



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE UN VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL MODIFICADO GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/23/22)

Título del ensayo

Estudio de fase III, aleatorizado, ciego para el observador, controlado con placebo, multicéntrico y multinacional para evaluar la eficacia, inmunogenicidad y seguridad de una vacuna contra el virus respiratorio sincicial (VRS) en lactantes y niños pequeños, del promotor Sanofi-Pasteur, Inc.

Características del ensayo clínico

El OMG, RSVΔNS2/Δ1313/I1314L, es una vacuna profiláctica viva atenuada, candidata para prevenir el VRS. Se administrará por vía intranasal (mediante dispositivo intranasal) a los sujetos (lactantes y niños pequeños) que participen en el estudio para evaluar la eficacia, inmunogenicidad y seguridad. Cada participante en el ensayo clínico recibirá 2 dosis de la vacuna en un intervalo de 2 a 3 meses. La duración del estudio será de entre 20 a 21 meses para cada participante.

El ensayo clínico se llevará a cabo en el Hospital Clínico Universitaria de Santiago, el Hospital Universitario de Navarra, el Hospital Quirónsalud Barcelona y el Instituto Hispalense de Pediatría.

Organismo modificado genéticamente

El vector clínico RSVΔNS2/Δ1313/I1314L es una versión viva atenuada de la cepa A2 del VRS parental.

El genoma viral del VRS está constituido por un ácido ribonucleico (ARN) lineal, monocatenario, negativo y no segmentado y el nombre del virus proviene del gran sincitio que se forma cuando las células infectadas se fusionan. El virión está formado por nueve proteínas estructurales y dos proteínas no estructurales. Tres proteínas están asociadas a la nucleocápside, a saber, nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) y polimerasa o proteína grande (L). Las otras cinco proteínas del virus se encuentran dentro de la envoltura y son: proteína de matriz no glicosilada (M), M2 (M2-1 y M2-2), proteína de fusión (F), glicoproteína (G) y proteína hidrófoba corta (SH). Las dos proteínas no estructurales son NS1 y NS2.

La cepa parental A2 del VRS de la vacuna se aisló por primera vez en 1961 de las vías respiratorias bajas de un lactante en Melbourne, Australia. Desde su aislamiento inicial, el VRS A2 se ha establecido como una cepa prototípica del VRS y se ha utilizado ampliamente como plataforma de genética inversa para el desarrollo de la mayoría de las vacunas atenuadas candidatas contra el VRS hasta la fecha, sin embargo, actualmente no se dispone de ninguna vacuna.

Los seres humanos son los huéspedes naturales del VRS y no hay reservorios conocidos de VRS fuera de los huéspedes humanos naturales.

El VRS está presente en todo el mundo y es la causa más frecuente de bronquiolitis y neumonía en lactantes y niños pequeños. Recientemente, el VRS también se ha identificado como un patógeno importante para las personas de edad avanzada.



El VRS se puede propagar a través de la tos o los estornudos de una persona infectada, por la liberación de gotículas contaminadas al ambiente. La transmisión se suele producir cuando estas gotículas entran en contacto con (o se inoculan) en los ojos, la nariz o la boca de otra persona.

El VRS tiene un ciclo de replicación intracitoplasmática y no puede replicarse fuera de un huésped. La infección por el VRS parece ser limitada, ya que éste se replica casi exclusivamente en células ciliadas apicales en el epitelio estratificado de las vías respiratorias. La infección suele estar restringida a las células superficiales del epitelio respiratorio y se transfiere a las secreciones respiratorias a partir de las células epiteliales infectadas de la garganta y la nasofaringe. Al inicio de la enfermedad, el VRS se replica en la nasofaringe del huésped infectado, y su título va disminuyendo con el tiempo durante la recuperación. La infección por VRS puede promover la diseminación de células epiteliales, lo que podría contribuir a la obstrucción de las vías respiratorias pequeñas en los lactantes.

La infección por VRS puede causar diversas enfermedades respiratorias en lactantes y niños pequeños. La mayoría de las veces causa una enfermedad seudogripal, pero también puede causar infecciones de las vías respiratorias inferiores como bronquiolitis y neumonía. La enfermedad grave se produce con mayor frecuencia en lactantes muy pequeños. Además, los niños con cualquiera de las siguientes afecciones subyacentes se consideran de alto riesgo: recién nacidos prematuros, lactantes muy pequeños, especialmente los de 6 meses o menos, niños menores de 2 años con enfermedad pulmonar crónica o cardiopatía congénita, niños con sistemas inmunitarios deprimidos y niños con trastornos neuromusculares, por ejemplo, los que tienen dificultad para tragar o eliminar las secreciones mucosas.

Las personas infectadas por el VRS suelen ser contagiosas durante 3 a 8 días. Sin embargo, algunos lactantes y las personas con sistemas inmunitarios debilitados pueden seguir diseminando el virus incluso tras el cese de los síntomas, durante hasta 4 semanas.

La estacionalidad del VRS varía en todo el mundo. En Europa, las infecciones por el VRS muestran estacionalidad, con una estación promedio que comienza en diciembre, alcanza su punto máximo a principios de febrero y continúa hasta principios de abril, con una amplia variación entre países. Los picos más tempranos se observan en las latitudes del sur, mientras que las del norte tienen una estación más larga.

Modificación genética

El plásmido de ADNc de longitud completa pRSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L se generó mediante mutagénesis dirigida y etapas de clonación de ADN.

El virus vivo atenuado (vector clínico) RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L se rescató mediante electroporación de células Vero con 6 plásmidos de rescate. Los plásmidos fueron: un plásmido que contiene el ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) de longitud completa del vector clínico junto con cuatro plásmidos de apoyo que codifican los genes N, P, M2-1 y P del VRS y el plásmido que codifica la polimerasa de ARN T7. El antigenoma del VRS expresado y las proteínas de apoyo, es decir, N, P, M2-1 y L, se ensamblan en nucleocápsides que inician una infección productiva.

El vector clínico RSVNS2/ Δ 1313/I1314L difiere del VRS A2 parental por la eliminación del gen NS2 y el codón 1313 del gen L y la sustitución de la isoleucina por leucina en la posición 1314. Además, la cadena principal del genoma de la cepa A2 se ha modificado mediante la eliminación de un fragmento



de 112 nucleótidos de la región no codificante en dirección 3' del gen SH y la modificación silenciosa de los últimos codones del marco de lectura abierto del SH.

Evaluación del riesgo.

-Estabilidad

La estabilidad genética *in vitro* del vector clínico se evaluó mediante pases en serie en células Vero. El material se secuenció mediante secuenciación masiva (*high throughput sequencing*, HTS) para evaluar la estabilidad genética y examinar si surgían subpoblaciones de virus mutantes con mutaciones compensatorias durante los pases sucesivos.

Se detectó una única sustitución de nucleótido de una timina (T) a una adenina (A) en una región de baja complejidad cerca de un homopolímero de timina y adenina no codificante. El resto de la secuencia se ajustó a lo esperada.

La estabilidad genética *in vivo* del vector clínico fue evaluada en niños vacunados. La RT-PCR y el análisis de secuencias parciales de aislados de lavado nasal (LN) obtenidos en el pico de excreción de la vacuna de 18 vacunados seronegativos para el VRS confirmaron la presencia de la delección NS2 y las mutaciones Δ 1313 e I1314L.

-Patogenicidad

El vector clínico es una versión viva atenuada de la cepa A2 del VRS. El rango de huéspedes, la especificidad y el tropismo tisular y celular del vector clínico son idénticos al virus original, excepto la sensibilidad a la temperatura del vector clínico que limita su propagación desde las vías respiratorias superiores hasta las vías respiratorias inferiores.

La fuerte atenuación del vector clínico a través de la combinación de modificaciones de Δ NS2 y Δ 1313/I1341L también da lugar a una reducción de la patogenicidad en comparación con el organismo parental. Además, la combinación de las mutaciones atenuadoras Δ NS2 y Δ 1313/I1341L reduce los títulos del virus diseminado tras la inmunización con el vector clínico, lo que reduce la probabilidad de propagación del huésped inicial, pero no hay otros cambios en la vía de transmisión.

Los fenotipos de atenuación de la mutación Δ NS2 y la delección del codón 1313 en el gen de la polimerasa se estabilizaron mediante la sustitución de leucina (L) por isoleucina (I) en el codón 1314, que confiere una sensibilidad moderada a la temperatura, de manera significativa, limita la capacidad de replicación del RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L en las vías respiratorias inferiores y, por lo tanto, garantiza la seguridad. Esta atenuación y seguridad se demostró en primates no humanos y en niños seronegativos al VRS de 6 a 24 meses de edad en los que la vacuna candidata tuvo una baja infectividad y fue bien tolerada, y también a través de la ausencia de diseminación del RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L en niños seropositivos vacunados.

El VRS es un virus con envoltura y, por tanto, muy frágil. El VRS de una persona infectada puede sobrevivir en fómites (como pañuelos de papel, camas, tableros de mesa y juguetes) hasta 6 horas. Además, el VRS puede sobrevivir en piel contaminada (p. ej., las manos) durante un máximo de 25 minutos. No se espera que la capacidad del vector clínico para sobrevivir fuera del huésped difiera del virus parental.



-Recombinación con el virus parental *in vivo*

El VRS no es un virus persistente ni invasivo y, por tanto, es muy poco probable que el virus atenuado RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L se vuelva persistente e invasivo. La recombinación de RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L con otras cepas del virus VRS es improbable. El VRS es un virus de ARN negativo, no segmentado, para el que la recombinación es generalmente infrecuente o incluso inexistente. Al ser un virus no segmentado, el VRS no puede recombinarse a través de un reordenamiento como los virus de la gripe. En este sentido, es muy improbable que RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L recupere el material genético completo de la delección del gen NS2 mediante recombinación. La delección atenuante de sensibilidad a la temperatura del codón 1313 en la polimerasa (L) se estabiliza mediante la sustitución de leucina (L) por isoleucina (I) en el codón 1314.

Los organismos con los que podría producirse la transmisión de material genético por recombinación homóloga en condiciones naturales son los virus pertenecientes al mismo género *Orthopneumovirus*. Los hospedadores humanos vacunados podrían estar infectados con otra cepa del VRS en el momento de la inoculación de la vacuna RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L. Sin embargo, la recombinación homóloga del VRS es un acontecimiento muy infrecuente incluso en condiciones experimentales optimizadas. Por tanto, dados los niveles muy bajos o nulos de recombinación homóloga natural, el riesgo de transferencia genética entre el VRS natural y el RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L es insignificante.

-Biodistribución

Se sabe que el virus del VRS natural tiene predilección en las vías respiratorias y no hay propensión intrínseca a replicación extrapulmonar. El virus de la vacuna, al igual que el virus del VRS natural, carece de propensión a la propagación sistémica, lo que se demostró por la ausencia de viremia en el estudio fundamental de toxicidad de dosis repetidas realizado con macacos cangrejeros.

La cantidad de virus RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L excretado en las secreciones nasales de los vacunados es baja y transitoria y el virus no puede replicarse ni sobrevivir mucho tiempo fuera del huésped.

Un aumento excesivo de la población del RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L en el medio ambiente requeriría una sólida multiplicación del virus en el huésped vacunado y una vía de transmisión muy eficaz de las personas vacunadas a las no inmunizadas.

Teniendo en cuenta la ausencia de replicación y supervivencia fuera de los hospedadores, la atenuación de RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L en el hospedador seronegativo para el VRS, y la ausencia de replicación en el hospedador seropositivo, se puede descartar la posibilidad de un incremento excesivo de la población del RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L en el medio ambiente. Por tanto, la liberación no afecta a ningún ecosistema específico.

La diseminación, la transmisibilidad, la estabilidad genética de la vacuna, así como la inmunogenicidad y la seguridad de la vacuna RSV, se están evaluando en el estudio en curso en lactantes y niños pequeños de 6 a 24 meses.

Está previsto incluir en este estudio una muestra al azar de al menos 100 niños, por parejas o grupo mayor de niños, que vivan en un contexto en el que se maximice la probabilidad de transmisión. El estudio también investigará la transmisión a contactos cercanos *ad hoc*.

Se recogerán frotis nasales antes de cada administración de la vacuna y distintos días después de la primera dosis, así como después de la segunda dosis. Todos los frotis nasales se analizarán con un ensayo qRT-PCR para la vacuna viva atenuada candidata. Paralelamente, se prevé realizar un análisis de placa en algunos frotis nasales seleccionados. La secuenciación por segmentos de las regiones



mutadas se realizará en cualquier virus aislado de la vacuna con resultados de PCR inesperados, así como en cualquier aislado del virus de la vacuna transmitido a los participantes de control.

Se recogerán muestras de sangre para las evaluaciones de inmunogenicidad antes de cada administración de la vacuna y después de la segunda administración en cada grupo. El seguimiento de la seguridad incluye vigilancia inmediata después de la vacunación, recogida de reacciones adversas.

-Manipulación, control y tratamiento de residuos

Se proporcionan instrucciones precisas al personal sanitario para evitar derrames durante la reconstitución, manipulación y administración y para la correcta eliminación del dispositivo de administración intranasal. Se utilizarán guantes como indumentaria de protección.

RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L tiene la misma estructura y propiedades físicas que el VRS parental, que es un virus frágil, con envoltura lipídica, sensible a la falta de humedad, y con un ciclo de replicación intracitoplasmática. Como todos los virus con envoltura, el VRS es sensible a detergentes y disolventes. Al igual que todos los virus, el VRS no se replica ni sobrevive fuera de la célula huésped y es sensible al calor y a la radiación ultravioleta. El RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L, al igual que el VRS parental, es sensible a desinfectantes frecuentes como el etanol al 70 %, a varios detergentes como el desoxicolato sódico al 0,1 %, el dodecilsulfato sódico y el Triton X-100, así como al hipoclorito sódico al 1 %, al formaldehído (formol al 5 %), al glutaraldehído al 2 % y al yodo al 1 %, y se inactiva por calor.

La descontaminación de RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L es como para cualquier otro virus con envoltura. Se contempla la descontaminación por calor o sustancias químicas (lejía, etanol/alcohol isopropílico, detergentes). Se ha demostrado que unos minutos a 100 °C o en contacto con sustancias químicas logran una descontaminación completa. Por tanto, la esterilización en autoclave o la incineración, que son procesos frecuentes de descontaminación, son totalmente aplicables a la vacuna RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L. Todo el material que haya estado en contacto con el OMG se destruirá como residuos biopeligrosos.

Se recogerán muestras en frotis nasales solo si se sospecha una infección por VRS entre los participantes. Si se sospecha que existe infección por VRS cerca del período de vacunación, los frotis podrían contener virus de la vacuna.

Las muestras nasales se manipularán y almacenarán como agentes infecciosos. El personal que manipule estas muestras llevará el equipo de protección personal adecuado, incluyendo guantes y gafas.

No habrá análisis de muestras en los centros de ensayo.

Al tratarse de una vacuna de virus vivos atenuados que se podría transmitir a las personas que estén en contacto con el paciente, el promotor informará por escrito a pacientes o cuidadores de las medidas higiénicas a seguir.

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 3 de noviembre de 2023