

Talimogene Laherparepvec

Dossier de Avaliação de Risco Ambiental

Versão para utilização em Consulta Pública em Portugal

Abril 2016

Amgen Ltd

240 Cambridge Science Park

Milton Road, Cambridge CB4 0WD

Reino Unido

Índice

1. Identificação das características que possam provocar efeitos adversos	8
1.1 Características do vírus parental, vírus modificado e do ambiente recetor	8
1.1.1 Características do vírus parental	8
1.1.3 Características do ambiente recetor	13
1.2 Características que podem provocar efeitos adversos	13
1.2.1 Efeitos na saúde humana	13
1.2.2 Efeitos no meio ambiente	18
1.3 Conclusões.....	19
2. Avaliação de eventuais consequências/Magnitude do efeito	19
2.1 Efeitos diretos da transmissão acidental de Talimogene Laherparepvec a um indivíduo	20
2.1.1 Magnitude do efeito.....	20
2.2 Efeitos indiretos da transmissão acidental de uma variante genética de Talimogene Laherparepvec a um indivíduo	27
2.2.1 Magnitude do efeito.....	27
2.2.2 Consequências da transmissão acidental de uma variante genética de talimogene laherparepvec a um indivíduo.....	27
2.3 Conclusões.....	28
3. Avaliação da probabilidade de ocorrência de efeitos adversos identificados	29
3.1 Probabilidade de efeitos diretos da transmissão acidental de talimogene laherparepvec a um indivíduo	29
3.1.1 Forma, escala e meio de libertação	29
3.1.2 Eventuais mecanismos de exposição e medidas de gestão de risco	30
3.1.3 Dados disponíveis relacionados com a disseminação do vírus e exposição humana a Talimogene Laherparepvec	31
3.1.4 Conclusão	31
3.2 Probabilidade de efeitos indiretos da transmissão acidental de uma variante genética de talimogene Laherparepvec a um indivíduo.....	31
3.3 Conclusões globais	32
4. Estimativa do risco colocado por cada característica identificada	32
4.1 Risco associado ao organismo parental (HSV-1 de tipo não mutado)	33
4.2 Risco associado à transmissão de talimogene laherparepvec a um recetor involuntário	34
5. Aplicação de estratégias de gestão para riscos.....	38
5.1 Desenho da construção viral	38

5.2 Controlo das libertações	38
5.3 Precauções no transporte	38
5.4 Precauções de manuseamento e administração	39
5.5 Limpeza e gestão de resíduos	41
5.6 Comunicação de riscos e advertências	43
5.7 Atividades de monitorização.....	43
5.8 Conclusões.....	43
6. Determinação do risco global do OGM.....	44
7. Referências.....	47

Lista de Tabelas

Tabela 1. Variantes genéticas estáveis teóricas de Talimogene Laherparepvec criadas por recombinação homóloga	15
Tabela 2. Classificações de biossegurança para o HSV-1 de tipo não mutado fora da EU	33

Lista de Abreviaturas

Termo/Abreviatura	Elucidação
% CV	Coeficiente de variação
°C	Graus Celsius
α -TIF	Fator transindutor <i>alfa</i>
AML	Leucemia mieloide aguda
APCs	Células apresentadoras de antígenos
BHK	Rim de cria de hamster
BSL-1	Nível 1 de biossegurança
BSL-2	Nível 2 de biossegurança
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
cGMP	Boas Práticas de Fabrico atuais
CMV	Citomegalovírus
SNC	Sistema nervoso central
CRO	<i>Contract Research Organization</i> (Empresas de Pesquisa Contratadas)
CT	Tomografia computadorizada
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOT	Departamento de Transportes dos EUA
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
ELISA	Ensaio Imunoabsorvente Ligado à Enzima
FAM	6-carboxifluoresceína
FBS	Soro bovino fetal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> dos Estados Unidos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
gC, gD, gH, gG, gL	Glicoproteínas (tipo C, D, H, G ou L)
GCP	Boas Práticas Clínicas
GFP	Proteína Fluorescente Verde
GLP	Boas Práticas Laboratoriais
GM-CSF	Fator estimulador da colónia de granulócitos-macrófagos
GMP	Boas Práticas de Fabrico
GTAC	Comité Consultivo de Terapia Genética
GxP	<i>Guidelines</i> de Boas Práticas, nas quais "x" pode ser "F" para Fabrico ou "C" para clínicas ou "L" para laboratório, etc.
hCMV IE	Citomegalovírus humano imediato precoce
hGM-CSF	Fator estimulador de colónia de granulócitos-macrófagos humano
HGMP	Projeto de mapeamento do genoma humano
HHV-1	Herpes Vírus humano de tipo 1
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
HSV	Vírus herpes simplex
HSV-1	Vírus herpes simplex de tipo 1
HSV-2	Vírus herpes simplex de tipo 2
HVEM	Mediador para entrada dos herpesvírus

Termo/Abreviatura	Explicação
IRL	Sequência repetida interna da região longa
IRS	Sequência repetida interna da região curta
i.l.	Intralesional
i.t.	Infratumoral
i.v.	Intravenoso
IATA	<i>International Air Transport Association</i>
IC50	Concentração inibitória a 50%
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
IPIM	Manual de Instruções do medicamento experimental
IEX	Cromatografia de troca iónica
IgG, IgM	Imunoglobulina G ou M
IMP	Medicamento experimental
LATs	Transcrição associada a latência
LD50	Dose letal mediana
mGM-CSF	Fator estimulador de colónia de granulócitos-macrófagos de murinos
MHC I or II	Complexo <i>major</i> de histocompatibilidade de Tipo I ou Tipo II
MOI	Multiplicidade de infeção
miRNA	Ácidos ribonucleicos micro
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MVL	Laboratórios de microvirologia
MVSS	<i>Master Viral Seed Stock</i>
NF12	<i>U.S. National Formulation 12</i>
NSN	Notificação de novas substâncias
OncoVEX ^{GM-CSF}	Vírus OncoVEX com expressão de hGM-CSF
OOS	Sem especificação
PAP	Fosfatase ácida prostática
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFU	Unidade formadora de placas
Ph Eur	Farmacopeia Europeia
PKR	Proteína R quinase
PPE	Equipamento protetor individual
QA	Avaliação da Qualidade
QC	Controlo de Qualidade
QMS	Sistema de Gestão da Qualidade
QP	Pessoa qualificada
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Tempo real
S	Curto
s.c.	Subcutâneo
SCCHN	Carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço

SDS	Dodecil sulfato de sódico
SEC	Cromatografia de exclusão por tamanho
SEM	Pele, olhos e/ou boca
SOP	Procedimentos operacionais padronizados
TAMRA	Tetrametilrodamina
TFF	Filtração de fluxo tangencial
TK	Timidina quinase
TRL	Sequência repetida do terminal longo
TRS	Sequência repetida do terminal curto
UK	Reino Unido
U _l	Região única longa
USP	Farmacopeia dos EUA
U _s	Região única curta
U.S.	Estados Unidos
VHS	Proteína do vhs (<i>virion host shutoff</i>)

Introdução

Talimogene laherparepvec (JS1/ICP34.5-/ICP47-/hGM-CSF), anteriormente designado por OncoVEX^{GM-CSF} é um vírus herpes simplex de tipo 1 (HSV-1), atenuado e recombinante. Talimogene laherparepvec foi criado pela modificação do genoma do HSV-1 de tipo não mutado (nova estirpe JS1 isolada) para suprimir funcionalmente as duas cópias dos genes ICP34.5 e ICP47 do “esqueleto” do vírus e para inserir uma “cassete” de expressão que codifica o gene do fator estimulador da colônia de granulócitos-macrófagos humano (hGM-CSF) nas duas regiões do ICP34.5.

Toda a informação técnica e científica sobre o OGM (Organismo Geneticamente Modificado) (talimogene laherparepvec) foi devidamente disponibilizada num documento em separado de acordo com o Anexo IIIA da Diretiva 2001/18/EC, sob a forma de informação confidencial.

Objetivo

O objetivo desta Avaliação de Risco Ambiental (ERA) é identificar e avaliar os potenciais efeitos adversos de talimogene laherparepvec na saúde humana e no meio ambiente que possam advir da realização de um ensaio clínico com um OGM, em conformidade com o Anexo IIA da Diretiva 2001/18/EC.

Talimogene laherparepvec é um medicamento experimental proposto para um estudo de fase 1b/3, multicêntrico, sem ocultação para proporcionar evidência de que um regime com uma imunoterapêutica oncolítica (talimogene laherparepvec) e um inibidor de um ponto de controlo imunitário (pembrolizumab) é seguro e tolerado e que a combinação pode aumentar a eficácia clínica de pembrolizumab em monoterapia no SCCHN (carcinoma das células escamosas da cabeça e pescoço), recorrente ou metastático. Talimogene laherparepvec destina-se a injeção intralesional em tumores cutâneos, subcutâneos e nodulares injetáveis por um Profissional clínico com experiência, num estabelecimento hospitalar onde o estudo esteja a decorrer.

Metodologia

Esta ERA foi realizada de acordo com o princípio de precaução, utilizando a metodologia estabelecida em Decisão de Comissão 2002/623/EC. Estes princípios gerais são:

- As características identificadas do OGM e sua utilização que tenham potencial para provocar efeitos adversos devem ser comparados aos aqui apresentados pelo organismo não-modificado do qual provém e sua utilização em situações equivalentes;
- A ERA deve ser efetuada de forma cientificamente correta e transparente, com base nos dados científicos e técnicos disponíveis;
- A ERA deve ser efetuada numa base caso-a-caso;
- Uma análise dos “efeitos cumulativos a longo prazo” relevantes para a introdução e condução do ensaio clínico.

1. Identificação das características que possam provocar efeitos adversos

1.1 Características do vírus parental, vírus modificado e do ambiente recetor

1.1.1 Características do vírus parental

O HSV-1 de tipo não mutado é um agente patogénico global endémico dos humanos, habitualmente transmitido pela primeira vez durante a infância através de contacto não sexual, apesar de poder ser adquirido por jovens adultos através de contacto sexual. Calcula-se que a seroprevalência em adultos seja de 70% em países desenvolvidos e 100% em países em desenvolvimento ([Gupta et al 2007](#)). O herpes bucolabial tem uma taxa de infeção de cerca de 33% em países em desenvolvimento e de 20% em países desenvolvidos ([Chayavichitsilp et al 2009](#)).

A sua transmissão é através de contacto direto com secreções infetadas ou mucosas/pele com lesões de um doente assintomático ou sintomático que dissemine o vírus ([Jerome & Morrow 2007](#); [Chayavichitsilp 2009](#); [Whitley 2006](#)). A transmissão do HSV-1 pode também verificar-se através de gotículas respiratórias ([Whitley 2006](#)).

O HSV-1 sobrevive no meio ambiente, nos hospedeiros (humanos), sob a forma de uma infeção persistente ou de uma infeção latente no núcleo de algumas células infetadas (principalmente neurónios do gânglio trigémeo), onde pode permanecer inativo indefinidamente ou ser reativado provocando a secreção de vírus e, por vezes, (mas nem sempre) sintomas clínicos.

Podem ocorrer diversas doenças mediadas pelo HSV-1 de tipo não mutado, como resumido abaixo.

Herpes labial/úlceras: As infeções primárias com HSV-1 são habitualmente adquiridas na infância e podem ser assintomáticas ou subclínicas ([Drew 2004](#); [Jerome & Morrow 2007](#); [Kimberlin 2005](#)). As infeções primárias sintomáticas manifestam-se maioritariamente como gengivo-estomatites, com febre, dores de garganta, halitose, anorexia, adenopatia cervical e edema das mucosas e lesões vesiculares e ulcerativas dolorosas na mucosa bucal, língua, gengivas e faringe ([Drew 2004](#); [Jerome & Morrow 2007](#); [Kimberlin 2005](#); [Miller & Dummer 2007](#)). As úlceras curam sem deixar cicatriz no prazo de 2-3 semanas ([Drew 2004](#); [Jerome & Morrow 2007](#)). As infeções recorrentes têm geralmente sintomas e uma evolução clínica mais moderadas ([Jerome & Morrow 2007](#)). As lesões recorrentes por HSV-1 ocorrem principalmente numa área específica do lábio (margem vermelha do lábio) e são conhecidas como “úlceras” ou “herpes labial” ([Drew 2004](#); [Kimberlin 2005](#)). As lesões curam-se em cerca de 8-10 dias ([Kimberlin 2005](#)).

Panarício herpético: Caracteriza-se pela formação de lesões vesiculares dolorosas na zona da unha ou dos dedos ([Drew 2004](#)) sendo observado com maior frequência em profissionais de saúde (dentistas, por exemplo).

Infeções oculares: A ulceração dendrítica característica ocorre na conjuntiva e córnea ([Drew 2004](#)). A infeção por HSV pode provocar outras doenças oftálmicas, nomeadamente

blefarite/dermatite, conjuntivite, queratite epitelial dendrítica e úlcera da córnea (Green & Pavan-Langston 2006).

Encefalites: Infecções graves do SNC, que afetam crianças e adolescentes (Whitley 2006). A encefalite é uma complicação rara que afeta aproximadamente 1 em 500.000 indivíduos por ano (Rozenberg et al, 2011). Pode ocorrer por infecção primária ou latente com o vírus HSV-1 (Drew 2004; Whitley 2006). A encefalite por HSV afeta um lobo temporal, causando sinais neurológicos focais e edema. A doença pode ser fatal (taxa de mortalidade de 70%) se não for tratada. (Drew 2004; Whitley 2006).

Herpes genital: O herpes genital é provocado maioritariamente pelo HSV-2, apesar de o HSV-1 se ter tornado tão frequente como o HSV-2 nas infecções genitais primárias em países desenvolvidos. É transmitido por via sexual através de contacto genital-genital ou orogenital.

Os medicamentos antivirais tais como o aciclovir, valaciclovir e famciclovir podem ser utilizados para inibir a replicação do HSV-1 de tipo não mutado (Drew 2004; Usatine & Tinitigan, 2010). O antivírico padrão utilizado contra o HSV-1 é o aciclovir. A inibição da replicação viral com aciclovir depende do gene da timidina quinase (TK) viral que cataliza o primeiro passo necessário à conversão de aciclovir de uma forma inativa para uma forma ativa. O valaciclovir e o famciclovir podem ser utilizados para inibir a replicação do HSV-1 de tipo não mutado (Usatine & Tinitigan, 2010). Em casos raros, o HSV consegue mutar as suas quinases virais para adquirir resistência ao aciclovir. Nestes casos, pode ser utilizado o antivírico Foscarnet (ácido fosfonofórmico) que não necessita de ativação por quinases virais. O Foscarnet inibe diretamente a DNA polimerase viral.

Os efeitos em populações especiais (neonatos e indivíduos imunocomprometidos) são discutidos em seguida.

A infeção neonatal por HSV provoca morbidade e mortalidade significativas apesar dos avanços significativos no tratamento (revisado em Kimberlin, 2004; Thompson & Whitley, 2011). A taxa atual estimada de ocorrência de doença neonatal por HSV nos Estados Unidos é de cerca de 1 em 3200 nascimentos. As infeções por HSV em recém-nascidos podem ser classificadas em três padrões, cuja frequência é praticamente igual. Incluem *doença disseminada* que envolve diversos órgãos viscerais, nomeadamente pulmões, fígado, glândulas suprarrenais, pele, olhos e cérebro; *doença do sistema nervoso central* (SNC), com ou sem lesões cutâneas e doença limitada à pele, olhos e/ou boca (*doença SEM*). Os indivíduos com doença disseminada e doença SEM têm uma manifestação mais precoce, geralmente aos 10-12 dias de vida, enquanto a doença do SNC se manifesta durante a segunda ou terceira semana de vida. Desde o aparecimento da terapêutica antivírica o prognóstico de HSV neonatal tem vindo a melhorar. Antes do aparecimento da terapêutica antivírica, 85% dos doentes com doença disseminada por HSV e 50% dos doentes com doença do SNC morriam no prazo de 1 ano. Com a utilização de aciclovir em doses alta, a mortalidade a 12 meses diminuiu para 29% na doença neonatal disseminada por HSV e para 4% na doença do SNC por HSV (revisado em Kimberlin 2004; Thompson & Whitley 2011). A maioria das infeções neonatais por HSV são provocadas pelo HSV-2 mas pensa-se que cerca de 15 a 30% sejam provocadas pelo vírus do Herpes Simplex neonatal HSV-1 (Rudnick & Hoekzema 2002).

Em hospedeiros imunocomprometidos, nomeadamente os com infeção por VIH, a doença por HSV pode ser particularmente grave, resultando em infeção crónica, persistente, ativa e, em alguns casos, em doença potencialmente fatal (Stewart et al 1995). Os doentes imunocomprometidos, especialmente os com diminuição da imunidade das células T, desenvolvem lesões graves que persistem durante mais tempo do que as no hospedeiro normal; estas lesões podem progredir para doença visceral. Consequentemente, quase todos os exemplos de complicações graves de infeções por HSV de tipo não mutado em humanos ocorrem em indivíduos imunocomprometidos. Nestes casos, o sistema imunitário é incapaz de controlar a infeção, que se dissemina. Os indivíduos imunocomprometidos suscetíveis incluem doentes a receberem citotóxicos, doentes transplantados e doentes com o vírus da imunodeficiência humana (VIH) (revisto em Brady & Bernstein 2004). O desenvolvimento de resistência do HSV ao aciclovir, um fenómeno observado especialmente em doentes imunocomprometidos devido ao seu tratamento de longo prazo, é também um motivo de preocupação. Contudo, até à data, não foi notificado qualquer caso de encefalite por uma estirpe de HSV resistente a aciclovir (Rozenberg et al 2011).

Durante a replicação ou a latência não se verifica integração do genoma viral com o genoma celular. O genoma viral linear circulariza pouco tempo após a infeção e este DNA circular é o modelo para replicação, permanecendo como um epíssoma extracromossómico, não integrado no genoma do hospedeiro (Efstathiou et al 1986; Mellerick & Fraser 1987; Rock & Fraser 1985). É provável que a circularização resulte da ligação direta mediada por fatores celulares pré-existentes ou componentes do novo virião (Mocarski & Roizman 1982).

Fora do hospedeiro, o HSV-1 é um vírus com envelope, sensível a inativação física (desidratação, calor ou pH baixo) e a desinfetantes (solventes lipídicos e detergentes suaves) que rapidamente o inativam. Não forma estruturas de sobrevivência e a sua sobrevivência fora do organismo hospedeiro está limitada a períodos de tempo curtos (Chayavichitsilp et al 2009). Uma revisão de Kramer et al (2006) refere que o HSV-1 pode sobreviver em superfícies inanimadas secas durante períodos que oscilam entre poucas horas e 8 semanas (esta última sobrevivência referida numa superfície seca, Mahl & Sadler (1975)). Contudo, publicações individuais referem tempos de sobrevivência muito inferiores em condições de humidade elevada. Nerurkar et al (1983) relata tempos de sobrevivência de 4 horas em água da torneira e de 4,5 horas em superfícies de plástico com humidade elevada. Diversas publicações de Bardell (1989, 1990, 1993, 1994) relatam uma redução marcada (2-3 log) nos títulos virais do HSV-1 ao fim de 1 hora em superfícies de plástico (maçanetas de portas) e superfícies cromadas (torneiras, manípulos), apesar do vírus infeccioso ainda ser recuperável ao fim de 2 horas (o ponto temporal máximo avaliado). O vírus infeccioso pode ainda ser recuperado da pele humana, no mínimo, 2 horas depois da sua introdução.

O ser humano é o único hospedeiro natural para a infeção por HSV-1. A Amgen realizou uma pesquisa bibliográfica para identificar relatos de infeções por HSV-1 em espécies não humanas. A pesquisa bibliográfica mostrou que a infeção em não humanos é rara mas identificou que foi reportada infeção por HSV-1 em diferentes espécies, nomeadamente roedores, coelhos, porcos-espinhos e primatas não humanos (Weissenbock et al 1997; Grest et al 2002; Huemer et al 2002; Wohlsein et al 2002; Allison et al 2002; Lefaux et al 2004; Muller et al 2009; Longa et al 2011). Nos relatos de casos disponíveis a infeção ocorreu subsequentemente a um

contacto próximo com humanos com propagação ativa de vírus. Um artigo de revisão que discute relatos de casos de HSV-1 que provocaram doença aguda fatal em primatas não humanos refere que “estudos recentes de infecção por HSV-1 em animais em cativeiro continuam a ser raros” (Epstein and Price 2009). Uma revisão da pesquisa bibliográfica não sustenta a infecção por HSV-1 humano em cães, gatos, cavalos, vacas ou outros animais domésticos comuns, apesar de poderem ser infetados com outros membros da família *Alfa-herpes-vírus* (McGeoch et al 2006). A infecção por HSV-1 em coelhos e roedores sintetiza as características histopatológicas marcantes da infecção sistêmica e neurovirulenta de HSV-1 em humanos, sendo frequentemente utilizados modelos experimentais para compreender os diversos aspetos da virologia do herpes, nomeadamente os mecanismos de infecção, genética viral, patogénese, latência e reativação (Webre et al 2012; Kumel et al 1986; Leib et al 2009; MacLean et al 1991; Weinstein et al 1990). Nestas experiências, os animais são infetados por injeção direta, instilação intranasal ou escarificação em superfícies mucosas.

As infeções naturais e experimentais em primatas não humanos sugerem que são extremamente sensíveis à infecção por HSV-1, que resulta em febre, lesões ulcerativas em redor da boca, infecção disseminada e encefalite fatal (Lefaux et al 2004; Longa et al 2011). Da mesma forma, foram referidas convulsões, desorientação e apatia após infecção ocular em chinchilas e sinais neurológicos graves resultantes de encefalite num coelho de estimação (Wohlsein et al 2002; Weissenbock et al 1997). A histopatologia nestes animais revelou necrose neuronal e corpos de inclusão intranuclear em diversas regiões do cérebro.

Talimogene laherparepvec foi geneticamente modificado para diminuir a replicação viral em células humanas normais, no entanto, não foi avaliado para atenuação de infecção e neurovirulência em outras espécies além de ratinhos. Em ratinhos imunocompetentes, a deleção do ICP34.5 diminuiu marcadamente a potência da estirpe parental de talimogene laherparepvec para induzir neurovirulência após injeção intracerebral direta ou instilação intranasal, não tendo sido associada a virulência sistêmica após exposição repetida em doses até 60 vezes superiores à maior dose clínica proposta (Estudos Amgen 4648-00027 e 4648-00028). Estes dados apontam para que talimogene laherparepvec tenha um risco reduzido ou sistémico de neurovirulência em outras espécies, conforme observado em ratinhos.

1.1.2 Características do vírus geneticamente modificado - Talimogene Laherparepvec

As modificações genéticas introduzidas no isolado clínico (JS1) do HSV-1 de tipo não mutado para produzir talimogene laherparepvec são resumidas em seguida.

Talimogene laherparepvec foi criado através da modificação do genoma do HSV-1 de tipo não mutado (novo isolado JS1) para apagar funcionalmente as duas cópias do gene ICP34.5 e ICP47 do “esqueleto” viral e para inserir uma cassete de expressão codificadora do gene do fator estimulador da colónia de granulócitos-macrófagos humano (hGM-CSF) nas duas regiões do ICP34.5.

A deleção funcional de ICP34.5 em talimogene laherparepvec diminui significativamente a virulência comparativamente ao HSV-1 de tipo não mutado. Assim, talimogene laherparepvec é capaz de se replicar em células tumorais mas está significativamente atenuado em células normais. É provável que, assim sendo, a toxicidade mediada pelo vírus seja residual. Estirpes

de HSV-1 sem ICP34.5 foram amplamente utilizadas sem incidentes em diversos modelos animais e também em diversos ensaios clínicos em humanos.

Talimogene laherparepvec foi criado para se replicar seletivamente em tumores, matando as células tumorais por lise viral e, em seguida, propagar-se pelo tumor e levar a cabo a lise de células tumorais. Adicionalmente, a oncólise de células tumorais por talimogene laherparepvec também liberta e expõe uma grande variedade de antígenos para iniciar uma resposta imunológica sistêmica, aumentada através da expressão de uma proteína estimuladora imunológica, o hGM-CSF do vírus (Estudo 4647-00041). Prevê-se que os antígenos libertados pelo tumor sejam capturados por células apresentadoras de antígenos (APCs) que depois os transportam para os gânglios linfáticos e se apresentam às células T, induzindo uma resposta imunitária. O hGM-CSF aumenta a atividade das APCs, melhorando as respostas imunitárias. Esta resposta imunitária destina-se a proporcionar um efeito antitumoral sistêmico, que inclui a redução da dimensão dos tumores que não estão em contacto direto com talimogene laherparepvec, a redução da doença micrometastática e proteção contra futura recidiva.

As principais características de talimogene laherparepvec são:

- O HSV-1 é um vírus não integrativo portanto, o tratamento com talimogene laherparepvec não resulta em quaisquer alterações no DNA do doente.
- Talimogene laherparepvec é baseado numa nova estirpe isolada de HSV-1 (estirpe JS1) que demonstrou matar células tumorais humanas mais eficazmente do que estirpes de laboratório de HSV-1 ([Liu et al 2003a](#)).
- A proteína ICP34.5 do HSV-1 promove habitualmente a neurovirulência ao ultrapassar as vias de defesa do hospedeiro e permitir que o vírus se replique em células não divisíveis, tais como os neurónios (ver Secção II.A.10(b)). As duas cópias do ICP34.5 são funcionalmente apagadas de talimogene laherparepvec, para evitar que o vírus se replique eficazmente em células não divisíveis. Em células tumorais é frequente que estas vias de defesa do hospedeiro sejam afetadas por isso, o ICP34.5 é indispensável para a replicação ([Aita et al 1999](#); [Farassati et al 2001](#); [Liang et al 1999](#)).
- A proteína ICP47 do HSV-1 inibe habitualmente o processamento de antígenos em células infetadas, permitindo que o vírus se esconda do sistema imunitário ([Hill et al 1995](#)). O ICP47 é apagado de talimogene laherparepvec de forma a melhorar a apresentação de antígenos virais e tumorais após a replicação viral específica para o tumor, aumentando a resposta imunológica antitumoral ([Liu et al 2003a](#)).
- A eliminação de ICP47 de talimogene laherparepvec provoca um aumento da expressão de outra proteína viral, a US11 que tem alguma redundância funcional com o ICP34.5 ([Mohr and Gluzman 1996](#)). O aumento da expressão da US11 melhora a replicação do HSV-1 sem ICP34.5 nas células tumorais sem perder a seletividade tumoral ([Mohr et al 2001](#)).
- Talimogene laherparepvec expressa a proteína estimuladora imunológica hGM-CSF para aumentar a resposta imunológica aos antígenos tumorais libertados, ao ajudar na diferenciação e proliferação de precursores de células dendríticas no tumor injetado e em seu redor ([Dranoff et al 1993](#)).

- O gene timidina quinase (TK) do HSV permanece intacto, o que torna talimogene laherparepvec suscetível a agentes antiviricos, tais como o aciclovir. Assim, o aciclovir pode ser utilizado para bloquear a replicação de talimogene laherparepvec.

1.1.3 Características do ambiente recetor

O objetivo da libertação é conduzir um ensaio de fase 1b/3, multicêntrico e sem ocultação para avaliar que o regime com uma imunoterapêutica oncolítica (talimogene laherparepvec) e um inibidor de um ponto de controlo imunitário (pembrolizumab) é seguro e tolerado e que a combinação poderá aumentar a eficácia clínica de pembrolizumab em monoterapia no SCCHN (carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço) recorrente ou metastático.

Talimogene laherparepvec destina-se a injeção intralesional em tumores cutâneos, subcutâneos e nodulares injetáveis por um médico num centro de um estabelecimento hospitalar.

Antes da administração, o produto deverá ser conservado num frigorífico seguro, à temperatura controlada de -70°C ou inferior, na farmácia ou noutra local seguro adequado.

Após a injeção, o local das injeções devem ser cobertos por um penso oclusivo antes de os doentes regressarem a suas casas.

1.2 Características que podem provocar efeitos adversos

1.2.1 Efeitos na saúde humana

1.2.1.1 Efeitos diretos na saúde humana

1.2.1.1.1 Transmissão involuntária de talimogene laherparepvec a um recetor humano

O HSV-1 de tipo não mutado é um agente patogénico global endémico dos humanos, que sobrevive no ambiente na espécie hospedeira sob a forma de um infeção persistente ou como infeção latente no núcleo de algumas células infetadas (principalmente neurónios do gânglio trigémeo), onde permanece inativo indefinidamente ou é reativado dando origem à replicação do vírus e, por vezes (mas nem sempre) a sintomas clínicos (ver [Secção 1.1.1](#)).

A sua transmissão é através de contacto direto com secreções infetadas ou mucosas/pele com lesões, a partir de um doente assintomático ou de um doente sintomático que dissemine o vírus. A transmissão do HSV-1 pode também verificar-se através de gotículas respiratórias (ver [Secção 1.1.1](#)).

Talimogene laherparepvec é muito atenuado comparativamente ao HSV-1 de tipo não mutado em termos de virulência e patogenicidade através da deleção funcional do ICP34.5 de tipo não mutado. Da mesma forma, é provável que a determinação da latência esteja diminuída pela deleção funcional de ICP34.5 ([Perng et al 1996](#)), provavelmente devido à deficiente replicação do vírus nos tecidos periféricos inervados pelos neurónios. Os níveis de reativação do tipo não mutado podem ser alcançados a partir de um vírus com deleção de ICP34.5 se for utilizado 1000 vezes mais vírus do que o de tipo não mutado ([Perng et al 1996](#)). Nestas experiências, o

vírus nulo de ICP34.5 continuava avirulento, mesmo na dose infecciosa 1000 vezes superior, apontando para que a latência/reativação e virulência são separáveis.

Apesar disto, a transmissão acidental de talimogene laherparepvec a um recetor humano involuntário e a determinação de latência/reativação devem ser consideradas um risco potencial.

A transmissão inicial teria potencialmente um efeito imediato na saúde humana enquanto uma reativação seria vista como um efeito tardio.

1.2.1.1.2 Capacidade para transferência genética entre humanos e talimogene laherparepvec

O DNA do HSV-1 de tipo não mutado circulariza como um epissoma extracromossômico e não está integrado no genoma da célula hospedeira (ver [Secção 1.1.1](#)). A capacidade do genoma do HSV-1 para circularizar não exige as sequências repetidas do terminal vírico, a síntese de quaisquer proteínas virais ou replicação viral. Assim, é de prever que a eficiência e cinética da circularização do DNA do genoma de talimogene sejam as mesmas do HSV-1 de tipo não mutado, sem integração no genoma da célula hospedeira.

1.2.1.2 Efeitos indiretos na saúde humana

1.2.1.2.1 Transmissão involuntária de uma variante genética de Talimogene Laherparepvec a um recetor humano

A criação de um HSV-1 de tipo não mutado durante o fabrico não é possível uma vez que nenhuma das deleções do gene de talimogene laherparepvec necessita de complemento para crescimento em cultura de tecidos, o que significa que as células utilizadas para fabricar talimogene laherparepvec não contêm as sequências de DNA que codificam os genes apagados, evitando a reparação das mutações durante a produção do vírus. Cada lote de medicamento é rigorosamente controlado durante a produção e rigorosamente testado para confirmar a sua identidade.

A estabilidade genética de talimogene laherparepvec em isolamento (i.e. na ausência de uma estirpe diferente coinfectante de HSV-1) foi demonstrada e continua a ser monitorizada. Foram realizados testes de estabilidade genética por sequenciação repetida de pequenas áreas do genoma de talimogene laherparepvec entre 2001 e 2012. Por exemplo, o GM-CSF do genoma de talimogene laherparepvec foi completamente coberto por projetos de sequenciação em larga escala, tanto de talimogene laherparepvec derivado de células de BHK como de células Vero, tendo sido demonstrada a sua conservação a 100%.

Espera-se que a estabilidade genética de talimogene laherparepvec *in vivo* seja a mesma do HSV-1 de tipo não mutado.

Experimentalmente, demonstrou-se que a recombinação não homóloga (recombinação entre diferentes regiões dos dois genomas virais) não ocorre em níveis detetáveis entre vírus não aptos para replicação e aptos para replicação ([Smith et al 2003](#)).

Contudo, pode ocorrer recombinação homóloga genómica espontaneamente na natureza entre os genomas virais de estirpes de HSV-1 de tipo não mutado. Para que isso ocorra seria

fundamental que uma célula (humana) fosse infectada simultaneamente por duas estirpes diferentes.

Assim, existe potencial teórico para casos de recombinação homóloga entre talimogene laherparepvec e HSV-1 de tipo não mutado, levando à criação de uma variante genética de talimogene laherparepvec num indivíduo e à possibilidade de transmissão dessa variante genética. Os eventuais produtos de recombinação homóloga entre talimogene laherparepvec e HSV-1 de tipo não mutado estão resumidos na [Tabela 1](#). O potencial para a criação de variantes genéticas estáveis com características imprevisíveis é minimizado pelo desenho da construção genética de talimogene laherparepvec, conforme descrito em seguida.

Tabela 1. Variantes genéticas estáveis teóricas de Talimogene Laherparepvec criadas por recombinação homóloga

Gene	ICP34.5	GM-CSF	ICP47	Sobrerregulação do US11
Função	Virulência	Estimulação imunológica	Evasão imunológica	Aumenta a replicação dos vírus nulos de ICP34.5 em tumores
Variante genética				
Talimogene laherparepvec	-/-	+/+	-	+
Reparação do ICP47	-/-	+/+	+	-
Reparação do ICP34.5 homozigótico	+/+	-/-	-	+
Reparação do ICP47 e reparação do ICP34.5 homozigótico (HSV-1 de tipo não mutado)	+/+	-/-	+	-

No caso improvável da recombinação homóloga entre o HSV-1 de tipo não mutado e talimogene laherparepvec ocorrer, e na região do ICP34.5, o local de inserção da cassete de hGM-CSF (que está no lugar do ICP34.5) impõe que a transferência do gene do hGM-CSF resulte na deleção funcional do gene ICP34.5 do HSV-1 de tipo não mutado durante o processo de recombinação. O resultado desta recombinação seria, portanto, um vírus de tipo não mutado (ICP47+) com expressão de hGM-CSF mas funcionalmente apagado para ICP34.5 e, portanto, apenas capaz de replicação seletiva do tumor. A expressão de US11 seria equivalente ao tipo não mutado uma vez que as regiões reguladoras da US11 natural estão situadas dentro do ICP47. A variante de talimogene laherparepvec produzida simultaneamente neste contexto repararia o ICP34.5 mas não codificaria nem expressaria hGM-CSF. O ICP47 (e as regiões reguladoras da US11 nele localizadas) permaneceria apagado, pelo que a expressão do US11 continuaria sobrerregulada. Foram criados vírus recombinantes que contêm a mutação de sobrerregulação da US11 com uma origem genética ICP34.5 no mutado ([Mohr et al 2001](#)). Estes dados demonstraram que a deleção do gene ICP34.5 é totalmente responsável pelo fenótipo atenuado da US11 sobrerregulada/vírus com deleção do ICP34.5 e que a

sobrerregulação da US11 contribui pouco para a presença do ICP34.5. Estes dados sugerem que ICP47 deveria ser apagado em caso de um vírus positivo ICP34.5, já que o contributo da sobrerregulação da US11 para a replicação desse vírus seria insignificante. Em termos de competência de replicação, os vírus resultantes seriam, assim, os mesmos que os materiais iniciais.

No caso improvável de ocorrer recombinação homóloga entre HSV-1 de tipo não mutado e talimogene laherparepvec na região do ICP47, poderia produzir-se uma versão de talimogene laherparepvec com hGM-CSF no lugar das duas cópias de ICP34.5 mas com uma cópia reparada de ICP47. Uma vez que a deleção de ICP47 não afeta significativamente a replicação em células não tumorais, seria de esperar que este vírus fosse afetado de forma semelhante por talimogene laherparepvec, no entanto, o vírus teria menor capacidade de replicação em células tumorais, uma vez que a recombinação substituiria as regiões reguladoras naturais da US11 (situadas no interior do ICP47). A variante do HSV-1 de tipo não mutado produzida em simultâneo neste cenário seria deletada para ICP47 (e as regiões reguladoras da US11 localizadas no seu interior) e, portanto, teria menos capacidade para bloquear a apresentação de antígenos e escapar ao sistema imunitário. De facto, encontrou-se um vírus sem ICP47, mas que continua a expressar US11, equivalente ao tipo não mutado em termos de replicação e virulência no local de inoculação e pele circundante. Contudo, o vírus sem ICP47 foi menos neurovirulento do que o tipo não mutado após injeção na córnea, tendo-se determinado que tal se deveu à incapacidade de inibir uma resposta das células CD8⁺ T protetoras ([Goldsmith et al 1998](#)).

A recombinação homóloga nas regiões do ICP34.5 e ICP47 resultaria em HSV-1 de tipo não mutado ou em talimogene laherparepvec.

Em teoria, é possível criar viriões recombinantes individuais que contenham DNA com uma cópia de ICP34.5 e uma cópia do GM-CSF (uma vez que o ICP34.5 está presente em duas cópias do genoma do HSV-1 de tipo não mutado, uma em cada uma das regiões de repetição longas). Apesar de se ter observado heterozigidade nas regiões de repetição, estas espécies heterozigóticas não são estáveis e revertem para homozigóticas muito frequentemente.

Um exemplo desta situação dá-se com o gene que codifica o ICP4, localizado na região de repetição curta do HSV-1. O ICP4 é um polipéptido precoce imediato essencial para a expressão de genes virais precoces diferidos e tardios. Mutações sensíveis à temperatura que afetam este gene diploide, que é de presença obrigatória nas duas cópias do gene, são frequentemente recuperadas ([Schaffer et al 1978](#)). Uma vez que é extremamente improvável que as duas cópias do ICP4 adquiram a mesma mutação independentemente, esta observação sugere que existe um mecanismo que cria homozigotos mutantes a partir de heterozigotos com muita frequência. Este facto foi confirmado pela propagação de linhagens de vírus provenientes de um mutante de repetição heterozigótico do HSV-1 (no qual as duas repetições invertidas que ladeiam o segmento curto de DNA viral diferiam em comprimento em cerca de 60 pares de bases). Verificou-se que a descendência deste heterozigoto continha cerca de 1/3 de heterozigotos e 2/3 de homozigotos após crescimento de 1 para 10⁷ PFU, confirmando que existe um mecanismo que cria homozigotos a partir de heterozigotos com muita frequência ([Varmuza & Smiley 1984](#)). Assim, o heterozigoto pode ser visto como um intermediário numa

cadeia de eventos que se inicia com a introdução de uma alteração numa das sequências diploides, seguida pela subsequente aquisição desta alteração na outra sequência diploide. Provavelmente, esta instabilidade deve-se à recombinação em curso entre as regiões de repetição do HSV no interior do genoma viral individual e as dos outros viriões que iniciaram a infecção, uma vez que é necessário mais do que um virião para que a replicação produtiva prossiga. Outras evidências de que os vírus de repetição heterozigóticos não persistem na população são provenientes de uma análise de mutantes com deleção do ICP4 isolados numa linhagem celular que criou ICP4 *in trans*. Todos estes mutantes contêm a mesma deleção nas duas cópias do ICP4 sendo, portanto, homozigotos (DeLuca et al 1985).

A instabilidade das regiões heterozigóticas do ICP34.5 foi estudada quando duas estirpes diferentes de HSV-1 foram usadas para criar um vírus heterozigótico que incluísse diferentes regiões de repetição longas (onde se encontra o ICP34.5). O vírus heterozigótico que daí resultou segregou-se nas duas classes de homozigotos de forma igual e com uma frequência elevada (Umene 1987). Para avaliar artificialmente a virulência do vírus que continha uma única cópia do ICP34.5, o gene foi clonado, sob o controlo de um promotor diferente, numa região única de um vírus com deleção de ICP34.5 (Holman & MacLean 2008). Este vírus, apesar de expressar mais ICP34.5 do que o vírus de tipo não mutado, não recuperou os níveis de virulência do tipo não mutado.

Os vírus oncolíticos que só expressam uma cópia de ICP34.5 foram criados artificialmente. Estes vírus só têm capacidade de existir com estabilidade devido às extensas deleções genómicas que evitam a recombinação homóloga. Por exemplo, no vírus oncolítico NV1020, em que a região de união das regiões longa (L) e curta (S) está apagada, o que significa que uma cópia do ICP34.5 se perdeu (Meignier et al 1988). A região apagada foi substituída por um fragmento de DNA de HSV-2 da região única curta. Este fragmento não contém nenhuma sequência da região de repetição apagada e, portanto, não proporciona um modelo para recombinação homóloga.

Tal como com a possibilidade de transmissão do próprio talimogene laherparepvec, a transmissão inicial de uma variante de talimogene laherparepvec seria um efeito imediato (e não um efeito tardio). Contudo, uma vez que o HSV-1 pode também entrar num estado latente, não replicativo, qualquer reativação seria vista como um efeito tardio na saúde humana.

1.2.1.2.2 Capacidade para transferência genética entre humanos e uma variante genética de Talimogene Laherparepvec

Não seria expectável que uma variante genética imaginável de talimogene laherparepvec produzida por recombinação homóloga alterasse a eficiência e cinética da circularização do DNA do genoma viral ou a sua existência como epissoma extracromossómico e, conseqüentemente, não se espera integração no genoma da célula hospedeira.

1.2.2 Efeitos no meio ambiente

1.2.2.1 Efeitos nos processos ambientais

O ser humano é o único hospedeiro natural da infecção por HSV-1 de tipo não mutado. Não infeta plantas, raramente infeta animais e não contribui para os ecossistemas ou processos ambientais. Não respira e não contribui para qualquer produção primária ou processo de decomposição. Na sua forma de virião não exibe qualquer atividade metabólica.

Não é de esperar que alguma das modificações genéticas feitas ao HSV-1 de tipo não mutante durante a construção de talimogene laherparepvec altere o seu efeito nos processos ambientais.

1.2.2.2 Transmissão a organismos não humanos no meio ambiente

O ser humano é o único hospedeiro natural para infecção por HSV-1 de tipo não mutado. A infecção em não humanos é rara mas já foi notificada infecção por HSV-1 em diversas espécies, nomeadamente roedores, coelhos, porcos-espinhos e primatas não humanos. Nos relatos de casos disponíveis a infecção ocorreu subsequentemente a contacto próximo com humanos com disseminação ativa do vírus (ver [Secção 1.1.1](#)).

O potencial de talimogene laherparepvec para exibir interações biológicas ou causar uma mudança na variedade de hospedeiros estabelecidos do HSV-1 de tipo não mutado é insignificante. Mesmo uma eventual recombinação entre talimogene laherparepvec e o vírus de tipo não mutado só poderia resultar numa reversão das interações de tipo não mutado na espécie hospedeira (humanos).

O HSV-1 penetra nas células por interação de glicoproteínas virais específicas com recetores da superfície celular. O gene inserido em talimogene laherparepvec é o hGM-CSF, uma proteína estimuladora da imunidade que não vai afetar a expressão das glicoproteínas virais pelo que não se espera que altere a variedade de hospedeiros ou o tropismo celular do vírus. As deleções genéticas em talimogene laherparepvec comprometem a capacidade do vírus para se replicar em células não tumorais mas não afetam as glicoproteínas virais pelo que não se antevê qualquer efeito na variedade de hospedeiros ou no tropismo celular. Em conformidade, demonstrou-se que talimogene laherparepvec tem uma variedade de hospedeiros e tropismo semelhantes aos do HSV-1 de tipo não mutado quando determinados tipos de células foram estudadas. Por exemplo, sabe-se que as células CHO (células de ovário de hamster chinês), que não têm recetores de entrada para o HSV-1, e as células U937 indiferenciadas (que permitem entrada do vírus mas que exibem um bloqueio ao nível da síntese do RNA) são não permissivas para o HSV-1 de tipo não mutado nem para talimogene laherparepvec, enquanto se descobriu que linhas permissivas conhecidas, tais como a linha do carcinoma de células escamosas humano, FaDu, sustentam replicação equivalente dos dois vírus. Resumindo, espera-se que a variedade de hospedeiros e o tropismo de talimogene laherparepvec (ou qualquer variante) sejam idênticos aos do HSV-1 de tipo não mutado.

1.2.2.3 Transferência de material genético para o meio ambiente

Em condições normais, não se conhecem casos em que HSV-1 de tipo não mutado transfira material genético para outros organismos além do ser humano. O vírus não é reconhecido como sendo zoonótico ou zoonótico reverso em condições naturais. A replicação de DNA ocorre no núcleo da célula. Não se verifica integração do genoma viral com o genoma celular durante a replicação ou latência (ver [Secção 1.1.1](#)).

No exterior do hospedeiro, o HSV-1 é um vírus com envelope, sensível à inativação física (desidratação, calor, pH baixo) e aos desinfetantes (solventes lipídicos e detergentes suaves) que rapidamente o inativam. Não forma estruturas de sobrevivência e a sua sobrevivência fora do organismo hospedeiro está limitada a curtos períodos de tempo. (ver [Secção 1.1.1](#)).

Não se espera que qualquer das modificações genéticas feitas ao HSV-1 de tipo não mutado durante a construção de talimogene laherparepvec permita a transferência ou a manutenção de material genético no meio ambiente (fora da sua espécie hospedeira) ou que tenham efeito na sensibilidade a agentes de inativação nem à capacidade de sobrevivência no meio ambiente. O gene timidina quinase (TK) do HSV permanece intacto, tornando talimogene laherparepvec sensível a agentes víricos como o aciclovir.

Por si só, o HSV-1 de tipo não mutado não apresenta resistência específica a antibacterianos. O vírus não contém qualquer gene que confira resistência a antibacterianos de interesse em termos de saúde humana ou animal. Na sua construção, não estão presentes em talimogene laherparepvec quaisquer genes que lhe confirmem resistência a antibacterianos nem foram utilizados quaisquer genes de resistência antibacteriana como marcadores.

1.3 Conclusões

Com base na natureza do organismo parental, nas modificações genéticas que resultaram em talimogene laherparepvec e no meio recetor, os eventuais efeitos adversos que talimogene laherparepvec possa exercer durante a realização do ensaio clínico estão limitados a:

- Efeitos diretos da transmissão acidental de talimogene laherparepvec a um recetor humano que podem ser imediatos ou tardios.
- Efeitos indiretos da transmissão acidental de uma variante genética de talimogene laherparepvec a um recetor humano que podem ser imediatos ou tardios.

Não foram identificados potenciais efeitos adversos de talimogene laherparepvec em organismos não humanos no meio ambiente, ecossistemas ou processos ambientais.

2. Avaliação de eventuais consequências/Magnitude do efeito

As eventuais consequências dos possíveis efeitos adversos na saúde humana identificados na [Secção 1](#) da ERA são comentadas nesta secção.

2.1 Efeitos diretos da transmissão acidental de Talimogene Laherparepvec a um indivíduo

2.1.1 Magnitude do efeito

É provável que casos de transmissão acidental de talimogene laherparepvec a um recetor humano sejam isolados. O medicamento será administrado a (e administrado por) um número limitado de indivíduos.

Os indivíduos com maior probabilidade de estarem em risco por uma transmissão involuntária são:

- Profissionais de saúde envolvidos na administração de talimogene laherparepvec
- Profissionais de saúde ou outros envolvidos nos cuidados ao doente, o que pode incluir a lavagem de áreas afetadas e a mudança de pensos
- Contactos próximos do indivíduo em tratamento (parceiros e familiares)

Prevê-se que a capacidade de disseminação generalizada de talimogene laherparepvec seja seriamente limitada devido a:

- Administração direta no tumor dos doentes elegíveis; a replicação no doente será autolimitada, dependendo da carga tumoral
- Baixa incidência de propagação do vírus infeccioso a partir de indivíduos tratados com talimogene laherparepvec (ver [Secção 3.1.3](#))
- Baixa persistência e viabilidade fora do organismo hospedeiro; elevada sensibilidade a agentes físicos e químicos (ver [Secção 1.1.1](#))
- Modo natural de transmissão (contacto direto)
- Atenuação do vírus por deleção do ICP34.5, tornando-o muito limitado para replicação em células normais (ver [Secção 1.1.2](#))
- Existência de imunidade ao HSV-1 de tipo não mutado numa proporção substancial da população
- Capacidade diminuída para evitar o sistema imunitário do hospedeiro, atribuída pela deleção do ICP47 (ver [Secção 1.1.2](#)).

2.1.2 Consequências da transmissão acidental de Talimogene Laherparepvec a um indivíduo

2.1.2.1 Virulência e patogenicidade

A deleção funcional do ICP34.5 no talimogene laherparepvec diminui significativamente a virulência comparativamente ao HSV-1 de tipo não mutado. Assim, o talimogene laherparepvec é capaz de se replicar em células tumorais mas está significativamente atenuado em células normais. Consequentemente, é provável que a toxicidade mediada pelo vírus seja residual.

Estirpes de HSV-1 sem ICP34.5 foram amplamente utilizadas sem incidentes em diversos modelos animais e também em diversos ensaios clínicos no ser humano, conforme detalhado em seguida.

Em qualquer eventualidade, a toxicidade não seria superior à observada para o HSV-1 de tipo não mutado (ver [Secção 1.1.1](#)) e talimogene laherparepvec continua sensível a agentes antivirais, tal como o aciclovir (ver [Secção 1.1.2](#)).

2.1.2.1.1 Dados não clínicos de segurança obtidos com mutantes nulos ICP34.5 de HSV-1

Foi utilizada inoculação intracerebral de ratinhos para estudar o grau de atenuação conferido pela deleção do ICP34.5. As estimativas oscilam entre 25 a 90 vezes maior atenuação do que no tipo não mutado ([Bolovan et al 1994](#); apesar do mutante utilizado nesta referência conter a inserção de um codão de terminação inserido no gene que codifica o ICP34.5, pode ter ocorrido este mesmo nível de leitura prévia) a um enfraquecimento superior a 100.000 vezes ([Chou et al 1990](#); [MacLean et al 1991](#)).

Com base em observações de estudos em animais, prevê-se que os vírus nulos ICP34.5 tenham melhorado a segurança das estirpes de HSV-1 de tipo não mutado no tratamento de diversos tumores humanos ([Chambers et al 1995](#); [Kesari et al 1998](#); [Martuza et al 1991](#); [Miller et al 2001](#); [Thomas & Fraser 2003](#)). Foi demonstrado que o HSV-1 com deleção do ICP34.5 é incapaz de se replicar ou provocar doença em células não divisíveis ([Brown et al 1994b](#)) e está atenuado para causar encefalite ([Whitley et al 1993](#)). Adicionalmente, o HSV-1 com deleção de ICP34.5 pode ter diminuído a virulência em determinados ratinhos imunodeficientes ([Valyi-Nagy et al 1994](#)); este assunto é discutido mais pormenorizadamente em “Segurança em ratinhos imunodeficientes” (ver secção 2.1.2.4.1). Além disso, a segurança dos vírus com deleção de ICP34.5 foi também demonstrada em diversas espécies, inclusive em ratinhos ([McKie et al 1998](#)), coelhos, ([Perng et al 1995](#)) e primatas não humanos ([Hunter et al 1999](#); [Varghese et al 2001](#)).

2.1.2.1.2 Dados clínicos de segurança obtidos com mutantes nulos ICP34.5 de HSV-1

Diversas estirpes de HSV-1 sem ICP34.5 foram largamente utilizadas sem incidentes em diversos ensaios clínicos em humanos já publicados.

Nenhum doente em qualquer destes ensaios clínicos desenvolveu encefalite por HSV ou necessitou de tratamento com aciclovir. Com a utilização de vírus apenas com deleção de ICP34.5, não se observou toxicidade após a administração i.t. até 10⁵ PFU de vírus em 21 doentes com glioma maligno ([Papanastassiou et al 2002](#); [Rampling et al 2000](#)) e em 5 doentes com melanoma metastático ([MacKie et al 2001](#)). Nestes estudos, nenhum dos doentes sofreu sintomas adversos atribuíveis à administração do vírus. Mais tarde, o mesmo vírus foi injetado no bordo da cavidade da resseção em 12 doentes com glioma tratado cirurgicamente ([Harrow et al 2004](#)) ou, por via intratumoral, em 20 doentes com carcinoma oral de células escamosas ([Mace et al 2008](#)). Mais uma vez, não se verificou evidência clínica de toxicidade associada à administração do vírus em qualquer destes doentes.

Foram também efetuados diversos ensaios clínicos com diversas versões nulas do ICP34.5 do HSV. Um destes vírus, o G207, também tem deleção do gene codificador da redutase de

ribonucleotídeo pelo que os resultados não são diretamente comparáveis aos de um vírus nulo ICP34.5. Todavia, foi demonstrado que administrações até 10^9 PFU de G207 foram seguras em 27 doentes com glioma maligno ([Markert et al 2000](#); [Markert et al 2009](#)).

Além da deleção funcional do ICP34.5, houve deleção do ICP47 de talimogene laherparepvec e inserção de uma cassete de expressão hGM-CSF no lugar do ICP34.5. Conforme anteriormente descrito, a cassete de expressão hGM-CSF é uma modificação estimuladora da imunidade e, portanto, não vai afetar a virulência ou atenuar mais o vírus. A deleção do ICP47 afeta indiretamente a capacidade do vírus se replicar em células tumorais mas não reverte a atenuação. Esta distinção é possível porque além de permitir que ocorra a apresentação de antígenos nas células infetadas, a deleção do ICP47 provoca a sobreexpressão do gene vizinho, o US11. O US11 é geralmente regulado como um gene tardio, mas a deleção do ICP47 coloca o US11 sob o controlo das sequências reguladoras do ICP47, fazendo com que se expresse como um gene precoce imediato ([Mohr & Gluzman 1996](#)). Este é um aspeto importante do mecanismo de ação de talimogene laherparepvec, uma vez que a sobreexpressão do US11 permite que talimogene laherparepvec se replique com maior eficácia em tumores. No entanto, foi demonstrado que a sobreexpressão do US11 num segundo plano de um vírus com deleção do ICP34.5 não afeta a virulência em tecidos sem tumor; em ratinhos imunocompetentes ou imunocomprometidos, um vírus nulo ICP34.5 com sobreexpressão do US11 está igualmente atenuado como um vírus nulo ICP34.5 isolado. Num estudo que abordou este assunto, 100% dos ratinhos imunocomprometidos que receberam 10^6 PFU do vírus HSV-1 de tipo não mutado tinham morrido 8 dias após injeção intraperitoneal. Pelo contrário, o vírus nulo ICP34.5 com US11 sobreexpressado foi indistinguível do vírus nulo ICP34.5, com 100% dos ratinhos a sobreviverem à administração de 10^6 PFU de qualquer um dos vírus durante o mínimo de 21 dias após a injeção ([Mohr et al 2001](#)).

2.1.2.2 Potencial para provocar encefalite

Para avaliar com rigor o risco de encefalite por HSV foram efetuados estudos para avaliar a capacidade dos vírus nulos ICP34.5 se replicarem em células endimárias, que são células de divisão que forram os ventrículos do cérebro mas que não têm origem tumoral. Apesar de ser ainda muito atenuado, comparativamente ao vírus de tipo não mutado, os vírus nulos ICP34.5 podem replicar num nível baixo nas células endimárias ([Kesari et al 1998](#); [Markovitz et al 1997](#); [Mehta et al 2010](#)). A exposição destes tipos de células particulares ao vírus só se verificaria se o vírus vazasse ou fosse involuntariamente inoculado no ventrículo cerebral pelo que é muito improvável que tal ocorra na sequência de uma injeção i.l. Contudo, para avaliar as suas eventuais consequências, foi injetada uma dose alta de vírus nulo ICP34.5 (G207, no qual também se apagou a redutase de ribonucleotídeo) nos ventrículos cerebrais de ratinhos. 100% dos ratinhos injetados com o vírus com deleção sobreviveram durante 20 semanas sem sintomas aparentes de doença, enquanto 80% dos ratinhos injetados com 10.000 vezes menos vírus de tipo não mutado morreram em 10 dias ([Sundaresan et al 2000](#)). Além disso, num ensaio clínico em humanos que utilizou o mesmo vírus G207 para gliomas malignos, um desvio inadvertido ao protocolo resultou na inoculação do vírus no ventrículo cerebral em vez de diretamente no glioma, num indivíduo incluído no ensaio clínico ([Markert et al 2009](#)). Este doente necessitou de tratamento com dexametasona mas uma IRM não encontrou alterações sugestivas de encefalite e não foi necessário aciclovir.

2.1.2.3 Efeitos potenciais do transgene

O único gene inserido em talimogene laherparepvec é o hGM-CSF, cujo produto não é uma toxina conhecida e é um produto farmacêutico aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos (US).

2.1.2.3.1 Potencial toxicidade de hGM-CSF

O hGM-CSF também é uma proteína natural, endógena e bem caracterizada que estimula a produção e maturação de macrófagos e células dendríticas. A expressão de hGM-CSF mediada pelo talimogene laherparepvec destina-se a estimular as células imunitárias a atacarem células tumorais e a exibirem antígenos tumorais, alertando assim o sistema imunitário e resultando em imunidade específica para o tumor ([Liu et al 2003b](#)).

A administração de hGM-CSF foi largamente testada e a sua segurança demonstrada em diversas espécies ([Baiocchi et al 2001](#); [Davis et al 1990](#); [Liu et al 2003a](#); [Liu et al 2003b](#); [Nemunaitis et al 1991](#); [Rowe et al 1995](#); [Soiffer et al 2003](#); [Wang et al 2002](#)). O GM-CSF humano tem sido também largamente utilizado em diversos ensaios clínicos, tendo demonstrado ser seguro e eficaz contra inúmeras situações malignas ([Bendandi et al 1999](#); [Daud et al 2008](#); [Jager et al 1996](#); [Sato et al 2008](#); [Schmittel et al 1999](#); [Spitler et al 2009](#)). Mais recentemente, num ensaio clínico que incluiu mais de 800 doentes concluiu-se que o hGM-CSF era seguro e eficaz, segundo a avaliação da sobrevivência livre de doença dos doentes com melanoma ressecado de alto risco ([Lawson et al 2010](#)).

O GM-CSF humano recombinante (Leukine®; sargramostim) foi aprovado pela FDA pela primeira vez em 1991 e, posteriormente em 1996, numa formulação diferente, para estimular a recuperação de glóbulos brancos após quimioterapia ou transplante medular. As doses de hGM-CSF administradas com esta terapêutica são geralmente muito superiores das que se esperaria que fossem criadas após tratamento com talimogene laherparepvec. Os efeitos adversos resultantes da perfusão intravenosa ou da injeção subcutânea de hGM-CSF em humanos são geralmente ligeiros, consistindo principalmente em febre, dor muscular e reação no local da injeção.

Provenge®, que consiste em células mononucleares autólogas de sangue periférico ativadas com PAP-GM-CSF (sipuleucel-T) para utilização na maturação *ex-vivo* e carga de células dendríticas com antígenos específicos da próstata para utilização em doentes com cancro da próstata, obteve autorização de comercialização na UE a 6 de setembro de 2013. A 6 de maio de 2015, a Comissão Europeia retirou a autorização de comercialização a Provenge® a pedido do titular de AIM, Dendreon UK Ltd, por razões comerciais. Provenge® está também aprovado nos EUA desde abril de 2010.

Recentemente, EmbryoGen®, um meio para fertilização *in vitro* com GM-CSF demonstrou auxiliar a implantação embrionária em mulheres com risco elevado de aborto. EmbryoGen® recebeu marcação CE na União Europeia em 2011 e obteve autorização 510k da FDA no final de 2012.

2.1.2.3.2 Eventual oncogenicidade de hGM-CSF

O hGM-CSF (Leukine®; sargramostim) é um medicamento aprovado pelos EUA e utilizado em rotina na prática clínica nos Estados Unidos. O GM-CSF não é um oncogene conhecido, mas inibe a apoptose e induz a proliferação de células alvo específicas de vida curta que expressam o recetor do hGM-CSF. Quando algumas células que normalmente não expressam o recetor do hGM-CSF foram desenhadas para o sobreexpressar e, em seguida, foram expostas a hGM-CSF, algumas das células sofreram transformações (Arecos et al 1993; Lang et al 1985). Contudo, nestes estudos as células recetoras já estavam imortalizadas, sugerindo que já tinham sido submetidas, pelo menos, a uma fase importante do processo de transformação. Ficou demonstrado que o hGM-CSF mostrou boa tolerância clínica (ver acima). No entanto, num ensaio clínico que avaliou o tratamento a longo prazo com hGM-CSF, dois dos 98 indivíduos desenvolveram leucemia mieloide aguda (AML) (Spitler et al 2009). É importante notar que estes doentes foram tratados com doses muito superiores de hGM-CSF do que as que seriam expressadas por talimogene laherparepvec. Além disso, não ficou claro neste estudo se estes casos se deveram a um crescimento descontrolado de mieloblastos induzido por hGM-CSF ou a doenças pré-existentes (um dos dois doentes tinha uma translocação cromossômica e o outro trabalhava com chapas de metais, com grande exposição a carcinógenos industriais). Até à data, não foram relatados casos de AML em doentes tratados com talimogene laherparepvec em ensaios clínicos.

2.1.2.4 Efeitos observados com a administração de Talimogene Laherparepvec durante o desenvolvimento

2.1.2.4.1 Dados não clínicos de segurança obtidos com Talimogene Laherparepvec

Foi realizado um programa exaustivo que avaliou a segurança e biodistribuição de talimogene laherparepvec. Este programa foi desenhado para cumprir as Considerações da ICH para Vírus Oncolíticos (setembro 2009), terapêuticas genéticas e terapêuticas derivadas de biotecnologias.

2.1.2.4.2 Dados clínicos de segurança obtidos com Talimogene Laherparepvec

Dez estudos clínicos foram, ou, estão a ser realizados em vários tipos de tumores avançados com um total de 430 doentes tratados com laherparepvec talimogene desde 05 de maio de 2014 (de acordo com a Brochura do Investigador V12, datada de outubro de 2014). A Amgen publicou dados clínicos de alguns desses estudos, incluindo dados de segurança em 292 doentes com melanoma não ressecável de fase IIIB a IV, no estudo de fase 3 (005/05) (Andtbacka et al 2015), 30 doentes com doença recidivada por vários tumores sólidos malignos (Hu et al 2006), 50 doentes com melanoma metastático (Senzer et al 2009) e 17 doentes com carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço (Harrington et al 2010). Nenhum doente em qualquer destes estudos desenvolveu encefalite por HSV. Os eventos adversos relacionados com o tratamento notificados com maior frequência em doentes tratados com talimogene laherparepvec em monoterapia incluíram: náuseas, vômitos, diarreia, arrepios, pirexia, fadiga, sintomas de tipo gripal, dor no local da injeção, reações no local da injeção e mialgia.

O uso concomitante de talimogene laherparepvec, cisplatina e radioterapia por feixe externo nos 17 doentes com carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço ([Harrington et al 2010](#)), não resultou em eventos adversos mais frequentes ou mais graves além dos normalmente encontrados com estas outras terapêuticas antineoplásicas isoladas.

Até à data, foram relatados quatro casos de exposição acidental com talimogene laherparepvec (ou com o seu equivalente murino). Destes, 3 foram ferimentos por picada de agulha, um dos quais resultou no desenvolvimento de uma lesão de tipo “panarício herpético” no local da punção no dedo. Confirmou-se por PCR que esta lesão foi provocada por talimogene laherparepvec como seria previsível com uma picada de agulha com uma dose pura de talimogene laherparepvec. Os outros dois ferimentos por picada de agulha (um com talimogene laherparepvec, outro com o seu equivalente murino) não produziram sinais nem sintomas. Destes três ferimentos por picada de agulha dois foram tratados com medicação anti-HSV1. A quarta exposição acidental foi um salpico de talimogene laherparepvec para a face do investigador que, posteriormente foi tratado com solução oftálmica antiviral em profilaxia e não desenvolveu quaisquer sinais ou sintomas associados à exposição.

2.1.2.5 Efeitos prováveis de Talimogene Laherparepvec em indivíduos involuntários

Em caso de transmissão a um recetor humano involuntário, espera-se que as consequências para o indivíduo sejam insignificantes. No entanto, é adequado ponderar eventuais cenários em indivíduos saudáveis imunocompetentes, em indivíduos imunocomprometidos (os muito novos ou muito velhos) e nos imunossuprimidos por doença subjacente ou por terapêutica (p.ex. doentes com VIH, transplantados, doentes com cancro submetidos a determinados tratamentos). É também importante considerar possíveis efeitos em recém-nascidos em caso de transmissão a uma mulher grávida.

2.1.2.5.1 Efeitos em indivíduos imunocompetentes

É pouco provável que a exposição de indivíduos imunocompetentes a talimogene laherparepvec produza efeitos adversos devido à natureza muito atenuada do vírus. Na pior das hipóteses, esperar-se-ia um perfil de eventos adversos semelhante ao observado em ensaios clínicos nos quais talimogene laherparepvec foi utilizado em monoterapia. No entanto, seria de esperar que essas reações fossem simultaneamente menos graves e menos frequentes num recetor involuntário uma vez que:

- A capacidade de talimogene laherparepvec replicar em células não tumorais está extremamente atenuada
- A replicação viral e a expressão do GM-CSF num ambiente não tumoral será significativamente inferior do que a que se verifica em doentes
- A exposição inicial será consideravelmente menor do que em doentes e, provavelmente, numa única ocasião, contrariamente a várias injeções recebidas pelos doentes

2.1.2.5.2 Efeitos em indivíduos imunocomprometidos

Quase todos os casos de complicações graves em infecções por HSV de tipo não mutado em humanos ocorrem em indivíduos imunocomprometidos (ver [Secção 1.1.1](#)). Nestes casos, o sistema imunitário é incapaz de controlar a infecção, que se dissemina.

Indivíduos imunocomprometidos expostos acidentalmente a talimogene laherparepvec poderão, portanto, manifestar toxicidade, no entanto, as consequências da transmissão aos gravemente imunocomprometidos não são consideradas maiores do que as colocadas pelo HSV-1 de tipo não mutado.

No protocolo do ensaio clínico (20130232) é incluído um critério de exclusão de indivíduos se houver evidência de imunossupressão clinicamente significativa. Ademais, o IPIM e os materiais de informação disponibilizados aos indivíduos incluem uma advertência referindo que indivíduos com imunossupressão não devem ter contacto direto com o local da injeção de talimogene ou com o penso de proteção.

Se houver indicação clínica, pode ser utilizado aciclovir, no tratamento para infecção disseminada por HSV-1 de tipo não mutado em indivíduos imunocomprometidos, uma vez que talimogene laherparepvec permanece suscetível devido à retenção do gene TK gene na construção (ver [Secção 1.1.2](#)). Contudo, de acordo com as orientações do protocolo, a dosagem deve ser permanentemente descontinuada se, na opinião do investigador, o indivíduo desenvolver evidência clínica de infecção grave por herpes (tal como HSV, hepatite, encefalite ou infecção disseminada).

2.1.2.5.3 Efeitos em recém-nascidos

As consequências de infecção por HSV-1 de tipo não mutado em recém-nascidos podem ser graves (ver [Secção 1.1.1](#)), devido a uma maior dependência da imunidade inata ao invés da adaptativa (adquirida) nas primeiras semanas de vida. A infecção é mais provável em casos nos quais as mães são expostas ao HSV-1 no último trimestre de gravidez, já que o feto não adquire imunidade passiva da mãe.

Apesar do risco do recém-nascido adquirir infecção viral de uma mãe exposta a talimogene laherparepvec não ter sido estabelecido, é provável que o risco de transmissão viral e infecção no recém-nascido seja inferior ao observado com o HSV-1 de tipo não mutado.

As mulheres grávidas foram excluídas dos estudos clínicos com talimogene laherparepvec e, até à data, não foram recebidos relatos de exposição acidental em mulheres grávidas ou a amamentarem. Os critérios de exclusão relacionados com gravidez, amamentação, intenção de engravidar e recusa de utilização de métodos contraceptivos estão incluídos no protocolo do ensaio clínico do estudo 20130232.

2.2 Efeitos indiretos da transmissão acidental de uma variante genética de Talimogene Laherparepvec a um indivíduo

2.2.1 Magnitude do efeito

Tal como com talimogene laherparepvec, é provável que os casos de transmissão de uma variante genética de talimogene laherparepvec a um recetor humano involuntário sejam isolados (ver [Secção 2.1.1](#)).

O medicamento em investigação será administrado a um número limitado de indivíduos, em conformidade com os critérios de inclusão e exclusão estipulados no protocolo do ensaio clínico (20130232).

Os indivíduos com maior probabilidade de serem recetores de uma transmissão involuntária de uma variante genética de talimogene laherparepvec seriam:

- Funcionários do centro do estudo envolvidos no manuseamento e administração do produto.
- trabalhadores em cuidados de saúde, ou outros, envolvidos nos cuidados ao doente, que podem incluir a lavagem de áreas afetadas e a mudança de pensos.
- Contactos próximos do indivíduo tratado (parceiros e familiares).

Espera-se que a capacidade para a disseminação generalizada de uma variante genética de talimogene laherparepvec seja extremamente limitada devido a:

- Atenuação do vírus, seja pela deleção continuada de ICP34.5, restringindo muito a sua replicação em células normais ou pela deleção continuada de ICP47, comprometendo a sua capacidade de iludir o sistema imunitário do hospedeiro. Assim, qualquer variante estável estará comprometida na sua capacidade para disseminação comparativamente ao HSV-1 de tipo não mutado, apesar de potencialmente não tão gravemente como o próprio talimogene laherparepvec (ver [Secção 1.1.2](#) para discussão das possíveis variantes genéticas estáveis de talimogene laherparepvec)
- Até à data, baixa incidência de libertação do vírus infeccioso a partir de indivíduos tratados com talimogene laherparepvec (ver [Secção 3.1.3](#)).
- Baixa persistência e viabilidade fora do hospedeiro; elevada sensibilidade a agentes físicos e químicos (ver [Secção 1.1.1](#)).
- Modo natural de transmissão (contacto direto)
- Existência de imunidade ao HSV-1 de tipo não mutado numa grande proporção da população

2.2.2 Consequências da transmissão acidental de uma variante genética de talimogene laherparepvec a um indivíduo

Conforme descrito na [Secção 1.1.2](#), existem apenas três possíveis variantes genéticas estáveis de talimogene laherparepvec que, em teoria, podem ser criadas por recombinação homóloga entre talimogene laherparepvec e HSV-1 de tipo não mutado, desde que se repliquem simultaneamente na mesma célula.

A reparação do ICP34.5 e do ICP47 resultariam num vírus de tipo não mutado (i.e. o mesmo do vírus coinfetante) que não representa outras preocupações além do potencial para transmissão do próprio vírus de tipo não mutado coinfetante.

A reparação apenas da função do ICP47 restituiria a capacidade da variante iludir o sistema imunitário (à semelhança do vírus de tipo não mutado) mas continuaria a não ser capaz de se replicar em células não tumorais devido à deleção funcional do ICP34.5. Em termos dos seus eventuais efeitos em recetores involuntários, esta variante não apresentaria riscos adicionais aos descritos para o próprio talimogene laherparepvec.

A reparação apenas da função do ICP34.5 resultaria na eliminação do transgene (GM-CSF). Assim, as potenciais consequências descritas na [Secção 2.1.2.3](#) já não se aplicariam. Contudo, esta variante não estaria atenuada na sua capacidade para replicação em células não tumorais e, portanto, esperar-se-ia que a sua virulência fosse equivalente à do vírus de tipo não mutado. Esta variante conservaria também uma deleção do ICP47, tornando-o conseqüentemente incapaz de iludir o sistema imunitário tão eficazmente como o vírus de tipo não mutado. Demonstrou-se que um vírus sem ICP47 mas ainda com expressão de US11 é equivalente ao vírus de tipo não mutado em termos de replicação e virulência no local de inoculação e pele circundante.

No entanto, o vírus sem ICP47 foi menos neurovirulento do que o de tipo não mutado após injeção na córnea, tendo sido demonstrado que tal se devia a uma incapacidade para inibir uma resposta protetora das células T CD8⁺ ([Goldsmith et al 1998](#)). Em termos dos seus eventuais efeitos em recetores involuntários, esta variante apresentaria, no máximo, efeitos patogénicos equivalentes aos observados em infeções por HSV-1 de tipo não mutado.

É importante notar que ao avaliar os riscos potenciais associados às variantes genéticas de talimogene laherparepvec que, em todos os casos, as variantes de talimogene laherparepvec só podem ser criadas por recombinação homóloga com um vírus HSV-1 de tipo não mutado, com replicação simultânea na mesma célula. Assim, a transmissão de qualquer uma destas três possíveis variantes genéticas estáveis de talimogene laherparepvec anteriormente descritas não constitui um risco acrescido para um recetor involuntário superior ao colocado pela própria infeção de tipo não mutado ‘precursora’.

2.3 Conclusões

Considera-se que a potencial magnitude de propagação acidental na população humana é baixa, dado a natureza atenuada de talimogene laherparepvec e das suas potenciais variantes.

Nos indivíduos que possam ter sido expostos de forma acidental a talimogene laherparepvec ou às suas possíveis variantes genéticas, espera-se que os efeitos adversos sejam de menor gravidade do que os observados com a infeção pelo HSV-1 de tipo não mutado que, por sua vez, é universalmente classificado como “risco individual moderado, risco baixo/limitado na comunidade”; ver [Secção 4.1](#).

Concluindo, espera-se que as potenciais consequências em caso de transmissão de talimogene laherparepvec ou das suas possíveis variantes genéticas sejam baixas e isoladas.

3. Avaliação da probabilidade de ocorrência de efeitos adversos identificados

A probabilidade de ocorrência de possíveis efeitos adversos na saúde humana identificados na [Secção 1](#) da ERA é avaliada nesta secção.

3.1 Probabilidade de efeitos diretos da transmissão acidental de talimogene laherparepvec a um indivíduo

Os potenciais efeitos adversos diretos e a magnitude e consequências dos efeitos descritos nas secções anteriores da ERA estão dependentes da probabilidade de exposição de recetores involuntários a talimogene laherparepvec.

Por sua vez, isto é influenciado pela forma, escala e ambiente de libertação, dos potenciais mecanismos de exposição e medidas específicas de gestão de risco em vigor para minimizar a exposição, assim como dos dados disponíveis relacionados com a disseminação e exposição a talimogene laherparepvec obtidos durante o desenvolvimento.

3.1.1 Forma, escala e meio de libertação

Talimogene laherparepvec é um medicamento proposto para um ensaio clínico de fase 1b/3, multicêntrico, sem ocultação, para avaliar se um regime de uma imunoterapia oncolítica (talimogene laherparepvec) e um inibidor de um ponto de controlo imunitário (pembrolizumab) é seguro e tolerado e que o tratamento combinado pode aumentar a eficácia clínica de pembrolizumab em monoterapia no SCCHN (carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço) recorrente ou metastático.

Talimogene laherparepvec destina-se a injeção intralesional em tumores cutâneos, subcutâneos e nodulares injetáveis por um médico qualificado num estabelecimento de saúde onde o estudo esteja a decorrer, com as devidas precauções (ver [Secção 5](#)). Esta investigação de fase 1b/3 será efetuada na Áustria, Austrália, Bélgica, Brasil, Canadá, República Checa, França, Alemanha, Grécia, Itália, Holanda, Polónia, Portugal, Espanha, Suíça, África do Sul, Reino Unido, EUA e em alguns países asiáticos, sujeito às aprovações locais necessárias.

A utilização de talimogene laherparepvec começará logo que possível após a receção das aprovações locais necessárias. A duração internacional global deste estudo de fase 1b/3 é de cerca de 96 meses.

Os frascos para injetáveis com 1,15 ml de talimogene laherparepvec serão fornecidos às farmácias dos centros do estudo em duas dosagens nominais; 10^6 PFU/ml ou 10^8 PFU/ml.

O volume máximo de talimogene laherparepvec administrado em qualquer dose é 4,0 ml para qualquer lesão individual. A dose máxima em qualquer tratamento é 8,0 ml (independentemente do número de lesões).

A duração do tratamento com talimogene laherparepvec varia entre indivíduos, até ao máximo de 24 meses. Consequentemente, participantes individuais poderão receber o máximo de 265 frascos para injetáveis, o que representa aproximadamente um total de 2×10^{10} PFU de talimogene laherparepvec durante a duração máxima do tratamento.

Após a injeção, os locais da injeção serão cobertos por um penso oclusivo antes de os doentes abandonarem o estabelecimento hospitalar.

3.1.2 Eventuais mecanismos de exposição e medidas de gestão de risco

3.1.2.1 Mecanismo de transmissão e capacidade de sobrevivência

O HSV-1 de tipo não mutado sobrevive no ambiente no hospedeiro (ser humano) sob a forma de uma infeção persistente ou uma infeção latente no núcleo de algumas células infetadas (especialmente neurónios do gânglio do trigémeo), onde pode permanecer inativo indefinidamente ou ser reativado provocando a secreção de vírus e, por vezes (apesar de nem sempre) sintomas clínicos.

O seu modo de transmissão é através de contacto direto com secreções infetadas ou membranas mucosas/lesões cutâneas a partir de um doente assintomático ou sintomático que dissemina o vírus. A transmissão do HSV-1 também pode ocorrer através de gotículas respiratórias (ver [Secção 1.1.1](#)).

Fora do hospedeiro, o HSV-1 é um vírus com envelope, sensível e rapidamente inativado por inativação física (desidratação, calor ou pH baixo) e desinfetantes (solventes lipídicos e detergentes suaves) (ver [Secção 1.1.1](#)).

Não é de esperar que alguma das modificações genéticas feitas ao HSV-1 de tipo não mutado durante a construção de talimogene laherparepvec tivesse efeito no modo de transmissão, capacidade de sobrevivência no meio ambiente ou sensibilidade a agentes inativantes (ver [Secção 1.2.2](#)).

3.1.2.2 Potencial para exposição durante a administração

Talimogene laherparepvec será administrado por injeção intralesional nos tumores injetáveis cutâneos, subcutâneos e nodulares, com ou sem imagem guiada por ecografia. A administração só será efetuada por um profissional de saúde nas instalações de um centro do estudo aprovado, com as devidas precauções (ver [Secção 5](#)).

Dado as pequenas manipulações exigidas para retirar a dose do frasco para injetáveis para uma seringa (com um potencial pouco provável de aerossol do espaço morto da agulha) o potencial para exposição durante a administração é baixo.

O mecanismo de exposição mais provável durante a administração são ferimentos por picada de agulha no profissional de saúde.

Os procedimentos de administração e precauções (incluindo a utilização de equipamento de proteção individual (PPE)) estão descritos na [Secção 5](#). A disponibilidade de PPE adequado e de procedimentos estabelecidos para eliminação de resíduos médicos potencialmente perigosos são universais em estabelecimentos hospitalares.

3.1.2.3 Potencial para exposição a partir do meio ambiente no local da administração

Talimogene laherparepvec é para administração nas instalações de um centro do estudo aprovado. As instruções para a eliminação de resíduos e para a resolução de derrames acidentais e roturas estão disponíveis na [Secção 5](#).

Assim, o potencial para exposição a partir do meio ambiente no local da administração é considerado baixo.

3.1.2.4 Potencial para exposição após administração

Após a administração, os locais da injeção devem ser cobertos por um penso oclusivo antes do doente abandonar as instalações do centro.

Foi detetado DNA de talimogene laherparepvec em 17% das amostras retiradas do exterior do penso durante o desenvolvimento (Estudo 20120324 a decorrer), mas o número de cópias foi geralmente inferior ao de esfregaços de lesões injetadas e nenhuma das amostras resultou em TCID₅₀ positivas para a presença de vírus infeccioso (ver [Secção 3.1.3](#)).

O folheto informativo distribuído a cada participante adverte que a eliminação de pensos usados deve ser feita no centro do estudo na visita seguinte agendada. O participante recebe pensos adicionais, luvas descartáveis e sacos plásticos de abertura fácil, assim como instruções específicas a seguir para minimizar o risco de exposição acidental ao meio ambiente.

Assim sendo, o potencial para exposição a talimogene laherparepvec após a administração é considerado baixo.

3.1.3 Dados disponíveis relacionados com a disseminação do vírus e exposição humana a Talimogene Laherparepvec

Até à data, foram relatadas quatro exposições acidentais a talimogene laherparepvec (ou ao seu equivalente murino) em ensaios clínicos. Três destas exposições acidentais foram com talimogene laherparepvec, duas por ferimento com picada de agulha e a terceira por salpico para a face. De referir que se verificou uma outra picada de agulha, com uma variante em desenvolvimento com o gene murino de GM-CSF fora do ambiente hospitalar. As consequências destes incidentes estão descritas na [Secção 2.1.2.4.2](#).

3.1.4 Conclusão

Tendo em consideração a forma, escala e meio de libertação, os potenciais mecanismos de exposição e as medidas de gestão de risco implementadas, assim como os dados clínicos disponíveis relativos à disseminação e exposição a talimogene laherparepvec, considera-se que a probabilidade de efeitos diretos de talimogene laherparepvec num recetor involuntário é baixa.

3.2 Probabilidade de efeitos indiretos da transmissão acidental de uma variante genética de talimogene Laherparepvec a um indivíduo

Uma variante genética de ocorrência espontânea de talimogene laherparepvec exigiria um evento(s) de recombinação inicial que levasse à criação de uma variante genética própria. É

pouco provável que um vírus de tipo não mutado se encontre no mesmo tecido que talimogene laherparepvec uma vez que este último é injetado diretamente nas células tumorais e não consegue propagar-se eficazmente em tecido normal, enquanto o HSV-1 pré-existente se encontra nos tecidos de mucosa ou gânglios neuronais do doente.

Da mesma forma, não seria de esperar que a exposição de recetores involuntários a talimogene laherparepvec resultasse em infeção de tecidos da mucosa ou gânglios neuronais, uma vez que a capacidade de talimogene laherparepvec se replicar em células não tumorais está fortemente atenuada (ver [Secção 1.1.2](#)).

A possibilidade da criação de variantes genéticas estáveis com características não intencionais é também minimizada pelo desenho da construção genética de talimogene laherparepvec descrita na [Secção 1.2.1.2.1](#).

Mesmo que uma variante genética de talimogene laherparepvec surgisse num doente ou num recetor involuntário não seria de esperar que fosse disseminada globalmente. O modo de transmissão e a capacidade de sobrevivência de uma variante genética de talimogene laherparepvec permanecerá inalterada pelas eventuais modificações genéticas que possam ocorrer através de recombinação homóloga com um vírus de tipo não mutado simultaneamente coinfectante.

Como tal, a probabilidade de transmissão de uma variante genética de talimogene laherparepvec a um recetor humano involuntário é considerada muito inferior do que a probabilidade de transmissão do próprio talimogene laherparepvec.

3.3 Conclusões globais

Tendo em conta a forma, escala e meio de libertação, os potenciais mecanismos de exposição e as medidas de gestão de risco implementadas, assim como os dados clínicos disponíveis relativos à disseminação e exposição a talimogene laherparepvec, considera-se que a probabilidade de efeitos diretos de talimogene laherparepvec num recetor involuntário é baixa.

A probabilidade de efeitos indiretos provocados por uma variante genética de talimogene laherparepvec em recetores involuntários é considerada muito inferior, uma vez que estes eventos exigiriam uma combinação da exposição com um outro evento de baixa frequência (recombinação homóloga no doente).

4. Estimativa do risco colocado por cada característica identificada

Os riscos colocados por cada um dos possíveis efeitos adversos identificados na Secção 1 da ERA na saúde de um recetor humano involuntário são analisados nesta secção.

Estes riscos são analisados através da combinação da estimativa das consequências do efeito com a estimativa da probabilidade do efeito (em conformidade com 2001/18/EC e 2002/623/EC). A estimativa é feita em relação ao risco atribuído ao organismo parental (HSV-1 de tipo não mutado) para contextualização. A estimativa também é influenciada pelo grau de incerteza científica destas estimativas, de acordo com o princípio de precaução.

4.1 Risco associado ao organismo parental (HSV-1 de tipo não mutado)

O HSV-1 de tipo não mutado é um agente patogénico global endémico dos humanos que está bem caracterizado. O modo de transmissão e os efeitos clínicos da infeção por HSV-1 de tipo não mutado no ser humano estão bem esclarecidos (ver [Secção 1.1.1](#)). O tratamento com antivirais, tal como o aciclovir é eficaz.

O HSV-1 de tipo não mutado está classificado no Grupo de Risco 2 na Comunidade Económica Europeia (CEE) de acordo com a Diretiva 2000/54/EC sobre a proteção de trabalhadores a riscos relacionados com exposição a agentes biológicos no trabalho.

Um agente biológico de Grupo de Risco 2 é definido, na UE, como “aquele que pode provocar doença humana e que pode constituir um perigo para os trabalhadores; é improvável que se propague à comunidade; habitualmente existe profilaxia ou tratamentos eficazes disponíveis”.

Deve referir-se que esta classificação não considera microrganismos geneticamente modificados, que estão atenuados ou que perderam genes para virulência.

Por outro lado, esta classificação baseia-se nos efeitos em trabalhadores saudáveis, não considerando efeitos em indivíduos com alterações da suscetibilidade que podem resultar de doença pré-existente, medicação, imunidade comprometida, gravidez ou amamentação.

Foram atribuídas classificações semelhantes de perigo para o HSV-1 pela Organização Mundial de Saúde (WHO) e nos EUA, Canadá e Austrália, conforme resumidos na [Tabela 2](#).

Assim, o risco em indivíduos saudáveis que trabalhem com o HSV-1 de tipo não mutado é globalmente considerado como moderado, com um risco baixo ou limitado para a comunidade.

Tabela 2. Classificações de biossegurança para o HSV-1 de tipo não mutado fora da EU

Território	Categoria	Definição	Referência
WHO	Grupo de Risco 2 (risco individual moderado, risco baixo na comunidade).	Agente patogénico que pode provocar doença no homem ou em animais mas que é improvável que represente um perigo grave para os profissionais de laboratório, para a comunidade, gado ou meio ambiente. As exposições em laboratório podem provocar infeção grave mas está disponível tratamento eficaz e medidas de prevenção e o risco de propagação da infeção é limitado.	<i>WHO Laboratory Biosafety Manual, 3ªEd (2004)</i>
US	Grupo de Risco 2	Agentes associados a doença no ser humano, raramente grave e para a qual estão frequentemente disponíveis intervenções preventivas ou	<i>Recombinant DNA Guidelines (USA, 2011) Appendix B-II-D. CDC/NIH Guidelines (2009)</i>

		terapêuticas.	<i>"Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" 5th Edition, 2009. Section VIII-E. Not listed under 42CFR73.3 – Select Agents and Toxins</i>
Canadá	Grupo de Risco 2 (risco individual moderado, risco na comunidade limitado).	Qualquer agente patogénico que possa provocar doença no homem mas que, em circunstâncias normais é improvável que represente um perigo grave para profissionais de laboratórios, para a comunidade, gado ou para o meio ambiente. As exposições em laboratório raramente provocam infeção que leve a doença grave mas está disponível tratamento eficaz e medidas de prevenção e o risco de propagação é limitado.	<i>Canadian Laboratory Safety Guidelines (2004) Human Pathogens and Toxins Act. S.C. 2009, c. 24. Schedule II.</i>
Austrália/NZ	Grupo de Risco 2 (risco individual moderado, risco na comunidade limitado).	Um agente patogénico que pode provocar doença no ser humano, em animais ou plantas mas que é improvável que represente um perigo grave para profissionais de laboratórios, para a comunidade, gado ou para o meio ambiente. As exposições em laboratório podem provocar infeção mas está disponível tratamento eficaz e medidas de prevenção e o risco de propagação é limitado.	<i>Standard AS/NZS 2243.3:2010. Safety in laboratories Part 3: Microbiological aspects and containment facilities. Standards Association of Australia, Sydney.</i>

4.2 Risco associado à transmissão de talimogene laherparepvec a um recetor involuntário

As consequências da transmissão de talimogene laherparepvec a um recetor involuntário são consideradas de nível 'baixo' e isoladas (ver [Secção 2.1](#)) (i.e. risco inferior ao da exposição ao HSV-1 de tipo não mutado). Esta avaliação baseia-se em:

- Virulência e patogenicidade diminuídas comparativamente ao HSV-1 de tipo não mutado devido a atenuação conferida pela deleção do ICP34.5 ([Secção 1.1.2](#)).
- As estirpes de HSV-1 com deleção de ICP34.5 têm sido largamente utilizadas sem incidentes em diversos modelos animais e também em diversos ensaios clínicos em humanos, incluindo em ensaios clínicos com talimogene laherparepvec ([Secção 2.1.2.1](#)).

- A proteína codificada pelo transgene, a hGM-CSF está bem estudada e os seus efeitos são bem conhecidos tanto pela sua natureza endógena como pela sua utilização em medicamentos em doses provavelmente muito superiores às que seria de esperar que se verificassem pela expressão de talimogene laherparepvec ([Secção 2.1.2.3](#)).
- Os níveis de replicação do vírus e da expressão da hGM-CSF num ambiente não tumoral será consideravelmente inferior ao que ocorre em doentes com tumores.
- A exposição inicial será consideravelmente inferior à dos doentes e provavelmente numa única ocasião, contrariamente às inúmeras injeções recebidas pelos doentes.

Assim, é improvável que a exposição de indivíduos imunocompetentes a talimogene laherparepvec produza efeitos adversos, devido à natureza largamente atenuada do vírus. Na pior das hipóteses, esperar-se-ia um perfil de eventos adversos semelhante ao observado em ensaios clínicos nos quais talimogene laherparepvec foi utilizado em monoterapia. No entanto, seria de esperar que essas reações fossem simultaneamente menos graves e menos frequentes num recetor involuntário.

A exposição de talimogene laherparepvec a indivíduos imunocomprometidos (inclusive recém-nascidos) pode ter potencial para causar efeitos adversos. A transmissão involuntária de talimogene laherparepvec a estas populações é, assim, também considerada de um ponto de vista conservador como ‘moderada’ (conforme o HSV-1 de tipo não mutado) apesar da probabilidade dessa transmissão continuar baixa.

Em resumo, considera-se que as consequências da exposição involuntária a talimogene laherparepvec são, portanto, inferiores às do HSV-1 de tipo não mutado, existindo um grau elevado de certeza científica que é este o caso, resultante dos dados disponíveis sobre o HSV-1 de tipo não mutado, hGM-CSF, a atenuação conferida pela deleção do ICP34.5 na construção e os dados clínicos da administração direta do próprio talimogene laherparepvec a doentes com tumores.

A probabilidade da transmissão involuntária de talimogene laherparepvec a um indivíduo involuntário também é considerada “baixa” (ver [Secção 3.1](#)) baseada em:

- Modo de transmissão (contacto direto)
- Capacidade de sobrevivência no meio ambiente e sensibilidade a inativação física e química
- Administração nas instalações de um centro do estudo aprovado, que disponha de Equipamento de Proteção Individual, sistemas de eliminação de resíduos e controlo ambiental (processos de limpeza de rotina)
- Dados clínicos disponíveis que sustentam uma baixa incidência de disseminação no local da administração e não deteção do vírus no exterior do penso oclusivo
- Ausência de evidência de transmissão durante o desenvolvimento clínico e até hoje
- Dados recolhidos durante o desenvolvimento clínico e até à data apontam para que a disseminação de talimogene laherparepvec no sangue e urina após a administração é rara, de baixo grau e transitória
- A deteção pouco frequente de níveis baixos de DNA viral no ovário e glândulas salivares e a ausência de DNA viral nas glândulas lacrimais, mucosa nasal, testículos ou fezes, conforme observado em dados não clínicos de distribuição, demonstram uma baixa

probabilidade de exposição secundária a DNA viral a partir de lágrimas, saliva, órgãos genitais, muco ou fezes após administração intralesional.

Assim, através de uma combinação das consequências de grau baixo a médio de transmissão e da baixa probabilidade de tal ocorrer, o risco global colocado por talimogene laherparepvec a um recetor involuntário é considerado **BAIXO**.

4.3 Risco associado à transmissão de uma variante genética de talimogene laherparepvec a um recetor involuntário

As consequências da transmissão de uma variação genética estável de talimogene laherparepvec a um recetor involuntário são consideradas de nível 'baixo' e isoladas (ver [Secção 2.2](#)).

Existem apenas três possíveis variantes genéticas estáveis de talimogene laherparepvec que, em teoria, podem ser criadas por recombinação homóloga entre talimogene laherparepvec e HSV-1 de tipo não mutado, desde que se repliquem simultaneamente na mesma célula (ver [Secção 1.1.2](#)).

- A reparação tanto do ICP34.5 como do ICP47 resultariam num vírus de tipo não mutado (i.e. o mesmo do vírus coinfectante) o que não representa quaisquer preocupações adicionais além do potencial para transmissão do próprio vírus de tipo não mutado coinfectante.
- A reparação da função do ICP47, por si só, restabeleceria a capacidade das variantes para iludir o sistema imunitário (semelhante ao do vírus de tipo não mutado) mas continuaria a ser incapaz de replicação em células não tumorais devido à deleção funcional do ICP34.5. Em termos dos seus efeitos potenciais em recetores involuntários, esta variante não apresentaria perigos adicionais aos descritos para o próprio talimogene laherparepvec.
- A reparação da função do ICP34.5, por si só, resultaria na eliminação do transgene (GM-CSF). Assim, as potenciais consequências da exposição ao GM-CSF descritas na [Secção 2.1.2.3](#) já não se aplicariam. Esta variante não estaria atenuada na sua capacidade de se replicar em células não tumorais mas manteria uma deleção do ICP47, tornando-a assim menos capaz de iludir o sistema imunitário tão eficazmente como o vírus de tipo não mutado. Em termos dos seus efeitos potenciais em recetores involuntários, esta variante apresentaria, no máximo, efeitos patogénicos equivalentes aos observados na infeção por HSV-1 de tipo não mutado.

As consequências de exposição a variantes genéticas de talimogene laherparepvec são, portanto, consideradas menores do que as a uma exposição ao HSV-1 de tipo não mutado, com base no "esqueleto" de tipo não mutado de talimogene laherparepvec, as possíveis variantes que, em teoria, poderiam surgir estáveis e as funções conhecidas do ICP34.5 e ICP47 disponíveis na literatura científica.

Contudo, uma vez que não existem dados clínicos ou não clínicos específicos disponíveis relativos à exposição a variantes genéticas de talimogene laherparepvec, existe alguma incerteza científica nesta conclusão. Assim, a aplicação do princípio de precaução determina que se tenha em consideração atribuir uma classificação de consequências mais elevada. Na ausência de dados clínicos e não clínicos, é adequado atribuir um nível de consequência

moderado, uma vez que isto implicaria um efeito semelhante ao do vírus de tipo não mutado ('risco individual moderado'; ver [Secção 4.1](#)).

A probabilidade da transmissão involuntária de uma variante genética de talimogene laherparepvec a um indivíduo involuntário é considerada muito inferior à probabilidade de transmissão do próprio talimogene laherparepvec (ver [Secção 3.1](#))

A transmissão de uma variante genética de talimogene laherparepvec a um recetor involuntário seria um efeito indireto, com base numa cadeia de eventos, nomeadamente:

- Presença simultânea de um vírus de tipo não mutado coinfectante nas células de um hospedeiro. Em doentes, é improvável que um vírus de tipo não mutado estivesse no mesmo tecido que talimogene laherparepvec uma vez que este é injetado diretamente nas células tumorais e não se consegue propagar eficazmente em tecido normal, enquanto um vírus HSV-1 de tipo não mutado pré-existente estaria em tecidos da mucosa ou nos gânglios neuronais do doente. Da mesma forma, não é de esperar que a exposição de recetores involuntários a talimogene laherparepvec resulte em infeção de tecidos da mucosa ou dos gânglios neuronais, já que a capacidade de talimogene laherparepvec para replicar em células não tumorais está extremamente atenuada.
- Recombinação homóloga espontânea entre talimogene laherparepvec e HSV-1 de tipo não mutado nos locais das modificações de ICP34.5 e/ou ICP47
- Transferência do doente para um recetor involuntário. O modo de transmissão e a capacidade de sobrevivência de uma variante genética de talimogene laherparepvec não sofrerá alterações pelas potenciais modificações genéticas que possam ocorrer pela recombinação homóloga com um vírus de tipo não mutado coinfectante simultâneo.

Podemos assim concluir que a probabilidade de transmissão de uma variante genética de talimogene laherparepvec a um recetor involuntário é muito baixa (ver [Secção 3.2](#)).

Contudo, uma vez que não existem dados não clínicos ou clínicos sobre a criação espontânea de variantes genéticas de talimogene laherparepvec existe algum grau de incerteza científica em relação a este aspeto. A aplicação do princípio de precaução determina que se tenha em consideração atribuir uma classificação de probabilidade superior. Neste caso, pode considerar-se que a probabilidade acima atribuída está subestimada. No entanto, não é adequado atribuir uma probabilidade "moderada" uma vez que tal implicaria uma maior probabilidade de transmissão do que a de talimogene laherparepvec ou do vírus de tipo não mutado (risco na comunidade baixo/limitado"; ver [Secção 4.1](#)).

Assim, através de uma combinação das consequências de nível moderado (aplicando o princípio de precaução) da transmissão e da baixa probabilidade desta ocorrer, o risco global colocado por uma variante genética de talimogene laherparepvec a um recetor involuntário é considerado **BAIXO**.

5. Aplicação de estratégias de gestão para riscos

5.1 Desenho da construção viral

Foram incluídas em talimogene laherparepvec inúmeras características de segurança:

- Deleção do ICP34.5 que funciona como um fator de virulência durante a infecção por HSV evitando que o vírus replique eficazmente em células não divisíveis
- A possibilidade de criação de variantes genéticas estáveis com características imprevisíveis é minimizada pelo desenho da construção genética de talimogene laherparepvec. A inserção da sequência de codificação de GM-CSF humano de forma a substituir o gene que codifica o ICP34.5 assegura que um potencial evento de recombinação entre talimogene laherparepvec e um vírus de tipo não mutado não poderia resultar de forma estável num vírus patogénico portador do gene para GM-CSF humano. A reparação apenas da função do ICP47 resultaria numa variante incapaz de replicação em células não tumorais (devido à deleção continuada do ICP34.5). Na hipótese de tanto as funções do ICP47 como do ICP34.5 serem recuperadas, o vírus resultante seria equivalente ao HSV-1 de tipo não mutado (i.e. equivalente ao HSV-1 existente, coinfetante).
- O gene timidina quinase (TK) do HSV permanece intacto, o que torna talimogene laherparepvec suscetível a agentes antivirais, tal como o aciclovir. Assim, o aciclovir pode ser utilizado para bloquear a replicação de talimogene laherparepvec.

5.2 Controlo das libertações

Após a aprovação do Pedido de Ensaio Clínico para talimogene laherparepvec, o produto será apenas fornecido aos centros do estudo aprovados e administrado a indivíduos incluídos no estudo por um médico qualificado, em conformidade com o protocolo do ensaio clínico (Protocolo 20130232).

Assim, o fabrico, distribuição e rastreabilidade de talimogene laherparepvec são controlados e monitorizados segundo os regulamentos farmacêuticos.

Antes da administração, o produto deverá ser conservado num frigorífico seguro, com a temperatura controlada de -70°C ou inferior na farmácia ou em outro local seguro adequado.

5.3 Precauções no transporte

Recomenda-se a seguinte classificação de transporte:

IATA – Número UN: 3245

Nome adequado para transporte – Microrganismo geneticamente modificado

De acordo com a definição da IATA, talimogene laherparepvec não é considerado infeccioso. A IATA define substâncias infecciosas como “agentes patogénicos que podem causar doença em humanos ou animais” mas especifica que substâncias nas quais os “agentes patogénicos foram neutralizados ou inativados de forma a não constituírem um risco para a saúde” ou seja “pouco provável que causem doença em humanos ou animais” estão isentos da definição de substâncias infecciosas. Talimogene laherparepvec cumpre estes dois critérios de isenção. Em

primeiro lugar, talimogene laherparepvec é uma versão atenuada de HSV-1, modificado para que haja replicação seletiva em células tumorais. Uma vez que, em células normais, o vírus está atenuado, não se preveem efeitos adversos em indivíduos ou animais saudáveis que, acidentalmente entrem em contacto com ele. Em segundo lugar, dados em animais e humanos suportam que é improvável que talimogene laherparepvec cause doença isentando-o, portanto, da definição de infeccioso da IATA.

Talimogene laherparepvec é um microrganismo geneticamente modificado (MGM) por ser um HSV-1 que foi geneticamente alterado de uma forma que não ocorre na natureza. Talimogene laherparepvec foi criado a partir da estirpe JS1 do HSV-1 por deleção do ICP34.5 (necessário para neurovirulência e replicação eficaz em células não tumorais) e do ICP47 (bloqueia a apresentação de antígenos em células infetadas por HSV-1) e pela inserção do gene GM-CSF. Sabe-se que a deleção do ICP34.5 no HSV-1 torna o vírus avirulento. Aos MGM que não cumprem a definição de substâncias tóxicas ou infecciosas deve ser atribuída a UN 3245.

A Ficha de Dados de Segurança de talimogene laherparepvec ([Amgen 2015](#)), que inclui instruções para manuseamento de salpicos acompanha todas as entregas.

5.4 Precauções de manuseamento e administração

A administração será apenas efetuada por profissionais de saúde qualificados, nas instalações de um centro do estudo aprovado.

Durante a preparação e administração do produto devem ser seguidas as recomendações institucionais para manuseamento, equipamento protetor individual, derrames acidentais e eliminação de resíduos.

As definições e requisitos para manuseamento adequado e eliminação de resíduos podem variar entre centros e legislação regional, contudo, as práticas universais de biossegurança são semelhantes entre recomendações e são geralmente seguidas em estabelecimentos médicos aquando do manuseamento de medicamentos injetáveis e de resíduos médicos, tais como:

- Acesso restrito
- Armazenamento seguro
- Formação do pessoal
- Disponibilidade e utilização de Equipamento de Proteção Individual (PPE; batas de laboratório, toucas, luvas e óculos de proteção)
- Práticas de rotina estabelecidas para manusear materiais com potencial de perigo biológico, tais como amostras/fluídos do doente e resíduos médicos (autoclaves, contentores para objetos cortantes, incineradores, desinfetantes e superfícies laváveis adequadas).

O Manual de Instruções para o Medicamento Experimental, emitido pela Amgen para cada centro do estudo, disponibiliza as precauções para utilização, resumidas em seguida.

Um ferimento por picada de agulha, derrame ou salpico durante a administração pode resultar em exposição acidental de Profissionais de Saúde a talimogene laherparepvec. A deleção do gene ICP34.5 destina-se a permitir apenas replicação seletiva no tumor e replicação viral

limitada ou inexistente em tecidos normais. Contudo, a injeção de talimogene laherparepvec pode resultar em sinais ou sintomas de infeção primária no local da exposição. Foram recebidos alguns relatos de exposição acidental em funcionários do estudo. Em um dos casos, o médico exposto desenvolveu sinais/sintomas clínicos de lesão de tipo “panarício herpético” no local da lesão por picada acidental de agulha que foi resolvida sem sequelas. Uma análise inicial para anticorpos deu positivo para um vírus de tipo HSV. Dez dias após a exposição acidental foi efetuada uma análise por PCR para confirmação, tendo dado positiva para um vírus com deleção de ICP47, apontando para que o vírus era, muito provavelmente, talimogene laherparepvec. Nenhum dos outros indivíduos expostos relatou sinais ou sintomas de infeção. Em alguns casos, foi administrado aciclovir ou valaciclovir oral.

Exposição acidental a talimogene Laherparepvec

A exposição acidental a talimogene laherparepvec pode causar sinais ou sintomas sugestivos de infeção herpética. Os profissionais de saúde podem estar expostos a talimogene laherparepvec durante a preparação ou administração. Em caso de uma exposição ocupacional acidental devido a salpicos para os olhos ou mucosas, lave abundantemente com água durante o mínimo de 15 minutos. Em caso de exposição a pele lesada ou a picada de agulha, limpe meticulosamente a área afetada com sabão e água e/ou desinfetante. Os profissionais de saúde com feridas expostas na pele ou que estejam imunocomprometidos não devem administrar talimogene laherparepvec ou não devem entrar em contacto direto com o local da injeção de talimogene laherparepvec. O pessoal de saúde que prepara ou administra injeções intralesionais e aplica pensos protetores às lesões injetadas deve cumprir precauções de segurança (p.ex. usar touca protetora ou bata de laboratório, óculos de proteção e luvas) para evitar contacto direto com talimogene laherparepvec. Os contactos próximos podem ser expostos a talimogene laherparepvec através de contacto direto com as lesões injetadas, com os pensos de proteção, ou, por contacto físico com fluídos corporais (p.ex. sangue e urina) dos indivíduos tratados. Indivíduos com lesões cutâneas expostas não devem entrar em contacto direto com o local de injeção de talimogene laherparepvec. Indivíduos imunocomprometidos devem evitar contacto direto com os indivíduos tratados. Os contactos próximos que auxiliam os doentes na aplicação de pensos de proteção nas lesões injetadas devem usar luvas de proteção e devem cumprir precauções de segurança para evitar contacto direto com talimogene laherparepvec. Em caso de exposição secundária (p.ex. derrame através do penso oclusivo ao doente ou a contactos) a talimogene laherparepvec, os indivíduos expostos devem ser advertidos para lavarem meticulosamente a área com sabão e água e/ou um desinfetante. Os indivíduos expostos deverão contactar os prestadores de cuidados de saúde em caso de sinais de infeção sistémica (febre, dores, náuseas e mal-estar) ou local (por exemplo, dor, vermelhidão e edema).

Talimogene laherparepvec é sensível ao aciclovir ou a qualquer antiviral que seja ativado pelo gene viral timidina quinase e que pode ser administrado caso haja indicação clínica.

Derrames acidentais

Os derrames de talimogene laherparepvec devem ser tratados com um agente viricida e materiais absorventes. Todos os materiais contaminados com talimogene laherparepvec devem ser eliminados de acordo com as recomendações institucionais locais.

Dado a natureza atenuada do organismo modificado, o facto de se desconhecer se o organismo progenitor se propaga através de aerossóis e as manipulações mínimas necessárias para retirar a dose do frasco para injetáveis para uma seringa (com improvável potencial para aerossol do espaço morto da agulha) não foi considerado necessário efetuar o processo de preparação numa cabine de biossegurança. Da mesma forma, não são necessárias outras precauções ao administrar o produto por injeção intralesional.

5.5 Limpeza e gestão de resíduos

O HSV-1 de tipo não mutado é sensível a inativação por diversos tratamentos físicos e químicos de uso vulgar e facilmente acessíveis:

Inativação física: O vírus HSV de tipo não mutado é facilmente inativado fora do hospedeiro por exposição a um pH < 4, temperaturas >56°C durante 30 minutos, pasteurização (60°C durante 10 horas) e aquecimento no micro-ondas durante 4 minutos ([Jerome & Morrow 2007](#), [Croughan & Behbehani 1988](#)).

Inativação química: O vírus HSV de tipo não mutado é facilmente inativado por solventes lipídicos ([Jerome & Morrow 2007](#)). Pode ser inativado por Lysol a 0,5% durante 5 minutos; por Listerine (mistura 1:1) durante 5 minutos; por 2000 ppm (2000 µl/litro) de lixívia durante 10 minutos; por álcool isopropílico (mistura 1:1) ([Croughan & Behbehani 1988](#)). O HSV também é suscetível a compostos de amónio quaternário ([Wood and Payne 1998](#)). A maioria dos herpesvírus são também suscetíveis a etanol e isopropanol a 30%, ortofenilfenol a 0,12% e glutaraldeído a 0,04% ([Prince & Prince 2001](#)).

As modificações genéticas efetuadas durante a construção de talimogene laherparepvec a partir do HSV-1 de tipo não mutado não afetam a sua sensibilidade à inativação física e química.

A sensibilidade de talimogene laherparepvec a diversos produtos de limpeza também foi avaliada. Talimogene laherparepvec é inativado em 1 minuto após tratamento com Septihol (70% álcool isopropílico), Vespene (0,8% v/v), LpH (0,8% v/v) e lixívia (2,5% v/v). A inativação também ocorre rapidamente (em 5 minutos) na presença de 0,1 N hidróxido de sódio ou de Spor-klenz. Para cada um destes agentes de limpeza foi observada uma redução superior a 6-log na infetividade viral de talimogene laherparepvec.

Após a administração de talimogene laherparepvec num centro do estudo, os frascos para injetáveis, seringas, agulhas e outros instrumentos descartáveis ou outros materiais usados durante o processo devem ser eliminados, conforme instruções no IPIM, cumprindo com as exigências locais/regionais e institucionais para resíduos biológicos perigosos.

Nas instalações do centro do estudo, isto irá envolver armazenamento temporária em contentores para objetos cortantes ou em sacos claramente identificados (p.ex. perigo biológico, resíduos médicos) antes da esterilização em autoclave e/ou incineração nas instalações ou fora delas, de acordo com as recomendações institucionais locais para manuseamento de materiais potencialmente infecciosos.

Geralmente, em ambiente hospitalar, o equipamento não descartável e outros materiais usados durante o processo são limpos com um desinfetante químico com atividade viricida durante o tempo necessário de contacto ou esterilizados em autoclave de acordo com as recomendações institucionais locais para o manuseamento de materiais potencialmente infecciosos.

Habitualmente, os procedimentos padronizados para eliminação em instalações hospitalares (onde o potencial de contaminação por outros agentes é potencialmente mais perigoso do que o representado por talimogene laherparepvec) são consistentes com as recomendações da 3ª edição do *Laboratory Biosafety Manual*, (2004) da WHO conforme referido seguidamente:

“Cortantes” contaminados (infecciosos)

Agulhas hipodérmicas, bisturis, facas e vidros partidos devem ser sempre colocados em contentores à prova de perfuração, equipados com proteções e tratados como infecciosos.

Após utilizadas, as agulhas hipodérmicas não devem voltar a ser tapadas, encaixadas ou retiradas das seringas descartáveis. O conjunto completo deve ser colocado num contentor para cortantes. As seringas descartáveis, sozinhas ou com agulhas, devem ser colocadas em contentores para cortantes e incinerados, depois de previamente esterilizadas em autoclave, caso seja necessário. Os contentores para eliminação de cortantes devem ser à prova de/resistentes a perfuração e não devem ser cheios até ao limite da sua capacidade. Quando estiverem cheios até três quartos deverão ser colocados em contentores para “resíduos infecciosos” e incinerados, com esterilização prévia em autoclave se as práticas laboratoriais o exigirem. Os contentores para eliminação de cortantes não devem ser descartados em aterros.

Materiais contaminados (potencialmente infecciosos) para esterilização em autoclave e reutilização:

Não deve ser feita qualquer tentativa de pré-limpeza de materiais contaminados (potencialmente infecciosos) para serem esterilizados em autoclave ou reutilizados. As limpezas ou reparações necessárias devem ser feitas apenas após esterilização em autoclave ou desinfeção.

Materiais contaminados (potencialmente infecciosos) para eliminação:

Além dos cortantes, já abordados, todos os materiais contaminados (potencialmente infecciosos) devem ser esterilizados em autoclave em contentores herméticos (p.ex sacos de plástico para autoclave, com código de cores), antes de eliminados. Depois da esterilização em autoclave, o material pode ser colocado em contentores adequados para transporte para a incineradora. Se possível, os materiais provenientes de atividades de saúde não devem ser eliminados em aterros mesmo após descontaminação. Se houver uma incineradora disponível no laboratório do centro, a esterilização em autoclave pode ser dispensada; os resíduos contaminados devem ser colocados em contentores identificados (p.ex. sacos com código de cores) e transportados diretamente para a incineradora. Os contentores para transporte reutilizáveis devem ser herméticos e terem proteções estanques. Devem ser desinfetados e limpos antes de serem devolvidos ao laboratório para posterior utilização.

Não é necessário limpar as instalações após a sua utilização desde que as precauções anteriormente referidas sejam seguidas durante a administração do produto ou ao lidar com derrames ou quebras acidentais. Contudo, as superfícies de trabalho deverão ser descontaminadas com um desinfetante químico com atividade viricida após a preparação e doseamento de talimogene laherparepvec.

O folheto informativo disponibilizado a cada um dos participantes informa que a eliminação de pensos utilizados deve ser feita através do centro de estudo na visita seguinte programada. O indivíduo recebe mais pensos, luvas descartáveis e sacos de plásticos de abertura fácil, assim como instruções específicas para seguir de forma a minimizar o risco de exposição acidental ao meio ambiente.

5.6 Comunicação de riscos e advertências

O IPIM e os materiais disponibilizados aos participantes incluem informação essencial para minimizar o risco de transmissão a um indivíduo involuntário, nomeadamente:

- Descrição do modo de administração e do equipamento individual de proteção a usar durante a preparação e administração da dose.
- Descrição das ações a tomar após exposição ocupacional acidental (picada de agulha ou salpico)
- Procedimentos para a eliminação de resíduos e procedimentos para gerir derrames e quebras acidentais.
- Instruções para o doente acerca dos cuidados com o local de injeção e eliminação de pensos
- Descrição dos principais sintomas de infeção por HSV-1 de tipo não mutado, com instruções para informar um médico caso o doente ou um seu contacto próximo apresentem sintomas. Estão também incluídas instruções para controlar uma infeção deste tipo.

5.7 Atividades de monitorização

A monitorização dos efeitos diretos e indiretos do talimogene laherparepvec em indivíduos será alcançada através das avaliações clínicas aprovadas no protocolo do ensaio clínico. Os investigadores do estudo irão monitorizar o tratamento dos participantes e reportar efeitos adversos à Farmacovigilância Global da Amgen de acordo com os requisitos estipulados no protocolo.

A Amgen irá realizar um programa de vigilância para auxiliar a avaliação de quaisquer riscos potenciais para terceiros, após o tratamento de indivíduos com talimogene laherparepvec.

5.8 Conclusões

Estão implementadas estratégias adequadas de gestão de risco para comunicar e minimizar os riscos e consequências da exposição acidental a indivíduos. São propostas estratégias de monitorização adequadas, a acrescentar à certeza científica da avaliação de risco ambiental.

6. Determinação do risco global do OGM

O ser humano é o único hospedeiro natural para a infecção por HSV-1. Este não infeta plantas e raramente infeta animais e não contribui para ecossistemas ou processos ambientais. Não respira e não contribui para qualquer produção primária ou processo de decomposição. Na forma de virião não exibe qualquer atividade metabólica. Desconhece-se se o HSV-1 de tipo não mutado é zoonótico ou zoonótico reverso em condições naturais

A replicação do DNA ocorre no núcleo da célula. Não ocorre integração do genoma viral com o genoma celular durante a replicação ou latência (ver [Secção 1.1.1](#)).

Fora do hospedeiro, o HSV-1 é um vírus com envelope, sensível à inativação física (desidratação, calor, pH baixo) e a desinfetantes (solventes lipídicos e detergentes suaves), sendo rapidamente inativado por ambos. Não forma estruturas de sobrevivência e a sua sobrevivência fora do organismo hospedeiro está limitada a curtos períodos de tempo (ver [Secção 1.1.1](#)).

Não se prevê que alguma das modificações genéticas feitas ao HSV-1 de tipo não mutado durante a construção de talimogene laherparepvec permita a transferência ou manutenção de material genético ao meio ambiente (fora das espécies hospedeiras) ou tenha efeito na sensibilidade a agentes de inativação ou capacidade de sobrevivência no meio ambiente. Não estão presentes em talimogene laherparepvec quaisquer genes que confirmam resistência a antibacterianos nem foram usados genes de resistência antibacteriana como marcadores, na sua construção.

Assim, não foram identificados potenciais efeitos adversos de talimogene laherparepvec em organismos não humanos no meio ambiente, ecossistema ou processos ambientais.

Com base na natureza do organismo parental, nas modificações genéticas que resultaram em talimogene laherparepvec e no meio recetor, os potenciais efeitos adversos que talimogene laherparepvec pode exercer durante este ensaio clínico estão limitados a:

- Efeitos diretos da transmissão acidental de talimogene laherparepvec a um recetor humano que podem ser imediatos ou tardios
- Efeitos indiretos da transmissão acidental de uma variante genética de talimogene laherparepvec a um recetor humano que podem ser imediatos ou tardios

A eventual magnitude de propagação acidental de talimogene laherparepvec ou das suas variantes genéticas teóricas na população humana é considerada baixa, dado a natureza atenuada de talimogene laherparepvec e das suas variantes, além da experiência clínica obtida até à data.

Para os indivíduos involuntários que possam ter sido expostos a talimogene laherparepvec ou às suas possíveis variantes genéticas, prevê-se que os efeitos adversos sejam de menor gravidade dos observados com a infecção por HSV-1 de tipo não mutado, classificado universalmente como de “risco individual moderado, baixo/risco limitado na comunidade”; ver [Secção 4.1](#). As consequências da exposição em indivíduos com imunocompromisso grave

podem ser consideradas equivalentes à exposição a HSV-1 de tipo não mutado (risco moderado).

Concluindo, prevê-se que as potenciais consequências em caso de transmissão de talimogene laherparepvec, ou, das suas possíveis variantes genéticas sejam de grau baixo a moderado e isoladas.

Tendo em consideração a forma, escala e meio de libertação, os potenciais mecanismos de exposição e as medidas de gestão de risco implementadas, assim como os dados clínicos disponíveis relativos à disseminação e exposição a talimogene laherparepvec, considera-se que a probabilidade de efeitos diretos de talimogene laherparepvec num recetor involuntário é baixa.

A probabilidade de efeitos indiretos provocados por uma variante genética de talimogene laherparepvec em recetores involuntários é considerada muito inferior, uma vez que tal evento exigiria uma combinação da exposição com um outro evento de baixa frequência (recombinação homóloga no doente ou uma reativação num doente involuntário).

Assim, a probabilidade de efeitos diretos ou indiretos da transmissão de talimogene laherparepvec ou de uma sua variante genética a um recetor humano involuntário é considerada baixa.

Os riscos potenciais identificados para a saúde humana (especificamente para um recetor involuntário) são considerados através da combinação da estimativa das consequências do efeito com a estimativa da probabilidade do efeito (em conformidade com a 2001/18/EC e 2002/623/EC).

Esta estimativa é feita tendo como base o risco atribuído ao organismo parental (HSV-1 de tipo não mutado) de acordo com o contexto. A estimativa também é influenciada pelo grau de incerteza científica nessas estimativas, de acordo com o princípio de precaução.

Assim, através da combinação das consequências de nível baixo a moderado de transmissão e da baixa probabilidade de tal ocorrer, **o risco global do talimogene laherparepvec a um recetor involuntário é considerado BAIXO.**

Da mesma forma, através de uma combinação das consequências de nível baixo/moderado (aplicando o princípio de precaução) de transmissão e da baixa probabilidade de tal ocorrer, **o risco global de uma variante genética de talimogene laherparepvec a um recetor involuntário é considerado BAIXO.**

Existem estratégias adequadas de gestão de risco para comunicar e minimizar os riscos e consequências de exposição a indivíduos involuntários nomeadamente:

- Desenho da construção viral
- Controlo da libertação
- Precauções de transporte
- Precauções de administração
- Limpeza e gestão de resíduos

- Comunicação de riscos e precauções

São propostas atividades adequadas de forma a monitorizar a libertação de talimogene laherparepvec e a responder a incertezas nos dados disponíveis.

Concluindo, na generalidade o impacto ambiental da libertação deliberada de talimogene laherparepvec como um medicamento experimental nas condições de libertação propostas e com as precauções e atividades de monitorização propostas, é considerado aceitável.

7. Referências

Aita VM, Liang XH, Murty VV, et al. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*. 1999;59:59-65.

Allison N, Chang TC, Steele KE, Hilliard JK. Fatal herpes simplex infection in a pygmy African hedgehog (*Atelerix albiventris*). *J Comp Pathol*. 2002;126(1):76-78.

Amgen Talimogene Laherparepvec Material Safety Data Sheet (2015). Revision 6; 11th February 2015.

Andtbacka, RHI, Kaufman, HL, Collichio F et al. Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 2015; ahead of print.

Armien AG et al. Chronic cortical and subcortical pathology with associated neurological deficits ensuing experimental herpes encephalitis. *Brain Pathol*. 2010;20(4):738-750.

Aster J and Kumar V. White cells, lymph nodes, spleen, and thymus. *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Cotran RS, Kumar V and Collins T. Philadelphia, PA, W.B. Saunders and Co. 1999:644-649.

Baiocchi RA, Ward JS, Carrodeguas L, et al. GM-CSF and IL-2 induce specific cellular immunity and provide protection against Epstein-Barr virus lymphoproliferative disorder. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108:887-894.

Bardell D. Hand-to-hand transmission of herpes simplex virus type 1. *Microbios*. 1989;59(239):93-100.

Bardell D. Survival of herpes simplex virus type 1 on some frequently touched objects in the home and public buildings. *Microbios*. 1990;63(256-257):145-150.

Bardell D. Survival of herpes simplex virus type 1 in saliva and tap water contaminating some common objects. *Microbios*. 1993;74(299):81-87.

Bardell D. Studies on the survival and inactivation of herpes simplex virus type 1 on coins. *Microbios*. 1994;77(312):161-166.

Bendandi M, Gocke CD, Kobrin CB, et al. Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma. *Nature medicine*. 1999;5:1171-1177.

Bolovan CA, Sawtell NM, Thompson RL. ICP34.5 mutants of herpes simplex virus type 1 strain 17syn+ are attenuated for neurovirulence in mice and for replication in confluent primary mouse embryo cell cultures. *Journal of virology*. 1994;68:48-55.

Bowden R, Sakaoka H, Donnelly P, et al. High recombination rate in herpes simplex virus type 1 natural populations suggests significant coinfection. *Infection, Genetics and Evolution*. 2004;4(2):115-123.

Brady and Bernstein. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Research*. 2004;61(2):73–81.

Brown SM, Harland J, MacLean AR, et al. Cell type and cell state determine differential in vitro growth of non-neurovirulent ICP34.5-negative herpes simplex virus types 1 and 2. *The Journal of general virology*. 1994b;75(Pt 9):2367-2377.

Chambers R, Gillespie GY, Soroceanu L, et al. Comparison of genetically engineered herpes simplex viruses for the treatment of brain tumors in a scid mouse model of human malignant glioma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92:1411-1415.

Chayavichitsilp P, Buckwalter JV, Krakowski AC, et al. Herpes simplex. *Pediatrics in Review*. 2009;30(4):119-129.

Chou J, Kern ER, Whitley RJ, et al. Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture. *Science*. 1990;250:1262-1266.

Croughan WS & Behbehani AM. Comparative study of inactivation of herpes simplex virus types 1 and 2 by commonly used antiseptic agents. *Journal of Clinical Microbiology*. 1988;26(2):213-215.

Daud AI, Mirza N, Lenox B, et al. Phenotypic and functional analysis of dendritic cells and clinical outcome in patients with high-risk melanoma treated with adjuvant granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26:3235-3241.

Davis TA, Monroy RL, Skelly RR, et al. Differential augmentation of in vivo natural killer cytotoxicity in normal primates with recombinant human interleukin-1 and granulocytemacrophage colony-stimulating factor. *Clin Exp Immunol*. 1990;79:436-442.

DeLuca NA, McCarthy AM, Schaffer PA. Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding immediate-early regulatory protein ICP4. *J. Virol*. 1985;56(2):558.

Dranoff G, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(8):3539-3543.

Drew WL. Herpesviruses. In Ryan KJ, & Ray CG (Eds.). *Sherris medical microbiology: An introduction to infectious diseases*. USA: McGraw Hill. 2004;4th ed:555-576.

Efstathiou S, Minson AC, Field HJ, et al. Detection of herpes simplex virus-specific DNA sequences in latently infected mice and in humans. *Journal of virology*. 1986;57:446-455.

Epstein JH and Price JT. The significant but understudied impact of pathogen transmission from humans to animals. *Mt Sinai J Med*. 2009;76(5):448-455.

Farassati F, Yang AD, Lee PW. Oncogenes in Ras signalling pathway dictate host-cell permissiveness to herpes simplex virus 1. *Nature cell biology*. 2001;3:745-750.

Feldman LT et al. Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. PNAS. 2002;99(2):978-983.

Geoffroy MC, Epstein AL, Toublanc E, et al. Herpes simplex virus type 1 ICP0 protein mediates activation of adenoassociated virus type 2 rep gene expression from a latent integrated form. J Virol. 2004;78(20):10977-10986.

Gesser RM and Koo SC. Oral inoculation with herpes simplex virus type 1 infects enteric neuron and mucosal nerve fibers within the gastrointestinal tract in mice. J Virol. 1996;70(6):4097-4102.

Goldsmith K, Chen W, Johnson DC, et al. Infected cell protein (ICP)47 enhances herpes simplex virus neurovirulence by blocking the CD8+ T cell response. J Exp Med. 1998;187:341-348.

Green LK & Pavan-Langston D. Herpes simplex ocular inflammatory disease. International Ophthalmology Clinics. 2006;46(2):27-37.

Grest P, Albicker P, Hoelzle L, Wild P and Pospischil A. Herpes simplex encephalitis in a domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). J Comp Pathol. 2002;126(4):308-311.

Gupta R, Warren T & Wald A. Genital herpes. Lancet. 2007;370(9605):2127-2137.

Harrington KJ et al. Phase I/II study of oncolytic HSV GM-CSF in combination with radiotherapy and cisplatin in untreated stage III/IV squamous cell cancer of the head and neck. Clin Cancer Res. 2010;16:4005.

Harris RA, Everett RD, Zhu XX, et al. The HSV immediate early protein Vmw110 reactivates latent HSV type 2 in an in vitro latency system. J Virol. 1989;63:3513-3515.

Harrow S, Papanastassiou V, Harland J, et al. HSV1716 injection into the brain adjacent to tumour following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival. Gene therapy. 2004;11:1648-1658.

Hu JC, et al. A phase I study of OncoVEXGM-CSF, a second-generation oncolytic herpes simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor. Clin Cancer Res. 2006;12:6737.

Huang AY, et al. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. Science. 1994;264(5161):961-965.

Huemer HP, Larcher C, Czedik-Eysenberg T, Nowotny N and Reifinger M. Fatal infection of a pet monkey with Human herpesvirus. Emerg Infect Dis. 2002;8(6):639-642.

Hunter WD, et al. Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207: safety evaluation of intracerebral injection in nonhuman primates. Journal of virology. 1999;73:6319.

Jager E, Ringhoffer M, Dienes HP, et al. Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo. Int J Cancer. 1996;67:54-62.

Jerome KR & Morrow RA. Herpes simplex viruses and Herpes B virus. In Murray PR (Ed.). *Manual of clinical microbiology*. Washington, D.C.: ASM Press.2007;9th ed:1523-1536.

Kesari S, Lasner TM, Balsara KR, et al. A neuroattenuated ICP34.5-deficient herpes simplex virus type 1 replicates in ependymal cells of the murine central nervous system. *The Journal of general virology*. 1998;79(3):525-536.

Kimberlin DW. Neonatal herpes simplex infection. *Clin Microbiol Rev*. 2004.

Kimberlin DW. Herpes simplex virus infections in neonates and early childhood. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. 2005;16(4):271-281.

Kino Y, Hayashi Y, Hayashida I, et al. Dissemination of herpes simplex virus in nude mice after intracutaneous inoculation and effect of antibody on the course of infection. *J Gen Virol*. 1982;63(2):475-479.

Koi H, et al. Syncytiotrophoblast is a barrier to maternal-fetal transmission of herpes simplex virus. *Biol Reprod*. 2002;67(5):1572-1579.

Kramer A, Schwebke I & Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*. 2006;6.

Kumel G, Schroder CH and Kaerner HC. Neurovirulence and latency in inbred mice of two HSV-1 intrastrain variants of divergent pathogenicity. *Med Microbiol Immunol*. 1986;174(6):313-324.

Lawson DH, Lee SJ, Tarhini AA, et al. E4697: Phase III cooperative group study of yeast-derived granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) versus placebo as adjuvant treatment of patients with completely resected stage III-IV melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 2010 ASCO Annual Meeting Proceedings. 2010;28:15s(suppl; abstr 8504).

Lefaux B, et al. Nonhuman primates might be highly susceptible to cross-species infectivity by human alpha-herpesviruses. *Vet Pathol*. 2004;41(3):302-304.

Leib DA, Alexander DE, Cox D, Yin J and Ferguson TA. Interaction of ICP34.5 with Beclin 1 modulates herpes simplex virus type 1 pathogenesis through control of CD4+ T-cell responses. *J Virol*. 2009;83(23):12164-12171.

Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*. 1999;402:672-676.

Liu BL, Robinson M, Han ZQ, et al. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and antitumour properties. *Gene therapy*. 2003a;10:292-303.

Liu X, Tian PK, Ju DW, et al. Systemic genetic transfer of p21WAF-1 and GM-CSF utilizing of a novel oligopeptide-based EGF receptor targeting polyplex. *Cancer Gene Ther*. 2003b;10:529-539.

Longa CS, et al. Human herpesvirus 1 in wild marmosets, Brazil, 2008. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(7):1308-1310.

Mace AT, Ganly I, Soutar DS, et al. Potential for efficacy of the oncolytic Herpes simplex virus 1716 in patients with oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2008;30:1045-1051.

McGeoch DJ, Rixon FJ and Davison AJ. Topics in herpesvirus genomics and evolution. *Virus Res*. 2006;117(1):90-104.

Mackie RM, Stewart B, Brown SM. Intralesional injection of herpes simplex virus 1716 in metastatic melanoma. *Lancet*. 2001;357:525-526.

MacLean AR, ul-Fareed M, Robertson L, et al. Herpes simplex virus type 1 deletion variants 1714 and 1716 pinpoint neurovirulence-related sequences in Glasgow strain 17+ between immediate early gene 1 and the 'a' sequence. *The Journal of general virology*. 1991;72(Pt 3):631-639.

Mahl MC & Sadler C. Virus survival on inanimate surfaces. *Can J Microbiol*. 1975;21(6):819-823.

Markert JM, Liechty PG, Wang W, et al. Phase Ib trial of mutant herpes simplex virus G207 inoculated pre and post-tumor resection for recurrent GBM. *Mol Ther*. 2009;17:199-207.

Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, et al. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene therapy*. 2000;7:867-874.

Markovitz NS, Baunoch D, Roizman B. The range and distribution of murine central nervous system cells infected with the gamma(1)34.5- mutant of herpes simplex virus 1. *Journal of virology*. 1997;71:5560-5569.

Martuza RL, Malick A, Markert JM, et al. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science*. 1991;252:854-856.

McKie EA et al. Histopathological responses in the SNC following inoculation with a non-neurovirulent mutant (1716) of herpes simplex virus type 1 (HSV 1): relevance for gene and cancer therapy. *Neuropathology and applied neurobiology*. 1998;24:367.

Mehta H, Muller J, Markovitz NS. Ultrastructural analysis of ICP34.5- herpes simplex virus 1 replication in mouse brain cells in vivo. *Journal of virology*. 2010;84:10982-10990.

Meignier B, Longnecker R, Roizman B. In vivo behavior of genetically engineered herpes simplex viruses R7017 and R7020: construction and evaluation in rodents. *J Infect Dis*. 1988;158:602-614.

Mellerick DM, Fraser NW. Physical state of the latent herpes simplex virus genome in a mouse model system: evidence suggesting an episomal state. *Virology*. 1987;158:265-275.

Mester JC & Rouse BT. The mouse model and understanding immunity to herpes simplex virus. *Rev Infect Dis*. 1991;13(Suppl 11):S935-945.

Miller CG, Krummenacher C, Eisenberg RJ, et al. Development of a syngenic murine B16 cell line-derived melanoma susceptible to destruction by neuroattenuated HSV-1. *Mol Ther*. 2001;3:160-168.

Miller GG & Dummer JS. Herpes simplex and varicella zoster viruses: forgotten but not gone. *American Journal of Transplantation*. 2007;7(4):741-747.

Minagawa H, Sakuma S, Mohri S, et al. Herpes simplex virus type 1 infection in mice with severe combined immunodeficiency (SCID). *Arch Virol*. 1988;103(1-2):73-82.

Mocarski ES, Roizman B. Structure and role of the herpes simplex virus DNA termini in inversion, circularization and generation of virion DNA. *Cell*. 1982;31:89-97.

Mohr I, Gluzman Y. A herpesvirus genetic element which affects translation in the absence of the viral GADD34 function. *The EMBO journal*. 1996;15:4759-4766.

Mohr I, Sternberg D, Ward S, et al. A herpes simplex virus type 1 gamma34.5 second-site suppressor mutant that exhibits enhanced growth in cultured glioblastoma cells is severely attenuated in animals. *Journal of virology*. 2001;75:5189-5196.

Muller K, et al. Encephalitis in a rabbit caused by human herpesvirus-1. *J Am Vet Med Assoc*. 2009; 235(1):66-69.

Nemunaitis J, Singer JW, Buckner CD, et al. Long-term follow-up of patients who received recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor after autologous bone marrow transplantation for lymphoid malignancy. *Bone Marrow Transplant*. 1991;7:49-52.

Nerurkar LS, West F, May M, et al. Survival of herpes simplex virus in water specimens collected from hot tubs in spa facilities and on plastic surfaces. *JAMA*. 1983;250(22):3081-3083.

Norberg P, Bergström T and Liljeqvist J-A. Genotyping of Clinical Herpes Simplex Virus Type 1 Isolates by Use of Restriction Enzymes. *J. Clin. Microbiol*. 2006;44(12):4511.

Orvedahl A, Alexander D, Tallozy Z, et al. HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell host & microbe*. 2007;1:23-35.

Papanastassiou V, Rampling R, Fraser M, et al. The potential for efficacy of the modified (ICP 34.5(-)) herpes simplex virus HSV1716 following intratumoural injection into human malignant glioma: a proof of principle study. *Gene therapy*. 2002;9:398-406.

Perng GC, Thompson RL, Sawtell NM, et al. An avirulent ICP34.5 deletion mutant of herpes simplex virus type 1 is capable of in vivo spontaneous reactivation. *Journal of virology*. 1995;69:3033-3041.

Perng GC, Ghiasi H, Slanina SM, et al. High-dose ocular infection with a herpes simplex virus type 1 ICP34.5 deletion mutant produces no corneal disease or neurovirulence yet results in wild-type levels of spontaneous reactivation. *Journal of virology*. 1996;70:2883-2893.

Prince HN & Prince DL. Principles of viral control and transmission. In Block SS (Ed.), *Disinfection, sterilization and preservation* (5th ed. pp. 543-571). Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 2001.

Rampling R, Cruickshank G, Papanastassiou V, et al. Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene therapy*. 2000;7:859-866.

Rasko JEJ and Gough NM. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *The Cytokine Handbook*. Thompson AW. London, Academic Press. 1994:343-369.

Rock DL, Fraser NW. Latent herpes simplex virus type 1 DNA contains two copies of the virion DNA joint region. *Journal of virology*. 1985;55:849-852.

Rowe JM, Andersen JW, Mazza JJ, et al. A randomized placebo-controlled phase III study of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adult patients (> 55 to 70 years of age) with acute myelogenous leukemia: a study of the Eastern Cooperative Oncology Group (E1490). *Blood*. 1995;86:457-462.

Rozenberg F, Deback C, Agut H. Herpes simplex encephalitis: from virus to therapy. *Infectious disorders drug targets*. 2011;11(3):235-50.

Rudnick and Hoekzema. Neonatal Herpes Simplex Virus Infections. *Am Fam Physician*. 2002;15,65(6):1138-1142.

Russell J, Stow ND, Stow EC, et al. Herpes Simplex Virus Genes Involved in Latency in vitro. *J. Gen. Virol*. 1987;68:3009-3018.

Sato T, Eschelmann DJ, Gonsalves CF, et al. Immunoembolization of malignant liver tumors, including uveal melanoma, using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26:5436-5442.

Schaffer PA, Carter VC, and Timbury MC. Collaborative complementation study of temperature-sensitive mutants of herpes simplex virus types 1 and 2. *J. Virol*. 1978;27:490-504.

Schmittel A, Keilholz U, Max R, et al. Induction of tyrosinase-reactive T cells by treatment with dacarbazine, cisplatin, interferon-alpha +/- interleukin-2 in patients with metastatic melanoma. *Int J Cancer*. 1999;80:39-43.

Senzer NN et al. Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27:5763.

Smith J, Thomas SK, Coffin RS, et al. Examination of the potential interactions between herpes simplex virus vectors and replication-competent virus in vitro and in vivo. *Gene Therapy and Regulation*. 2003;2:29-47.

Soiffer R, Lynch T, Mihm M, et al. Vaccination with irradiated autologous melanoma cells engineered to secrete human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor generates

potent antitumor immunity in patients with metastatic melanoma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003;95:13141-13146.

Spitler LE, Weber RW, Allen RE, et al. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, sargramostim) administered for 3 years as adjuvant therapy of stages II(T4), III, and IV melanoma. J Immunother. 2009;32:632-637.

Stewart et al. Herpesvirus infections in persons infected with human immunodeficiency virus. Clin Infect. Dis. 1995;21(Suppl 1):S114-S120.

Sundaresan P, Hunter WD, Martuza RL, et al. Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207: safety evaluation in mice. Journal of virology. 2000;74:3832-3841.

Thomas DL, Fraser NW. HSV-1 therapy of primary tumors reduces the number of metastases in an immune-competent model of metastatic breast cancer. Mol Ther. 2003;8:543-551.

Thompson C, Whitley R. Neonatal herpes simplex virus infections: where are we now? Adv Exp Med Biol. 2011;697:221-30.

Umene K. Transition from a heterozygous to a homozygous state of a pair of loci in the inverted repeat sequences of the L component of the herpes simplex virus type 1 genome. Journal of virology. 1987;61:1187-1192.

Usatine PA and Tinitigan R. Nongenital Herpes Simplex Virus. *American Family Physician*. 2010. 82(9).

Valyi-Nagy T, Fareed MU, O'Keefe JS, et al. The herpes simplex virus type 1 strain 17+ gamma 34.5 deletion mutant 1716 is avirulent in SCID mice. The Journal of general virology. 1994;75(Pt 8):2059-2063.

Varghese S et al. Preclinical safety evaluation of G207, a replication-competent herpes simplex virus type 1, inoculated intraprostatically in mice and nonhuman primates. Human gene therapy. 2001;12:999.

Varmuza, SL & Smiley JR. Unstable heterozygosity in a diploid region of herpes simplex virus DNA. J. Virol. 1984;49:356-362.

Wadsworth, S, Jacob RJ and Roizman B. Anatomy of herpes simplex virus DNA. II. Size, composition, and arrangement of inverted terminal repetitions. J Virol. 1975;15:1487-1497.

Wadsworth S, Hayward GS and Roizman B. Anatomy of herpes simplex virus DNA. V. Terminally repetitive sequences. J Virol. 1976;17:503-512.

Wang L, Qi X, Sun Y, et al. Adenovirus-mediated combined P16 gene and GM-CSF gene therapy for the treatment of established tumor and induction of antitumor immunity. Cancer Gene Ther. 2002;9:819-824.

Webre JM, et al. Rabbit and mouse models of HSV-1 latency, reactivation, and recurrent eye diseases. J Biomed Biotechnol. 2012; 2012:612316.

Weinstein DL, Walker DG, Akiyama H and McGeer PL. Herpes simplex virus type I infection of the SNC induces major histocompatibility complex antigen expression on rat microglia. *J Neurosci Res.* 1990;26(1):55-65.

Weissenbock H, Hainfellner JA, Berger J, Kasper I and Budka H. Naturally occurring herpes simplex encephalitis in a domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Pathol.* 1997; 34(1):44-47.

Whitley RJ, Kern ER, Chatterjee S, et al. Replication, establishment of latency, and induced reactivation of herpes simplex virus gamma 1 34.5 deletion mutants in rodent models. *The Journal of clinical investigation.* 1993;91:2837-2843.

Whitley R J. Herpes simplex encephalitis: adolescents and adults. *Antiviral Research.* 2006;71(2-3):141-148.

Wohlsein P, et al. Spontaneous human herpes virus type 1 infection in a chinchilla (*Chinchilla lanigera f. dom.*). *Ata Neuropathol.* 2002;104(6):674-678.

Wood A & Payne D. The action of three antiseptics/disinfectants against enveloped and non-enveloped viruses. *Journal of Hospital Infection.* 1998;38(4):283-295.