

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA, INOVAÇÕES E
COMUNICAÇÕES
PARECER TÉCNICO Nº 6062/2018

Processo SEI nº: 01250.062702/2017-54

CQB: 0251/08

Requerente:Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Farmacêutica Ltda.

Assunto: Solicitação de liberação comercial da vacina Ingelvac Provenza-
Vacina vírus vivo modificado contra Influenza Suína.

Extrato Prévio nº: 5832/2017, publicado no DOU em 8 de novembro de
2017.

Reunião: 213ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 07 de junho de
2018

Deliberação: Deferido

A CTNBio, após apreciação da Solicitação de parecer para liberação comercial da vacina Ingelvac Provenza- Vacina vírus vivo modificado contra Influenza Suína, conclui 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 plenamente às normas da CTNBio e à legislação pertinente que visam garantir a biossegurança do meio ambiente, agricultura, saúde humana e animal.

Parecer Técnico para a vacina Ingelvac Provenza

Ementa:O responsável legal pela Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Farmacêutica Ltda., Dr. Fabiano Andreatta, solicita parecer técnico da CTNBio para liberação comercial da vacina Ingelvac Provenza- Vacina vírus vivo modificado contra Influenza Suína. O produto é classificado como sendo da classe de risco 1 e será produzido nos Estados Unidos e importado e distribuído no Brasil pela empresa. O processo descreve as características de biossegurança do produto, bem como a declaração formal do responsável assegurando que as informações descritas no processo são completas e acuradas

A BOEHRINGER INGELHEIM DO BRASIL QUÍMICA E FARMACÊUTICA LTDA., situada à rodovia Régis Bittencourt (BR 116) Km 286, Itapecerica da Serra, SP, inscrita no CNPJ 60.831.658/0021-10, vem através de seus representantes legais solicitar a liberação comercial de organismo geneticamente modificado presente na vacina ingelvac Provenza- Vacina vírus vivo modificado contra Influenza Suína.

Fundamentação técnica

1. Justificativa

A infecção pelo Vírus da Influenza Suína A (VIS), sobretudo com as cepas H1N1 e o H3N2, é uma das mais comuns entre as que afetam o sistema respiratório e tem forte impacto econômico na suinocultura além de serem consideradas zoonoses já que podem também infectar o ser humano. Em geral, o vírus da Influenza Suína induz doença respiratória aguda em suínos. A gravidade da enfermidade depende de inúmeros fatores, entre os quais se incluem a idade do hospedeiro, a cepa do vírus e as infecções secundárias.

O vírus da Influenza Suína pertence à família *Orthomyxoviridae* e é um vírus de RNA de sentido negativo com genoma segmentado. O genoma viral consiste em oito segmentos de RNA denominados HA, NA, PB2, PB1, PA, NP, M e NS. Em específico a presença da "Proteína Não Estrutural 1" (NS1) de forma funcional permite ao vírus selvagem esquivar-se da resposta imune inata mediada pelo IFN-g, sendo por isso considerado um fator de maior virulência.

A tecnologia da vacina proposta se baseia no conceito de truncagem da "Proteína Não Estrutural 1" (NS1), ocorrendo uma supressão ineficaz da resposta imune e o sistema imune consegue assim desenvolver imunidade rápida e eficaz contra o vírus da vacina.

A proposta de liberação comercial compreende a vacina denominada comercialmente como Ingelvac Provenza que é uma vacina contra a Influenza suína, cepas H1N1 e H3N2, que contém duas cepas de vírus vivo modificado, indicada para suínos de um dia de idade, e administrada em dose única de 1 mL por via intranasal.

A vacina será elaborada, submetida ao controle de qualidade e manufaturada na Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. em Saint Joseph, estado de Missouri, nos Estados Unidos. O produto será importado em sua apresentação final, e todas as etapas de fabricação ocorrerão nos Estados Unidos. A filial brasileira será responsável pelo recebimento, estocagem e comercialização da vacina.

2. Identificação do OGM

A vacina bivalente do Vírus de Influenza Suína NS1, vírus vivo modificado (MLV), possui um isolado de H1N1 NS1 (lote no 241-192) e um isolado de H3N2 NS1 (lote no 241-196). O Vírus da Semente-Mãe (MSV) para cada fração é um isolado de Vírus da Influenza Suína que foi atenuado por meio da truncagem de NS1.

MSV da Influenza Suína H1N1 NS1, Lote no. 241-192 - O agente biológico controlado é o MSV de Influenza Suína H1N1 NS1, um recombinante criado em laboratório que contém:

- HA e NA de A/swine/Minnesota/37866/1999 (H1N1).- PB2, PB1, PA, NP, M de A/Swine/Texas/4199-2/98 (H3N2).
- O gene modificado NS1-126 derivado de A/Swine/Texas/4199-2/98 (H3N2) que codifica uma proteína NS1 com porção carboxi truncada constituída pelos aminoácidos 1 ao 126 de NS1.

MSV da Influenza Suína H3N2 TX98 NS1, Lote no. 241-196 — O agente biológico controlado é o MSV de Influenza Suína H3N2 TX98 NS1, um recombinante criado em laboratório que contém:

- HA, NA, PB2, PB1, PA, NP e M de A/Swine/Texas/4199-2/98 (H3N2).
- O gene modificado NS1-126 derivado de A/Swine/Texas/4199-2/98 (H3N2) que codifica uma proteína NS1 com porção carboxi-truncada constituída pelos aminoácidos 1 ao 126 do NS1.

3. Processo de produção do OGM

O plasmídeo pHW2000 foi utilizado para clonar cada um dos oito segmentos de DNA genômico viral e sua posterior transfecção na criação do MSV de Influenza Suína H1N1 NS1 recombinante. A *E. coli* é utilizada para transformar e amplificar os plasmídeos pHW2000.

Hoffmann, *et. al.* implementaram um sistema de transfecção baseado em plasmídeo para resgatar o vírus de influenza A completo de DNAC clonado (A DNA transfection system for generation of influenza A vírus from eight plasmids. Hoffmann *et. al.* PNAS 2000;97:6108-6113). O sistema de transfecção baseado em oito plasmídeos é um sistema de transcrição bidirecional-DNAC que fornece um meio para a criação de quantidades suficientes de RNA_v e proteínas virais para permitir a formação de vírus de Influenza Infeciosa A. Os oito plasmídeos de expressão com um promotor pol I e um promotor pol II contêm uma cópia de cada DNAC viral dos oito segmentos. Os marcos abertos de leitura para as 10 proteínas virais são flanqueados pelo segmentos regiões não codificantes específicas. A orientação das duas unidades de transcrição permite a síntese de RNA viral com sentido negativo e RNAm com sentido positivo de um modelo de DNAC viral, inclusive a replicação viral necessária e as sequências reguladoras. Em última análise, a interação de todas as moléculas derivadas da transcrição celular e viral e a maquinaria de tradução resulta na criação do vírus de Influenza Infeciosa A.

4. Classe de risco

O organismo parental, cepas H1N1 e H3N2 do vírus da influenza suína são classe de risco II. Porém, após a atenuação pela modificação genética introduzida, os OGMs são considerados classe de risco 1 pois perderam seu potencial virulento, sendo considerados de baixo risco individual e para a coletividade).

5. Produto da expressão do gene inserido no organismo parental

O produto final é uma vacina composta por duas cepas geneticamente modificadas que são atenuadas em relação ao vírus selvagem pois sofrem perda de função do gene NS1 por truncamento do produto gênico.

6. Avaliação de risco a saúde animal e humana

A referida vacina é indicada para a vacinação de suínos de um dia de idade, não sendo recomendada a aplicação em animais enfermos.

Como ocorre com outros vírus de Influenza de mamíferos, o tropismo tissular esperado dos vírus de Influenza Suína H1N1 NS1 e H3N2 NS1 é pelos tecidos pulmonares e do trato respiratório superior. A truncagem de NS1 não deve alterar o tropismo tissular e na verdade deve ocasionar uma menor capacidade de replicação nos tecidos do pulmão e do trato respiratório superior.

A exposição humana aos vírus da vacina poderia ocorrer durante a fabricação, distribuição e/ou administração do produto experimental ou registrado. Em geral, as precauções comuns adotadas na produção e na manipulação de todo produto biológico previnem a exposição humana aos microorganismos da vacina. Os procedimentos específicos para a proteção da segurança humana são adotados nas instalações de produção da vacina aprovada pelo USDA na Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. (BIV). Também poderia haver exposição humana no manejo dos suínos vacinados. Tal evento é improvável, pois é limitada a excreção dos animais vacinados para os animais não vacinados. Dada a menor virulência do vírus vacinal no animal hospedeiro, também é menor a capacidade de cruzar a barreira de espécie para seres humanos.

Quanto à possibilidade de propagação e dispersão em animais:

Foram apresentados resultados de um estudo de propagação e dispersão em suínos de 1 dia com o MSV de Influenza Suína H1N1 NS1 (Estudo BIV 2012201-Estudo de Segurança em Laboratório para Análise da Propagação e Dispersão da Vacina de Influenza Suína, H1N1 e H3N2, Vírus

Vivo Modificados). Nesse estudo foi administrado 1 mL ($6,60 \log_{10}$ FAID50/dose de H1N1) a suínos de um a dois dias de vida. (FAID = Dose Infeciosa 50% determinada por teste de imunofluorescência). A vacina revelou-se clinicamente segura nos suínos inoculados, foi excretada por no máximo 7 dias nas secreções nasais dos suínos vacinados e foi observado que se propaga apenas minimamente nos suínos inoculados. Tanto as fêmeas dos leitões vacinados como os grupos não vacinados não eliminaram vírus nas secreções nasais. Em última análise, a vacina revelou-se clinicamente segura no estudo, já que não houve relato de nenhum efeito adverso.

Um segundo estudo foi realizado em espécies não alvo a saber: furão, galinha e ratos (V 2013266 - Estudo de Laboratório para Avaliação da Segurança da Vacina Bivalente de Influenza Suína a Vírus Vivo Modificado). Neste estudo foi administrada cerca de uma quinta parte da dose-alvo ($4,4 \log_{10}$ FAID50/dose de H1N1) em 50 μ l em ratos (n=7) e cerca de uma quinta parte da dose-alvo ($5,0 \log_{10}$ FAID50/dose de H1N1) em 200 μ l em galinhas (n=8) e furões(n=8). A vacina revelou-se segura em todas as espécies sem indicação de uso que foram avaliadas nesse estudo. A maioria das amostras de secreções coletadas nesse estudo apresentou resultado negativo para o vírus vacinal, com exceção de uma galinha com uma amostra com resultado positivo e todos os furões com no mínimo uma amostra com resultado positivo no dia seis. Depois do dia seis todos os furões apresentaram secreções com resultado negativo do dia sete até o término do estudo.

Somando-se os dois estudos, há clara demonstração que é insignificante o risco de excreção do vírus vacinal dos animais vacinados para os animais não expostos em quantidades suficientes para permitir a replicação e posterior excreção. Aliado aos protocolos de biossegurança a serem adotados quando do uso da vacina, é insignificante o potencial de escape do vírus vacinal das instalações e de propagação para uma população não tratada previamente.

Quanto à possibilidade de reversão do fenótipo:

Ambas as sementes-mãe de VIP NS1 H1N1 e VIP NS1 H3N2 foram analisadas em retropassagens e estudos de reversão à virulência.

Resumidamente, suínos (de um dia a três semanas de vida, dependendo da passagem) foram inicialmente inoculados pela via intratraqueal com os vírus MSV com título de $6,04 \log_{10}$ DICT50/mL no caso do isolado H1N1 NS1 e $7,52 \log_{10}$ DICT50/mL no caso do isolado H3N2 NS1. Os animais foram observados para verificar a ocorrência de sinais clínicos quatro horas pós-inoculação e depois diariamente durante cinco dias. Cinco dias pós-inoculação, os suínos foram necropsiados. Foram coletados os fluidos do lavado broncoalveolar e os fluidos do lavado das vias aéreas

superiores. Foram analisadas as amostras para detectar a presença de VIP por meio de isolamento do vírus. Foi feito um pool com as amostras positivas, utilizado para inoculação no próximo grupo de suínos por via intratraqueal. Esse processo foi repetido por cinco passagens. Na quinta passagem, os animais foram observados durante 21 dias e então necropsiados.

No estudo da semente-mãe de VIP NS1 H1N1, foi inoculado um total de 24 suínos durante as 5 passagens. Desses 24 suínos, quatro apresentaram tosse e onze, aumento na frequência respiratória nos dias pós-inoculação. Nenhum dos suínos apresentou febre e não foi observado aumento de lesões pulmonares após a quinta passagem do vírus.

No estudo da semente-mãe de VIP NS1 H3N2, foi inoculado um total de 45 suínos durante as 5 passagens. Desses 45 suínos, três apresentaram tosse; quatorze, aumento da frequência respiratória; e um, depressão nos dias pós-inoculação. Nenhum dos suínos apresentou febre e não foi observado aumento de lesões pulmonares após a quinta passagem do vírus.

Os estudos de reversão à virulência das sementes-mãe de H1N1 NS1 e H3N2 NS1 foram aceitos pelo USDA em cumprimento às exigências de estabilidade e segurança da semente-mãe, no dia 6 de junho de 2012 e no dia 7 de junho de 2012, respectivamente. Embora tenham ocorrido algumas alterações genéticas que posteriormente levaram à truncagem da região NS1, nenhuma delas ocasionou a restauração de um gene NS1 funcional ou aumento da virulência. Estes dados fornecem evidência científica do baixo risco nos animais com indicação de uso.

Aspectos Ambientais

Pela própria característica do OGM (vírus vivo modificado), a possibilidade de produção de esporos é inexistente.

A maior ou incomum sobrevivência das cepas da vacina no meio ambiente poderiam aumentar a possibilidade de propagação ambiental e exposição e colonização em animais que não são as espécies alvos e em seres humanos. Porém, a sobrevivência das cepas da vacina deve ser semelhante à do microrganismo parental. O Influenza é um vírus de RNA envelopado. Em geral, os vírus envelopados apresentam baixa sobrevivência no ambiente e são facilmente inativados pela maioria dos desinfetantes e pela exposição à luz ultravioleta. Além disso, a truncagem do segmento do gene NSI não confere vantagem seletiva no ambiente. A capacidade da Influenza Suína, H1N1 ou H3N2 NSI para sobreviver no meio ambiente não é maior do que a do vírus da Influenza Suína selvagem presente no ambiente.

As cepas da vacina poderiam ter potencial de se espalhar no meio ambiente se excretados via secreções ou nos excrementos dos suínos vacinados.

Entretanto, a evidência experimental indica que as cepas da vacina não são excretadas em quantidades que possibilitariam a propagação efetiva no meio ambiente. A presença do segmento do gene NS1-126 não representaria uma vantagem seletiva ao ambiente, a capacidade de a Influenza Suína H1N1 ou H3N2 sobreviver no meio ambiente não seria superior à do vírus da Influenza Suína selvagem já presente. Além disso, é uma prática comum entre os suinocultores fazer a desinfecção completa das instalações dos suínos nos grupos alojados. Esses fatores minimizariam a propagação das cepas da vacina no ambiente por meio de fatores físicos ou químicos.

Os antígenos da vacina poderiam resultar em efeitos ecológicos adversos significativos se infectassem e se revelassem altamente patogênicos para as espécies sem indicação de uso, causando-lhes morbidade e mortalidade. Por sua vez, o número limitado de hospedeiros, a baixa capacidade de sobrevivência no meio ambiente e a susceptibilidade ao interferon do hospedeiro não indicam que o uso dessa vacina poderá causar danos ao meio ambiente.

Se as cepas da vacina fossem transmitidas e colonizassem espécies de invertebrados, elas poderiam causar doença nessas populações ou possivelmente poderiam fornecer um meio para a sua propagação mais ampla no ambiente, desempenhando os invertebrados o papel de vetores. Para responder a esta questão, no artigo "Accumulation and inactivation of avian influenza virus by the filter-feeding invertebrate *Daphnia magna*." Applied Environmental Microbiology, Dezembro 2013; 79(23):7249-55, os autores pesquisaram a capacidade do invertebrado *Daphnia magna* acumular os vírus em água enriquecida com vírus da Influenza aviária. Como conclusão, os autores sugerem que o invertebrado *Daphnia* inativa o vírus em um curto intervalo de tempo pós-ingestão e reduz a concentração do vírus na água. Desta forma, o potencial de transmissão para invertebrados é baixo. Não há evidência para concluir que as consequências das cepas com NS1 truncado apresentam maior probabilidade de transmissão aos invertebrados. Os MSV de Influenza Suína H1N1 NSI e H3N2 NSI são atenuados na espécie alvo (suínos) e a incorporação do NSI-126 truncado deve conferir o mesmo nível de atenuação nos animais sem indicação de uso. Em resumo, a capacidade do MSV Influenza Suína H1N1 NSI ou H3N2 NSI sobreviver no meio ambiente não seria maior do que a do vírus selvagem.

7. Conclusão

Tendo em vista o apresentado pela proponente propiciando a adequada avaliação de risco deste produto por este assessor quanto à

segurança em relação à saúde dos animais, a CTNBio foi de parecer favorável a sua liberação comercial para o uso indicado.

Referências

- Vincent AL et al. Influenza A virus vaccines for swine. *Vet Microbiol.* 2017 Jul;206:35-44.
- Hoffmann et. al. A DNA transfection system for generation of influenza A vírus from eight plasmids. *PNAS* 2000;97:6108-6113.
- Meixel, et. al. Accumulation and inactivation of avian influenza vírus by the filter-feeding invertebrate *Daphnia magna*." *Applied Environmental Microbiology*, Dezembro 2013; 79(23):7249-55.
- BIAH studies #2013200, 2013232, and 2014001 publicado no endereço: [littp://productdata.apliis.usda.gov](http://productdata.apliis.usda.gov).
- Genzow M, Góode11 C, Kaiser TJ, Johnson W, Eichmeyer M. Live attenuated influenza virus vaccine reduces virus shedding of newborn piglets in the presence of maternal antibody. *Influenza Other Respir Viruses.* 2017;00:1-7. doi: 10.1111/irv.12531.
- Alvarez J, Sarradell J, Kerkaert B, et ai. Association of the presence of influenza A virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in sow farms with post-weaning mortality. *Prev Vet Med.* 2015;121:240-245.
- Vincent AL, Ma W, Lager KM, et al. Efficacy of intranasal administration of a truncatecl NS 1 modified live influenza viras vaccine in swine. *Vaccine.* 2007;25:7999-8009.
- Janke BH. Influenza A virus infections in swine: Pathogenesis and diagnosis. *Vet Pathol.* 2014,51 :410- 426.

Parecer:

Ante aos dados apresentados pela proponente e a literatura consultada concluímos que esse evento geneticamente modificado não oferece riscos à saúde humana, animal e ao meio ambiente. Considerando ainda que o presente pedido de liberação comercial atende às normas e às legislações vigentes que visam garantir a biossegurança ambiental, vegetal, animal e do homem, a CTNBio foi de parecer favorável a solicitação da empresa Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Farmacêutica Ltda. de Liberação Comercial da vacina Ingelvac Provenza- Vacina vírus vivo modificado contra Influenza Suína.

Dra. Maria Sueli Soares Felipe
Presidente da CTNBio