

PARECER TÉCNICO SETORIAIS DE SAÚDE HUMANA/ANIMAL

Processo SEI nº: 01200.705102/2016-05

Requerente: Merial Saúde Animal Ltda.

CQB: 048/98

Assunto: Solicitação de Liberação Comercial de OGM

Extrato Prévio: 5331/16 publicado em 29/09/16

Reunião: 199ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 08 de fevereiro de 2017 (aprovado apenas na setorial humana/animal)

Decisão: DEFERIDO

A CTNBio, após apreciação do processo de pedido de Parecer Técnico referente à biossegurança de produto para liberação comercial, concluiu pelo deferimento, nos termos deste Parecer Técnico.

No âmbito das competências dispostas na Lei 11.105/05 e seu decreto 5.591/05, a Comissão concluiu que o presente pedido atende às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

PARECER TÉCNICO

1) Fundamentação técnica

O responsável legal da instituição vem requerer à CTNBio parecer técnico referente à biossegurança para Liberação Comercial da vacina viva recombinante contra a Influenza dos equinos em território nacional. A instituição afirma que dispõe de infraestrutura adequada e pessoal técnico competente para desenvolver com segurança as atividades propostas. Foi encaminhada à CTNBio a documentação referente a essa solicitação.

Apresentação do produto

ProteqFlu é uma vacina destinada a proteger equinos domésticos contra a influenza equina (H3N8). É uma vacina líquida (suspensão para injeção) contendo 2 vírus de canarypox recombinantes que expressam o gene HA, que codifica a hemaglutinina do vírus da gripe equina. A vacina é indicada para imunização ativa de equinos contra influenza, para reduzir os sinais clínicos e a excreção viral após a infecção. A via de administração é a intramuscular em

condições assépticas e sempre sob prescrição e supervisão de um médico veterinário. A vacina será comercializada em frascos de vidro hermeticamente lacrados e cada dose de 1ml conterá Poxvírus recombinantes da bouba de canário expressando o gene codificador da proteína HA dos vírus da influenza equina A/equi-2/Ohio/03 (H3NS) - cepa vCP2242 e A/eq/Richmond/1/07 (H3N8) - cepa vCP3011 e carbômero como adjuvante. A hemaglutinina é a única proteína exógena expressa pelos OGMs. A ProteqFlu deve ser aplicada pela via intramuscular em equinos com 4 meses de idade ou mais em condições assépticas e sob a supervisão de um Médico Veterinário.

I. Descrição do OGM

Classificação do OGM a ser liberado: Classe de Risco 1.

1. Identificação do OGM

ProteqFlu - vacina contra a influenza equina {H3N8}.

Vírus recombinante da bouba dos canários, cepas vCP3011 e vCP2242

Família: Poxviridae

Subfamília: Chordopoxviridae

Gênero: Avipoxvirus

Espécie: Canarypox virus

Aplicação do produto: importação, armazenamento, transporte e comercialização de vacina destinada a proteger equinos domésticos contra a influenza equina.

Característica da proteína expressa

A hemaglutinina é uma glicoproteína antigênica encontrada na superfície dos vírus influenza. Duas glicoproteínas da membrana do vírus influenza, hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), reconhecem e ligam ácido siálico. A hemaglutinina (HA) liga-se ao ácido siálico monossacárido que está presente na superfície das células hospedeiras alvo. A HA é uma glicoproteína trimérica composta por subunidades idênticas, cada uma das quais contém dois polipeptídeos que resultam da clivagem proteolítica de um único precursor. A clivagem do precursor é essencial para a ativação do potencial de fusão da membrana e, portanto, da

infectividade. A iniciação da infecção viral envolve várias hemaglutininas que se ligam aos ácidos siálicos nas cadeias laterais de carboidrato de glicoproteínas de superfície celular e glicolípidos. Respostas imunes específicas à proteína HA são reconhecidas mediadoras de proteção contra a infecção por influenza em várias espécies animais.

Caracterização do OGM

Os vírus canarypox recombinantes, cepas vCP2242 e vCP3011, presentes na vacina ProteqFlu, foram obtidos por transformação gênica, sendo o gene HA, que codifica a hemaglutinina da Influenza Equina inserido no locus de inserção C5 do referido vírus pelo processo de recombinação homóloga. Os documentos apresentados pela requerente contem descrição detalhada dos métodos de construção e purificação dos OGMs.

De forma resumida, o poxvírus da bouba de canário receptor (clone ALVAC) recebeu o gene que codifica a proteína HA do vírus da influenza equina (cepa A2/Ohio/03), gerando a cepa recombinante vCP2242 e o gene que codifica a proteína HA do vírus da influenza equina (cepa A/eq/Richmond/1/07) gerando a cepa recombinante vCP3011.

Para a construção dos organismos recombinantes (tanto a cepa vCP3011 quanto a vCP2242) foram utilizados vetores plasmidiais doadores usados para a inserção das sequências de interesse no organismo receptor. O plasmídeo pC5 H6p Eqf foi utilizado para a construção da cepa recombinante vCP3011 e o plasmídeo pJY1571.1 para a construção da cepa recombinante vCP2242. Foram formados cassetes de expressão contendo o gene codificador da proteína HA da influenza equina, sob controle da sequência promotora H6 e ladeados por braços flanqueadores C5 do vírus da bouba de canário (Plasmídeos pC5 H6p Eqf e pJY1571.1 = braço flanqueador C5R + promotor H6 + gene HA + braço flanqueador CSL). A identificação do plasmídeo utilizado foi analisada por mapeamento com enzimas de restrição e sequenciamento. A homogeneidade da população foi confirmada por um ensaio imunológico, que detecta a expressão do gene inserido. Os resultados mostraram que o material é homogêneo para a expressão do produto do gene HA e o mapeamento por endonuclease de restrição e as análises de Southern blotting do DNA viral indicaram a inserção apropriada da sequência codificadora de HA. A sequência correta do gene inserido em vCP2242 e vCP3011 foi reconfirmada por

sequenciamento. Tanto para vCP2242 como para vCP3011, o fragmento inserido corresponde ao cassete de expressão constituído pelo gene HA colocado sob o controlo do promotor.

O único produto da expressão do gene inserido nos organismos receptores é a proteína exógena HA.

A estabilidade dos OGMs foi avaliada pelo mapeamento por endonuclease de restrição e análise de sequência das cepas-mãe vCP3011 e vCP2242 após nove passagens, mostrando alta estabilidade genética. A estabilidade fenotípica foi analisada por meio de imunoensaio em placas usando-se anticorpos monoclonais específicos para a proteína inserida. Os resultados mostraram, que após nove (vCP3011) e dez passagens (vCP2242), 100% dos OGMs expressaram especificamente o gene HA das respectivas cepas de influenza equina. Deste modo, o vírus recombinante demonstrou a preservação da sequência codificante inserida, com alta estabilidade genética e fenotípica ao longo das passagens in vitro.

Saúde humana e animal

Foram realizados estudos de segurança nas espécies-alvo, em testes laboratoriais e em ensaios de campo, de várias idades (de 3,5 meses a 13 anos em laboratório, de 1 mês a 40 anos no campo) e do estado fisiológico (potros, adultos do sexo masculino, éguas prenhes). Em particular, a segurança da vacina foi testada em éguas prenhes em várias fases do período gestacional. Foram utilizadas três formulações da vacina correspondentes a diferentes níveis de purificação e diferentes estabilizantes nos ensaios laboratoriais e de campo. A equivalência destas formulações foi estabelecida. Foram utilizados vários lotes para componentes de gripe equina, muitos dos quais com títulos muito elevados. Os resultados dos estudos de segurança realizados nas espécies-alvo suportam o perfil de segurança do novo produto formulado.

Embora os vectores ALVAC sejam conhecidos como não replicativos em mamíferos, foram também realizados estudos para avaliar a capacidade dos vírus vivos de se espalhar, disseminar, replicar no local de inoculação, multiplicar in vitro e recombinar com outro vírus. Em particular, estudos de segurança foram conduzidos em espécies não-alvo, envolvendo canários, patos, galinhas, porcos, ratos e cobaias e os resultados corroboram o perfil de segurança do produto.

A vacina é armazenada em frascos de vidro hermeticamente lacrados. As injeções nos equinos são feitas por médico veterinário ou sob sua orientação. A pele é cuidadosamente desinfetada. O material é descartado após o uso. Pelo fato de os vírus serem defectivos em replicação em mamíferos, a via de administração intramuscular oferece uma barreira natural de contenção. Dessa forma, as chances de organismos não-alvo serem infectados acidentalmente são altamente improváveis.

Tanto o organismo parental (clone ALVAC), quanto os OGM derivados não são replicativos em humanos. Estudo realizado em linhagem de células humanas demonstrou a ausência de capacidade reprodutiva. Várias vacinas baseadas no poxvírus recombinante de canário vêm sendo usada em humanos como vetor de vários genes distintos, sendo reconhecidas como seguras.

Meio ambiente

As características dos organismos doadores parental, do vetor e dos organismos modificados vCP2242 e vCP3011 foram devidamente apresentados e a estabilidade genética dos vírus recombinantes foram demonstrada. Esses OGMs não estão envolvidos em processos ambientais (produção primária, renovação de nutrientes, decomposição de matéria orgânica ou respiração), possuindo assim impacto desprezível na qualidade da água, do ar e do solo.

Os OGMs não sobrevivem, não se multiplicam e nem se disseminam em água, ar ou solo, uma vez que sua resistência quando exposto ao meio-ambiente é extremamente reduzida.

Após a inoculação, os vírus não se multiplicam no cavalo, mas expressam as proteínas protetoras. Considerando que a vacina é administrada por injeções intramusculares individuais, que os canarypoxvirus recombinantes são construções seguras, não se replicam e que não se disseminam de animais para animais, não há potencial risco ambiental que possa ser identificado pelo uso vacina ProteqFlu.

Plano de monitoramento pós-liberação comercial

A requerente apresenta plano de monitoramento pós-liberação comercial objetivando obter informações que possam indicar efeitos adversos decorrentes da liberação comercial do

OGM sobre o meio ambiente ou sobre saúde humana ou animal, que atende a Resolução Normativa 09 da CTNBio de 02 de dezembro de 2011.

Conclusão

A análise dos dados experimentais apresentados na presente solicitação mostram que os OGMs em questão são inócuos para as demais espécies de animais, ao homem e ao meio ambiente.

PARECER: Pela análise das informações apresentadas e dados disponíveis em literatura, concluímos que essa Proposta atende aos requisitos legais preconizados pelas Resoluções Normativas da CTNBio. Atendidas as recomendações e as medidas de biossegurança contidas no processo, essa atividade não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou prejudicial à saúde humana.

Referências Bibliográficas

- Gamblin SJ, Skehel JJ. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem.* 2010; 285(37):28403-9.
- 10.1074/jbc.R110.129809. Orlich M, Gottwald H, Rott R. Nonhomologous recombination between the hemagglutinin gene and the nucleoprotein gene of an influenza virus. *Virology.* 1994; 204(1):462-5.
- Tartaglia J, Cox WI, Taylor J, Perkus M, Riviere M, Meignier B, Paoletti E. Highly attenuated poxvirus vectors. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1992; 8(8):1445-7.
- Khatchikian D, Orlich M, Rott R. Increased viral pathogenicity after insertion of a 28S ribosomal RNA sequence into the haemagglutinin gene of an influenza virus. *Nature.* 1989; 340(6229):156-7.
- Lai MM- IZNA recombination in animal and 1)larit viruses. *Microbiol Rev.* 1992; 56(1):61-70.
- Copper PD, Steiner-Pryor A, Scotti PD, DeLong D. On the nature of poliovirus genetic recombinants. *J Gen Virol.* 1974; 23(1):41-9.

Dra. Maria Aparecida Nagai e Dr. Carlos Henrique Coelho de Campos

Membros da CTNBio

Enviado eletronicamente para Rubens José em 10/02/17