



MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E COMUNICAÇÕES

PARECER TÉCNICO CTNBio Nº 5407/2017

Processo nº: 01200.002496/2015-57

Requerente: Merial Saúde Animal Ltda.

CQB: 048/98

Próton: 34719/15

Assunto: Solicitação de parecer para liberação comercial OGM

Extrato Prévio: 4681/15, publicado em 07/06/15

Reunião: 200ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 09 de março de 2017

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.

Adicionalmente, a CTNBio acata a solicitação de isenção de apresentação de Plano de Monitoramento, apresentada pela requerente.

PARECER TÉCNICO

EMENTA: O responsável legal da instituição requereu à CTNBio parecer técnico referente à biossegurança da vacina denominada PUREVAX RAIVA, para felinos, para liberação comercial 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.

1. Informações Gerais:

A vacina PUREVAX RAIVA, destinada à imunização de felinos contra raiva, consiste no vírus

Canarypox recombinante, que expressa a glicoproteína G do vírus da raiva, dando origem ao vírus recombinante vCP65. Essa proteína é a unidade básica de projeção da superfície do vírus, e responsável pela indução da produção de anticorpos neutralizantes. O vírus de suporte (*Canarypox*) é originalmente utilizado para a produção de vacinas para canários contra varíola, e é mantido há mais de 200 passagens em células embrionárias de galinha em cultura. O gene recombinante da glicoproteína rábica foi obtido de uma amostra ERA do vírus rábico, empregada em imunização de mamíferos há mais de 50 anos.

O vírus recombinante, *Canarypox* vCP65, utilizado na vacina PUREVAX RAIVA obteve registro de uso comercial em 1998 nos Estados Unidos da América, em 2000 no Canadá e em 2004 na Comunidade Européia, com autorização de uso ratificada em 2011.

O OGM foi obtido através da inserção de cassete codificador para a glicoproteína rábica no genoma de *Canarypox*, utilizando técnicas tradicionais de engenharia genética. A glicoproteína usada na construção do vírus recombinante vCP65, que é a unidade básica de projeção da superfície do vírus, é responsável pela indução de produção de anticorpos neutralizantes. A replicação limitada do vírus recombinante, que ocorre exclusivamente no citoplasma das células infestadas, torna praticamente nula a possibilidade de ocorrência de alterações genéticas no material genético das mesmas.

A vacina obtida utilizando o OGM descrito acima já está liberada para uso comercial nos Estados Unidos desde 1998, no Canadá desde 2000 e na Comunidade Europeia desde 2004, sem quaisquer restrições de utilização. Os experimentos para avaliação de risco incluíram testes em células.

2. Descrição do OGM:

A construção de vacina está fundamentada na recombinação do vírus *Canarypox*, de forma a expressar a Proteína G do vírus da raiva (vCP65). O vírus de suporte (*Canarypox*) possui mais de 200 passagens em cultivo de células embrionárias de galinha e destina-se originalmente a vacinação de canários contra a boubá (varíola ou pox) dos canários.

O gene da glicoproteína do vírus da raiva usado na construção do vCP65 é derivado da amostra ERA do vírus rábico. O gene rábico codifica a glicoproteína de superfície G que é a unidade básica de projeção e é responsável pela produção de anticorpos neutralizantes do vírus da raiva. A amostra ERA é empregada na imunização em mamíferos há mais de 50 anos em todo o mundo. O vírus recombinante *Canarypox* vCP65 é usado na vacina PUREVAX FELINE RABIES e está registrado nos EUA desde 1998 e no Canadá desde 2000.

A classificação taxonômica do vírus receptor usado na geração do OGM é a seguinte:

Família: Poxviridae

Subfamília: Chordopoxviridae

Gênero: Avipoxvirus

Espécie: Vírus *Canarypox*

Clone: ALVAC

O vetor ALVAC pode ser também denominado CPpp (*Canarypox* plaque purified), e como tal é apresentado na literatura e trabalhos científicos de suporte.

A classificação taxonômica do organismo doador usado na geração do OGM é a seguinte:

Família: Rhabdoviridae

Gênero: Lyssavirus

Cepa: ERA (Evelyn Rotnicki-Abelseth)

O gene da glicoproteína G rábica é proveniente da amostra ERA de vírus rábico. A amostra ERA é utilizada para a imunização de mamíferos em todo o mundo por mais de 50 anos, dada sua segurança, eficácia e imunidade proporcionada. A glicoproteína G do vírus rábico é o principal imunógeno responsável pela indução de imunidade protetiva (anticorpos neutralizantes) contra a raiva (de Mattos et al., 2001).

A amostra de Canarypox empregada não foi transmitida nos trabalhos de inoculação intradérmica, subcutânea ou intramuscular em galinhas, pombos ou aves silvestres (Kirmse, P., 1969). O vírus foi adaptado para replicar em culturas de células primárias de galinhas - fibroblastos. Adicionalmente, a amostra ALVAC tem sido usada exaustivamente como vetor para o carreamento de outros genes de expressão com vista a gerar potenciais candidatos a vacinas recombinantes, alguns deles comercializados sem restrições em países desenvolvidos. Esta lista inclui diversas espécies (canários, gatos, galinhas, cães, patos, ferrões, cobaias, cavalos, humanos, entre outros) e diferentes agentes imunógenos (raiva, leucopenia felina, influenza, West Nile Virus, cinomose, parvovírus, sarampo, entre outros).

A amostra vCP65 foi gerada por recombinação homóloga *in vitro* em fibroblastos de embrião de galinha. Esta amostra carrega o gene da glicoproteína da raiva da amostra ERA do vírus rábico sob o controle do vírus promotor derivado da vaccínia H6, inserido no locus denominado C5. A glicoproteína G do vírus rábico é o principal imunógeno responsável pela indução de imunidade protetiva (anticorpos neutralizantes) contra a raiva.

Os métodos usados para a construção, sítios de clonagem, estruturas dos plasmídeos são descritos em detalhes na documentação de suporte encaminhada. O locus C5 é um dos mais frequentes locais de inserção usados na recombinação deste vírus. Cada genoma do vírus Canarypox contém dois locos C5, localizados no terminal invertido repetido.

Várias análises foram realizadas (hibridização de placa *in situ*, imunoprecipitação, imunofluorescência indireta, ensaios de imunoplasmas, análises de enzimas de restrição) para demonstrar a homogeneidade da população recombinante de Canarypox-raiva e a inserção apropriada do cassete de expressão da glicoproteína rábica no locus C5 (Reportes 7-03-RAB, 7-01-RAB, Análise de Restrição de CPpp e o vCP65). Em complementação, a inserção do gene G da raiva da Semente Master de Vírus (MSV) foi sequenciada, confirmando que a sequência correta estava presente na construção.

3. Biossegurança do Produto:

Análise do OGM conforme Resolução Normativa Nº 5, de 12 de março de 2008 Anexo III

A amostra vacinal Canarypox é uma cepa viral atenuada uma vez que foi mantida por mais do que 200 passagens em sistemas de células embrionárias de galinhas.

Em função do Canarypox não se replicar em espécies não-aviárias, sua sobrevivência em mamíferos é curta e a habilidade de formar estruturas remanescentes vivas é considerada nula. A tentativa de adaptação do vírus vacinal a espécie-alvo (gatos) foi infrutífera. Além disso, em estudos realizados por Taylor e colaboradores (1995), os autores não conseguiram induzir a replicação da amostra vacinal recombinante em células não-aviárias de macacos e humanos. Outros trabalhos apresentados e compilados na literatura

apresentada na documentação submetida pela empresa confirmam esta incapacidade de replicação em humanos, cavalos, cães e macacos. Isto indica que a amostra ALVAC possui uma faixa de hospedeiros muito estreita, e os estudos *in vitro* mostraram que seu tropismo pode estar limitado às células apresentadoras de antígenos, o que sugere que a administração de amostras baseadas em construção usando a amostra ALVAC a mamíferos resultará em uma presença temporária do vírus no sítio de administração, sua captura pelas células apresentadoras de antígeno e transferência para os linfonodos regionais.

A replicação de vCP65 foi testada e comparada com a da cepa parental CPpp em cinco tipos celulares diferentes (CEC, CRFK, MDCK, IDH-1, MRC5) por meio do estudo da cinética de título viral ao longo do tempo e depois de 6 passagens. Em cada passagem, três amostras foram coletadas nos dias zero, três e sete para titulação do vírus no CEC. Os resultados indicam que em células de aves, a cada passagem em CEC, os títulos de vírus de ambos vCP65 e CPpp aumentaram entre dias zero e 03, e aumentou ou permaneceu estável entre 03 e 07. Crescimento viral foi semelhante para vCP65 e CPpp. Em células de mamíferos, apenas títulos residuais, devido à diluição do vCP65 inicial e inóculo CPpp foram registrados até a segunda passagem, em raras amostras. Nenhum vírus foi quantificado nas últimas 4 passagens em nenhuma condição experimental. Não houve adaptação de vCP65 para células de mamíferos, mesmo após seis passagens. Estes resultados confirmam, *in vitro*, a restrição de hospedeiro do vCP65 e CPpp em replicar-se apenas em células de aves, mas não nas quatro linhagens celulares de mamífero testadas, isto é, felino (CRF), equino (IDH-1), canino (MDCK) e humano (células MRC 5). A inserção de um gene da glicoproteína da raiva não alterou o tropismo pela cepa parental. Vale ressaltar que a fim de aumentar a probabilidade de infecção das células, uma MOI elevada (razão vírus/célula) foi usada em células de mamífero (0,5 OTCID₅₀ / célula), e uma MOI inferior mas ainda relativamente elevada em células de aves (0,1 OTCID₅₀ / célula).

Em estudos de segurança de uso na espécie alvo, felinos, os animais foram inoculados com amostras com diferentes MOI das partículas virais. As avaliações indicaram que não houve reações adversas locais ou gerais. Quanto à soroconversão, títulos de anticorpos neutralizantes foram produzidos por todos os gatos das passagens 1 e 2, mas não foi observada soroconversão em qualquer gato das passagens subsequentes.

Amostras de biópsia da pele dos animais inoculados mostraram que após a primeira passagem *in vivo*, apenas quatro amostras foram positivas para os 10 gatos. Na segunda passagem, apenas uma das amostras coletadas em 05 foi positiva. Na terceira passagem, duas amostras foram positivas com títulos baixos. No entanto, nenhum vírus poder ser re-isolado das passagens 4 e 5.

Em conjunto, os dados listados acima indicam que o vetor vacinal apresenta baixíssimo risco de propagação na espécie alvo ou em outras espécies de mamíferos. Desta forma, o vetor pode ser considerado seguro para uso para o fim indicado.

4. Segurança Alimentar:

Por se tratar de vacina viral para uso em animais domésticos, cujo agente imunizante, o vírus recombinante *Canarypox* vCP65, 1) se replica exclusivamente no citosol de células infectadas; 2) apresenta capacidade replicativa limitada a células de aves; e 3) apresenta baixa resistência a sobrevivência no ambiente; a probabilidade que o vírus venha a contaminar fontes alimentares, tanto humanas quanto animais, é muito baixa. Em estudos *in vivo*, o evento recombinante não foi detectado em secreções e/ou excreções de gatos e cachorros injetados com altas doses de vCP65, confirmando o baixo potencial para contaminação de fontes alimentares. O risco de infecção acidental de espécies alvo do vírus de suporte, aves, também é baixo, como demonstrado pelo resultado de que nenhum vírus foi encontrado em *swabs* traqueais de galinhas mantidas em contato com animais imunizados com vCP65 por

distintas vias, incluindo subcutânea e escareficação. Esses resultados indicam que o uso do OGM vCP65 para sua utilidade fim não oferece risco previsível teórico para segurança alimentar

5. Plano de Monitoramento Pós-Liberação Comercial:

A Empresa solicita à CTNBio, com base na documentação de segurança do produto apresentada neste processo que a mesma seja dispensada da elaboração de "Plano de Monitoramento Pós-Comercial" do produto PUREVAX RAIVA com base nos seguintes argumentos de segurança:

- A vacina decorrente desta modificação genética se destina a imunização de animais domésticos (gatos), em aplicações individuais, via injetável, estando a espécie-alvo em ambiente controlado.
- O agente carreador da alteração genética é um vírus vacinai com mais de 200 passagens em substrato "in vivo", ou seja, células embrionárias de aves, e é usado em sua forma inalterada para a imunização de canários contra a varíola das aves.
- Por se tratar de agente espécie-específico, não ocorre viremia do mesmo na espécie alvo da vacina, seja na forma natural como na forma alterada geneticamente.
- A possibilidade de recombinação genética, dadas as características do agente e sua interação com o hospedeiro, é praticamente nula.
- A possibilidade de eliminação do agente no meio ambiente é bastante reduzida, e quando ocorre, a mesma se dá em ambiente doméstico, e em volumes ínfimos que não impactam o meio ambiente.
- A facilidade de eliminação do agente, através do uso de detergentes e desinfetantes comuns, é bastante ampla, facilitando sua eliminação em caso de vazamentos de pequenos volumes decorrente da aplicação injetável individual.
- Por se tratar de produto preconizado para o uso exclusivo em animais de companhia, de aplicação individual via parenteral e do vírus recombinante depender exclusivamente de células para sua multiplicação, o impacto no ambiente é considerado praticamente nulo.

A empresa considera que o produto não oferece riscos ao ambiente e à saúde humana, e com isso monitoramento pós-liberação comercial não se faz necessário. Essa Comissão concorda com os pontos colocados e concorda com a dispensa de procedimentos de monitoramento pós-liberação para este produto específico.

6. Parecer Final:

Considerando que vCP65:

1. é derivado de uma cepa de vacina de vírus *Canarypox* altamente atenuada e não se replica em células de espécies não-aviárias, inclusive a espécie alvo (gatos);
2. tem capacidade insignificante para sobreviver, se estabelecer e disseminar no ambiente, e capacidade negligenciável para transferência genética;
3. demonstrou ser não-patogênico em todas as espécies testadas incluindo gatos, cães, canários, roedores e seres humanos;
4. não tem capacidade de transmitir características potencialmente prejudiciais, como por exemplo através de plasmídeos;

5. deve ser inoculado em animais domésticos em condições assépticas, sob estrito acompanhamento de médico veterinário;
6. é fornecido como preparação líquida em dose única, hermeticamente fechada,

a probabilidade de ocorrerem

eventos que coloquem em risco a segurança tanto dos seres humanos, como de animais e do meio ambiente é bastante limitada; e

7. por se tratar de produto voltado para o uso exclusivo em animais, de aplicação individual via parenteral e do vírus recombinante depender exclusivamente de células para sua multiplicação e portanto o impacto no ambiente ser considerado praticamente nulo.

Assim, frente ao exposto acima, somos pelo deferimento do pedido de liberação comercial do produto PUREVAX RAIVA

7. Bibliografia:

- Bennett M, Gaskell RM, Gaskell CJ, Baxby D, Kelly DF. Studies on poxvirus infection in cats. *Arch Virol.* 1989; 104(1-2): 19-33.
- Cadoz M, Strady A Meignier B, Taylor J, Tartaglia J, Paoletti E, Plotkin S. Immunization with canarypox virus expressing rabies glycoprotein. *Lancet*, 1992; 339(8807): 1429-32.
- Fries LF, Tartaglia J, Taylor J, Kauffman EK, Meignier B, Paoletti E, Plotkin S. Human safety and immunogenicity of a canarypox-rabies glycoprotein recombinant vaccine: an alternative poxvirus vector system. *Vaccine* 1996; 14(5): 428 -34.
- Gubser C, Hué S, Kellam P, Smith GL. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen. Virol.* 2004; 85: 105- 17.
- Hansen H, Okeke M I, Nilssen O, Traavik T. Recombinant viruses obtained from co infection in vitro with a live vaccinia-vectored influenza vaccine and a naturally occurring cowpox virus display different plaque phenotypes and loss of the transgene. *Vaccine* 2004; 23(4): 499 -506.
- Hu N, Yu R, Shikuma C, Shiramizu B, Ostrowski MA, Yu Q. Role of cell signaling in poxvirus-mediated foreign gene expression in mammalian cells. *Vaccine* 2009; 27(22): 2994-3006.
- Ignatius R, Marovich M, Mehlhop E, Villamicle L, Mahnke K, Cox WI, Isdell F, Frankel SS, Mascola JR, Steinman RM, Pope M. Canarypox virus-induced maturation of dendritic cells is mediated by apoptotic cell death and tumor necrosis factor alpha secretion. *J Virol.* 2000; 74(23): 11329-38.
- Kirmisc P. Host specificity and pathogenicity of poxviruses from wild berries. *Wild Dis.* 1969; 5(4): 376-86.
- Kuzrnin IV, Novella IS, Dietzgen RG, Padhi A, Rupprecht CE. The rhabdoviruses: biodiversity, phylogenetic, and evolution . *Infect. Genet. Evol.* 2009; 9(4): 541-53.
- Nowotny N. Serologic studies of domestic cats for potential human pathogenic virus infections from wild rodents. *Zentra Ibl Hyg Umweltmed.* 1996; 198(5): 452-61.
- Paoletti E, Tartaglia J, Taylor J. Safe and effective poxvirus vectors--NYVAC and ALVAC. *Dev. Biol. Stand.* 1994; 82: 65-9.
- Plotkin SA, Cadoz M, Meignier B, Méric C, Leroy O, Excler JL, Tartaglia J, Paoletti E, Gonczol E, Chappuis G. The safety and use of canarypox vectored vaccines. *Dev Biol Stand.* 1995;84:165-70.
- Taylor J, Trimarchi C, Weinberg R, Languet B, Guillemin F, Desmettre P, Paoletti E. Efficacy studies on a canarypox-rabies recombinant virus. *Vaccine* 1991; 9(3): 190-3.
- Taylor J, Meignier B, Tartaglia J, Languet B, Van der Hoeven J, Franchini G, Trimarchi C, Paoletti E. Biological and immunogenic properties of a canarypox-rabies recombinant, ALVAC-RG (vCP65) in non-avian species. *Vaccine* 1995; 13(6): 539-49.

- Tulman ER, Afonso CL, Lu Z, Zsak L, Kutish GF, Rock DL. The genome of canarypox virus. J Virol. 2004; 78(1): 353-66.
- Yamaguchi N, Macdonald DW, Passanisi WC, Harbour DA, Hopper CD. Parasite prevalence in free-ranging farm cats, *Felis silvestris catus*. Epidemiol. Infect. 1996; 116(2): 217-23.
- Yu Q, Jones B, Hu N, Chang H, Almad S, Liu J, Parrington M, Ostrowski M. Comparative analysis of tropism between canarypox (ALVAC) and vaccinia viruses reveals a more restricted and preferential tropism of ALVAC for human cells of the monocytic lineage. Vaccine 2006; 24(40-41): 6376-9 1.

Dr. Edivaldo Domingues Velini

Presidente da CTNBio



Documento assinado eletronicamente por **Edivaldo Domingues Velini, Pesquisador**, em 22/03/2017, às 07:45, conforme art. 3º, III, "b", das Portarias MC nº 89/2014 e MCTIC nº 34/2016.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <http://sei.mc.gov.br/verifica.html> informando o código verificador **1730042** e o código CRC **1725009F**.