



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE VIRUS DEL DENGUE MODIFICADO GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/24/07)

Título del ensayo

Estudio de fase 3, aleatorizado, doble ciego, comparativo con placebo, de uniformidad entre lotes, para evaluar la seguridad, la tolerabilidad y la inmunogenicidad de V181 (vacuna tetravalente frente al dengue rDENVΔ30 [microbios vivos atenuados]) en adultos sanos de 18 a 50 años, del promotor Merck, Sharp & Dohme de España, S.A.

Características del ensayo clínico

El resultado esperado de las modificaciones genéticas realizadas es obtener las cuatro cepas del virus del dengue atenuadas, de forma que su replicación esté reducida y den lugar a niveles bajos de viremia en seres humanos, pero con capacidad de expresión antigénica y de activar una respuesta inmune específica a cada una de las 4 cepas del virus del dengue.

El OMG se administrará a sujetos del estudio por inyección subcutánea.

El ensayo se realizará en el Hospital Universitario Vall d'Hebron, el Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) y Hospital Universitario La Princesa.

Modificación genética

Organismo receptor

Virus del Dengue

- Serotipo DENV1 (Western Pacific)
- Serotipo DENV3 (Slemen 78)
- Serotipo DENV4 (Dominica/81 cepa 814669)

Organismo donante

Virus del dengue serotipo 2 (DENV2)

El virus del dengue es un arbovirus envuelto cuyo material genético es ARN monocatenario positivo. El virus del dengue se replica en el citoplasma. Al tratarse de un virus ARN, no hay ADN intermediario y por tanto no se integra en el ADN de la célula huésped.

Los 4 serotipos del virus del dengue comparten una homología de secuencia del 70-80%. Dentro de un mismo serotipo existe cierta variación genética. Dentro de cada uno de los cuatro serotipos del virus del dengue, los estudios filogenéticos han identificado subtipos genéticos que difieren en la secuencia de nucleótidos hasta en un 12% en el gen de la envoltura (E), que determina la mayoría de las características antigénicas del virus.

La proteína de la envoltura del virus (E) desempeña un papel importante en la adhesión del virus a las células diana y su interacción con una amplia gama de receptores celulares cuya afinidad por la unión del DENV puede ser específica del serotipo.

Organismo modificado genéticamente



El OMG, V181, está compuesto por los 4 serotipos del virus del dengue atenuados (rDENV1Δ30, rDENV2/4Δ30(ME), rDENV3Δ30/31 y rDENV4Δ30).

Cada cepa monovalente del virus incluye una modificación genética del genoma del dengue que consiste en una delección de 30 nucleótidos en la región no codificante 3' (Δ30).

El componente DENV3 tiene una delección adicional de 31 nucleótidos en la región no codificante 3' (Δ30/31).

rDENV2/4Δ30(ME) es un virus quimérico con los genes que codifican para las proteínas pre-M y E de DENV2 insertados en un esqueleto de rDENV4Δ30 atenuado en el que, además de la delección de 30 nucleótidos en la región no codificante 3', se han eliminado los genes que codifican para las proteínas pre-M y E de DENV4.

Evaluación del riesgo

-Patogenicidad

Respecto a la seroprevalencia, aunque se han detectado casos de viajeros que visitan los trópicos y vuelven a la Unión Europea infectados, el virus no es endémico en la Unión Europea. Por este motivo, no hay datos relevantes de seroprevalencia en la UE.

El rango de huéspedes del virus del dengue está restringido a humanos, simios y mosquitos. De las especies que pueden infectarse con el virus del dengue, la enfermedad sintomática manifiesta y las consecuencias graves de la infección se limitan a los humanos.

El virus del dengue se transmite principalmente en humanos a través de las picaduras del mosquito *Aedes aegypti*. Otras especies de mosquitos del género *Aedes*, como *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* y *Aedes scutellaris*, tienen una capacidad limitada para actuar como vectores del dengue. El virus también puede transmitirse de humano a humano a través de transfusiones de sangre contaminada.

Los humanos son infecciosos para los mosquitos unos días antes y después del periodo febril, y los mosquitos se vuelven infecciosos para los humanos entre 8 y 12 días después de la infección.

La carga global del dengue puede relacionarse con la abundancia y la densidad del vector (el mosquito), así como el tamaño y densidad de población del huésped definitivo (humanos). El dengue está muy extendido en los trópicos y en las regiones subtropicales, donde los mosquitos del género *Aedes* son endémicos. La propagación del dengue está influida por las condiciones locales y aumenta con las precipitaciones, la temperatura, la humedad relativa y una rápida urbanización no planificada.

El virus del dengue puede sufrir 2 ciclos diferentes de transmisión y amplificación, selvático y urbano. En el ciclo selvático, el virus pasa por rondas de infección, amplificación y reinfección entre primates no humanos y artrópodos vectores. Se cree que los artrópodos vectores infectados migran entonces de los entornos selváticos e inician el ciclo urbano en el que se producen los ciclos de infección, amplificación y reinfección entre los humanos y las especies vectores.

La circulación del DENV entre humanos y mosquitos se presenta cuando el mosquito se alimenta con la sangre de un individuo infectado por el virus. Así, el mosquito, al ingerir sangre humana infectada favorece la infección de las células epiteliales de su intestino; luego, las partículas virales producidas en estas células son liberadas al hemocele y hacia algunos órganos del mosquito, como las glándulas salivares, las cuales se convierten en órganos reservorios para el virus. La infección en el humano se presenta cuando este mosquito infectado pica nuevamente para alimentarse, liberando saliva y virus.



Después de 4 o 5 días, el paciente desarrolla los síntomas de la enfermedad y se puede detectar el virus en sangre. El DENV infecta predominantemente a monocitos, macrófagos y linfocitos, sin embargo, la infección subclínica del hígado también parece común.

El dengue es una enfermedad febril aguda causada por cuatro serotipos (DENV 1 a 4). El DENV2 es el serotipo que con más frecuencia produce casos severos de la enfermedad.

La infección por el virus del dengue da lugar a un cuadro clínico diverso que va desde una enfermedad febril inaparente o leve, pasando por la fiebre del dengue clásica (FD) caracterizada por fiebre alta, cefalea, dolor articular y muscular, erupción cutánea, linfadenopatía y leucopenia, hasta la fiebre hemorrágica del dengue (FHD)/síndrome del shock por dengue (SSC), potencialmente mortales. El cuadro clínico de FHD y SSC se caracteriza por manifestaciones hemorrágicas que van desde la presencia de petequias y equimosis hasta la hemorragia grave espontánea y el shock profundo que, si no se trata, puede provocar la muerte.

El DENV infecta predominantemente a monocitos, macrófagos y linfocitos, sin embargo, la infección subclínica del hígado también parece común. La infección primaria por DENV provoca la inducción de anticuerpos neutralizantes del virus que son ampliamente reactivos entre sí poco después de la infección, y se vuelven más específicos del tipo con el tiempo (al menos de 6 a 24 meses y más). La infección primaria por el dengue confiere inmunidad duradera contra el serotipo infeccioso, pero sólo protección a corto plazo contra los demás serotipos de dengue. Las formas más graves de la enfermedad se producen con mayor frecuencia tras una infección secundaria por dengue, es decir cuando a la infección por un serotipo del DENV le sigue, tiempo después, una segunda infección por otro serotipo.

Se ha observado que la gravedad de las infecciones secundarias por dengue aumenta con un intervalo más largo entre la primera y la segunda infección. La infección con un segundo tipo de DENV suele dar lugar a respuestas inmunitarias muy robustas y ampliamente reactivas, incluidos anticuerpos neutralizantes del virus de título elevado reactivos frente a los 4 tipos de virus. La enfermedad asociada a una tercera o cuarta infección por DENV sólo se ha descrito en raras ocasiones, lo que sugiere que la mayoría de los individuos están protegidos frente a todos los serotipos del virus tras una infección secundaria.

El OMG V181 contiene virus que se replican con menos eficacia en las personas que las cepas del virus original, lo que da lugar a un fenotipo atenuado. Los estudios del *National Institutes of Health* (NIH) estadounidenses indican que los virus atenuados que componen V181 no se transmiten de una persona a otra a través de los mosquitos. Los estudios experimentales de infección y transmisión en los que se utilizaron virus vacunales y mosquitos vectores han demostrado que el título máximo de virus de todas las cepas de virus vivos atenuados de la vacuna contra el dengue V181 analizadas hasta ahora en personas estuvo al menos 100 veces por debajo del nivel de viremia necesario para la transmisión a los mosquitos. Además, para que el virus de la vacuna se transmita de una persona a otra tendría que producirse la siguiente sucesión de eventos: (1) el sujeto tendría que presentar viremia con un título máximo de virus superior a 10^5 Unidades formadoras de placas (UFP)/ml; (2) el sujeto con viremia tendría que ser picado por un mosquito vector viable en el momento de viremia máxima; (3) este mosquito tendría que vivir durante un período de 10-14 días después de la picadura para ser infeccioso para el virus de la vacuna; (4) el mismo mosquito tendría que picar a otra persona.



Con respecto a los datos de transmisibilidad en mosquitos, se evaluó el componente DENV4 para determinar su transmisibilidad de las personas vacunadas a los mosquitos y su capacidad de crecer en el interior de los mosquitos. Los mosquitos *A. albopictus* ingirieron sangre de personas vacunadas los días en que cabía esperar que tuvieran viremia. No se detectó el virus de la vacuna en ninguno de los mosquitos que ingirieron sangre de esas personas. Los estudios en mosquitos *A. aegypti* demostraron que, en comparación con el virus salvaje, la capacidad de rDENV4 Δ 30 de infectar el intestino medio y diseminarse a otros lugares era limitada. Esta falta de transmisibilidad se atribuyó tanto al bajo nivel de viremia de los sujetos como a la capacidad limitada de rDENV4 Δ 30 de diseminarse desde el intestino medio del mosquito a su cabeza.

La vacuna rDENV1 Δ 30 de los NIH, se evaluó en un experimento preclínico, en el que los mosquitos ingirieron sangre que contenía diluciones seriadas de la suspensión del virus de rDENV1 Δ 30. El virus rDENV1 Δ 30 mostró una baja infectividad. Un mosquito ingiere solo entre 1 y 2 μ l de sangre cada vez que pica, lo que permite suponer que la transmisión del virus de la vacuna a un mosquito es improbable.

También se inoculó la vacuna rDENV2/4 Δ 30(ME) por vía intratorácica en *Toxorhynchites splendens* y se determinó la presencia de virus en la cabeza.

Aunque la vacuna rDENV3 Δ 30/31 no se ha evaluado directamente, DENV3-Sleman/78, el virus original de la estructura se transmite muy mal a los mosquitos.

Se espera que el perfil biológico del vector clínico, incluido el rango de huéspedes, la especificidad de huéspedes y el tropismo tisular o celular, sea idéntico al del virus parental, salvo que los virus que comprenden al vector clínico se repliquen con menos eficacia en seres humanos y mosquitos en comparación con las cepas del virus parental, dando lugar a un fenotipo atenuado.

También se espera que la vía de transmisión sea la misma, pero con menor replicación viral en seres humanos y mosquitos en el caso de la vacuna, y los datos disponibles sugieren que los virus atenuados no se transmitirían eficientemente a través de los mosquitos.

-Estabilidad

Para verificar la estabilidad genética, el promotor llevó a cabo una secuenciación de alto rendimiento. El análisis de secuencias incluye la confirmación de la secuencia de consenso de longitud completa y la evaluación de variantes menores de un solo nucleótido.

-Potencial recombinación y reversión de la atenuación

El dengue salvaje no suele estar presente en regiones no tropicales, como Estados Unidos y Europa, por lo que la probabilidad de coinfección por el dengue salvaje en el momento de la vacunación es muy baja. La recombinación entre un vector de vacuna y un virus salvaje, si se produjera, no debería dar lugar a una estructura más virulenta que el propio virus salvaje. Además, la OMS, en su informe de 2013 sobre la calidad, seguridad y eficacia de las vacunas tetravalentes contra el dengue, señala que el potencial de los recombinantes, en caso de que surgieran, de causar enfermedad o diseminación sería probablemente muy bajo. Por ello, no se recomienda realizar estudios de laboratorio de doble infección entre las cepas vacunales y salvajes porque el valor clínico predictivo de estos estudios sería bajo.

La probabilidad de recombinación no homóloga, entre V181 y otro virus de ARN no relacionado, es considerablemente menor que la de recombinación homóloga entre virus relacionados. El mecanismo de recombinación no homóloga consiste en una unión por escisión o en una unión de fragmentos de



ARN, que generalmente se produce sin replicación o es un requisito para la ARN-polimerasa viral. Rara vez se detectan recombinaciones no homólogas, debido principalmente a que son perjudiciales. Se ha demostrado que son acontecimientos relativamente raros incluso en condiciones experimentales forzadas.

Por último, puede descartarse la transferencia génica horizontal a bacterias. V181 es un virus de ARN y es improbable que contenga secuencias homólogas con bacterias que permitan dicha transferencia.

-Biodistribución y excreción del vector clínico (Shedding)

Rara vez se ha comunicado que la infección por el virus del dengue salvaje cause la diseminación del virus en saliva y orina. Además, estas vías no están implicadas como fuente ambiental de diseminación del dengue. Incluso en caso de diseminación accidental de los OMG en las aguas residuales, no cabe esperar el establecimiento de estos en dicho sistema debido a los bajos volúmenes liberados y a su destrucción con las técnicas de tratamiento de las aguas residuales (p. ej., temperatura, cloración, etc.).

V181 son virus encapsulados. Se sabe que estos virus se inactivan fácilmente mediante la limpieza y desinfección rutinarias de las superficies. La envoltura lipídica puede destruirse fácilmente con alcoholes y se dispone de una gran variedad de desinfectantes comerciales que se ha comprobado que inactivan estos virus. Adicionalmente, el OMG solo será manipulado por el personal autorizado de los centros clínicos, que están formados para actuar en el caso de exposición accidental o en caso de una liberación accidental.

La duración de la excreción de orina y saliva y la viremia se estudiarán en este ensayo.

-Manipulación, control y tratamiento de residuos

El OMG se debe transportar del lugar de almacenamiento a donde se preparará y administrará en un contenedor que se pueda desinfectar (y/o que se pueda esterilizar por autoclave), debidamente etiquetado, impermeable e irrompible.

El personal del estudio involucrado en el almacenamiento, preparación y administración del OMG estará apropiadamente entrenado. Para minimizar la exposición, a todo el personal que maneje el OMG se le requerirá el uso de un equipo de protección personal apropiado, de acuerdo con los procedimientos institucionales establecidos para el manejo de OMG clasificados como organismos BSL1. Se recomienda usar al menos guantes en todo momento durante la preparación y administración del OMG.

La descontaminación de las superficies (incluidos los derrames accidentales de vacunas) debe realizarse con un desinfectante adecuado: la lejía y los desinfectantes fenólicos y a base de amonio cuaternario inactivarán el virus.

Los materiales contaminados se eliminarán de la habitación y se mantendrán en recipientes sellados o en bolsas especiales que estén claramente etiquetadas como desecho médico biopeligroso.

Para reducir al mínimo la diseminación del OMG después de la vacunación, el lugar de inyección se cubrirá con un apósito adecuado (p. ej., un apósito adhesivo o gasa y esparadrapo) que proporcione una barrera física que proteja del contacto directo. El apósito podrá retirarse cuando no haya fugas visibles de líquido a los 30 minutos después de la vacunación. Los apósitos se desecharán en un recipiente de residuos biopeligrosos de acuerdo con los procedimientos del centro.



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 21 de marzo de 2024