentam tipicamente taxas de mutação muito baixas de uma passagem para a outra (Nalca A. and Zumbrun E., 2010). Dryvax®, a partir do qual se preparou o vírus Pexa-Vec, é uma população mista de clones de Vaccinia.



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

Características patológicas, ecológicas e fisiológicas:

Classificação do risco de acordo com as regras comunitárias em vigor para a proteção da saúde humana e ou do ambiente

Em termos da classificação de perigo, o VV é considerado como sendo um agente biológico do Grupo 2, segundo a Diretiva 2000/54/CE. 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 NIH dos EUA.

Tempo de geração em ecossistemas naturais, ciclo de reprodução sexuada e assexuada

Ver a secção "Descrição da distribuição geográfica e do habitat natural do organismo, incluindo informação sobre os seus predadores, presas, parasitas e concorrentes, simbioses e hospedeiros naturais"

Informação sobre a sobrevivência, incluindo a sazonalidade e a capacidade para formar estruturas de sobrevivência

Ver a secção "Descrição da distribuição geográfica e do habitat natural do organismo, incluindo informação sobre os seus predadores, presas, parasitas e concorrentes, simbioses e hospedeiros naturais"



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

Patogenicidade: inafetividade, toxigenidade, virulência, alergenicidade, vetor de agentes patogénicos, vetores possíveis, gama de hospedeiros, incluindo organismos que não o organismo alvo.

Possibilidade de ativação de vírus latentes (provírus).

Capacidade para colonizar outros organismos

Não existe um hospedeiro reservatório natural conhecido do VV. Já foram infetados pelo VV seres humanos, vacas, búfalos, camelos, raposas, texugos, porcos, etc. Contudo, acredita-se que o VV não produz infeção latente e que, após o aparecimento da infeção, o vírus é rapidamente eliminado do hospedeiro.

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 (SC) 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. O VV pode causar reações locais, incluindo eritema, edema e reações sistémicas, como a febre e o mal-estar, conforme se observou com a vacinação convencional contra a varíola. Durante a campanha de vacinação contra a varíola, ocorreram complicações graves em menos de 1 em 4000 indivíduos, sobretudo em indivíduos imunossuprimidos 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). Estudos recentes de vacinas contra a varíola identificaram lesões cardíacas, incluindo pericardite e miocardite, como sendo um risco potencial (Halsell J.S. et al., 2003).

Alguns indivíduos foram identificados como estando em risco acrescido de acontecimentos adversos graves:

- Mulheres grávidas ou a amamentar
- Crianças de idade inferior a 12 meses
- Pessoas com doenças cutâneas de tipo esfoliativo (por ex., eczema grave, dermatite ectópica ou problemas cutâneos semelhantes) que exijam terapêutica sistémica
- Pessoas com imunodeficiência significativa devido a uma doença subjacente (por ex., VIH/SIDA) e/ou devido a medicação (por ex., corticosteróides sistémicos ou outras medicações imunossupressoras, incluindo cortisona, dexametasona, hidrocortisona, prednisona, prednisolona, interferão, cisplatina, doxorubicina, fluorouracilo, etc.).

Os doentes e profissionais de saúde nesses grupos "de risco" serão excluídos da participação no ensaio clínico proposto.

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 CDC nos EUA para determinadas reações graves à vacina da varíola.

A replicação do VV ocorre exclusivamente no citoplasma, eliminando-se assim qualquer risco de integração do DNA viral no genoma do hospedeiro (Moss B., 2007).

Resistência aos antibióticos e potencial utilização destes no ser humano e nos organismos domésticos para fins profiláticos e terapêuticos

Não aplicável.

Participação em processos ambientais: produção primária, utilização de nutrientes, decomposição de matéria orgânica, respiração, etc.

Não aplicável.



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

Natureza dos vetores nativos:

Sequência

Não aplicável.

Frequência de mobilização

Não aplicável.

Especificidade

Não aplicável.

Presença de genes que conferem resistência

Não aplicável.

Historial de modificações genéticas anteriores

Não aplicável.

II. A. c) Do organismo parental

O organismo parental é o recetor descrito na secção II. A. b).

B) Características do vetor

Natureza e origem do vetor

Informação confidencial.

Sequência dos transposões, dos vetores e de outros segmentos genéticos não codificantes utilizados para construir o OGM e nele fazer funcionar o vetor e a sequência inserida

Os segmentos genéticos utilizados para elaborar o OGM não foram sequenciados antes da sua inserção no recetor.

Frequência de mobilização do vetor inserido e ou capacidade de transferência genética, bem como métodos para a respetiva determinação

Informação confidencial.

Informação que indique em que medida o vetor se limita ao DNA necessário para executar a função pretendida

Informação confidencial.

C) Características do organismo modificado

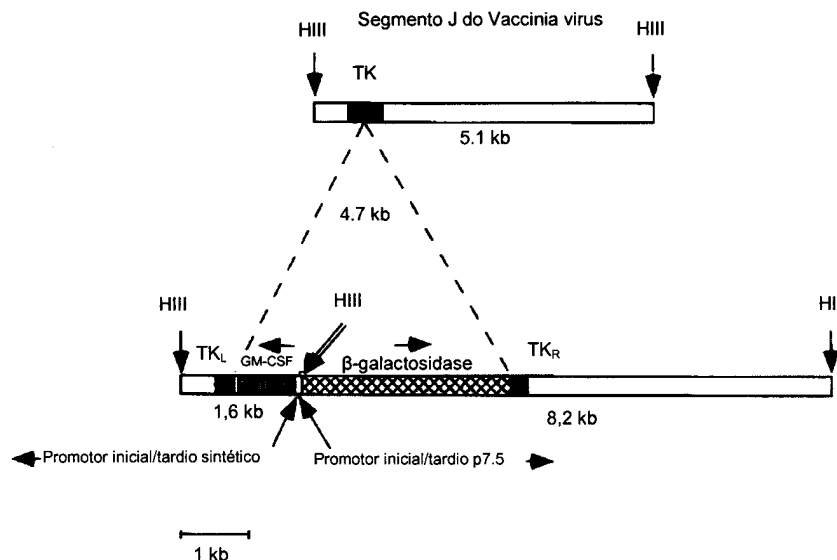
O Pexa-Vec é um organismo geneticamente modificado. É um VV recombinante oncolítico replicativo derivado da estirpe Wyeth. O vírus Pexa-Vec contém três modificações genéticas comparativamente à estirpe Wyeth de tipo selvagem: 1) interrupção do gene da timidina cinase (TK) através de 2) inserção do gene do fator estimulador de colónias de macrófagos e granulócitos humano (hGM-CSF) e 3) inserção do gene LacZ.

Informações relativas à modificação genética:**Métodos utilizados para a modificação**

Informação confidencial.

Métodos utilizados para a construção e introdução da(s) sequência(s) no recetor ou para a deleção de uma sequência

A estrutura do vírus recombinante encontra-se esquematizada na Figura 1.



O fragmento "J" da enzima de restrição Hind III, de 5,1 kb, e a posição do gene TK de VV estão indicados na parte superior. A recombinação homóloga no gene TK de Vaccinia de sequências do plasmídeo de recombinação pSC65/hGM-CSF, que transportou os genes de hGM-CSF e de β-galactosidase, separou o gene TK em duas sequências (TKL e TKR) que flanqueiam a inserção de hGM-CSF-β-galactosidase (GM-bg) (Mastrangelo M.J. et al., 1998).

Figura 1: Estrutura de Pexa-Vec**Descrição da sequência inserida e ou da construção do vetor**

A transcrição dos genes codificados no genoma de VV ocorre no citoplasma da célula hospedeira e requer maquinaria de transcrição transportada e codificada viralmente. Por conseguinte, quaisquer genes estranhos terão de estar sob o controlo dos promotores de Vaccinia para serem transcritos por esta maquinaria.

Pureza da sequência inserida, em termos de ausência de sequências desconhecidas, e informação que indique em que medida a sequência inserida se limita ao DNA necessário para executar a função pretendida

Os elementos genéticos da cassette de expressão de Pexa-Vec foram sequenciados após a amplificação por PCR (Bell J. et al., 2008).

Métodos e critérios de seleção

Informação confidencial.



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

Sequência, identidade funcional e localização do(s) segmento(s) de ácidos nucleicos modificado(s)/inserido(s)/suprimido(s) em causa, com especial referência a eventuais sequências prejudiciais conhecidas

A caracterização molecular do vírus recombinante demonstrou a estrutura prevista do genoma. A comparação dos Southern blots de DNA dos Vaccinia virus parentais e recombinantes digerido com HindIII, utilizando o gene hGM-CSF como sonda, demonstrou a introdução dos genes de hGM-CSF e de β -galactosidase no genoma.

Demonstrou-se a atividade biológica incubando fluido de cultura de células inoculadas com o vírus recombinante com a linha celular Mo7e dependente de GM-CSF, utilizando GM-CSF recombinante como padrão (Avanzi G.C. et al., 1988) (Tada H. et al., 1986). A infeção de 106 células 143B gerou aproximadamente 105 unidades de GM-CSF, ou 0,1 unidade/célula.

Através destas análises, identificaram-se a estrutura e as propriedades bioquímicas e funcionais do vírus Pexa-Vec recombinante.

Não há nenhuma sequência nociva inserida no vírus Pexa-Vec. Ver secções "Descrição da sequência inserida e ou da construção do vetor" e "Pureza da sequência inserida, em termos de ausência de sequências desconhecidas, e informação que indique em que medida a sequência inserida se limita ao DNA necessário para executar a função pretendida".

Informações sobre o OGM na sua forma final:

Descrição da(s) característica(s) genética(s) ou fenotípicas e, em especial, de quaisquer novas características que possam passar a exprimir-se ou a deixar de se exprimir

O OGM final é o vírus Pexa-Vec em suspensão. O OGM final tem os mesmos traços genéticos ou características fenotípicas que o vírus Pexa-Vec recombinante. Devido à inserção dos transgenes, o gene TK de Pexa-Vec é inativado (ver secção II.A.b) 4). Isto diminui a virulência do vírus, restringindo a sua replicação às células em proliferação. Isto também está direcionado para a disseminação dos vírus nos tumores.

Estrutura e quantidade de qualquer ácido nucleico do vetor e ou do dador que resulte como produto residual da construção do organismo modificado

Ver secção C)

Estabilidade do organismo em termos de características genéticas

Desenvolveram-se três ensaios, que podem ser implementados para confirmar a estabilidade genética. Os resultados mostram que a estabilidade genética é comparável de um lote clínico para o outro.



AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE

Taxa e nível de expressão do novo material genético. Método e sensibilidade da medição

As medições do título infeccioso, genomas virais, integridade genética, atividade oncolítica, expressão da β -galactosidase e expressão de hGM-CSF podem realizar-se no material do ensaio clínico.

Título infeccioso

A inafetividade de Pexa é medida num ensaio com placas de diluições de vírus em placas sobre células de osteossarcoma U2OS.

Genomas virais

Informação confidencial.

Mapa de restrição

Ver secção “Estabilidade do organismo em termos de traços genéticos”.

Atividade oncolítica

Dado que a oncólise é um mecanismo de ação primário do Pexa-Vec, desenvolveu-se um ensaio EC50 utilizando células U2OS para determinar a atividade de eliminação de células tumorais pelo vírus. Este teste permite demonstrar uma atividade oncolítica consistente entre lotes de Pexa-Vec.

Expressão da B-galactosidase

Ver secção “Estabilidade do organismo em termos de traços genéticos”.

Expressão de hGM-CSF

A estimulação do sistema imunitário com hGM-CSF também é um mecanismo de ação importante de Pexa-Vec. Desenvolveu-se um ensaio de expressão de hGM-CSF para demonstrar a expressão consistente de hGM-CSF entre lotes de Pexa-Vec.

Atividade da(s) proteína(s) expressa(s)

Para além dos ensaios descritos na secção “Taxa e nível de expressão do novo material genético. Método e sensibilidade da medição”, desenvolveram-se testes para avaliar a atividade ou a presença das proteínas expressas.

Bioatividade do hGM-CSF

Uma vez que a estimulação do sistema imunitário com hGM-CSF é provavelmente um mecanismo de ação adicional de Pexa-Vec, é importante verificar se a bioatividade da proteína hGM-CSF se mantém em cada uma das etapas do processo de fabrico.

Descrição das técnicas de identificação e deteção, incluindo as técnicas de identificação e deteção da sequência inserida e do vetor

Estão implementadas várias técnicas para a identificação e deteção das sequências inseridas:

– **Identidade e estabilidade genética**

Informação confidencial.

– **Identidade da estirpe de VV**

Informação confidencial.

- **Caracterização da inserção genética por PCR**

Ver secção “Pureza da sequência inserida, em termos de ausência de sequências desconhecidas, e informação que indique em que medida a sequência inserida se limita ao DNA necessário para executar a função pretendida”

Sensibilidade, fiabilidade (em termos quantitativos) e especificidade das técnicas de deteção e identificação

A identidade e estabilidade genética, bem como a caracterização da inserção genética por PCR são métodos qualitativos.

Utilizou-se um método de Q-PCR para confirmar a identidade da estirpe de VV (ver secção “Taxa e nível de expressão do novo material genético. Método e sensibilidade da medição”).



AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE

**Antecedentes de libertações
ou utilizações do mesmo OGM**

A informação sobre libertações anteriores do OGM é a apresentada na secção que se segue.

Antes de ser administrado aos doentes, a farmacologia e toxicologia de Pexa-Vec foram investigadas em ratinhos, ratos e coelhos, conforme descrito abaixo (ver secções "Efeitos tóxicos ou alergénicos dos OGM e ou dos seus produtos metabólicos" e "Outros riscos").

Pexa-Vec entrou em desenvolvimento clínico em 1996. Até à data, mais de 306 doentes (incluindo 7 doentes em uso compassivo) foram tratados com Pexa-Vec administrado através de injeção intratumoral (IT) direta e/ou perfusão intravenosa (IV) em 13 protocolos de investigação clínica.

Estudo clínico do melanoma, de Fase I (Mastrangelo M.J. et al., 1998):

Pexa-Vec foi bem tolerado no ensaio clínico de Fase I, de novo medicamento experimental (IND) promovido pelo investigador, em sete doentes com melanoma metastático revacinados, que receberam múltiplas injeções IT. As injeções foram administradas duas vezes por semana durante um mínimo de seis semanas, até cerca de seis meses. Cinco de sete (71%) doentes apresentaram respostas tumorais no local da injeção, incluindo duas respostas completas (uma levou a ressecção cirúrgica completa). A expressão de GM CSF e a infiltração de linfócitos T foram documentadas em biopsias tumorais. Quatro doentes do ensaio apresentavam metástases dérmicas no momento da entrada no ensaio, que não foram subsequentemente injetadas. As metástases dérmicas que não foram diretamente injetadas regrediram nestes quatro doentes. Estes resultados sugerem que a viroterapia oncolítica, e especificamente o Pexa-Vec, tem o potencial de tratar a doença metastática distante. Dois doentes permaneceram livres de doença durante pelo menos um ano e meio e seis anos após o tratamento, enquanto a mediana da esperança de vida para estes doentes antes do tratamento com Pexa-Vec estava estimada em seis a nove meses.

Estudo clínico JX594-IT-HEP001:

Um estudo de Fase I, de escalonamento da dose de Pexa-Vec administrado por múltiplas injeções IT em doentes com tumor(es) sólido(s) refratário(s) situados no fígado realizou-se na Coreia do Sul e foi concluído em 2007 (Park B.H. et al, 2008). Pexa-Vec foi injetado em 1-3 tumores sob orientação radiográfica a cada três semanas até à progressão do(s) local(ais) da injeção ou até o doente ter recebido 2 tratamentos. Podiam administrar-se seis ciclos adicionais aos doentes com resposta objetiva do(s) tumor(es) injetado(s) ou com benefício clínico (i.e. era possível fazer oito tratamentos no máximo). Os níveis da dose do estudo foram de 1 x 10⁸ UFP (coorte 1), 3 x 10⁸ UFP (coorte 2), 1 x 10⁹ UFP (coorte 3) e 3 x 10⁹ UFP (coorte 4) por tratamento. Utilizaram-se as orientações padronizadas para o escalonamento da dose na Fase I, com 2 a 6 doentes incluídos por coorte (3 se não tivessem sido notificadas toxicidades limitadoras da dose (DLT)). O estudo mostrou que múltiplas injeções IT de Pexa-Vec em tumores hepáticos primários ou metastáticos foram em geral bem toleradas. A dose máxima tolerada foi identificada aos 1 x 10⁹ UFP sendo a hiperbilirrubinemia direta a toxicidade limitadora da dose, observada em 2 doentes a 3 x 10⁹ UFP. A segurança foi aceitável no contexto da replicação de Pexa-Vec, expressão de GM CSF, disseminação sistémica e Pexa-Vec apresentou efeitos anti-tumorais contra vários carcinomas refratários.

Estudo clínico JX594-IT-MEL005:

Realizou-se um estudo de Fase I/II de Pexa-Vec nos doentes com melanoma maligno irressecável de estadió 3/4, nos Estados Unidos (EUA), que se encontra concluído (Hwang T.H. et al., 2011). Dez doentes foram tratados a uma dose de 1 x 10⁸ UFP por tratamento semanalmente, durante um total de seis tratamentos. Os dados de segurança indica que Pexa-Vec foi bem tolerado nos doentes do estudo. Não foram notificados acontecimentos adversos graves (AAG) nem DLT relacionados com o tratamento, apesar de uma contagem aumentada de leucócitos após o tratamento. Foram notificados dois AAG não relacionados (compressão da espinal medula e esofagite aguda).

Foi demonstrada doença estável, segundo os critérios RECIST, nos locais tumorais injetados em todos os doentes avaliáveis (5). Três doentes apresentaram uma resposta parcial num tumor não injetado.

Estudo clínico JX594-IT-HEP007:

Concluiu-se um ensaio aleatorizado de Fase 2, de determinação da dose de Pexa-Vec em 30 doentes com cancro hepático (CHC). Pexa-Vec foi administrado por injeção IT a cada 2 semanas, para 3 doses no total, em doentes com tumores injetáveis no fígado. Os doentes foram aleatorizados para receber uma dose ou 1 x 10⁸ UFP (Braço A) ou 1 x 10⁹ UFP (Braço B).

Pexa-Vec foi bem tolerado nos doentes do estudo, sendo a maior parte dos AA de intensidade ligeira a moderada. Os AA mais frequentes relacionados com o tratamento com Pexa-Vec, identificados como percentagem do total de doentes tratados, incluíram os seguintes, geralmente ligeiros a moderados: pirexia (97%), calafrios (80%), náusea (43%), vómitos (43%), cefaleia (33%), doença de tipo gripal (27%), dor no local da injeção (23%) e hipertensão (20%).

Para a coorte de dose baixa, os AA de Grau 3 relacionados com o tratamento incluíram: hipertensão, astenia, dispneia, hiperbilirrubinemia, linfopenia (2), aumento da aspartato aminotransferase (2) e diminuição da contagem de leucócitos. Não foram notificados AA de Grau 4 ou de Grau 5 relacionados com o tratamento. Para a coorte de dose elevada, os AA de Grau 3 relacionados com o tratamento incluíram: pirexia (3), hiperbilirrubinemia, desidratação, hiponatremia, hipofosfatasia e diminuição da contagem de linfócitos. Não foram notificados AA de Grau 4 ou de Grau 5 relacionados com o tratamento.

Acontecimentos transitórios, ligeiros a moderados, como citopenia, hipocalcemia, hiperglicemia e elevações de AST/ALT foram frequentes após o tratamento. A maioria destas alterações ocorreu e resolveu-se, regressando aos valores basais, no prazo de 1 semana após o tratamento. Em geral, estas alterações laboratoriais não estiveram associadas a AA clinicamente significativos. As alterações, ligeiras a moderadas, nos sinais vitais incluíram febre, taquicardia, hipertensão e, inversamente, hipotensão. Estas alterações nos sinais vitais em geral ocorreram e resolveram-se no prazo de 24 horas após o tratamento.

Foi possível observar respostas segundo os critérios RECIST modificados (mRECIST) e mChoi à Semana 8 nos doentes tratados com ambos os níveis posológicos. Quatro doentes, em 26 doentes avaliáveis, apresentaram respostas mRECIST para CHC (Lencioni 2010) à Semana 8.

Os dois grupos estavam bem equilibrados quanto aos principais fatores de prognóstico. Observou-se um benefício de sobrevivência a favor dos doentes no braço da dose elevada. Pexa-Vec em dose elevada esteve associado a uma mediana da sobrevivência global de 14,1 meses vs. 6,7 meses para a dose baixa (relação de risco [HR]: 0,39; valor de p: 0,020, teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon; teste unilateral para a superioridade da dose elevada).

Pexa-Vec foi bem tolerado e os doentes em geral apresentaram sintomas de tipo gripal de Grau 1-2 transitoriamente durante ≤ 24 horas, sem transaminite significativa.

Estudo clínico JX594-HEP016:

Pexa-Vec foi bem tolerado nos doentes do estudo, sendo a maior parte dos AA de intensidade ligeira a moderada. Os AA mais frequentes relacionados com o tratamento com Pexa-Vec, identificados como percentagem do total de doentes tratados, incluíram os seguintes, geralmente ligeiros a moderados: pirexia (96%), calafrios (76%), linfopenia (36%), náusea (32%), vómitos (24%), cefaleia (20%) e neutropenia (20%).

Os AA de Grau 3 notificados como estando relacionados com Pexa-Vec incluíram: linfopenia (4), neutropenia (3), leucopenia (3), diminuição da hemoglobina (3), diminuição na contagem de neutrófilos (2), diminuição na contagem de leucócitos (2), diminuição do apetite (1), diarreia infecciosa (1), diminuição da contagem de plaquetas (1), calafrios (1), hiponatremia (1) e doença de tipo gripal (1). Os AA de Grau 4 notificados como estando relacionados com Pexa-Vec incluíram: linfopenia (5), neutropenia (1) e leucopenia (1). Não foram notificados AA de Grau 5 relacionados com o tratamento.

Observaram-se diminuições transitórias nas contagens de leucócitos, em particular de neutrófilos e linfócitos, nas primeiras 24 horas após cada dose de tratamento de Pexa-Vec.



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

Estudo clínico JX594-IV-CRC014:

Pexa-Vec foi bem tolerado nos doentes do estudo, sendo todos os AA de intensidade ligeira a moderada. Os AA mais frequentes relacionados com o tratamento com Pexa-Vec, identificados como percentagem do total de doentes tratados, incluíram os seguintes, geralmente ligeiros a moderados: pirexia (93%), calafrios (93%), taquicardia (73%), cefaleia (60%), náusea (53%), exantema pápulo-pustular (40%), hipotensão (40%), diminuição do apetite (33%), exantema (27%), estomatite (20%), dor (20%) e vômitos (20%).

Não foram notificadas AA de Grau 3, 4 ou 5 relacionados com o tratamento. Não foram notificadas toxicidades limitadoras da dose e não se atingiu a MTD. Desenvolveram-se pústulas cutâneas (Grau 1) dependentes da dose nos Dias 3–7 do ciclo em apenas 7 de 9 doentes na dose alta e em 0 de 6 na dose baixa.

Estudo pediátrico JX594-IT-P009:

O tratamento foi em geral bem tolerado, sendo os AA mais frequentes relacionados com o tratamento AA ligeiros a moderados. Não houve toxicidades limitadoras da dose. Não estão disponíveis dados de eficácia a esta altura.

Estudo clínico JX594-HEP018 (TRAVERSE):

Cento e vinte e nove doentes com insucesso anterior na terapêutica com sorafenib foram incluídos neste estudo de Fase 2b e aleatorizados na proporção de 2:1 para receber Pexa-Vec mais os melhores cuidados de suporte (BSC) (Braço A) ou apenas BSC (Braço B). Oitenta e seis doentes foram atribuídos ao braço de Pexa-Vec, para receberem uma dose IV seguida de um máximo de cinco (5) injeções IT (1, 3, 6, 12 e 18 semanas após a perfusão IV) e 43 para o braço apenas com BSC.

Pexa-Vec foi bem tolerado nos doentes do estudo, sendo a maior parte dos AA de intensidade ligeira a moderada. Os AA mais frequentes relacionados com o tratamento com Pexa-Vec, identificados como percentagem do total de doentes tratados, incluíram os seguintes, geralmente ligeiros a moderados: pirexia (51%) e calafrios (33%). Os AA de Grau 3 notificados como estando relacionados com Pexa-Vec incluíram: pirexia (7), hipotensão (7), aumento da bilirrubina sérica (4), aumento da aspartato aminotransferase (3), anemia (3), diminuição da contagem de plaquetas (2), vômitos (2), encefalopatia hepática (2), fadiga (2), hipertensão (2), hiperidrose (1), diminuição da contagem de neutrófilos (1), alterações ao estado mental (1), dor abdominal superior (1), ascite (1), diminuição do sódio sérico (1), diminuição da contagem de linfócitos (1), calafrios (1), náusea (1), aumento da alanina aminotransferase (1), edema periférico (1), hemorragia hepática (1), hepatite viral (1) e dor abdominal (1). Os AA de Grau 4 notificados como estando relacionados com Pexa-Vec incluíram: insuficiência respiratória (1). Os AA de Grau 5 notificados como estando relacionados com Pexa-Vec incluíram: insuficiência hepática (1).

Os AA mais frequentes relacionados com Pexa-Vec e apresentados pelos doentes do Braço A incluíram: pirexia (78,6%), calafrios (50,0%), exantema pustular (28,6%), hipotensão (26,2%) e náusea (25%). Estes AA foram em geral de intensidade ligeira a moderada e toleráveis, à exceção da hipotensão, que foi mais grave do que anteriormente observado noutros ensaios de Pexa-Vec.

Os AA de Grau 3 possível ou provavelmente relacionados com Pexa-Vec incluíram pirexia (8,3%), hipotensão (8,3%), aumento da bilirrubina sérica (4,8%), anemia (3,6%), aumento da AST sérica (3,6%); fadiga, encefalopatia hepática, hipertensão, diminuição da contagem de plaquetas, vômitos, (2,4% para cada acontecimento); dor abdominal e aumento da alanina aminotransferase (ALT) sérica (1,2% para cada acontecimento). Assinalaram-se dois acontecimentos de Grau 4 ou Grau 5: insuficiência respiratória (Grau 4) e insuficiência hepática (Grau 5).

Seis doentes apresentaram pelo menos um AA de Grau 3–4 possível ou provavelmente relacionado com o procedimento de injeção IT (7,1%): estes AA incluíram hipotensão (2,4%), dor abdominal superior, insuficiência respiratória aguda, anemia, ascite, sobrecarga de fluidos, hemorragia hepática, derrame pleural, insuficiência renal aguda, sepsia estafilocócica e aumento da troponina (1,2% para cada acontecimento). Nenhum AA relacionado com o procedimento resultou na morte de doentes.

O AAG mais frequente relacionado com Pexa-Vec, que ocorreu em 6 doentes (8 AAG), foi hipotensão grave, definida como sendo uma pressão arterial sistólica < 90 mmHg duradoura e que exigiu tratamento médico durante pelo menos 24 horas após a administração de Pexa-Vec.

É de notar que estava a decorrer tratamento com medicação anti-hipertensiva no momento do tratamento com Pexa-Vec, antes do desenvolvimento de hipotensão na maioria destes doentes, exacerbando possivelmente desta forma o potencial para a hipotensão.



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

O tratamento com Pexa-Vec não melhorou a sobrevivência global nem outras medidas de eficácia em comparação com os BSC nos doentes com CHC neste estudo em regime aberto. Não foi demonstrada uma melhoria significativa da sobrevivência global no Braço A em comparação com o Braço B ($p = 0,426$, teste log-rank estratificado) para a população com intenção-de-tratar (ITT). A mediana da sobrevivência global foi de 4,2 (intervalo de confiança [IC] a 95%: 3,3 a 5,4 meses) vs 4,4 meses (IC a 95%: 3,2 a 6,0 meses) para o Braço A vs. Braço B, respetivamente. A HR observada foi de 1,19 (IC a 95%: 0,78 a 1,80). A taxa global de controlo da doença (proporção de doentes com resposta completa [CR], resposta parcial [PR] ou doença estável [SD]) durante o estudo foi de 13% (IC a 95%: 7% a 22%) vs. 19% (IC a 95%: 8% a 33%) para o Braço A vs. Braço B, respetivamente. É de notar que a maioria dos doentes do TRAVERSE não recebeu o regime de tratamento completo com Pexa-Vec, especificado no protocolo. No Braço A, 12 de 86 doentes aleatorizados (13,9%) receberam os 6 tratamentos planeados; e apenas metade dos doentes (51,2%) recebeu pelo menos três (3) tratamentos IT (um (1) IV mais três (3) IT), conforme administrado em ensaios anteriores com Pexa-Vec no CHC.

O número limitado de doentes que concluiu o tratamento no Braço A, em conjunto com a mediana de sobrevivência global significativamente mais curta (~4,2 vs. 4,4 meses nos Braços A e B, respetivamente), observados neste estudo em comparação com estudos de outros agentes para o tratamento de segunda linha do CHC (~7–9 meses) sugere que no TRAVERSE foi incluída uma população de doentes com CHC relativamente mais avançado (Llovet 2013; Zhu 2014).

Estudo clínico JX594-CRC019:

Pexa-Vec foi bem tolerado nos doentes do estudo, sendo a maior parte dos AA de intensidade ligeira a moderada. Os AA mais frequentes relacionados com o tratamento com Pexa-Vec, identificados como percentagem do total de doentes tratados, incluíram os seguintes, geralmente ligeiros a moderados: pirexia (88%), calafrios (81%), hipotensão (58%), náusea (46%), exantema pustular (38%), vómitos (35%), cefaleia (35%), taquicardia (33%), fadiga (29%) e hipertensão (27%).

Não foram notificados AA de Grau 5 relacionados com o tratamento.

Os AA de Grau 3 seguintes, relacionados com o tratamento com Pexa-Vec como agente único, apresentados por (3,6%, $n = 1$) dos doentes, foram: calafrios, hipotensão, fadiga, hipertensão, dor abdominal, aumento da bilirrubina sérica, síndrome de libertação de citocinas, hipoxia, aumento da ALT, aumento da AST, sonolência e aumento da troponina. Não foram notificados AA de Grau 4 ou de Grau 5 relacionados com Pexa-Vec.

Os AA mais frequentes notificados como estando possivelmente/provavelmente relacionados com o tratamento (Pexa-Vec ou Pexa-Vec e irinotecano) nas coortes de associação de Pexa-Vec com irinotecano incluíram: pirexia (88%), calafrios (75%), hipotensão (54%) e náusea (50%). Os AA de Grau 3 relacionados com o tratamento (Pexa-Vec ou Pexa-Vec e irinotecano) nas coortes de associação de Pexa-Vec com irinotecano incluíram: pirexia (14,2%), hipertensão (9,5%); e 4,8% para cada AA no caso da náusea, fadiga, vómitos, dor abdominal superior e neutropenia. Não foram notificados AA de Grau 4 ou de Grau 5 relacionados com o tratamento (Pexa-Vec ou Pexa-Vec e irinotecano).

Os dados finais de eficácia e segurança encontram-se pendentes a esta altura.

Estudo clínico JX594-REN022:

Pexa-Vec foi bem tolerado nos doentes do estudo, sendo a maior parte dos AA de intensidade ligeira a moderada. Os AA mais frequentes relacionados com o tratamento com Pexa-Vec, identificados como percentagem do total de doentes tratados, incluíram os seguintes, geralmente ligeiros a moderados: doença de tipo gripal (100%), náusea (24%) e vómitos (24%).

Os AA de Grau 3 notificados como estando relacionados com Pexa-Vec incluíram: diminuição da contagem de plaquetas (1), hiperglicemia (1), hematúria (1) e hipertensão (1). Não foram notificados AA de Grau 4 ou de Grau 5 relacionados com o tratamento.



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

Considerações em matéria de saúde humana e animal, bem como das plantas:

Efeitos tóxicos ou alergénicos dos OGM e ou dos seus produtos metabólicos

Toxicidade clínica:

O vírus parental de Pexa-Vec (i.e. a estirpe Wyeth do VV) utilizada na vacina Dryvax® foi administrada a centenas de milhões de pessoas na década de 1960 e até ao início da década de 1980, durante a campanha de erradicação da varíola. A segurança clínica do VV utilizado em condições de vacinação (escarificação cutânea com 105 – 106 UFP) é, por conseguinte, bem conhecida (Cono J. et al., 2003; Kretzschmar M. et al., 2006).

Até à data, conforme referido acima, os estudos clínicos conduzidos com Pexa-Vec mostraram um perfil de segurança aceitável de Pexa-Vec.

Comparação do organismo modificado, em termos de patogenicidade, com o dador, com o recetor ou (se oportuno) com o organismo parental

As características replicativas e propagativas do VV foram atenuadas no Pexa-Vec com a disrupção do gene da TK, o que deixa o organismo modificado dependente de células em divisão acelerada, como é o caso das células cancerígenas (Parato K.A. et al., 2011). Por conseguinte, Pexa-Vec deverá ter uma patogenicidade reduzida em comparação com o VV parental.

Capacidade de colonização

Devido às suas propriedades não integrativas, a replicação dá-se preferencialmente em células em divisão intensa, como por exemplo as células cancerígenas, e dado o facto de o vírus parental raramente ser isolado a partir de animais fora do laboratório (Fenner F. et al., 1989), prevê-se que Pexa-Vec não consiga colonizar nenhum outro organismo que não os participantes aos quais se irá injetar Pexa-Vec no âmbito da participação no ensaio clínico proposto.



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

Se o organismo for patogénico para o ser humano imunocompetente:

Doenças causadas e mecanismo de patogenicidade, incluindo a invasividade e virulência;

Transmissibilidade;

Dose infecciosa;

Gama de hospedeiros, possibilidades de alteração;

Possibilidades de sobrevivência fora do hospedeiro humano;

Presença de vetores ou meios de difusão;

Estabilidade biológica;

Padrões de resistência aos antibióticos;

Alergenicidade;

Disponibilidade de terapias adequadas

O VV está a ser considerado um organismo patogénico de menor importância para o ser humano (Dumbell K.R., 1985). O VV não causa nenhuma doença humana conhecida, à exceção de complicações da vacinação (i.e. eczema desencadeado pela vacina em doentes com história de eczema, exantema disseminado causado por Vaccinia, Vaccinia progressivo em indivíduos com deficiência em células T e encefalite em 1-2 por milhão de pessoas vacinadas (Fields B.N., 1996)). Devido à inativação da atividade da sua TK, o que limita a replicação do Pexa-Vec às células em divisão intensa, Pexa-Vec pode, por conseguinte, ser ainda menos patogénico do que o vírus parental.

- Transmissibilidade

Até à data, não houve transmissões de doentes tratados com Pexa-Vec para prestadores de cuidados ou para membros da família. Também não houve transmissões dos doentes para outros organismos.

- Dose infecciosa

Houve reações adversas relacionadas com o tratamento com a dose IV de 1 x 10⁵ UFP/kg, indicando a presença de vírus a essa dose, que foi a dose mais baixa testada.

- Leque de hospedeiros, possibilidade de alteração

O vírus parental, VV, não tem um hospedeiro de manutenção conhecido na natureza. Já foi registada a transmissão de VV de pessoas vacinadas contra a varíola para animais (Baxby D., 1985). A transmissão de VV e outros ortopoxvírus de animais para seres humanos também já ocorreu (Palca J., 1988) (Pether J.V. et al., 1986) (Egberink H.F. et al., 1986) (Gershon P.D. et al., 1989; Moussatche N. et al., 2008). No entanto, estas transmissões ocorrem raramente, uma vez que não houve ocorrência aumentada na transmissão após as administrações em massa durante a campanha de vacinação contra a varíola. Além disso, a patogenicidade reduzida de Pexa-Vec deverá reduzir quaisquer potenciais transmissões entre seres humanos e de seres humanos para animais.

- Possibilidade de sobrevivência fora do hospedeiro humano

Desconhece-se a ecologia do VV. Pensa-se em geral que o VV não se encontra naturalmente no meio ambiente.

- Presença de vetores ou meios de disseminação

São dadas instruções sobre como prevenir a disseminação e a contaminação nas Orientações específicas para Pexastimogene Devacirepvec (Pexa-Vec) (Anexo 2) e que serão facultadas aos investigadores, farmacêuticos e a todo o pessoal envolvido no manuseamento do produto. 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.

Todos os doentes do estudo irão receber instruções detalhadas (semelhantes às descritas acima) como parte do processo de consentimento informado. Conforme assinalado anteriormente, estas recomendações baseiam-se, de forma conservadora, nas orientações dos CDC dos EUA para a vacina padronizada com Vaccinia (não atenuada). De recordar, conforme a informação prestada anteriormente neste documento, que Pexa-Vec é uma vacina mais fraca, atenuada, com Vaccinia.



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

Não foi relatada a transmissão de Pexa-Vec pessoa para pessoa, apesar do desenvolvimento de pústulas superficiais em cerca de 20% – 25% dos doentes após o tratamento com Pexa-Vec. Ainda assim, a SillaJen aplicou muitas das mesmas orientações conservadoras para minimizar o potencial teórico de transmissão de Pexa-Vec a outras pessoas que possam entrar em contacto físico direto especificamente com um doente que tenha desenvolvido uma pústula.

Todos os doentes tratados com Pexa-Vec (com ou sem uma pústula) devem:

1. Praticar uma boa higiene das mãos, com água morna e sabão ou desinfetantes de mãos que contenham álcool a pelo menos 60%.
2. Utilizar um método barreira de contraceção durante pelo menos 6 semanas após cada tratamento de Pexa-Vec

Apenas para os doentes que desenvolvam uma pústula cutânea superficial (ou na mucosa oral) relacionada com Pexa-Vec:

Para além das orientações indicadas acima para todos os doentes tratados com Pexa-Vec, devem instituir-se as seguintes até à resolução das pústulas (por ex., até que a lesão tenha formado crosta e esta tenha caído):

1. Cobrir a pústula cutânea com um penso não oclusivo (por ex., gaze)
2. Não permitir que terceiros ou o doente tenham contacto físico direto com a(s) pústula(s) propriamente dita(s) nem com qualquer material potencialmente contaminado (por ex., penso da pústula, vestuário, lençóis). Se for necessário prestar cuidados ao doente (por ex., trocar o penso da pústula), devem utilizar-se luvas e devem lavar-se as mãos em seguida com água morna e sabão ou com um desinfetante de mãos que contenha álcool a pelo menos 60%.
3. Evitar o contacto físico direto (sobretudo com a[s] pústula[s] e com qualquer material potencialmente contaminado) com crianças de idade < 12 meses e com a população de Indivíduos Excluídos (mulheres grávidas ou a amamentar, indivíduos com uma doença cutânea de tipo inflamatório grave continuada que exija tratamento médico ou história de eczema grave que tenha exigido tratamento médico, indivíduos imunocomprometidos [por ex., recetores de transplante de órgãos, indivíduos VIH-positivos, ou a receber medicação imunossupressora crónica]).
4. Evitar tocar noutras partes do corpo (por ex., olhos, nariz, ou outras áreas) após tocar numa pústula ou em qualquer outro material potencialmente contaminado (por ex., após a troca do penso da pústula).
5. Se estiver presente uma pústula na boca:
 - a. Usar uma máscara quando estiver junto de outras pessoas
 - b. Não partilhar artigos como escovas de dentes, talheres, etc.
6. Eliminar materiais contaminados (por ex., gaze, pensos) num contentor selado ou num saco com fecho de tipo ziplock no lixo normal. Os tecidos (por ex., roupas, lençóis, toalhas) que tenham tocado numa pústula descoberta podem ser lavados em água quente com detergente. Em alternativa, pode usar lixívia em água morna ou fria para inativar o vírus (uma chávena por carga da máquina).

O pessoal do estudo deve dar instruções aos doentes no sentido de informar o médico do estudo caso notem que desenvolveram uma pústula ou se notarem algo de invulgar ou diferente relativamente ao que lhes foi dito para esperarem.

Os doentes que não consigam cumprir as orientações acima na eventualidade de desenvolverem uma pústula relacionada com Pexa-Vec não deverão ser incluídos num ensaio com Pexa-Vec.



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

EXPOSIÇÃO ACIDENTAL A PEXA-VEC

Caso ocorra uma exposição humana accidental a Pexa-Vec, não são indicadas intervenções específicas que não o cuidado local à ferida, conforme o necessário, e a observação atenta. Especificamente, recomenda-se o seguinte:

1. Implementação das orientações locais, institucionais ou outras relativamente à picada de agulha.
2. Lavar muito bem a área com água e sabão.
3. Cobrir a área com um penso não oclusivo até à resolução completa.
4. Comunicar o acontecimento ao Investigador Principal, ao Especialista em Biossegurança da instituição e/ou a um médico experimentado no cuidado de indivíduos sujeitos a infeção por Vaccinia.

Até à data, documentaram-se quatro exposições inadvertidas a Pexa Vec sem sintomas clinicamente significativos nem necessidade de tratamento específico que não a observação local mínima do local da exposição. Na eventualidade de uma exposição percutânea num indivíduo que se encontre de resto saudável, não se esperam sequelas clinicamente significativas para além de uma potencial vermelhidão cutânea local e cicatrização gradual sem complicações. Caso se desenvolva uma pústula, prevê-se o curso habitual após a vacinação intencional, que inclui o desenvolvimento de uma pústula no prazo de 7–14 dias, seguido de formação de crosta e resolução no prazo de 21–28 dias no total. A(s) pústula(s) deve ser coberta com um penso não oclusivo.

Já foi descrita a transmissão secundária de VV de tipo selvagem a partir de um recetor de vacinação para um contacto sexual (MMWR, 2004) (MMWR, 2010). Estes relatos, juntamente com os dados não clínicos de Pexa-Vec em animais, mostram uma distribuição de DNA viral e de abscessos nos testículos que se resolvem ao longo do tempo. Nos estudos com Pexa-Vec em seres humanos, implementaram-se precauções quanto ao contacto sexual para os doentes que participem. É exigido aos doentes que utilizem um método barreira durante pelo menos 6 semanas após cada tratamento com Pexa-Vec.

- Estabilidade biológica

Os estudos atuais de estabilidade genética realizados no ME demonstraram a integridade genética do vírus recombinante.

- Padrões de resistência aos antibióticos

Não aplicável.

- Alergenicidade

Até à data, Pexa-Vec foi administrado a mais de 250 doentes, sem notificações de efeito alérgico relacionado com o tratamento. O GM-CSF é uma citocina pró-inflamatória que está envolvida nas reações imunes inflamatórias. Pode teoricamente participar na exacerbação da resposta imunitária de um doente a um alérgeno. No entanto, tal não foi notificado com Pexa-Vec.

- Disponibilidade de terapêuticas adequadas

Estão disponíveis vários agentes antivirais aprovados ou experimentais para tratar as infeções por poxvírus no caso de uma resposta adversa. VIG e cidofovir são terapêuticas eficientes recomendadas pelos CDC nos EUA para determinadas reações graves à vacina da varíola.



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

Outros riscos

INTEGRAÇÃO:

O VV mostrou replicar o seu DNA no citoplasma das células infetadas. O genoma de VV não entra no núcleo, o que torna a probabilidade de integração do VV no cromossoma do hospedeiro extremamente remota. Além disso, não há na literatura qualquer referência à integração do Vaccinia vírus ou VV no genoma da célula hospedeira, nem de acontecimentos associados, como por exemplo mutagénese insercional e cancro.

PROPAGAÇÃO:

O vírus parental de Pexa-Vec, VV, é capaz de se propagar eficientemente de célula para célula e de se movimentar através da corrente sanguínea para tecidos distantes. A inativação do gene TK no Pexa-Vec não modifica as propriedades de inafetividade do vírus. Contudo, foi demonstrado em estudos pré-clínicos que o vírus recombinante se replica preferencialmente nas células em divisão ativa, como por exemplo as células cancerígenas (Parato K.A. et al., 2011). Portanto, após um período inicial de distribuição alargada pelos tecidos, prevê-se que Pexa-Vec seja completamente eliminado do hospedeiro, exceto nas células cancerígenas.

TRANSMISSÃO HORIZONTAL:

A disseminação de Pexa-Vec aos profissionais de saúde e membros da família é um risco potencial para todos os vetores de terapia genética. Não foi documentada transmissão ou seroconversão entre os profissionais de saúde que entraram em contacto com doentes.

O VV de tipo selvagem pode propagar-se tocando num local de vacinação antes de este ter cicatrizado ou tocando em pensos e vestuário contaminados. O VV também pode propagar-se através de qualquer fluido biológico contaminado do doente. Houve ainda notificações raras de transmissão secundária através de contactos sexuais, no caso de contactos domésticos imunocomprometidos (MMWR, 2004) (Vora S. et al., 2008) (MMWR, 2010) e de contactos relacionados com atividades desportivas (Hughes C.M. et al., 2011) (Young G.E. et al., 2011). Um artigo recente estimou que havia 5,4 casos de transmissão secundária de Vaccinia por 100.000 vacinados com VV não recombinante (Wertheimer E.R. et al., 2011). A patogenicidade reduzida de Pexa-Vec deve reduzir qualquer potencial transmissão secundária.

A maioria dos casos foi notificada após a primeira administração de Pexa-Vec. Em cada um dos casos, a pele sobre a pústula encontrava-se intacta, não se tendo documentado libertação de partículas para o meio ambiente. Pexa-Vec só foi detetado nos fluidos depois de ter sido 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 para as vacinações de rotina com Vaccinia, que formam pústulas cutâneas. Todas as pústulas se resolveram completamente no prazo de cerca de 3 a 4 semanas. Os doentes não apresentaram sequelas clínicas nem toxicidade nos órgãos; o sangue apresentou resultado negativo para Pexa-Vec por volta da altura de identificação das pústulas em todos os doentes. O aparecimento e a progressão temporal destas pústulas foram consistentes com os descritos após a vacinação de rotina com Vaccinia, com Dryvax®. Não houve indicações de libertação de partículas virais nem de transmissão aos prestadores de cuidados ou a membros da família. 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.

Conforme indicado acima, não foi notificada transmissão do Pexa-Vec de pessoa para pessoa. É necessária a higiene frequente das mãos para todos os doentes tratados com Pexa-Vec. Para outras medidas que serão tomadas no ensaio clínico proposto para evitar a disseminação de Pexa-Vec, consulte a secção II.C.2.(i)(iv) (presença de vetores ou meios de disseminação).



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

Sabendo que os investigadores, farmacêuticos, todo o pessoal envolvido no manuseamento do produto, os doentes e as respetivas famílias irão receber instruções detalhadas sobre como prevenir a disseminação do vírus nas Recomendações específicas para o manuseamento de Pexa-Vec e gestão dos doentes (Anexo 2) ou num resumo destas recomendações, é improvável que haja contaminação da equipa de profissionais de saúde e do círculo familiar.

Caso ocorra, e uma vez que apenas uma fração da dose administrada iria estar envolvida neste acontecimento, o potencial efeito nocivo deverá ser semelhante ao encontrado durante a campanha de vacinação contra a varíola. A experiência da vacinação em massa contra a varíola mostra que a transmissão secundária do VV é uma ocorrência rara.

TRANSMISSÃO VERTICAL:

Dado que o ciclo de vida do VV tem lugar exclusivamente no citoplasma, a probabilidade de transmissão vertical é extremamente baixa. É exigido aos doentes que utilizem um método barreira durante pelo menos 6 semanas após cada tratamento com Pexa-Vec.

OUTROS:

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).

III) Informações relativas às condições de libertação e ao meio recetor

A) Informações sobre a libertação

Descrição da libertação deliberada proposta, incluindo o seu objetivo e os produtos previstos

A libertação proposta consistirá na administração do produto experimental, em ambiente hospitalar ou clínico, através de injeções IT a doentes como parte de um ensaio clínico internacional multicêntrico.

Cerca de 40 centros de ensaio clínico na UE irão incluir doentes no estudo JX594-HEP024. Também serão conduzidos estudos em centros de ensaio clínico na Austrália, Canadá, China, Israel, (República da) Coreia, Nova Zelândia, Singapura, Taiwan, Tailândia e EUA. Serão recrutados, no total, 600 doentes neste ensaio clínico, com a expectativa de haver 200 doentes da UE. Dentre estes, 300 doentes (i.e. cerca de 100 doentes na UE) irão receber Pexa-Vec através de injeções IT.

Datas previstas para as libertações e planeamento temporal da experiência, incluindo a frequência e duração das libertações

Prevê-se que a inclusão de participantes no estudo JX594-HEP024 comece no 2.º trimestre de 2016 e esteja concluída até ao 2.º trimestre de 2020. Em Portugal, prevê-se que a inclusão de participantes no estudo JX594-HEP024 comece em Dezembro de 2016 e esteja concluída em Dezembro de 2020.



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

Preparação do local antes da libertação

O medicamento Pexa-Vec será libertado exclusivamente para uso clínico, será colocado em frascos para injetáveis e adequadamente rotulado. A administração será feita sob a responsabilidade do investigador, segundo o protocolo clínico e em conformidade com as Boas Práticas Clínicas.

São dadas instruções sobre como prevenir a disseminação e a contaminação nas Recomendações para o Manuseamento de Pexa-Vec e Gestão dos Doentes (Anexo 2), que serão facultadas aos investigadores, farmacêuticos e a todo o pessoal envolvido no manuseamento do produto. Os doentes irão receber estas instruções como parte do seu processo de consentimento informado. O local de injeção (o sítio na pele através do qual o Pexa-Vec irá ser administrado) e quaisquer úlceras, pústulas acneiformes ou exantemas na pele serão cobertos com um penso e com vestuário durante um período de 7 dias após o tratamento, ou até à resolução de qualquer ulceração, sinal de varíola ou exantema na pele relacionados, seja qual for o período mais longo. Caso se desenvolvam lesões superficiais na mucosa oral, os doentes deverão aderir ao maneio conservador das suas pústulas e utilizar uma máscara quando estiverem junto de outras pessoas até à resolução das pústulas orais. Os doentes receberão instruções no sentido de evitar o contacto direto com as pústulas, seguido de contacto com outras partes do corpo (por ex., os olhos, o nariz, ou outras áreas). 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, enquanto estiverem em casa, receberão instruções no sentido de limpar as superfícies que entrem em contacto com a pústula com uma solução de lixívia ou com qualquer outro desinfetante ativo. O vestuário, toalhas e roupa de cama serão lavados utilizando o ciclo de água quente com detergente. Durante a participação no estudo, recomenda-se a lavagem frequente das mãos, evitar o contacto direto com a saliva (por ex., beijar), evitar a partilha de artigos domésticos (por ex., talheres), e evitar o contacto físico direto com pessoas que estejam em grupos de risco [i.e., crianças de idade < 12 meses, mulheres grávidas ou a amamentar, populações imunocomprometidas (por ex., recetores de transplantes de órgãos, indivíduos VIH-positivos, ou pessoas a receber medicação imunossupressora crónica) e com pessoas com doenças cutâneas de tipo inflamatório (por ex., eczema que tenha exigido tratamento prévio, dermatite atópica)].

Já foi descrita a transmissão secundária sexual de VV a partir de um recetor de vacinação (MMWR, 2004; MMWR, 2010). Este relato, juntamente com os dados pré-clínicos de PexaVec, que mostram a distribuição de DNA viral e abscessos nos testículos de coelhos, faz destacar a importância das precauções relativas ao contacto sexual, que já tinham sido implementadas para os doentes que iriam participar no ensaio de Fase III proposto. Seria exigido aos doentes que utilizassem um método barreira durante pelo menos 6 semanas após cada injeção de Pexa-Vec.



Dimensões do local

Não há uma dimensão específica exigida para o centro de ensaio. Os participantes serão tratados e observados durante 20 horas após a administração de Pexa-Vec. Todas as consultas do estudo restantes serão conduzidas em ambulatório.

Todas as zonas nas quais Pexa-Vec irá ser manuseado e administrado aos doentes, e nas quais os doentes serão hospitalizados após a administração de Pexa-Vec terão de ser de acesso restrito (i.e. o acesso a estas zonas será controlado e limitado à equipa hospitalar autorizada que recebeu formação sobre as medidas para controlar a infeção). Será afixado o símbolo internacional de perigo biológico em cada uma das entradas para as zonas restritas. A preparação de soluções virais deve fazer-se numa câmara de segurança biológica de tipo IIA (por ex., uma câmara de fluxo laminar de quimioterapia padronizada, equipada com um filtro de alta eficiência para partículas no ar [HEPA] com manutenção adequada)

Método a utilizar para a libertação

Os 300 doentes aleatorizados para o braço experimental serão tratados através de injeções IT de PexaVec na dose de 1×10^9 UFP ($9,0 \log$ UFP) nos Dias 1, 15 e 29. No braço de controlo, os 300 doentes não irão receber Pexa-Vec.

Quantidades do OGM a libertar

Considerando:

- a dose máxima administrada por doente, i.e. 1×10^9 UFP ($9,0 \log$ UFP) por injeção,
- o número total planeado de doentes a ser tratados com Pexa-Vec no estudo, i.e. 300 doentes
- o número máximo de injeções de Pexa-Vec por doente, i.e. 3 injeções

A quantidade máxima de OGM que se prevê que seja libertada durante todo o estudo é de 9×10^{11} UFP.

Nota: Estas doses de Pexa-Vec não serão todas libertadas em centros de ensaio clínico localizados na UE (cerca de 1/3 da libertação do OGM no estudo será na UE).

Perturbação do local (tipo e método de cultivo, de extração, de irrigação ou outras atividades)

Não aplicável.



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

**Medidas aplicadas
durante a libertação
para proteção dos
trabalhadores**

As farmácias, hospitais e clínicas administram organismos infecciosos rotineiramente (por ex., vacinas virais vivas e BCG viva para o cancro da bexiga) e as recomendações de manuseamento para a preparação e administração de Pexa-Vec também se baseiam nas orientações dos CDC para a preparação da vacina com Vaccinia padronizada (CDC 2009). Pexa-Vec está classificado como sendo um agente de nível de segurança 1 ou 2 (BSL-1 ou 2) quanto ao perigo biológico, com base na patogenicidade muito baixa e no potencial de propagação apenas através de contacto físico direto (NOTA: a classificação como BSL-1 ou BSL-2 depende dos países). Outros exemplos de agentes BSL 2 frequentemente encontrados na prática clínica de rotina na Medicina incluem: Escherichia coli, Helicobacter pylori, Staphylococcus aureus e vírus Herpes simplex. Independentemente da classificação BSL, seguem-se as medidas conservadoras para a preparação, descontaminação e armazenamento de Pexa-Vec:

1. Indivíduos excluídos do manuseamento (preparação e administração):

- mulheres grávidas ou a amamentar
- indivíduos imunocomprometidos (por ex., recetores de transplante de órgãos, indivíduos VIH-positivos, ou a receber medicação imunossupressora crónica)
- indivíduos com doenças cutâneas de tipo inflamatório graves que exijam tratamento médico ou com história de eczema grave que tenha exigido tratamento médico.

2. Acesso limitado:

- a. Colocar um sinal de perigo biológico na área de preparação
- b. Limitar o acesso à área designada para o efeito (por ex., à câmara de fluxo laminar utilizada para preparar Pexa-Vec) durante a preparação

3. Equipamento

As seguintes medidas são as recomendadas como sendo medidas conservadoras para a preparação, descontaminação e armazenamento de Pexa-Vec [A ser adaptadas aos requisitos locais]:

- a. Preparar numa Cabine de Segurança Biológica de Classe IIA (por ex., uma câmara de fluxo laminar de quimioterapia padronizada, equipada com um filtro de alta eficiência para partículas no ar [HEPA] com manutenção adequada)
- b. Usar EPI padronizado – luvas, óculos, máscara e bata ao preparar o agente (por ex., como com as precauções padronizadas para a quimioterapia)

4. Limpeza e descontaminação recomendadas da câmara de fluxo laminar:

- a. Prepare a câmara de fluxo laminar para a preparação de Pexa-Vec utilizando os requisitos institucionais padronizados para a limpeza e descontaminação após a mistura de agentes para quimioterapia.
- b. Pexa-Vec é inativado pelos métodos físicos e químicos padronizados de desinfeção, incluindo os assinalados abaixo [Infection Control Guidelines 1998].

Após a preparação de Pexa-Vec, limpe completamente o interior da câmara de fluxo laminar com:

- i. Álcool a pelo menos 60%, OU
- ii. Solução de lixívia (com cloro ativo a pelo menos 0,6%) seguida de álcool a pelo menos 60%, OU
- iii. Outros agentes recomendados 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 (75 ppm), compostos fenólicos e aldeídos.

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.

Todo o material contaminado deve ser eliminado num contentor claramente identificado como sendo para resíduos biomédicos e eliminado em conformidade com os procedimentos habituais da instituição para os resíduos infecciosos.

5. Armazenamento:

- a. Conserve Pexa-Vec a uma temperatura de -60°C ou menos, num congelador com alarme, monitorização de temperatura e medidas de segurança, de acesso restrito.
- b. Pexa-Vec pode ser armazenado juntamente com outros produtos terapêuticos, mas deve ficar separado das amostras laboratoriais.

É possível que a equipa hospitalar possa ser injetada acidentalmente e que ocorra a transmissão secundária nos membros da família dos doentes. A infeção seria nociva nas populações em risco, mas os doentes que não possam evitar o contacto físico direto com pessoas nesses grupos de risco, bem como os profissionais de saúde que se encontrem nesses grupos de risco, serão excluídos da participação no estudo. Até à data, os profissionais de saúde estudados que estiveram em contacto com doentes tratados não apresentaram seroconversão devido à exposição a Pexa-Vec.



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

**Tratamento do local
pós-libertação**

A câmara de segurança biológica na qual o produto irá ser preparado para injeção será descontaminada antes e após a manipulação com álcool isopropílico a 70% ou com qualquer outro desinfetante ativo.

Todo o material exclusivo para efeitos do ensaio clínico será eliminado após a utilização e será posteriormente autoclavado, incinerado ou tratado com uma solução de hipoclorito de sódio por pessoal com formação na eliminação de resíduos com perigo biológico.

O material não exclusivo do ensaio clínico será esterilizado ou limpo com um desinfetante ativo (por ex., solução de lixívia com cloro ativo a 0,6% ou qualquer outro desinfetante ativo) seguido de álcool isopropílico a 70% antes da utilização para outros fins.

Os vírus Vaccinia, tal como a maior parte dos vírus com invólucro, são sensíveis à inativação pelos métodos físicos e químicos padronizados de desinfeção. Deve utilizar-se um desinfetante hospitalar padronizado para limpar o equipamento ou os dispositivos médicos não críticos de cuidados prestados aos doentes entre a utilização para cada doente (por ex., arrastadeiras, cadeiras sanitárias, braçadeiras para medição da pressão arterial, oxímetros, aparelhos de medição da glicemia [Infection Control Guidelines 1998]). 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 (75 ppm), compostos fenólicos e aldeídos. 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. Os dispositivos críticos e semi-críticos devem ser limpos e reprocessados em conformidade com as orientações institucionais.

Todo o material contaminado (por ex., seringas, cateteres, agulhas, tubos, luvas, recipientes, ligaduras, etc.) deve ser eliminado num contentor claramente identificado para resíduos biomédicos e eliminado em conformidade com o procedimento habitual da instituição para os resíduos infecciosos, i.e.: autoclavagem, incineração ou tratamento com uma solução de hipoclorito de sódio. Os materiais têxteis e tecidos podem ser descontaminados através da lavagem utilizando os protocolos de rotina para instituições de cuidados de saúde (por ex., lavagem em água quente com detergente e secagem com ar quente).

Após o doente ter alta para ir para casa, o local do hospital (superfícies e chão) e a casa de banho serão limpas de forma padronizada utilizando um desinfetante de tipo hospitalar.

**Técnicas previstas
para a eliminação ou
inativação dos OGM
no fim da
experiência**

O OGM Pexa-Vec é administrado a seres humanos para fins terapêuticos.

Para a eliminação e inativação de Pexa-Vec nas superfícies, materiais e equipamentos, ver secção III.A.9.

Todos os frascos para injetáveis terão de ser eliminados num recipiente para resíduos biomédicos (i.e. num saco à prova de fugas de material com perigo biológico), claramente identificado, segundo as políticas da instituição para os resíduos com perigo biológico. Antes da eliminação, podem ser tratados com hipoclorito de sódio (por ex. diluição de hipoclorito de sódio a 1:10 (por ex., Clorox) para uma concentração funcional de hipoclorito de sódio a 0,615%). Sabe-se que o hipoclorito de sódio inativa Vaccinia no prazo de 10 minutos a uma concentração tão baixa quanto 0,02% (Klein M. and DeForest A., 1965). O Vaccinia virus é um vírus com invólucro. Em consequência, é sensível a muitos outros desinfetantes clássicos, como por exemplo a lixívia, aldeídos, álcoois (por ex., álcool isopropílico a 30% ou álcool etílico a 40% durante 10 minutos), peróxido de hidrogénio, compostos fenólicos e compostos quaternários de amónia. Um desinfetante disponível no mercado, como por exemplo Virkon®, ou germicidas padronizados registados pela EPA, também serão eficazes se utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

Todos e quaisquer resíduos deverão então ser autoclavados, incinerados ou tratados com solução de hipoclorito de sódio pelo pessoal com formação sobre eliminação de resíduos com perigo biológico. Os resíduos médicos autoclavados não podem ser eliminados como o lixo normal. Cada instituição terá de cumprir a regulamentação local relativa à eliminação de resíduos.



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

Informação e resultados de anteriores libertações do OGM, em especial a diferentes escalas e em diferentes ecossistemas

A informação sobre ensaios clínicos anteriores conduzidos com este produto encontra-se descrita na secção de História de libertações ou utilizações anteriores do OGM.

B) Informações sobre o ambiente (no local e no ambiente em sentido lato)

Localização geográfica e referência da grelha do(s) local(ais) (nas notificações ao abrigo do capítulo III, o local de libertação corresponde às zonas previstas para a utilização do produto)

O nome e endereço dos centros de ensaio que participam neste ensaio são:	
Centro de ensaio clínico	Localização
Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António	Largo Prof. Abel Salazar Porto 4099-001
Instituto Português de Oncologia Do Porto Francisco Gentil EPE	Rua Dr. António Bernardino de Almeida Porto 4200-072
Centro Hospitalar de Lisboa Central, E.P.E. – Hospital de Santo António dos Capuchos	Alameda de Santo António dos Capuchos Lisboa 1169-050
Centro Hospitalar E Universitário de Coimbra EPE – Hospitais da Universidade de Coimbra	Av. Afonso Romão, Santo António dos Olivais Coimbra, Coimbra, 3000-602
Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil Centro Regional de Oncologia de Coimbra EPE	Avenida Bissaya Barreto - Praceta Prof. Mota Pinto Coimbra, Coimbra, 3000-075

Proximidade física ou biológica de seres humanos e de outros biota significativos

Informação confidencial.

Proximidade de biótopos significativos, zonas protegidas ou instalações de água potável

Não aplicável: o OGM irá ser injetado a seres humanos em quartos de hospital.

Características climáticas da(s) região(ões) mais passíveis de serem afetadas

Não aplicável.

Características geográficas, geológicas e pedológicas

Não aplicável.

Flora e fauna, incluindo culturas, rebanhos animais e espécies migratórias

Não aplicável.

Descrição dos ecossistemas alvo e não alvo mais passíveis de serem afetados

A probabilidade de o Pexa-Vec se tornar persistente e invasivo nos habitats naturais é baixa pelos seguintes motivos:

- Devido à inativação do gene TK, o Pexa-Vec replica-se preferencialmente em células que se encontram em divisão ativa (Parato K.A. et al., 2011). Por conseguinte, prevê-se que o Pexa-Vec se propague sobretudo em células cancerígenas. Os atuais estudos de estabilidade genética realizados no Pexa-Vec não detetaram revertidos espontâneos do Pexa-Vec.
- O Pexa-Vec permanece exclusivamente no citoplasma das células infetadas, eliminando assim qualquer risco de integração do DNA viral no genoma do hospedeiro.
- Durante a libertação proposta, pode ocorrer a libertação de partículas infecciosas para o meio ambiente e potencialmente para o público. No entanto, serão tomadas disposições, conforme as descritas nas Recomendações para o manuseamento de Pexa-Vec e gestão de doentes, no ensaio clínico proposto para minimizar a disseminação e a transmissão inadvertidas.
- Durante a campanha de vacinação contra a varíola, na qual se administrou o vírus parental do Pexa-Vec, não atenuado, a milhões de pessoas, não surgiu nenhuma preocupação ambiental.

Comparação do habitat natural do organismo recetor com o(s) local(ais) proposto(s) para a libertação

Não aplicável. O vetor do VV não se encontra naturalmente no meio ambiente.

Desenvolvimento previsto ou alterações já conhecidas da utilização dos solos na região que sejam suscetíveis de influenciar o impacte ambiental da libertação

Não aplicável.

Frequência de mobilização

Não aplicável.

IV) Informações relativas às interações dos OGM com o ambiente

A) Características que afetem a sobrevivência, multiplicação e dispersão

Características biológicas que afetem a sobrevivência, multiplicação e dispersão

As características replicativas e propagativas do VV foram atenuadas no Pexa-Vec com a disrupção do gene da timidina cinase, que deixa o organismo modificado dependente de células em divisão acelerada, como é o caso das células cancerígenas (Parato K.A. et al., 2011). Ver secção "*Habitat previsto dos OGM*" para informação adicional.

Condições ambientais conhecidas ou previstas que possam afetar a sobrevivência, multiplicação e dispersão (vento, água, solos, temperatura, pH, etc.)

Não há condições ambientais conhecidas ou previstas que possam afetar a sobrevivência, a multiplicação e a disseminação de Pexa-Vec. Desconhece-se a ecologia do VV. 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. 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.



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

**Sensibilidade a agentes
específicos**

Pexa-Vec é um vírus com invólucro à base de lípidos e é, consequentemente, sensível a muitos desinfetantes clássicos, como o hipoclorito de sódio (10 minutos a uma concentração tão baixa quanto 0,02% (Klein M. and DeForest A., 1965), aldeídos, álcoois (por ex., álcool isopropílico a 30% ou álcool etílico a 40% durante 10 minutos), peróxido de hidrogénio, compostos fenólicos e compostos quaternários de amónia (recomendação do CDC em www.bt.cdc.gov/agent/smallpox/response-plan/files/guide-f.pdf). Um desinfetante disponível no mercado, como por exemplo Virkon®, Incidin®, Amphospray® ou um germicida padronizado registado pela EPA, também serão eficazes se utilizados de acordo com as instruções do fabricante. VIG e cidofovir são as terapêuticas eficientes recomendadas pelos CDC nos EUA para determinadas reações graves à vacina da varíola.

B) Interações com o ambiente

Habitat previsto dos OGM

O habitat previsto de Pexa-Vec é o ser humano. O OGM foi desenhado para ser dirigido para as células cancerígenas e as experiências mostram que se replica preferencialmente nas células em divisão ativa. A presença do vetor foi documentada no sangue, em esfregaços faríngeos e em exsudados de pústulas de doentes aos quais foi administrado Pexa-Vec. Serão tomadas disposições neste ensaio clínico para minimizar a disseminação e a transmissão inadvertida. As informações clínicas disponíveis até à data sugerem que Pexa-Vec não se propagou às pessoas 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 improvável de um indivíduo exposto demonstrar toxicidade associada ao vírus, poderia iniciar-se terapêutica com VIG e/ou com cidofovir para contornar qualquer risco para a saúde pública.

**Estudos do comportamento e
características dos OGM e seu
impacte ecológico, realizados
em ambiente natural simulado,
como, por exemplo,
microcosmos, salas de cultura,
estufas**

Não há dados disponíveis quanto ao comportamento e características de Pexa-Vec nos ambientes referidos.



Capacidade de transferência genética:

Transferência pós-libertação do material genético dos OGM para outros organismos nos ecossistemas afetados

Há um potencial mínimo para a transferência de genes para outras espécies no âmbito da libertação proposta do OGM. O OGM irá ser libertado para os doentes em quartos de hospital e é improvável que entre em contacto com outras espécies animais.

Transferência pós-libertação do material genético de organismos nativos para os OGM

Há um potencial mínimo para a transferência de genes para outras espécies no âmbito da libertação proposta do OGM. O OGM irá ser libertado para os doentes em quartos de hospital e é improvável que entre em contacto com outras espécies animais.

Probabilidades de seleção pós-libertação que conduzam à expressão de características genéticas inesperadas e ou indesejáveis no organismo modificado

Não há dados disponíveis.

Medidas aplicadas para garantir e verificar a estabilidade genética. Descrição das características genéticas que possam impedir ou minimizar a disseminação do material genético. Métodos de verificação da estabilidade genética

As características genéticas que minimizam a dispersão de Pexa-Vec são as modificações genéticas que levam à capacidade replicativa limitada do vetor. A reposição da capacidade replicativa é improvável, dado que os estudos de estabilidade genética anteriores não evidenciaram revertidos de Pexa-Vec.

A estabilidade genética de Pexa-Vec pode verificar-se em placas isoladas com a deteção da expressão de β -galactosidase (ver secção II.C.2.(s)). A β -galactosidase de E. coli é facilmente detetada através de kits laboratoriais comerciais comuns, que já se encontram disponíveis e rotineiramente em stock nos hospitais.

Itinerários de disseminação biológica, modos conhecidos ou potenciais de interação com o agente de disseminação, incluindo a inalação, ingestão, contacto superficial, construção de galerias, etc.

Ver secção "Outros perigos do produto"

Descrição dos ecossistemas em que o OGM poderá ser disseminado

Desconhece-se a ecologia do VV. Pensa-se em geral que o VV não se encontra naturalmente no meio ambiente. Não se prevê que as modificações genéticas introduzidas em Pexa-Vec aumentem a capacidade de disseminação e de sobrevivência do OGM em comparação com o vírus parental.

Potencial de aumento excessivo da população no ambiente

Não há nenhuma condição conhecida que pudesse levar à sobrevivência e ao aumento da população no meio ambiente.

Vantagem competitiva dos OGM em relação ao organismo recetor ou parental não modificados

A vantagem da utilização de Pexa-Vec em doentes com cancro avançado em comparação com o VV é que Pexa-Vec foi desenhado para se replicar preferencialmente nas células em divisão ativa e, por conseguinte, para se propagar sobretudo nas células cancerígenas (Parato K.A. et al., 2011).

Se pertinente, identificação e descrição dos organismos alvo

Ver secção "Informação sobre o OGM final"



Se pertinente, mecanismo e resultados da interação esperada dos OGM libertados com o organismo alvo

Ver secção "Informação sobre o OGM final"

Identificação e descrição dos organismos não alvo que poderão ser adversamente afetados pela libertação do OGM e previsão dos mecanismos inerentes à interação adversa eventualmente apurada

Ver secção "Informação sobre o OGM final"

Probabilidade de alteração das interações biológicas ou da gama de hospedeiros a seguir à libertação Frequência de mobilização

Ver secção "Informação sobre o OGM final"

Interações conhecidas ou previstas com organismos não alvo no ambiente, incluindo com concorrentes, presas, hospedeiros, simbiotes, predadores, parasitas e agentes patogénicos

Ver secção "Informação sobre o OGM final"

Participação conhecida ou prevista em processos biogeoquímicos

Ver secção "Informação sobre o OGM final"

Outras eventuais interações com o ambiente

Ver secção "Informação sobre o OGM final"

V) Informações sobre a monitorização, controlo e tratamento de resíduos e planos de emergência

A) Técnicas de monitorização

Métodos de rastreio dos OGM e de monitorização dos seus efeitos

Métodos de rastreio dos OGM: conforme descrito na secção IV.B.5, a expressão de β -galactosidase pode verificar-se nos doentes através de imuno-histoquímica e através da deteção de anticorpos específicos para a β -galactosidase. Os genomas de VV também podem monitorizar-se através de Q-PCR no sangue, no plasma ou nas biopsias de tecido dos doentes. Também podem detetar-se unidades virais infecciosas através de ensaio de placas nos fluidos biológicos dos doentes.
Métodos de monitorização dos efeitos do OGM: a monitorização dos efeitos de Pexa-Vec irá consistir na monitorização e avaliação da segurança, da eficácia e também da resposta imunológica nos doentes.

Especificidade (para identificação dos OGM e para os distinguir do dador, do recetor ou, quando necessário, dos organismos parentais), sensibilidade e fiabilidade das técnicas de monitorização

Sensibilidade do ensaio de Q-PCR: o limite de deteção no plasma e no sangue é de 5 cópias/reação.
Sensibilidade do ensaio em placas: o limite de deteção é de 20 UFP/mL na amostra inicial (urina, EDTA-plasma ou esfregaços faríngeos).
Sensibilidade à deteção da expressão de β -galactosidase: se necessário, o teste para a deteção da expressão de β -galactosidase será desenvolvido e a respetiva sensibilidade será determinada nessa altura.

Técnicas de deteção das transferências do material genético doado para outros organismos

A deteção da transferência do gene lac-Z para outro organismo pode fazer-se medindo a expressão de β -galactosidase nesse organismo. Também pode monitorizar-se a transferência do gene hGM-CSF determinando os anticorpos para hGM-CSF no caso de um organismo imunocompetente.

Duração e frequência da monitorização

A segurança e eficácia clínica, bem como a resposta imunológica, serão monitorizadas durante o ensaio clínico, conforme descrito no protocolo clínico.

B) Controlo da libertação

Métodos e procedimentos para evitar e ou minimizar a disseminação dos OGM para além do local da libertação ou da zona designada para a sua utilização

Ver secções "Preparação do local antes da libertação", "Medidas aplicadas durante a libertação para proteção dos trabalhadores", "Tratamento do local pós-libertação" e "Técnicas previstas para a eliminação ou inativação dos OGM no fim da experiência"

Métodos e procedimentos para a proteção do local contra a intrusão de indivíduos não autorizados

Todas as zonas nas quais Pexa-Vec irá ser manuseado e administrado aos doentes, e nas quais os doentes serão hospitalizados após a administração de Pexa-Vec terão de ser de acesso restrito (i.e. o acesso a estas zonas será controlado e limitado à equipa hospitalar autorizada que recebeu formação sobre as medidas para controlar a infeção). Será afixado o símbolo internacional de perigo biológico em cada uma das entradas para as zonas restritas. Não está planeada nenhuma outra medida específica para proteger o centro de ensaio da intrusão por pessoas não autorizadas.

Métodos e procedimentos para impedir outros organismos de entrar no local

Não será aplicado nenhum procedimento em particular para evitar qualquer contaminação por outro organismo viral, à exceção dos procedimentos hospitalares padronizados.



C) Tratamento de resíduos

Tipo de resíduos gerados

Ver secção “Técnicas previstas para a eliminação ou inativação dos OGM no fim da experiência “

Quantidade prevista desses resíduos

A titulação do vírus no lote clínico que será utilizado para o ensaio JX594-HEP024 é de $5,0 \times 10^8$ UFP/mL. O vírus encontra-se suspenso num volume total de 2,3 mL, dos quais são extraíveis 2,0 mL.

Os 300 doentes aleatorizados para o braço experimental serão tratados através de injeções IT de PexaVec na dose de 1×10^9 UFP ($9,0 \log$ UFP) nos Dias 1, 15 e 29.

A dose total que será injetada aos doentes do ensaio clínico proposto será de $3,0 \times 10^9$ UFP.

Descrição dos tratamentos previstos

Ver secção “Técnicas previstas para a eliminação ou inativação dos OGM no fim da experiência “



AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE

D) Planos de emergência

Métodos e procedimentos para controlo dos OGM em caso de disseminação inesperada

Será pedido ao pessoal envolvido no manuseamento de Pexa-Vec e no cuidado dos doentes que atuem conforme o recomendado abaixo em caso de um incidente com a utilização de Pexa-Vec.

Contaminação cutânea:

Deve colocar-se imediatamente um lenço de papel absorvente sobre a área afetada, tendo retirado as roupas contaminadas, que devem ser tratadas como material infeccioso. Após a remoção deste lenço de papel, lavar muito bem a pele com um sabão suave. Enxaguar abundantemente com água da torneira. O lenço de papel absorvente retirado deve ser eliminado com material infeccioso, segundo o procedimento hospitalar habitual. Em seguida, tratar a área cutânea da seguinte forma:

- Tratar com uma solução de lixívia com cloro ativo a 0,45% (3 pastilhas [se forem de 1,5 g/pastilha de cloro ativo] por litro de água ou 1 volume de lixívia com Cl a 2,6% [i.e. 26 g/l de cloro] para 5 volumes de água ou 1 volume de lixívia com Cl a 9,6% [i.e. 96 g/l de cloro] para 20 volumes de água).

Tratar seguindo estes passos: 1. Humedecer uma compressa com a solução acima. 2. Deixar em contacto com a área contaminada durante pelo menos 5 minutos. 3. Enxaguar a área cutânea abundantemente com água da torneira.

ou:

- Tratar com uma solução de iodo a 4% durante 5 minutos, utilizando uma compressa. Enxaguar abundantemente com água da torneira. Em seguida tratar a área com uma solução de iodo a 10% durante 5 minutos. Enxaguar abundantemente com água da torneira.

Além disso, em caso de lesão (corte ou punção), permitir o sangramento da ferida antes de a irrigar com água corrente limpa, de preferência esterilizada. Em seguida, cobrir a área lesionada com um penso de gaze estéril, que deve ser eliminado adequadamente de acordo com o procedimento hospitalar habitual quando retirado. O indivíduo exposto deve ser referenciado e clinicamente monitorizado por um médico com conhecimentos no cuidado e tratamento de doentes com infeções por Vaccinia. É necessária uma avaliação e seguimento médicos do indivíduo exposto até se excluir a possibilidade de uma infeção ativa, ou conforme o exigido pelas políticas da instituição.

Contaminação ocular:

Enxaguar imediatamente e durante 3 minutos o(s) olho(s) afetado(s) com água da torneira ou, idealmente, com uma solução de soro fisiológico (NaCl a 0,9%) fazendo o líquido fluir lateralmente para o(s) olho(s) afetado(s). Caso um único olho seja afetado, evitar a contaminação do outro olho (o olho afetado terá de estar abaixo do outro olho durante o enxaguamento). Manter as pálpebras abertas e mexer o olho em todas as direções. Se disponível, instilar uma gota de uma solução de trifluridina a 1%. A pessoa lesada deve receber aconselhamento de um oftalmologista assim que possível. É necessária uma avaliação e seguimento médicos do indivíduo exposto até se excluir a possibilidade de uma infeção ativa, ou conforme o exigido pelas políticas da instituição.

Ingestão:

Não induzir o vómito. Contactar imediatamente o investigador ou um médico. É necessária uma avaliação e seguimento médicos do indivíduo exposto até se excluir a possibilidade de uma infeção ativa, ou conforme o exigido pelas políticas da instituição. Para qualquer exposição inadvertida, deve colher-se uma amostra de soro no momento da notificação da exposição e a cerca de 4 semanas pós-exposição (se possível). Ambas as amostras devem ser conservadas para testes de anticorpos.



**AGÊNCIA
PORTUGUESA
DO AMBIENTE**

**Métodos para a
descontaminação das zonas
afetadas, ou seja, erradicação
dos OGM**

Em caso de derrame acidental, as pessoas na área imediata devem ser alertadas e o restante pessoal da instituição será notificado conforme o exigido pelas políticas institucionais. A área do derrame deve ser contida, limitando o tráfego não essencial na área e utilizando barreiras para prevenir o fluxo do material para além da área local. O pessoal envolvido na limpeza do derrame deve usar luvas, bata, uma máscara cirúrgica e óculos de segurança com proteções laterais (ou óculos de mergulho). Deve permitir-se o assentamento dos aerossóis antes de se colocarem toalhas de papel ou material absorvente de laboratório sobre o derrame. Os vírus Vaccinia, tal como a maior parte dos vírus com invólucro, são sensíveis à inativação pelos métodos físicos e químicos padronizados de desinfecção. Deve utilizar-se um desinfetante hospitalar padronizado para limpar o equipamento ou os dispositivos médicos não críticos de cuidados prestados aos doentes entre a utilização para cada doente (por ex., arrastadeiras, cadeiras sanitárias, braçadeiras para medição da pressão arterial, oxímetros, aparelhos de medição da glicemia [Infection Control Guidelines 1998]). 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 (75 ppm), compostos fenólicos e aldeídos. 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. Os dispositivos críticos e semi-críticos devem ser limpos e reprocessados em conformidade com as orientações institucionais.

**Métodos para a eliminação ou
saneamento de plantas, animais,
solos, etc., que tenham sido
expostos durante ou após a
disseminação**

Não aplicável.

**Métodos para o isolamento da
zona afetada pela propagação**

Ver a secção "Métodos para a descontaminação das zonas afetadas, ou seja, erradicação dos OGM"

**Planos para proteger a saúde
humana e o ambiente no caso da
ocorrência de efeitos
indesejáveis**

Os doentes serão monitorizados quanto à ocorrência de acontecimentos adversos e de acontecimentos adversos graves (AAG) em conformidade com o protocolo clínico. Cada AAG será registado e avaliado pela equipa hospitalar e pelo promotor do estudo, notificando-se as Autoridades de Saúde quando relevante. As instruções sobre como prevenir a disseminação e a contaminação são fornecidas na Brochura do Investigador, nas RECOMENDAÇÕES PARA O MANUSEAMENTO DE PEXA-VEC E GESTÃO DE DOENTES (Anexo B) e na documentação clínica fornecida ao centro do estudo.

Responsável pela notificação

Assinatura

Nome

DIANA FERREIRA

Data

02-JUNHO-2016

Anexos:

- *Resumo da notificação efetuada nos termos da Decisão do Conselho n.º 2002/813/CE*

- *Relatório da avaliação dos riscos ambientais efetuada nos termos do anexo II do Decreto-Lei n.º 72/2003*



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*
- 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.
- Avanzi G.C., Lista P., Giovinazzo B., Miniero R., Saglio G., Benetton G., Coda R., Cattoretti G. and Pegoraro L. "Selective growth response to IL-3 of a human leukaemic cell line with megakaryoblastic features." *Br J Haematol.* (1988) 69(3): 359-366.
- Baxby D. *Vaccinia virus.* New York, Elsevier.(1985)
- 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)
- Bell J., Le Boeuf R. and Wang A. "Characterization of plaque-purified JX-594: restriction enzyme and insert DNA sequence analyses. ." Study Report (JXR019) Ontario, Canada, OHRI, Center for Cancer Therapeutics, (2008)
- Breitbach C.J., Burke J., Jonker D., Stephenson J., Haas A.R., Chow L.Q., Nieva J., Hwang T.H., Moon A., Patt R., Pelusio A., Le Boeuf F., Burns J., Evgin L., De Silva N., Cvancic S., Robertson T., Je J.E., Lee Y.S., Parato K., Diallo J.S., Fenster A., Daneshmand M., Bell J.C. and Kim D.H. "Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans." *Nature.* (2011) 477(7362): 99-102.
- 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.
- Casey C., Vellozzi C., Mootrey G.T., Chapman L.E., McCauley M., Roper M.H., Damon I. and Swerdlow D.L. *Vaccinia Case Definition Development Working Group; Advisory Committee on Immunization Practices-Armed Forces Epidemiological Board Smallpox Vaccine Safety Working Group. Surveillance Guidelines for Smallpox vaccine (vaccinia) adverse reactions. MMWR Recomm Rep. 2006 Feb.(2006) 3: 1-16.*
- CDC. *US CDC (Biosafety in microbiological and biomedical laboratories (BMBL) 5th Edition, December 2009)* (2009)
- Chakrabarti S., Brechling K. and Moss B. "Vaccinia virus expression vector: coexpression of beta-galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques." *Mol Cell Biol.* (1985) 5(12): 3403-3409.
- Chakrabarti S., Sisler J.R. and Moss B. "Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression." *Biotechniques.* (1997a) 23(6): 1094-1097.
- Chakrabarti S., Sisler J.R. and Moss B. "Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression." *Biotechniques.* (1997b) 23(6): 1094-1097.
- 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)
- 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.



- Davison A.J. and Moss B. "Structure of vaccinia virus early promoters." *Journal of Molecular Biology*. (1989) 210(4): 749-769.
- Dranoff G., Jaffee E., Lazenby A., Golumbek P., Levitsky H., Brose K., Jackson V., Hamada H., Pardoll D. and Mulligan R.C. "Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity." *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1993) 90(8): 3539-3543.
- Dumbell K.R. *Aspects of the biology of orthopoxviruses relevant to the use of recombinant vaccinia as field vaccines*. New York, Elsevier.(1985)
- Egberink H.F., Willemse A. and Horzinek M.C. "Isolation and identification of a poxvirus from a domestic cat and a human contact case." *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B*. (1986) 33(3): 237-240.
- 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.
- Gershon P.D., Kitching R.P., Hammond J.M. and Black D.N. "Poxvirus genetic recombination during natural virus transmission." *The Journal of general virology*. (1989) 70 (Pt 2): 485-489.
- Grabenstein J.D. and Winkenwerder W., Jr. "US military smallpox vaccination program experience." *Jama*. (2003) 289(24): 3278-3282.
- Halsell J.S., Riddle J.R., Atwood J.E., Gardner P., Shope R., Poland G.A., Gray G.C., Ostroff S., Eckart R.E., Hospenthal D.R., Gibson R.L., Grabenstein J.D., Arness M.K. and Tornberg D.N. "Myopericarditis following smallpox vaccination among vaccinia-naive US military personnel." *JAMA : the journal of the American Medical Association*. (2003) 289(24): 3283-3289.
- 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.
- Hwang T.H., Moon A., Burke J., Ribas A., Stephenson J., Breitbach C.J., Daneshmand M., De Silva N., Parato K., Diallo J.S., Lee Y.S., Liu T.C., Bell J.C. and Kirn D.H. "A mechanistic proof-of-concept clinical trial with JX-594, a targeted multi-mechanistic oncolytic poxvirus, in patients with metastatic melanoma." *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. (2011) 19(10): 1913-1922.
- Infection Control Guidelines 1998 – Bolyard EA, Tablan OC, Williams WW, Pearson ML, Shapiro CN, Deithman SD. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). See also CDC; Am Journal Infect Control 1998;26:289-354.
- Kim J.H., Oh J.Y., Park B.H., Lee D.E., Kim J.S., Park H.E., Roh M.S., Je J.E., Yoon J.H., Thorne S.H., Kim D. and Hwang T.H. "Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF." *Mol Ther*. (2006) 14(3): 361-370.
- Klein M. and DeForest A. "The chemical disinfection of viruses." *Fed. Proc*. (1965) 24: 319-326.



- 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.
- Lee J.H., Roh M.S., Lee Y.K., Kim M.K., Han J.Y., Park B.H., Trown P., Kim D.H. and Hwang T.H. "Oncolytic and immunostimulatory efficacy of a targeted oncolytic poxvirus expressing human GM-CSF following intravenous administration in a rabbit tumor model." *Cancer Gene Therapy.* (2010) 17(2): 73-79.
- Lencioni R and Llovet JM. Modified RECIST (mRECIST) assessment for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2010;30:52–60.
- Llovet JM, Decaens T, Raoul JL, Boucher E, Kudo M, Chang C, et al. Brivanib in patients with advanced hepatocellular carcinoma who were intolerant to sorafenib or for whom sorafenib failed: results from the randomized phase III BRISK-PS study. *J Clin Oncol.* 2013;31:3509-16.
- Louie A.Y., Huber M.M., Ahrens E.T., Rothbacher U., Moats R., Jacobs R.E., Fraser S.E. and Meade T.J. "In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging." *Nat Biotechnol.* (2000) 18(3): 321-325.
- Mastrangelo M.J., Maguire H.C., Jr., Eisenlohr L.C., Laughlin C.E., Monken C.E., McCue P.A., Kovatich A.J. and Lattime E.C. "Intratumorally recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma." *Cancer Gene Therapy.* (1998) 6(5): 409-422.
- 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 and their replication." *Virology Study Report: 2079-2111* (1990)
- Moss B. *Poxviridae: The viruses and their replication. In Fields Virology*, D. M. Knipe.(2007)
- Moussatche N., Damaso C.R. and McFadden G. "When good vaccines go wild: Feral Orthopoxvirus in developing countries and beyond." *Journal of infection in developing countries.* (2008) 2(3): 156-173.
- Nalca A. and Zumbrun E. "ACAM2000TM: The new smallpox vaccine for United States Strategic National Stockpile." *Drug Design, Development and Therapy.* (2010) (4): 71-79.
- NIH. *NIH guidelines for research involving recombinant or synthetic nucleic acid molecules (NIH guidelines) November 2013*
- Palca J. "Row over vaccine trial." *Nature.* (1988) 331(6156): 470.
- 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., Kim 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).
- Pardoll D.M. "Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy." *Annu Rev Immunol.* (1995) 13: 399-415.
- Pether J.V., Trevains P.H., Harrison S.R., Baxby D., Bennett M. and Gibb A.P. "Cowpox from cat to man." *Lancet.* (1986) 1(8471): 38-39.



- 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.
- Tada H., Shiho O., Kuroshima K., Koyama M. and Tsukamoto K. "An improved colorimetric assay for interleukin 2." *J Immunol Methods.* (1986) 93(2): 157-165.
- Thorne S.H., Hwang T.H., O'Gorman W.E., Bartlett D.L., Sei S., Kanji F., Brown C., Werier J., Cho J.H., Lee D.E., Wang Y., Bell J. and Kim D.H. "Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum, systemically effective oncolytic poxvirus, JX-963." *The Journal of Clinical Investigation.* (2007) 117(11): 3350-3358.
- 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).
- Williams N.R. and Cooper B.M. "Counselling of workers handling vaccinia virus." *Occupational medicine.* (1993) 43(3): 125-127.
- Wong G.G., Witek J.S., Temple P.A., Wilkens K.M., Leary A.C., Luxenberg D.P., Jones S.S., Brown E.L., Kay R.M., Orr E.C. and et al. "Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins." *Science.* (1985) 228(4701): 810-815.
- Young G.E., Hidalgo C.M., Sullivan-Frohm 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.
- Zhu AX, Kudo M, Assenat E, Cattani S, Kang YK, Lim HY, et al. EVOLVE-1: Phase 3 study of everolimus for advanced HCC that progressed during or after sorafenib. *J Clin Oncol* 2014b;32:suppl 3; abstr 172. 2014 Gastrointestinal Cancers Symposium.