



## **EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DEL VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR MODIFICADO GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/25/33)**

### **Título del estudio**

Ensayo de fase I, abierto, de escalado de dosis de BI 3923948 en monoterapia y en combinación con un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-PD-1 en pacientes con tumores sólidos avanzados, irresecables y/o metastásicos, del promotor Boehringer Ingelheim International GmbH.

### **Características del ensayo**

El medicamento en investigación se administrará mediante inyección intratumoral.

El ensayo se realizará en el Hospital Clínic i Provincial de Barcelona y el Hospital Clínico Universitario de Valencia (INCLIVA).

### **Organismo modificado genéticamente**

BI 3923948 es un virus de la estomatitis vesicular (VSV) recombinante y quimérico, portador de la glucoproteína de envoltura (GP) de la cepa WE-HPI no neurotrópica y visceral del virus de la coriomeningitis linfocítica (Lymphocytic Choriomeningitis Virus, LCMV), un arnavirus en una versión optimizada por codones, en lugar de la glucoproteína natural (G), que expresa dos proteínas de carga inmunoestimuladoras humanas. La información genética de estas proteínas se insertó en el genoma para reforzar el concepto de activación de las células inmunitarias residentes en el cáncer.

### **Organismo receptor**

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

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



(receptor de lipoproteínas de baja densidad), que sirve como principal puerto de entrada celular del VSV.

El VSV es un virus transmitido por artrópodos y la transmisión entre huéspedes naturales se produce a través de la picadura de flebótomos. La transmisión entre un huésped infectado y otro no infectado también puede ocurrir a través del contacto directo con una lesión activa que contiene una alta concentración de virus infeccioso ( $\sim 10^6$  TCID<sub>50</sub>), pero es poco probable que esto resulte en una difusión generalizada.

En cuanto a la persistencia del virus en la naturaleza, se ha demostrado que se producen anticuerpos neutralizantes del virus no solo en el ganado doméstico sino también en muchas especies de animales salvajes. Sin embargo, aún no está claro cuál es el reservorio huésped natural definitivo, y tampoco se han determinado los ciclos de transmisión entre los vectores y la vida silvestre.

El VSV existe exclusivamente en el hemisferio occidental. Se mantiene en nichos ecológicos estables en América Central y del Sur y México y emerge de áreas tropicales para causar epidemias esporádicas en climas más fríos durante los meses de verano.

El VSV no se considera un patógeno humano dado que rara vez induce enfermedades en humanos, con sólo síntomas mínimos, y no representa una amenaza para comunidad en general, aunque se ha informado de que los humanos que viven en áreas enzoóticas tienen una alta tasa de seroprevalencia y de que el contacto íntimo con animales infectados puede conducir a la infección de humanos con síntomas similares a los de la gripe. Se cree que la transmisión a humanos se produce a través del contacto directo con lesiones activas o saliva que contiene VSV infeccioso. No se ha notificado que los seres humanos transmitan la infección a otros seres humanos o a los animales, aunque es probable que se produzca la transmisión a través de equipos, manos, guantes y ropa contaminados. Los veterinarios, los técnicos en sanidad animal, los cuidadores de ganado, el personal de laboratorio y otras personas que trabajan en contacto con animales infectados o con virus vivos corren un mayor riesgo. Sin embargo, la mayoría de las personas seropositivas no han tenido la enfermedad clínica o han tenido síntomas de la enfermedad mucho menos graves (por lo general, una enfermedad leve similar a la gripe). Hasta la fecha, no se ha hecho ninguna referencia a la presencia de VSV en Europa.

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

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



responden a los IFN de tipo I que impiden la replicación del virus mediante la inducción de un estado antiviral en la célula infectada y en las células vecinas.

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

#### Organismo donante

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

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

Se sabe que la glicoproteína WE-HPI del LCMV se une a los receptores de superficie, incluidos, entre otros, el  $\alpha$ -distinglicano ( $\alpha$ DG), que es un receptor de superficie celular que se expresa de forma ubicua. Las propiedades de unión de la glicoproteína WE-HPI del LCMV y la disponibilidad de múltiples receptores alternativos hacen que exista una amplia gama de células y organismos huésped susceptibles.

#### Organismo modificado genéticamente

BI 3923948 es una variante de BI 1831169 que expresa dos proteínas de carga inmunoestimuladoras humanas.

BI 1831169 es el OMG del ensayo clínico B/ES/22/12 autorizado el 19/10/2022.

Se anticipa que el amplio tropismo del VSV se conserva con la excepción de las células sanguíneas y las neuronas.

El tropismo del VSV está mediado por la glicoproteína del VSV, que permite la infección de una amplia variedad de tipos de células eucariotas de una amplia gama de especies huésped. Este pantropismo se debe a la expresión generalizada del receptor de LDL, que sirve como principal puerto de entrada celular para el virus. Además, la glicoproteína G del VSV permite que el virus entre en las neuronas, donde la falta de respuesta al interferón conduce a una replicación viral descontrolada y a neurotoxicidad. La glicoproteína WE-HPI del LCMV se eligió para reemplazar la proteína G del VSV dado que se había descrito que no permitía la entrada a las neuronas. De hecho, se ha demostrado experimentalmente que el VSV que contiene la glicoproteína del LCMV, en lugar de la G del VSV, conduce a la anulación de la neurotoxicidad. Además, los estudios no clínicos en ratones y cerdos han demostrado que el intercambio de glicoproteínas eliminaba el riesgo de patogenicidad.



Con la carga inmunomoduladora se pretende mejorar de la funcionalidad de los linfocitos T e inducir una actividad antitumoral. Ambas cargas ayudan a BI 3923948 a hacer que el microentorno tumoral sea más inmunogénico, lo que favorece la reducción del tumor mediada por el sistema inmunitario.

BI 3923948 se ha diseñado para ser competente en la replicación, y su objetivo es infectar, replicarse y destruir las células cancerosas deficientes en interferón, acompañando la expresión de sus cargas terapéuticas. No se ha diseñado para expresar de forma permanente productos génicos exógenos ni para alterar de forma permanente las células infectadas.

La expresión de sus cargas terapéuticas cesa si la célula muere por la replicación del virus en la célula infectada o si la célula infectada por el virus es eliminada por la respuesta inmunitaria del hospedador. Por lo tanto, las cargas terapéuticas codificadas por el genoma del virus solo se expresan de forma transitoria en las células infectadas hasta que estas se destruyen. La respuesta antiviral suprimirá la infección por VSV en las células normales sanas. Cabe esperar una reacción al tratamiento en forma de reacción fisiológica a la aplicación del virus, como fiebre leve y linfopenia temporal. Debido a las respuestas antivirales, la actividad de BI 3923948 se limita a unos pocos días en los pacientes tratados. No se espera un curso crónico ni latente del virus.

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

#### **-Estabilidad**

Como parte de la selección de clones del virus semilla maestro (VSM), el pre-VSM se sometió a pruebas para determinar su estabilidad genética mediante pases del virus utilizando la línea celular de producción. El pre-VSM se sometió a dos pases, correspondientes a las etapas relevantes para la fabricación del VSM y la sustancia farmacéutica (SF). El pase 1 corresponde al VSM, mientras que el pase 2 corresponde a la SF. Al comparar los datos de secuenciación de genoma viral, carga infecciosa, copias del genoma y expresión de carga, no se observaron diferencias significativas entre el VSM (pase 1) y la SF (pase 2).

No se detectaron variantes preocupantes durante la atenuación según el proceso de fabricación de BI 3923948. Las variantes del número de pases relevantes solo aparecen en frecuencias alélicas bajas cercanas al umbral de detección de variantes.

#### **-Patogenicidad**

BI 3923948 es una variante recombinante del VSV con capacidad de replicación que utiliza la glucoproteína WE-HPI del LCMV en lugar de la glucoproteína del VSV, como en BI 1831169. Además, BI 3923948 codifica para una carga inmunoestimuladora que se expresa solo de forma transitoria en las células infectadas y se secreta desde ellas, sin incorporarse a ninguna progenie viral producida a partir de las células infectadas.

Se espera que el pantropismo del VSV se mantenga en el BI 1831169, dado que la GP del LCMV también presenta un amplio tropismo celular. No obstante, a diferencia del VSV, BI 1831169 es incapaz de infectar a las neuronas ni a las células sanguíneas. Los estudios que se están llevando a cabo para investigar la especificidad de las células diana con BI 1831169 también se consideran relevantes para BI 3923948.

La posible vía de transmisión de BI 1831169 sigue sin estar clara, pero teniendo en cuenta las vías de transmisión de ambos virus parentales, podría producirse por contacto directo o por contacto con secreciones o fluidos corporales.



Las propiedades patógenas de BI 1831169 se deben principalmente a la estructura del VSV, con la excepción del neurotropismo del VSV, que está relacionado con la proteína G, la cual permite que el virus entre en las neuronas. Se ha demostrado que sustituir la proteína G por la GP del LCMV elimina por completo la neurotoxicidad. La mayoría de las infecciones humanas por los serotipos Indiana y Nueva Jersey del VSV parecen ser subclínicas.

En los pacientes que presentan manifestaciones clínicas, el síntoma inicial es fiebre alta, que a menudo es bifásica. Los síntomas subsiguientes son similares a los de la gripe, como malestar general intenso, dolores de cabeza, mialgia, artralgia, dolor retroesternal, dolor ocular y náuseas. Es posible que se formen vesículas en la mucosa oral, los labios y la nariz, pero estos son síntomas raros de la estomatitis vesicular. Los datos parecen indicar que la respuesta inmunitaria adaptativa desempeña un papel en la protección contra la encefalitis mortal causada por el VSV en ratones. La ausencia de efectos secundarios neuronales en pacientes tratados en ensayos clínicos con virus oncolíticos basados en el VSV (VSV-IFN $\beta$  y virus Maraba) o vacunas (VSV-EBOV) y el hecho de que en ratones el perfil de seguridad de BI 1831169 sea superior permite concluir que el riesgo es insignificante incluso en grupos vulnerables (como los pacientes con cáncer).

#### **-Supervivencia y recombinación.**

Las condiciones de inactivación de BI 1831169 son las mismas que las de su progenitor VSV; la recombinación con GP del LCMV cambia el receptor utilizado para la entrada en las células y no tiene ningún impacto en la resistencia del virus a las acciones físicas y químicas, por lo que se aplican las mismas condiciones de inactivación.

Los datos *in vitro* obtenidos con BI 1831169 mostraron que la pérdida de infectividad se produce tras el secado; en el plazo de una hora tras el secado, los títulos disminuyeron de forma constante en más de 100 veces y el virus infeccioso dejó de ser detectable tras 24 horas. En cuanto al virus mezclado con heces, los resultados muestran que la persistencia de BI 1831169 es baja. Por lo tanto, el riesgo de transmisión de BI 1831169 debido a contaminación no deseada es bajo.

La recombinación solo se observa en raras ocasiones en condiciones experimentales con virus de ARN de cadena negativa. BI 3923948 no produce un intermediario de ADN durante la replicación y no se replica en el núcleo de la célula hospedadora ni necesita proteínas nucleares de la célula hospedadora para su ciclo de replicación.

Por lo general, la biología del BI 3923948 permite la complementación por proteínas virales de superficie alternativas. Sin embargo, el virus expresa grandes cantidades de su propia glucoproteína y desactiva la capacidad de producción de proteínas de las células infectadas, incluida la expresión potencial de elementos virales del genoma celular. Para mitigar aún más este riesgo, en el caso de los virus oncolíticos basados en BI 1831169 se ha probado en neuronas humanas que no permiten la entrada a través del receptor de GP y se ha demostrado que no infecta estas células, lo que demuestra la dependencia de la proteína GP. Por lo tanto, concluyen que el riesgo de complementación es insignificante.

#### **-Excreción /Shedding**

La excreción de BI 3923948 se extrapoló a partir de estudios realizados con BI 1831169. Tras la administración de una dosis única de BI 1831169 en ratones, perros o conejos con tumores, se demostró la ausencia de excreción de BI 1831169 infeccioso en los hisopos nasobucuales.



### Excreción de BI 1831169 en ratones con tumores

Se evaluó la excreción del virus en ratones portadores de tumores a los que se administró una dosis única de BI 1831169. Se analizó el ARN de BI 1831169 en muestras nasobucales y tumorales y en muestras fecales y urinarias recogidas.

Los hisopos del tumor mostraron la mayor concentración viral. La excreción del tumor aumentó entre las 2 y las 24 horas, antes de disminuir a las 72 horas. La excreción nasobucal descendió entre las 2 y 24 horas y se redujo aún más a las 72 horas.

A las 24 horas, la excreción viral era mayor en las muestras de orina que en las muestras fecales. Todas las muestras de orina y fecal analizadas demostraron resultados negativos a las 72 horas excepto en una muestra de orina inferior al límite de detección.

La señal TCID50 fue positiva en muestras detectadas en el lugar de la inyección 2, 24 y 72 horas después de la administración, y en ninguno de los ratones 61 días después de la administración. La señal TCID50 fue inferior al límite inferior de cuantificación (LIC) en los hisopos nasobucales, la orina y las muestras fecales en todos los puntos temporales.

### Biodistribución y excreción en conejos

Se analizaron la biodistribución y la excreción de BI 1831169 en conejos sanos a los que se administró una sola dosis por vía intravenosa. No se detectó virus vivo replicativo en las muestras de excreción (hisopo nasal, saliva, heces) en ningún momento, ni en los órganos (bazo, corazón, riñón, cerebro, pulmón, hígado y gónadas), 7 días después del tratamiento.

### Excreción en perros

Se investigó la excreción de BI 1831169 después de una dosis repetida administrada por vía intravenosa. No se detectó material replicativo en las muestras de excreción (heces, orina, hisopos nasales/orales/del lugar de inyección) ni en la sangre.

### Patogenicidad y excreción en el ganado

Se evaluaron la patogenicidad y la excreción de BI 1831169 en cerdos sanos. Se inoculó a los cerdos por vía intradérmica en el ápice del hocico con VSV o BI 1831169. La aplicación del BI 1831169 fue apatógena en cerdos (es decir, no se observaron lesiones vesiculares en el hocico de los animales infectados con BI 1831169) y no se detectó excreción, salvo una cantidad mínima de virus en el hisopo nasal, el lugar de administración.

Como se ha indicado, BI 3923948 demostró una replicación *in vitro* similar a la de BI 1831169, lo que indica que la carga no afecta a la replicación. Además, BI 3923948 no difiere en términos de patogenicidad ni biodistribución en comparación con otras variantes de BI 1831169 (con o sin carga). En conjunto, estos datos respaldan la conclusión de que BI 3923948 no presenta un riesgo mayor en comparación con BI 1831169.

Sin embargo, para garantizar la seguridad y el cumplimiento de las normas de los ensayos clínicos se informará a los participantes que durante los 10 días siguientes a cada tratamiento con BI 3923948 deben de evitar el contacto cercano con animales de granja (por ejemplo, cerdos, vacas, caballos) y roedores y, si es inevitable el contacto, utilizar una mascarilla quirúrgica (FFP1) cuando se encuentre a una distancia que permita el contacto físico.





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

Se deberá utilizar una cabina de bioseguridad de clase II con técnicas estériles para la preparación del medicamento en investigación. Las jeringuillas preparadas deben transportarse en un recipiente de plástico impermeable desechable con material absorbente en el fondo.

La administración intratumoral debe efectuarla un médico o personal de radiología que utilice bata protectora, guantes, mascarilla (se recomiendan mascarillas FFP2/N95) y protección ocular de un solo uso si existe un riesgo conocido o teórico de exposición a salpicaduras.

Cualquier derrame o material contaminado se deberá manipular según los procedimientos estándar para material infeccioso/contaminado.

BI 3923948 es sensible a todos los desinfectantes para virus con envoltura y se inactiva por exposición a ácido cresílico al 1 %, fenólicos, fenol clorado, fenol al 2,5 %, HCl al 0,4 %, ortofenilfenato de sodio al 2 % e hipoclorito de sodio al 1 %. Inactivación física: El BI 3923948 se inactiva por calentamiento (60°C, 30 min.). BI 3923948 sobrevive temporalmente en superficies contaminadas.

Los residuos se gestionarán como residuos con riesgo biológico.

Se ingresará al paciente en una habitación privada, donde permanecerá tras la administración de BI 3923948 y hasta el alta; los movimientos del paciente dentro del hospital se limitarán al mínimo necesario (por ejemplo, el paciente podrá desplazarse desde el lugar de administración a otra habitación privada para pasar la noche). Cuando se encuentre fuera de la habitación, el paciente deberá llevar una mascarilla quirúrgica y asegurarse de que todas las zonas inyectadas y biopsiadas estén cubiertas con apósitos herméticos e impermeables. Tras el alta del paciente, las superficies potencialmente contaminadas (por ejemplo, el equipamiento del cuarto de baño: grifo, inodoro, lavabo, etc.), el mobiliario de la habitación (mesilla de noche, mesa, silla, suelo, pasamanos, etc.) deben desinfectarse siguiendo los procedimientos de limpieza locales pertinentes.

Durante el estudio se obtendrán muestras bucales, nasales y del lugar del tumor en las visitas indicadas. Las muestras se analizarán mediante un análisis basado en RCP-RTc validado y, si es necesario, un ensayo de infectividad celular cualificado. Se recogerán también muestras de biopsia y de sangre lo largo del estudio en las visitas indicadas.

En el entorno del hospital, las muestras de cualquier paciente se manejan siempre como potencialmente infecciosas.

Las muestras deben estar contenidas en recipientes que eviten posibles derrames y transportarse a los laboratorios. Si las muestras se almacenan *in situ*, se colocarán en contenedores etiquetados y que eviten cualquier derrame accidental. Las muestras deben manipularse de acuerdo con las normas especificadas por los laboratorios de ensayo.

Se informará a los pacientes de las medidas que deberá seguir para evitar la diseminación del OMG.

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



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

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

Madrid a 12 de noviembre de 2025