

PARECER TÉCNICO Nº 4594/2015

Processo nº: 01200.002226/2014-65

Requerente: Boehringer Ingelheim Química e Farmacêutica Ltda.

CQB: 251/08

Proton: 20581/2014

Endereço: Avenida das Nações Unidas, 14171, 18º andar – Torre B – Vila Gertrudes. São Paulo – SP. CEP 04794-000.

Assunto: Solicitação de parecer para liberação comercial de vacina composta por micro-organismo geneticamente modificado da classe I de risco biológico.

Extrato Prévio: 4130/2014, publicado no DOU nº 13 em 13 de junho de 2014.

Reunião: 183ª Reunião Ordinária da CTNBio, realizada em 10 de junho de 2015

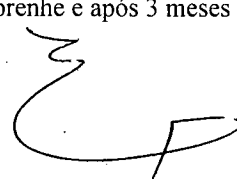
Decisão: DEFERIDO

A CTNBio, após apreciação da Solicitação de parecer para liberação comercial de vacina composta por micro-organismo geneticamente modificado da classe I de risco biológico, 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.

A Sra. Patrícia Schwarz, responsável técnico pela empresa Boehringer Ingelheim Química e Farmacêutica Ltda., detentora do Certificado de Qualidade em Biossegurança 251/08, vem requerer a liberação para registro para uso comercial de vacina composta por micro-organismo geneticamente modificado da classe I de risco biológico, "**Bovela® - Vacina viva modificada contra diarreia viral bovina tipo 1 e tipo 2**". O processo descreve as condições de biossegurança do manuseio do micro-organismo, bem como a declaração formal do responsável assegurando a veracidade das informações prestadas a CTNBio. A empresa requerente Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Farmacêutica Ltda., com base no que estabelece a Resolução Normativa Nº 5 da CTNBio, solicita análise e emissão de parecer técnico para a liberação comercial da Vacina viva modificada contra diarreia viral bovina Tipo 1 e Tipo 2; Protocolado em 05/05/14. Em 28 de abril de 2014, a referida empresa apresentou o relatório técnico do produto Bovela para solicitação do parecer técnico para liberação comercial.

Descrição do OGM: A Bovela é uma vacina veterinária destinada à imunização ativa de bovinos contra a doença causada pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) tipos I e II, inclui aqui a vacinação em vacas e novilhas, pois protege também o feto contra a infecção transplacentária por BVDV. As cepas parentais dos 2 tipos virais foram isoladas de animais infectados na Alemanha (KE9, BVDV-1) e USA (NY-93, BVDV-2). Este vírus é um pestivirus de RNA (fita simples) de cadeia positiva e só se replica no citoplasma (família *Flaviviridae*). As proteínas E^{ms} e N^{pro} quando excluídas ou manipuladas do genoma viral gera atenuação dos respectivos mutantes e retardo de crescimento quando comparados ao tipo selvagem. Estas proteínas possuem a capacidade de inibir a resposta imune tipo Th1 dependente de interferon (IFN-gama), inibindo assim a resposta imune do hospedeiro. Por outro lado, a ausência das sequências codificadoras para estas proteínas do genoma viral prejudicam a capacidade de inibir a produção de interferon estimulando assim o sistema imune do hospedeiro. A vacina é livre de adjuvante e é destinada ao uso para imunização ativa do gado prenhe e após 3 meses de idade a fim de reduzir os sinais clínicos da doença, viremia e excreção viral.



PROTON 50368/2015

Finalidade (objetivo): solicita parecer sobre a biossegurança da vacina Bovela® com objetivo de registro comercial para imunização ativa contra o vírus BVDV contra a diarreia bovina.

Descrição do OGM:

O produto desta solicitação de liberação comercial é uma vacina veterinária destinada à imunização ativa de bovinos contra a doença causada pelo vírus da diarreia viral bovina (BVDV) tipos 1 e 2 e para a imunização ativa de vacas e novilhas, a fim de proteger o feto contra a infecção transplacentária por BVDV. Para produção da vacina, foram utilizadas como cepas parentais do vírus respectivamente cepa KE9 de BVDV-1 e cepa NY93 de BVDV-2. O vírus do BVDV é um pestivirus de RNA de cadeia positiva e pertence a família *Flaviridae* replicando-se exclusivamente no citoplasma das células infectadas. Os pestivirus são vírus com RNA de sentido positivo e único filamento com genomas de aproximadamente 12,3 kb que contêm um código de fase de leitura aberta (ORF) longo para uma poliproteína de cerca de 4.000 aminoácidos, que é co- e pós-translacionalmente processada em pelo menos 12 proteínas maduras. O BVDV se restringe a animais biungulados (ordem dos *Artiodactyla*) como as espécies domésticas *Bos taurus* (bovinos), *capra hircus* (caprinos), *Ovis aries* (ovinos) e *Sus scrofa* (suínos), assim como em algumas espécies de ruminantes selvagens, incluindo o *Cervus elaphus* (veado vermelho), *Ozotrogon bezoarticus* (cervo), *Odocoileus virginianus* (veado de cauda branca), *Bison bison* (bisão), *Vicugna pacos* (alpaca) e *Lama glama* (lhama), entre outros.

A transformação genética sofrida pelos vírus parentais foi a deleção funcional de dois genes, a saber: (1) deleção da região de codificação do aminoácido 349 do gene da ribonuclease (E^{ms}) e (2) deleção da região de codificação do gene que codifica a proteína N^{pro} , exceto os 4 códons da cauda amino-terminal. A E^{ms} é uma glicoproteína viral que reside no vírion e é excretada pelas células infectadas pelo vírus. A exclusão do único aminoácido da E^{ms} interfere em sua atividade de RNase. Já a N^{pro} é uma protease expressa na célula infectada e leva à degradação de IRF3, fator essencial na cascata de sinalização de interferon do hospedeiro. Estas alterações genéticas nos BVDVs permitem a formação de replicons de maneira autônoma nas células hospedeiras porém com perda da capacidade de produzir partículas infecciosas do vírus. Além disso, ambas as proteínas selvagens têm capacidade de interferir com uma resposta a interferon (IFN) tipo 1 em células infectadas com diferentes vírus ou tratadas com dsRNA. Portanto, as deleções descritas acima prejudicam a capacidade de reprimir a produção de interferon por parte do hospedeiro ocasionada pelo vírus, o que leva a uma melhor resposta imune ativa dos animais. Em especial, quando esta vacina for usada em fêmeas prenhes, espera-se a prevenção da infecção transplacentária do feto por BVDV-1 e BVDV-2, e também consequente imunização ativa dos bezerros desde os três meses de vida, reduzindo os sinais clínicos, excreção do vírus, viremia e minimizando a redução na contagem de leucócitos causada pelo BVDV.

Biotécnica empregada e estabilidade dos OGMs:

Brevemente, os RNAs do BVDV-1 e do BVDV-2 modificados foram transcrito *in vitro* a partir de clones completos de cDNA pXIKE-B-NdN (correspondente ao BVDV-2 modificado) e pKANE99C (correspondente ao BVDV-1 modificado). Posteriormente, as cepas de BVDV foram propagadas em linhagens celulares MDBK-B2 e o RNA viral foi extraído para estabelecer a biblioteca padrão de cDNA e para a extensão por reação em cadeia de polimerase (RT-PCR). Os vírus vivos alvo, modificados e atenuados, foram obtidos pela elaboração de cDNA após

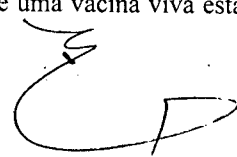
a transcrição *in vitro* e transfecção do RNA de células MDBK. O sequenciamento das sementes mãe-virais (MSV) para os BVDVs modificados foram usados para inoculação em células MDBK-B2 e após 48 horas de incubação, o material sobrenadante foi removido e as células lavadas e lisadas. O RNA total foi extraído das células, avaliados quanto a sua integridade e posteriormente convertidos em cDNA, para sequenciamento. Os resultados do sequenciamento do MSV estabelecido confirmaram a presença das deleções introduzidas em N^{pro} e E^{ms}. A comparação das sequências do MSV e dos isolados originais KE9 e NY93 demonstrou a presença de apenas algumas diferenças de nucleotídeos, que foram determinados como sem influência sobre o fenótipo atenuante. Os dados de PCR obtidos para o MSV e WSV (MSV+5) das cepas da vacina de BVDV modificado também confirmaram a presença da deleção N^{pro} induzida. Esses dados *in vitro* também foram suportados por dados da PCR obtidos em amostras positivas para BVDV (método de isolamento viral), que mostraram que a deleção N^{pro} introduzida permanecia estável por várias passagens *in vivo*. Juntos, esses dados demonstram que os genomas de BVDV contendo as deleções inseridas são geneticamente estáveis *in vitro* e *in vivo*.

I. Identificação do OGM

Designação do OGM: Os nomes científicos das cepas com as deleções genômicas que codificam para as proteínas referidas são – Vírus da Diarréia Viral Bovina 1 (BVDV-1) Cepa KE9 e Vírus da Diarréia Viral Bovina 2 (BVDV-2) Cepa NY93.

Espécie: Vírus de RNA, BVDV-1 e BVDV-2, são espécies do gênero *Pestivirus*, família *Flaviviridae*.

Método de introdução e característica(s) inseridas: Os pestivirus são vírus de RNA, fita simples única e linear, positiva, possuem um genoma de cerca de 12,3 Kb e expressam uma poliproteína de aproximadamente 400 KDa que é processada co- e pós-traducionalmente para gerar as proteínas virais. No caso do BVDV-1 (cepa KE9) este foi utilizado para produzir um clone de cDNA infeccioso, utilizado para as deleções atenuantes. O mesmo foi realizado para o caso do vírus BVDV-2 (cepa NY-93). As 2 cepas vacinais, relativos aos vírus BVDV-1 e BVDV-2, contêm duas exclusões genômicas idênticas, a primeira excluiu a maior parte do gene N^{pro} que impede a expressão da protease N^{pro} na porção N-terminal e a segunda excluiu um códon do gene E^{ms}, que resultou na eliminação da função da ribonuclease viral. Os RNAs modificados dos 2 vírus foram transcritos *in vitro* a partir de clones completos dos 2 cDNAs individuais (pXIKE-B-NdN – BVDV-2 e pKANE99C – BVDV-1). As cepas de BVDV, modificados e atenuados, foram propagadas em linhagens celulares de MDBK-B2 (linhagem celular de rim bovino), por transfecção dos RNAs. A N^{pro} é uma protease expressa na célula infectada que leva a degradação do IRF3, fator importante na cascata de sinalização para produção de IFN-gama no hospedeiro. A exclusão da atividade da proteína E^{ms} resulta em replicons capazes de replicar os RNAs de modo autônomo, mas incapazes de produzir as partículas virais infecciosas. Os dados experimentais apresentados pela requerente demonstraram que os genomas de BVDV contendo as deleções inseridas são geneticamente estáveis *in vivo*, pois após várias passagens em células hospedeiras foram realizados experimentos de biologia molecular (RT-PCR e sequenciamento nucleotídico) que demonstraram que as variações nucleotídicas existentes estavam dentro da faixa esperada para vírus de RNA fita positiva e que estas modificações não aumentavam a capacidade de multiplicação do vírus. Este dado é de extrema importância tanto no que diz respeito ao desenvolvimento de uma vacina viva estável bem como para a questão de biossegurança do produto.



II - Aspectos relacionados à saúde humana e dos animais

O OGM utilizado na vacina Bovela é categorizado na Classe de Risco 1 (conforme RN 2, de novembro de 2006), baixo nível individual e baixo risco para a coletividade, pois não causa agravos a saúde humana e animal bem como efeitos adversos aos vegetais e meio ambiente.

Risco para seres humanos:

Sabe-se que o BVDV não é infeccioso para os seres humanos, não tem potencial de zoonose e não tem influência na saúde humana conforme OIE - *World Organization for Animal Health* 2008. Efeitos tóxicos e alérgicos não foram descritos na literatura. O BVDV não tem a capacidade de infectar as células humanas mesmo quando estas são induzidas a expressar um dos receptores alvo do BVDV, o CD46 bovino. Isso enfatiza mais ainda a enorme barreira que impede o BVDV de infectar os seres humanos. As cepas da vacina são incapazes de infectar o ser humano, portanto, não são patogênicas para os humanos, independentemente da idade, saúde ou estado imunológico do indivíduo.

Os excipientes que fazem parte da composição da vacina não são farmacologicamente ativos e não têm efeito tóxico após a exposição do ser humano. Todos os excipientes estão descritos na farmacopeia (Farm. Eur.), e comumente são utilizados nos medicamentos para humanos. Os sais (WPBS e salina fisiológica) e açúcar (sacarose) não têm relevância biológica e são metabolizados pelo organismo.

O animal vacinado que possui o estado geral afetado por imunossupressão ou concomitância com outra doença pode não ter uma resposta imune normal à vacina. As deleções dentro do genoma não aumentam a susceptibilidade à imunossupressão.

O organismo vacinal não integra seu genoma no DNA do genoma do hospedeiro. Os vírus BVDV-1 e BVDV-2 pertencem à família *Flaviviridae*, e são compostos por uma fita única de RNA com orientação positiva. A replicação do genoma viral ocorre no citoplasma das células infectadas. O ciclo de vida não inclui a intermediação do DNA e os vírus não codificam ou expressam a transcriptase reversa. Portanto, a recombinação no DNA da célula hospedeira não é esperada.

A semente mãe BVD tipo 1 P05022006 BVD e o vírus da semente mãe BVDV tipo 2, ddBVD Tub 2 MSV, lote nº P14022806, 03/15/06 não reverteram à virulência e são seguros para a utilização na produção de vacinas vivas modificadas conforme resultados observados nos estudos “nº 6131-0955-06B-090 - Estudo de segurança de reversão da virulência para o vírus da diarreia viral bovina Tipo 1 vírus semente mãe de dupla deleção” e “nº 6131-0955-06B-034 - Estudo de segurança de reversão da virulência para o vírus da diarreia viral bovina Tipo 2 vírus semente mãe de dupla deleção”. Brevemente, ambos estudos buscavam demonstrar que não houve reversão à virulência do vírus da semente mãe de BVD tipo 1 ou tipo 2 com dupla deleção. Foi utilizado modelo de retropassagem que usa bezerros recém nascidos e que não receberam colostro, sendo livres de vírus ou de anticorpos maternos passados via colostro. Os achados dos estudos demonstraram que não houve reversão à virulência após 2 e 3 retropassagens respectivamente para o BVDV-2 e BVDV-1, não havendo indicações de infecção ativa pelo BVDV.

Estudos realizados em animais prenhes demonstraram que a vacinação do gado leiteiro com uma vacina para BVDV composta de uma cepa de vacina BVDV-1 e outra da BVDV-2 é segura em vacas prenhes e não

prenhes em todos os estágios de prenhez. A vacinação não tem impacto algum sobre o índice de concepção. Com relação à eficácia, devido aos diversos achados, há indicações da ocorrência de proteção do grupo vacinado contra a infecção de campo por BVDV.

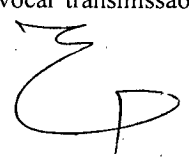
Relativo a infecção persistente por BVDV não foi estabelecida em nenhum dos fetos, e não foi observada influência sobre o desenvolvimento normal do feto e/ou neonatos causada pela vacinação. Não foi ainda observada reação sistêmica ou local grave após tratamento com a vacina. Com base nos resultados de um dos estudos, podemos concluir que a administração de uma superdosagem de dez vezes da vacina com BVDV-1 e BVDV-2 em novilhas prenhas nos dois semestres de gestação é segura.

Não é esperado que a vacina Bovela® cause interferência na eficácia de outras vacinações, entretanto não é recomendável o uso do produto com outras vacinas.

III – Avaliação de riscos - aspectos ambientais e riscos à saúde humana e animal

O BVDV tem baixa capacidade de sobreviver fora do hospedeiro, pois precisam da célula viva para se replicarem. O BVDV foi totalmente inativado dentro do período de 3 semanas à 5°C, dentro de 3 dias a 20°C e dentro de 5 min. à 50°C em esterco bovino e em pH menor que 5,7 e maior que 9,3. Além disso, a radiação solar é capaz de inativar membros do gênero *Flavivirus* em alguns dias. O ciclo deste vírus não possui fase de DNA (não possui transcriptase reversa codificada no seu genoma, pois não é um retrovírus) e as células hospedeiras também não produzem a TR. O único material genético é o RNA, o que não possibilita a recombinação com o DNA hospedeiro. Portanto, o risco de transferência genética do genoma viral para o genoma dos animais vacinados ou qualquer outro animal ou bactérias ambientais e nosocomiais é extremamente baixo.

Estudos clínicos em bovinos com cada cepa da vacina foram realizados, os quais demonstraram que – 1) o início da imunização ocorreu após 3 semanas com 10^4 TCID₅₀ da vacina em gados de 3 meses de idade, 2) a duração da imunidade foi de 12 meses para as duas cepas vacinais, 3) o tempo de detecção dos OGMs nos animais vacinados demonstrou que os vírus estavam presentes em órgãos linfóides até o dia 13 após a vacinação e nos tecidos respiratórios e gastro-intestinais bovinos nos dias 6-9 pós-vacinação, 4) a viremia foi observada entre os dias 6-10 e, no máximo até o dia 14 pós-vacinação, 5) o vírus modificado foi encontrado em traços no leite de vacas vacinadas (entre os dias 6-23 DPV), mas não há transmissão do vírus da vacina pelo leite, pois não houve resposta sorológica positiva em bezerros amamentados com o leite contendo vírus vacinal, 6) não há possibilidade de infecção em seres humanos, uma vez que as células humanas não possuem o receptor viral bovino BVDV denominado CD46, 7) não houve reversão da virulência dos vírus BVDV tipos I e II com as deleções, sendo portanto seguros para produção de vacinas vivas modificadas, 8) as vacinas são seguras em vacas prenhas em todos os estágios e, não apresenta também impacto sobre o índice de concepção, bem como efeitos não ocorreu nenhuma influência sobre o desenvolvimento do feto (não apresentou efeito teratogênico), 9) apesar do relatório mencionar na lista de referências 2 estudos (nºs 2009054 e 2009055) sobre avaliação da duração da proteção fetal, não ficou claro no relato se de fato a Bovela faz proteção transplacentária para o feto; este ponto poderia ter sido mais bem esclarecido, 10) as cepas da vacina viva tipos I e II apresentaram segurança e eficácia em vacinação em gado leiteiro em todos os estágios da prenhez, em gado não prenhe e também em animais com inseminação programada, 11) não houve detecção dos vírus na secreção nasal (que poderia provocar transmissão horizontal para o meio ambiente), sangue, urina, fezes em nenhum momento durante os estudos.



O BVDV é um vírus envelopado e não apresenta estruturas resistentes que possam sobreviver, apresenta baixa capacidade de sobrevivência fora do hospedeiro. A integridade e estabilidade do vírus é fortemente afetada por luz solar (radiação UV), detergentes, temperatura e pH. Tanto o BVDV selvagem como o modificado da vacina Bovela podem ser inativados por alvejantes, álcool e detergentes.

As mutações e deleções presentes nas cepas atenuadas da vacina BVDV-1 e BVDV-2 auxiliam o sistema imunológico desenvolvendo uma resposta adequada para eliminar o vírus. Não há evidências científicas de aumento da capacidade de transmissão do vírus BVDV atenuados para espécies não-alvo.

Monitoramento

Com relação ao plano de monitoramento pós-liberação comercial a CTNBio determina que sejam seguidas as instruções e executadas as ações técnicas de monitoramento constante na Resolução Normativa 09 da CTNBio de 02 de dezembro de 2011.

IV – Conclusão

Os dados da literatura associados aos resultados dos experimentos conduzidos e apresentados pela empresa requerente demonstram que a vacina Bovela não apresenta risco significativo ao meio ambiente, é segura para a saúde humana e para os animais, considerando que:

- 1- os vírus modificados BVDV-1 e BVDV-2 (semente-mãe) não apresentaram reversão da virulência e o fenótipo atenuado é estável;
- 2- o vírus BVDV não é infeccioso para seres humanos, não afeta a saúde humana e não tem potencial de zoonose;
- 3- as cepas das vacinas foram geradas por deleções em 2 genes do genoma viral, N^{pro} e E^{ns} , não contendo nenhuma sequência externa adicional, o que significa que transferência de sequências a não ser do BVDV seria impossível de ocorrer;
- 4- Em adição, uma vez que o genoma do BVDV é constituído apenas por RNA e, o mesmo não possui codificação para a transcriptase reversa, o potencial de transferência genética para genomas de outras espécies é nulo;
- 5- Apesar do desafio requerido para a proteção imunológica, devido à heterogeneidade que existe entre as cepas de BVDV, ambas as vacinas (viva-modificada ou morta) têm se mostrado eficaz para controlar a doença. A vacinação não é 100% efetiva em cada animal individualmente, mas é efetiva em nível de rebanho. Apesar das vacinas mortas serem potencialmente mais seguras do que as vacinas vivas, estas são menos efetivas e requerem “boosters” frequentes (no mínimo 2x/ano).
- 6- O BVDV é um vírus envelopado e não apresenta estruturas resistentes que possam sobreviver, apresenta baixa capacidade de sobrevivência fora do hospedeiro. A integridade e estabilidade do vírus é fortemente afetada por luz solar (radiação UV), detergentes, temperatura e pH. Tanto o BVDV selvagem como o modificado da vacina Bovela podem ser inativados por alvejantes, álcool e detergentes, o que minimiza/elimina a possibilidade de causar danos ambientais.

A CTNBio considera que as informações enviadas atendem ao disposto na Resolução Normativa 05 e é de parecer que o produto é seguro para uso e favorável à liberação da vacina Bovela para utilização comercial. A

CTNBio considera que essa atividade não é potencialmente causadora de significativa degradação do meio ambiente ou de agravos à saúde humana e animal.


Dr. Edivaldo Domingues Velini

Presidente da CTNBio

REFERÊNCIAS:

- 1- Ridpath JF. Immunology of BVDV vaccines. *Biologicals* 41(1):14-9, 2013.
 - 2 - B. Sarikaya, A.K. Azkur & S. Gazyagci. Inactivated Bovine Viral Diarrhea Virus Vaccine Trigger Leucopenia and Lymphopenia on Calves. *Acta Scientiae Veterinariae* 39(4): 994, 2011.
 - 3- Krey T, Himmelreich A, Heimann M, Menge C, Thiel HJ, Maurer K, Rümenapf T. Function of bovine CD46 as a cellular receptor for bovine viral diarrhea virus is determined by complement control protein 1. *J Virol.* 80(8): 3912-22, 2006.
 - 4- Fairbanks, K. Schnackel, J. Chase, C. Evaluation of a Modified Live Virus Type-1a Bovine Viral Diarrhea Virus Vaccine (Singer Strain) against a Type-2 (Strain 890) Challenge. *Veterinary Therapeutics* • Vol. 4, No. 1, 2003
 - 5- DuBois WR, Cooper VL, Duffy JC, et al: A Preliminary Evaluation of the Effect of Vaccination with Modified Live Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) on Detection of BVDV Antigen in Skin Biopsies Using Immunohistochemical Methods. *Bov Pract* 34(2):98-100, 2000
 - 6- Novartis – Bovidec – vacina contendo apenas o vírus BVDV-1, inativado com adjuvante e preservado em tiomersal 0,013% (não protege contra BVDV-2).
 - 7- Estudo nº 2009054: Evaluation of the duration of foetal protection and minimum immunizing dose of a Type-1 and Type-2 BVDV vaccine candidate against virulent Type-1 BVDV challenge 12 month after vaccination, 02/11/2010.
 - 8- Estudo nº 2009055: Evaluation of the duration of foetal protection and minimum immunizing dose of a Type-1 and Type-2 BVDV vaccine candidate against virulent Type-2 BVDV challenge 12 month after vaccination, 04/07/2011
- 