

KENTTÄKOEHAKEMUS: MUUNTOGEEENISET MIKRO-ORGANISMIT (GMM)

Rastita ja täytä tarpeelliset kohdat:

- 1 Geenitekniikkalain (377/1995) 17 §:ssä tarkoitettu hakemus tarkoituksellisesta levittämisestä ympäristöön muussa kuin markkinoillesaattamistarkoituksessa

Kokeen tyyppi: Kliininen koe ihmislääkkeellä
 Kliininen koe eläinlääkkeellä
 Muu, millainen?

Kenttäkokeen nimi:

Vaiheen III satunnaistettu, havainnoitsijalta sokkoutettu, lumelääkekontrolloitu, monikansallinen monikeskustutkimus, jossa arvioidaan RSV-rokotteen tehoa, immunogeenisuutta ja turvallisuutta vauvoilla ja pikkulapsilla.

- 2 Hakemukseen sisältyy salassa pidettävää tietoa.

Salassa pidettävät tiedot on koottu erilliseen, selkeästi merkittyyn liitteeseen nro(t): 1 ja 2 eikä mitään salassa pidettäviä tietoja ilmene ilmoituksen/hakemuksen muista osioista.

Hakemuslomakkeen mukana on liitteitä 5 kpl.

Huom!

Geenitekniikan lautakunnalle on tämän hakemuslomakkeen liitteenä lähetettävä aina myös riskinarviointiasiakirja. Riskinarviointi on laadittava sosiaali- ja terveystieteiden ministeriön asetuksen 1105/2019 7 luvun mukaisesti.

Toiminnanharjoittaja laatii lisäksi hakemuksen englanninkielisen tiivistelmän (B-SNIF), joka tehdään sähköisessä EU:n E-Submission Food Chain Platform (ESFC) -järjestelmässä.

Hakemus toimitetaan geenitekniikan lautakunnalle sähköpostitse osoitteeseen gtlk@gov.fi

I TOIMINNANHARJOITTAJA

- 1 Toiminnanharjoittajan nimi
Sanofi Pasteur Inc.
- 2 Toiminnanharjoittajan Y-tunnus (*jos olemassa*):
- 3 Toiminnanharjoittajan postiosoite:
Discovery Drive, Swiftwater, PA 18370-0187, USA
- 5 Vastuuhenkilö(ide)n nimi ja syntymäaika:
 - Linong Zhang
 - Rajamuthu Srinivasan
 - Olubukola IdokoTiedot pätevydestä ja kokemuksesta löytyvät kunkin vastuuhenkilön ansioluettelosta.
- 6 Vastuuhenkilö(ide)n yhteystiedot (*työpaikan postiosoite, puhelinnumero ja s-postiosoite*):
Tiedot pätevydestä ja kokemuksesta löytyvät kunkin vastuuhenkilön ansioluettelosta
- 7 Tiedot vastuuhenkilöiden pätevydestä ja kokemuksesta:
Tiedot pätevydestä ja kokemuksesta löytyvät kunkin vastuuhenkilön ansioluettelosta.
- 8 Verkkolaskutusosoite ja laskutusviite:
invoicesFI@sanofi.com
Toimitamme laskutusviitteen jälkikäteen.
- 9 Laskun vastaanottajan Y-tunnus ja postiosoite, jos muu kuin toiminnanharjoittaja:
1048723-8
Revontulenkujä 1, 02100 ESPOO

II KÄYTETTÄVÄT ORGANISMIT

- 1 Hakemus koskee seuraavaan ryhmään kuuluvaa GMM:ia:

<input type="checkbox"/> Bakteeri	<input type="checkbox"/> Sieni	<input type="checkbox"/> Arkeoni
<input type="checkbox"/> DNA-virus	<input checked="" type="checkbox"/> RNA-virus	<input type="checkbox"/> Viroidi
<input type="checkbox"/> Eläinsoluviljelmä	<input type="checkbox"/> Kasvisoluviljelmä	<input type="checkbox"/> Muu, mikä

HUOM! Osiossa II on tarpeen antaa pyydetyistä tiedoista vain ne, jotka ovat oleellisia kyseessä olevassa tapauksessa. Tietojen yksityiskohtaisuus riippuu ehdotetun kenttäkokeen luonteesta ja laajuudesta.

- 2 **Vastaanottaja**organismien (tai emo-organismien) tieteellinen nimi ja muut nimet (kannan nimi tai koodi), taksonomia, fenotyypiset ja geneettiset markkerit:

Elävän heikennetyn RS-viruksen tuottamiseen käytetty emokanta on A2.

Perhe: Pneumoviridae

Suku: Ortopneumovirus

Laji: RSV

Kannat: A2

RSV-virushiukkaset ovat vaipallisia ja pleomorfisia, ja niitä esiintyy epäsäännöllisinä pallomaisina hiukkasina, joiden halkaisija on 100–350 µm, ja pitkiä filamenttikuituja, joiden halkaisija on 60–200 µm ja pituus 10–200 µm (2). Virioni koostuu yhdeksästä rakenteellisesta proteiinista ja kahdesta ei-rakenteellisesta proteiinista. Kolme proteiineista on nukleokapsidin proteiineja, eli nukleoproteiini (N), fosfoproteiini (P) ja polymeeraasi tai suuri proteiini (L). Muut viisi virusproteiinia, jotka ovat viruksen vaipassa, ovat glykosyloimaton matriisiproteiini (M), M2 (M2-1 ja M2-2), fuusioproteiini (F), glykoproteiini (G) ja lyhyt hydrofobinen proteiini (SH). Kaksi ei-rakenteellista proteiinia ovat NS1 ja NS2. Virusgenomi koostuu lineaarisesta, yksijuosteisesta, negatiivisäikeisestä ei-segmentoidusta RNA:sta (noin 15,2 kiloemästä), ja sen nimi on peräisin infektoituneiden solujen toisiinsa fuusioituessaan muodostamasta suuresta solusitkoksesta eli synsytiumista.

Rokotteen emokanta RSV A2 eristettiin ensimmäisen kerran vuonna 1961 vastasyntyneen alahengitysteistä Melbournessa, Australiassa (3). Alkueristyksensä jälkeen RSV A2 on määritetty RSV-kantojen prototyyppiksi, ja sitä on käytetty laajalti käänteisgeneettisenä alustana useimpien tähän mennessä esiintyvien elävien rokotteiden kehittämiseen (4), mutta yhtäkään näistä rokotteista ei ole tällä hetkellä saatavilla. Lisäksi kanta on RSV-rakenteen tutkimuksen avainjärjestelmä, ja sillä on ollut keskeinen rooli immuunivasteiden selvittämisessä RSV-infektion eläinmalleissa (5).

3 **Vastaanottajaorganismien (tai emo-organismien) tunnistus- ja havaitsemismenetelmien kuvaus sekä menetelmien herkkyys, kvantitatiivinen luotettavuus ja spesifisyys:**

RSV voidaan havaita joko viruksen nukleiinihapoilla, esimerkiksi genomien havaitsemistesteillä, joissa käytetään kvantitatiivista tai tavanomaista käänteistranskriptaasi-polymeeraasiketjureaktiota (RT-PCR) tai replikoitumiskykyistä (kahdentumiskykyistä) virusviljelmää esimerkiksi plakkimäärityksellä. Genomien havaitsemistestit ovat spesifisempiä, ja ne voivat erottaa villityypin (wt) A2:n RSV □ NS2 -rokoterakenteesta, vaikka RT-PCR ei osoitakaan eroa ei-tartunnallisten ja tartuntavaarallisten hiukkasten välillä.

Määrityksen herkkyys määrityksen alarajalla (LLOQ) on 3,71 log₁₀ genomikopiota/ml. LLOQ:n rajamailla oleva laimennustarkkuusanalyysi osoitti, että absoluuttinen ero oli enintään 0,43 log₁₀ kopiota/ml havaittujen ja odotettujen arvojen välillä. Määrityksen sisäisen tarkkuuden keskihajonta on 0,2625 ja välitarkkuus on 0,2959, log₁₀ genomikopiota/ml. Näin ollen määrittäminen on herkkä, luotettava ja spesifinen.

4 **Vastaanottajaorganismien (tai emo-organismien) maantieteellinen levinneisyys ja sen luonnollisen elinympäristön kuvaus, mukaan lukien tiedot luonnollisista saalistajista, saaliista, loisista ja kilpailijoista, symbionteista ja isännistä; organismit, joiden kanssa perintöaineksen siirtymistä tiedetään tapahtuvan luonnollisissa olosuhteissa:**

RSV tunnistettiin uudeksi virukseksi vuonna 1956 viruksen tultua löydettyksi simpanssiyhdyksunnasta siinä puhjetun nuhakuumeinfektion jälkeen (6). Tämän jälkeen eristettiin virus aikuisilta, joiden perheessä oli keuhkokuume- ja bronkioliittioireita osoittavia lapsia. Viruksen osoitettiin olevan serologisesti identtinen vankeudessa eläviä simpanssien hengitysteitä vaivaavan viruksen (7). RSV:tä esiintyy maailmanlaajuisesti, ja se on yleisin vauvoilla ja pikkulapsilla bronkioliittia ja keuhkokuumetta aiheuttava virus. Hiljattain RSV on myös tunnistettu merkittäväksi patogeeneiksi ikääntyneille.

RSV voi levitä, kun tartunnan saanut henkilö yskii tai aivastelee vapauttaen kontaminoituneita pisaroita ilmaan. Tartunta tapahtuu yleensä, kun nämä pisarat tulevat kosketuksiin (ns. inokulaatio) toisen henkilön silmien, nenän tai suun kudosten kanssa (8).

Monissa organismeissa geneettisen materiaalin siirtyminen voi tapahtua homologisen rekombinaation kautta luonnollisissa olosuhteissa ja siten vaikuttaa organismien biologiseen kehitykseen monilla eri tasoilla. Useimmissa negatiivisäikeisissä RNA-viruksissa, mukaan lukien RSV, luonnollinen rekombinaatio näyttää olevan yleensä harvinainen tai jopa puuttuva, vaikka satunnaiset aidot esimerkit osoittavat, että homologinen rekombinaatio on mahdollista (9). RSV:n rekombinaatiotapahtumien tutkimiseksi tehtiin kahden RSV-mutanttiin in vitro -ko-infektio tutkimus. Osoittautui, että RSV-variantti tunnistettiin rekombinoituna RSV-viruksena vain yhdessä kuudesta ko-infektiosta (10). Vain yhden rekombinantin RSV:n eristäminen optimoiduissa kokeellisissa olosuhteissa viittaa siihen, että rekombinaatio on todellakin harvinaista RSV:ssä. Näin ollen on selvää, että luonnollinen rekombinaatio ei aiheuta huolta rokotteen stabiiliudesta ja turvallisuudesta.

- 5 Organismien geneettisen pysyvyyden todentaminen ja pysyvyyteen vaikuttavat tekijät:
- Kaksi mekanismia, jotka voivat vaikuttaa geneettiseen stabiilisuuteen: valintapaineen vaikutuksen alaiset homologinen rekombinaatio ja mutaatiomuutosten kertyminen. Toinen mekanismi, joka voi vaikuttaa geneettiseen stabiilisuuteen, on RNA-virusgenomien virhealtis replikoituminen. Mutaationopeudet vaihtelevat RNA-virusten välillä, vaihteluvälin ollessa 10^{-6} – 10^{-4} per nukleotidikohta per soluinfektio, riippuen RNA-viruksesta ja käytetyistä menetelmistä (11). Pistemutaatiot ovat hyvin harvinaisia RSV A2 -kannassa.
- 6 Siirrettävän geenin **luovuttaja**organismien tieteellinen nimi ja muut nimet (kannan nimi tai koodi), taksonomia, fenotyyppiset ja geneettiset markerit; luovuttaja- ja vastaanottajaorganismien sukulaisuusaste:
- GMO:n genomisessa nukleotidisekvenssissä ei havaittu plasmidi- tai tuntemattomia sekvenssejä (katso kohta II.14).
- 7 **Luovuttaja**organismien (tai emo-organismien) tunnistus- ja havaitsemismenetelmien kuvaus ja menetelmien herkkyys, luotettavuus ja spesifisyys:
- GMO:n genomisessa nukleotidisekvenssissä ei havaittu plasmidi- tai tuntemattomia sekvenssejä (katso kohta II.14).
- 8 **Luovuttaja**organismien maantieteellinen levinneisyys ja sen luonnollisen elinympäristön kuvaus, mukaan lukien tiedot luonnollisista saalistajista, saaliista, loisista ja kilpailijoista, symbionteista ja isännistä; organismit, joiden kanssa perintöaineksen siirtymistä tiedetään tapahtuvan luonnollisissa olosuhteissa:
- GMO:n genomisessa nukleotidisekvenssissä ei havaittu plasmidi- tai tuntemattomia sekvenssejä (katso kohta II.14).
- 9 Seuraavat **vastaanottaja**- ja **luovuttaja**organismien patologiset, ekologiset ja fysiologiset ominaisuudet:
- a) voimassa olevien EU:n säädösten ja määräysten mukainen vaaraluokitus
- RSV on luokiteltu kuuluvaksi riskiryhmään 2 Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivin 2000/54/EY mukaisesti (18. syyskuuta 2000, direktiivi työntekijöiden suojelemisesta vaaroilta, jotka liittyvät biologisille tekijöille altistumiseen työssä) (12).

- b) generaatioaika luonnollisissa ekosysteemeissä sekä suvullinen ja suvuton lisääntymiskierto

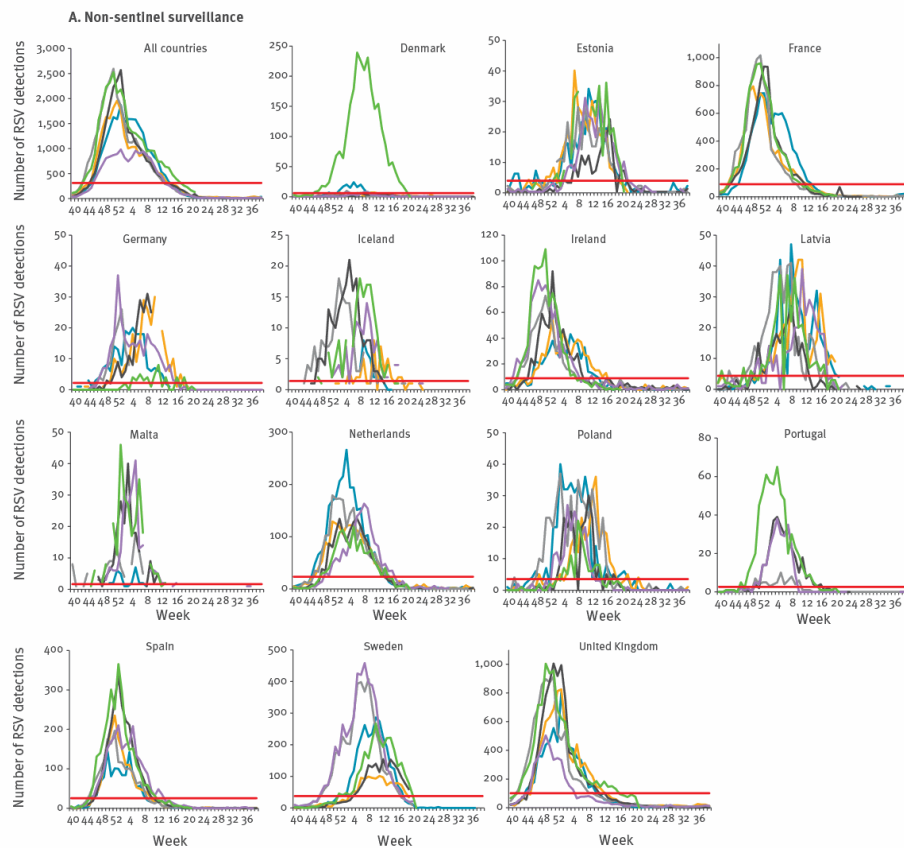
RSV:llä on intrasytoplasmisen replikaatiosykli, eikä se voi replikoitua isäntäeliön ulkopuolella. RSV-infektio näyttää olevan rajoittunut, koska se tartuttaa vain apikaalisia soluja hengitystie-epiteelissä. RSV-infektion saaneet henkilöt ovat yleensä tartuttavia 3–8 päivän ajan. Jotkut pikkulapset ja henkilöt, joiden immuunijärjestelmä on heikentynyt, voivat kuitenkin jatkaa viruksen erittämistä myös jopa oireiden katoamisen jälkeen niinkin pitkään kuin 4 viikkoa.

- c) tiedot elossa säilymisestä, mukaan lukien vuodenaikaisrytmi ja kyky muodostaa säilymismuotoja

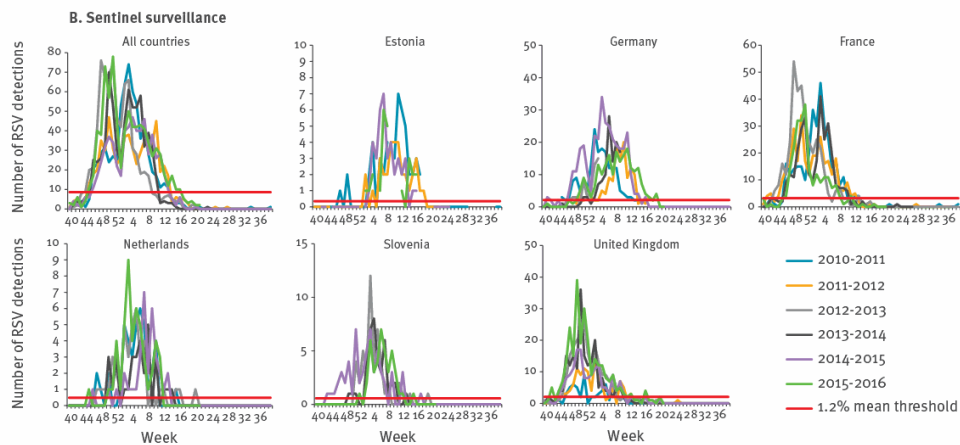
RSV on vaipallinen virus ja siksi se on erittäin helposti tuhoutuva. Infektoituneen henkilön RS-virus voi selvitä välikappaleissa (kuten nenäliinat, sängyt, pöytälevyt ja lelut) enintään 6 tunnin ajan(13). Lisäksi RSV voi selvitä iholla (esim. kädet) enintään 25 minuutin ajan(13, 14).

RSV:n kausiluonteisuus vaihtelee eri puolilla maailmaa. Euroopassa RSV-infektioiden kausi on kausiluonteinen, ja keskimääräinen kausi alkaa joulukuun alussa, on huipussaan helmikuun alussa ja jatkuu huhtikuun alkuun asti, mutta tässä esiintyy suuria eroja maasta riippuen (katso kuva 1 ja kuva 2). Tartunnat saavuttavat huippunsa aikaisemmin eteläisillä leveysasteilla, kun taas pohjoisilla leveysasteilla kausi on pidempi(15).

Kuva 1: ei erityisvalvonnan alaisisten eli ns. ei-sentinellien (n = 14) maiden RSV-havainnot maittain, vuodenajan ja havaintoviikon mukaan, EU/ETA, 2010–2016 (15)



Kuva 2: ei erityisvalvonnan alaisten eli ns. sentinellien (n = 6) maiden RSV-havainnot maittain, vuodenajan ja havaintoviikon mukaan, EU/ETA, 2010–2016 (15)



- d) patogeenisuuteen liittyvät tiedot: infektiivisyys, toksisuus, virulenssi, allergeenisuus, patogeenin kantaja, mahdolliset vektorit sekä isäntäkirjo mukaan lukien myös muut kuin kohdeorganismit, latenttien (pro)virusten mahdollinen aktivoituminen sekä kyky kolonisoida muita organismeja

RSV aiheuttaa sairauksia vain ihmisissä ja simpansseissa.

Terveillä aikuisilla RSV-infektio on usein oireeton tai rajoittuu ylähengitysteihin (upper respiratory tract, URT), ja oireet ovat samanlaisia kuin flunssassa. Vauvoilla ja pikkulapsilla RSV on yleisin alahengitystieinfektioon (lower respiratory tract, LRT) johtava virus, (16) joka aiheutti noin 33 miljoonaa alahengitystiesairaustapausta (low respiratory illness, LRI-tapausta) ja noin 118 000 kuolemaa alle 5-vuotiailla lapsilla vuonna 2015 (17).

Simpansseilla tauti ilmenee flunssana (6).

Kantajavektoria ei ole, infektio voi levitä vain yskän tai aivastusten yhteydessä ilmaan vapautuneiden kontaminoitujen pisaroiden kautta.

- e) antibioottiresistenssi ja kyseisten antibioottien mahdollinen ennaltaehkäisevä/hoidollinen käyttö ihmisillä ja kotieläimillä

Ei sovellu: RSV-virus ei sisällä antibioottiresistenssigeenejä.

- f) osallistuminen ympäristöprosesseihin: perustuotanto, ravintoaineiden kiertokulku, orgaanisten aineiden hajoaminen ja hengitys

Ei sovellu

- 10 Organismissa luonnostaan olevien vektoreiden luonne: sekvenssi, mobilisaatiotaajuus, spesifisyys, resistenssiä aiheuttavien geenien esiintyminen ja aiemmat geenitekniset muuntamiset:

Sekvenssi

Ei sovellu

Liikkumistiheys

Ei sovellu

Spesifisyys

Ei sovellu

Resistenssiä aiheuttavien geenien esiintyminen

Ei sovellu

Aiemmat geneettiset muutokset

A2-genomirunkoa muutettiin poistamalla 112-nukleotidialue SH-geenin alavirran ei-koodaavasta alueesta ja peittyvästi muokkaamalla muutamaa SH:n avoimen lukukehyksen viimeisistä kodoneista, millä parannettiin cDNA:n kasvunaikaista stabiiliutta *Escherichia coli*ssa (18). Mutaatiot suoritettiin tavanomaisilla kloonaustekniikoilla.

11

Muuntamisessa käytetyn **vektorin** ominaisuudet: luonne ja alkuperä; niiden transposonien, vektoreiden ja muiden kuin koodaavien geneettisten elementtien sekvenssi, joita käytetään GMM:n tuottamiseen ja joilla siirretty vektori ja insertti saadaan toimimaan GMM:ssä; siirretyn vektorin mobilisaatiotaajuus ja sen kyky siirtää geneejiä sekä näiden määrittäminen menetelmät; tieto siitä, missä määrin vektorin kokoa on minimoitu:

Δ NS2/ Δ 1313/I1314L-antigenomia koodaava plasmidi rakennettiin emokannan RSV A2 -rangasta tavanomaisilla kloonaustekniikoilla ja virus luotiin käänteisgenetiikkajärjestelmällä(4). Elävä virus ei sisällä sekvenssejä plasmidivektorista.

Vektorin luonne ja lähde

Kokopitkä pRSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L cDNA-plasmidi (1) luotiin kohdassa II.12 kuvatulla tavalla..

Elävän viruksen tuottamiseksi kokopitkästä pRSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L cDNA:sta käänteisgenetiikkamenetelmällä käytettiin neljää RSV N-, P-, L- ja M2-1-proteiineja koodaavia tukiplasmidia sekä yhtä T7-polymeraasia koodaavaa plasmidia (ks. Kohta II.12).

Transposonien, vektorien ja muiden ei-koodattavien geneettisten segmenttien sekvenssi, joita käytetään GMO:n rakentamiseen sekä lisätyn vektorin ja insertiotoiminnon GMO:hon tekemiseen

Elävässä muuntogeenisessä organismissa ei ole vieraita geneettisiä segmenttejä. Yksikään viidestä apuplasmidista tai näiden tuotteista ei esiinny puhdistetussa viruksessa.

Insertoidun vektorin mobilisointitaajuus ja/tai geneettisen materiaalin siirtokyky ja määrittäminen menetelmät

pRSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L-vektorissa ei ole insertioita verrattuna emoplasmidiin D46/6120. Kaikki muutokset, jotka koostuvat kahdesta deleetiosta ja yhden aminohapon mutaatiosta, tarkistettiin DNA-sekvensoinnilla.

Tiedot siitä, missä määrin vektori rajoittuu DNA:han, joka tarvitaan aiotun toiminnon suorittamiseen

Tartuntavaaralliset RNA-transkriptit, jotka on tuotettu RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L-molekyylin tuoton aikana käänteisgenetiikalla koostuvat vain RSV-virussekvensseistä, eivätkä ne sisällä sekvenssejä rakennusvaiheiden aikana käytetyistä molekyylivektoreista (pRSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L tai apuplasmidit).

- 12 Geenitekniinen muuntamismenetelmä/-menetelmät, joilla insertti/insertit on muodostettu ja viety vastaanottajaorganismiin tai joilla sekvenssiä on poistettu; insertin ja vektorin rakenteen kuvaus; insertin sisältämät mahdolliset tuntemattomat sekvenssit ja tiedot insertin koon minimoinnista; muunnettujen/siirrettyjen/poistettujen nukleiinihapposegmenttien sekvenssi, toiminnallinen luonne ja sijainti sekä erityisesti mahdolliset haitallisiksi tiedetyt sekvenssit; selektioon käytetyt menetelmät ja perusteet:

Muunnoksessa käytetyt menetelmät

RSV-sekvenssi, johon RSV-kantaviruslääkeaine RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L perustuu, on johdettu villityyppiin RSV-kannasta A2, joka alun perin eristettiin Melbournessa, Australiassa asuvasta lapsesta vuonna 1961(3).

Rekombinanttirokotekanta luotiin käänteisgenetiikkamenetelmällä infektioautien laboratoriossa (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, Yhdysvallat). Rokotekantaa heikennettiin kolmella mutaatiolla – RSV NS2 -geenin (ei-rakenteellinen proteiini) deleetio, L-geenin (RNA-ohjattu RNA-polymeraasi) kodonin 1313 deleetio ja isoleusiinin korvaaminen leusiinilla L-geenin kodonissa 1314L. Rokotekanta saatiin elektropoimalla Vero-soluja antigenomiplasmidilla Δ NS2/ Δ 1313/I1314L ja neljällä apuplasmidilla pCITE-N, pCITE-P, pCITE-M2.1, pCITE-L ja pT7. Ilmennetty RSV-antigenomi ja tukiproteiinit, ts. N, P, M2-1 ja L kootaan nukleokapsideiksi, jotka käynnistävät virusta tuottavan infektiota.

Yllä luotua rokotevirus-ehdokasta käytettiin kliinisen tutkimusmateriaalin valmistamiseen Charles River Laboratoriesissa (Malvern, PA, Yhdysvallat). Kliininen tutkimus IND015465 on parhaillaan käynnissä Yhdysvalloissa. Sanofi Pasteurille on annettu pääsy tähän muunneltuun viruskantaan yhteistyössä NIH:n (Collaborative Research and Development Agreement [CRADA] -sopimus, kesäkuu 2016) kanssa.

NIH:n virusrokotekanta on peräisin Sanofi Pasteur (SP) -bakteerista käyttämällä käänteisgenetiikkaa. Tämä tehtiin NIH-rokotevirukseen liittyvän kahden rajoituksen ylipääsemiseksi – seerumin käyttö kannan luomisen aikana ja plakkipuhdistuksen puuttuminen.

Virus on johdettu uudelleen Sanofi Pasteurin ilman seerumia viljeltävien Vero-solujen avulla ja menetelmään kuuluu nyt kolme virusplakkipuhdistuskierrosta sikiönaudan seerumiin (Fetal Bovine Serum, FBS) liittyvien riskien vähentämiseksi ja solusubstraatin jäljitettävyyden ja viruskannan homogeenisuuden varmistamiseksi. RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L pelastettiin NIH:n tutkimussuunnitelman perusteella menetelmällä, johon liittyy 6 pelastusplasmidin elektroporaatio Sanofi Pasteurin seerumittomiin Vero-soluihin ja tätä seuraavat kolme virusplakkipuhdistuskierrosta. Puhdistetut plakit amplifioitiin sarjoissa P1, P2 ja P3, jonka tuloksena saatiin RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L:n Pre-Master-kanta (Pre-Master Seed, pre-MSL).

Menetelmät, joita käytetään insertin (inserttien) rakentamiseen ja lisäämiseen vastaanottajaan tai sekvenssin poistamiseen

Kokopitkä pRSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L -cDNA-plasmidi luotiin NIH:n laboratoriossa (Laboratory of Infectious Diseases, Bethesda, Maryland) paikkaohjatun mutageneesin ja DNA-kloonausvaiheiden avulla. Plasmidia D46/6120 käytettiin templaattina paikkaohjatulle mutageneesille(18).

Rokote-ehdokkaan täysimittainen genomi, joka on koodattu plasmidiin D46/6120, eroaa kokopitkästä kanta-A2-viruksen villityypistä sillä, että siitä on poistettu 112 nukleotidia SH-geenin alavirran ei-translatoitavasta alueesta, ja että SH:n avoimen lukukehyyksen alavirtapäähän on lisätty viisi translaation suhteen peittyvää nukleotidimuutosta(18).

Tämä deleetio ja nämä peittyvät (aminohappotasolla) muutokset tehtiin cDNA:n stabiloimiseksi bakteerissa kasvatuksen aikana. Tärkeää on, että ne eivät vaikuttaneet merkittävästi virusfenotyyppiin soluviljelmässä tai hiirissä. Ensimmäisenä pRSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L:n luontivaiheena poistettiin L-geenin kodoni 1313 poistettiin plasmidissa D46/6120 paikkaohjatulla mutageneesillä, millä saatiin versio D46/6120 Δ 1313.

NS2-geeni poistettiin käyttämällä 2652 emäsparin (bp) pituista EagI/AvrII-restriktiofragmenttia (joka sisältää 1 044 bp kloonausvektorista ja alkupäästä, NS1:n ja osan NS1-geeniä), joka saatiin aiemmin kuvatusta RSV Δ NS2:ta koodaavasta cDNA:sta (19), ja sitä käytettiin korvaamaan eagI/AvrII-fragmentti, joka sisälsi alkupään, NS1:n, NS2:n ja osan N-geeniä D46/6120 Δ 1313:ssa, jolloin saatiin D46/6120 Δ NS2 Δ 1313. Lopuksi I1314L-mutaatio (ATA CTG:ksi) introdusoitiin D46/6120 Δ NS2 Δ 1313:een paikkaohjatun mutageneesin avulla parantamaan tämän rokotteen geneettisen stabiiliutta, minkä tuloksen saatiin kokopitkä pRSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L-cDNA-plasmidi

Insertin puhtaus mistä tahansa tuntemattomasta sekvenssistä ja tiedot siitä, missä määrin lisätty sekvenssi rajoittuu DNA:han, jota tarvitaan aiotun toiminnon suorittamiseen

Sen varmistamiseksi, ettei RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L sisällä mitään tuntemattomia sekvenssejä, se sekvensoitiin koko mitaltaan automatisoidulla sekvensoinnilla, millä todettiin, että se ei sisällä mitään osaa, jonka tuotetta tai toimintaa ei tunneta (ks. Kohta II.14).

Valintaan käytetyt menetelmät ja kriteerit

NIH:n virusrokotekanta johdettiin uudelleen Sanofi Pasteurilla käyttämällä käänteisgenetiikkaa. Virus johdettiin uudelleen Sanofi Pasteurin seerumittomien Vero-solujen avulla. Pelastettu virus palkkipuhdistettiin 3 kertaa, sitten sarjalla amplifikointeja satiin RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L Pre-Master-kanta (pre-MSL).

Sanofi Pasteurin pre-MSL-erän genomisen nukleotidisekvenssi määritettiin, ja sitä verrattiin NIH:lta saatuun RSV-antigenomiplasmidiin Δ NS2/ Δ 1313/I1314L (ks. Kohta II.14).). pre-MSL:ää käytettiin pääviruskantaerän tuottamiseen, jonka genomisen nukleotidisekvenssi määritettiin myös (ks. Kohta II.14).).

Kyseessä olevan muunnetun/insertoidun/poistetun nukleinihapposegmentin (tai -segmenttien) sekvenssi, toiminnallinen identiteetti ja sijainti erityisesti viitaten mahdollisesti tunnettuihin haitallisiin sekvensseihin

Sanofi Pasteurin pre-MSL:n genomisen nukleotidisekvenssi määritettiin ja sitä verrattiin NIH:lta saatuun RSV-antigenomiplasmidiin pRSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L (ks. taulukko 1).

Tärkeimmät muutokset emo-RSV A2:han nähden ovat NS2-geenin ja kodonin 1313 deleetiot ja isoleusiinin (I) korvaaminen leusiinilla (L) L-geenin kodonin 1314 kohdalla tarkoituksena heikentää virus. Katso tarkempia tietoja kohdasta II.14.

Yhtäkään plasmidia tai tuntemattomia sekvenssejä ei siirretty GMO:hon.

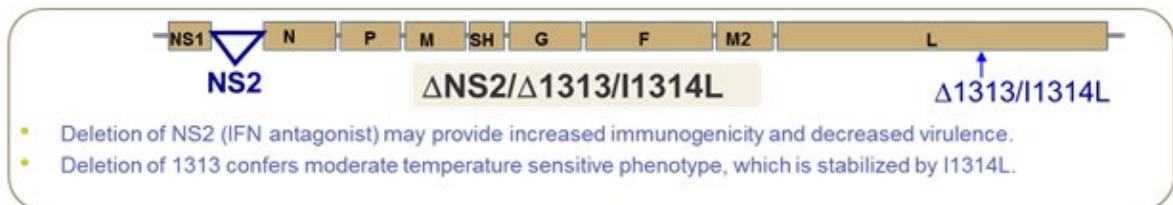
- 14 **Lopullisen muuntogeenisen mikro-organismien (GMM) geneettisten tai fenotyypisten ominaisuuksien kuvaus sekä erityisesti uusien mahdollisesti ilmentyvien tai ei enää ilmentyvien ominaisuuksien kuvaus; GMM:n geneettisten ominaisuuksien pysyvyys:**

Geenipiirteet

Verrattuna villityyppi-RSV:n sekvenssiin (GenBankin rekisteröintinumero M74568), RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L (NIH-ehdokas) sisältää kolme deleetiota (fenotyypisesti peitetty 112 nukleotidin pituinen deleetio SH-geenin ei-koodaavassa sekvenssissä(18), heikentävä 523 nukleotidin mittainen NS2-geenin deleetio (19)(20)(21) ja heikentävä 3 nukleotidin mittainen L-geenin kodonin 1313 deleetio(3), ja 27 nucleotidieroavuutta: 9 peittyvää mutaatiota ei-koodaavilla alueilla, 9 peittyvää mutaatiota koodaavilla alueilla ja 9 koodausmuutosta, jotka ovat fenotyypisesti merkityksellisiä(22).

RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L:n genomirakenne kuvataan 3. NIAID:n (National Institute of Allergy and Infectious Diseases) infektioautien laboratorion (NIH) saadun plasmidin pRSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L genomisekvenssi esitetään liitteessä 1. Taulukossa 1 vertaillaan NIAID:n (National Institute of Allergy and Infectious Diseases) infektioautien laboratorion (NIH) saadun RSV-antigenomiplasmidin Δ NS2/ Δ 1313/I1314L ja Sanofi Pasteurin Pre-Master-kantaerän (pre-MSL-erä) nukleotidisekvenssejä.

Kuva 3: RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L:n genomirakenne



Taulukko 1: RSV:n (NIH) antigenomiplasmidin Δ NS2/ Δ 1313/I1314L ja Sanofi Pasteurin Pre-Master-kantaerän RSV 2018-053 nukleotidisekvenssien vertailu

Alue NIH:n antigenomiplasmidissa Δ NS2/ Δ 1313/I1314L	RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L Sanofi Pasteurin Pre-Master-kantaerä *
Ei-koodaava sekvenssi 3'-alkupäässä	Identtinen
NS1	Identtinen
NS2	Geeni poistettu NIAID-antigenomiplasmidin mukaisesti
N	Identtinen
P	Identtinen
M	Identtinen
SH	Identtinen
G	Identtinen
F	Identtinen
M2-1	Identtinen

M2-2	Identtinen
L	Identtinen
Δ1313 kohdassa L	Kodoni poistettu NIAID-antigenomiplasmidin mukaisesti
I1314L kohdassa L	Kodoni muunnettu NIAID-antigenomiplasmidin mukaisesti

* RSVΔNS2 pre-MSL RSV2018-053:n sekvenssistä katetaan 99,7 % suurikapasiteettisella sekvennoinnilla

Fenotyyppiset piirteet

RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L on elävä, heikennetty RSV, josta on poistettu NS2-geeni (nukleotidit 577–1098) ja kodoni 1313, ja isoleusiini (I) on korvattu leusiinilla (L) L-geenin kodonissa 1314. RSV:n ei-rakenteellinen proteiini, NS2, estää interferoni α/β :n tuotannon ja estää myös solua muodostamasta antiviraalista tilaa (23).

NS2-geenin deleetio heikentää RSV:tä ja lisää mahdollisesti immunogeenisuutta (24) NS2-proteiinilla on äskettäin osoitettu olevan patogeenisia vaikutuksia, jotka johtavat distaalisten hengitysteiden tukkeutumiseen, ja sen deleetio voi lisätä rokotteen siedettävyyttä. Muut lieventävät mutaatiot tässä rokote-ehdokkaassa suunniteltiin käänteisgeneettisellä menetelmällä parantamaan lämpöherkkien fenotyyppien stabiliteettia (esim. Δ1313/I1314L). L-geenin kodonin 1313 (nukleotidit 12 434–12 436) deleetio (Δ1313) tuotti lämpötilaherkän heikentävän mutaation (kattolämpötila 37 °C). RSV:n, jossa Δ1313, replikoituminen heikkeni noin 50-kertaisesti nenäkuorikoissa ja 200-kertaisesti keuhkoissa verrattuna villityyppiin RSV:hen (25). Tämä mutaatio oli altis sekundaarisen kohdan kompensoivalle mutaatiolle kodonissa 1314, mutta tämä stabiloitiin I1314L-mutaatiolla (kodoni ATA muutettiin CTG:ksi, nukleotidit 12 437–12 439)(1). Pelkästään NS2:n deleetio vähensi RSV:n replikoitumista puuvillarotilla 100-kertaisesti (20). Yhdistettyinä ΔNS2 ja Δ1313 heikensivät replikoitumista hiirillä havaitsemistason alapuolelle (25) mikä viittaa additiiviseen vaikutukseen.

Organismin stabiilisuus geneettisten ominaisuuksien osalta In vitro -tutkimukset

Geneettinen stabiilisuus

RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L:n pre-Master-kannan (P3) geneettinen stabiilisuus arvioitiin pasasoimalla se peräkkäin enintään viisi kertaa ilman seerumia viljellyissä SP:n Vero-soluissa (pasasointi 8). Kussakin pasasoinnissa infektoitiin ilman seerumia T225-maljoissa viljeltyjä SP:n Vero-soluja RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L:llä infektion monikerralla (multiplicity of infection, MOI) 0,01 ja inkuboitiin 32 °C:ssa 5 päivän ajan, ja elatusliuos vaihdettiin päivänä 3. Infektoituneet solut yhdessä elatusaineessa olevien virusten kanssa kerättiin ja jäädytettiin. Sulatuksen jälkeen kerätyt virukset sekoitettiin HSG-puskuriin, jaettiin määräosiin ja jäädytettiin. Tätä käytettiin seuraavan pasasoinnin aikana. Kunkin pasasoinnin välillä virustitteri mitattiin vastaamaan viidestä erillisestä pullosta saadun tuloksen keskimäärää, jotta varmistettiin MOI = 0,01 kullakin pasasoinnilla.

RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L:n geneettinen stabiilisuus arvioitiin sekvensoimalla pre-MSL ja pasasoinnin nro 8 virus (pre-Master-kanta 5 pasasoinnin jälkeen) suurikapasiteettisella sekvennoinnilla (high-throughput sequencing, HTS) ja tutkimalla ilmenikö sarjoittaisten pasasointien aikana kompensoivia mutaatioita kantavia virusalapopulaatioita kynnysarvolla 5 %. 99,7 % täysimittaisesta genomista sekvensoitiin, ja sekä pre-MSL-että P8-virusten sekvenssi oli odotetun mukainen.

Pasasointien 3 ja 8 pre-MSL:n geneettisen stabiilisuuden arvioinnissa käytetty RSV-viitesekvenssi perustuu yllä esitetyn suunnitellun plasmidin odotettuun sekvenssiin. Alkuperäinen RSV-sekvenssin sisältävä NIH-plasmidi on peräisin NIH:lta. Tämä viitesekvenssi sisältää suunnitellun deleetion $\Delta 1313$ ja mutaation I1314L:ssä.

Geneettisen stabiilisuutta koskevan tutkimuksen tulokset esitetään alla:

Taulukko 2: Pre-Master-kannan sarjoittainen kasvatus

Peräkkäinen pasasointi	Pasasoinnin taso	HTS-sekvensointi
Pre-Master-kanta (P3)	Pre-master-taso	Sekvenssi odotetun mukainen
Pre-Master-kanta+1 (P4)	Master-kantataso	Ei oleellinen
Pre-Master-kanta+2 (P5)	Tuotetaso (vaihe I)	Ei oleellinen
Pre-Master-kanta+3 (P6)	Tuotetaso + 1	Ei oleellinen
Pre-Master-kanta+4 (P7)	Tuotetaso + 2	Ei oleellinen
Pre-Master-kanta+5 (P8)	Tuotetaso + 3	Sekvenssi odotetun mukainen

Taulukossa 2 esitetyt pre-MSL:n geenistabiiliteettia koskevat tulokset pasasointien 3 ja 8 kohdalla raportoidaan ”sekvenssi odotetun mukainen”. Selvytyksen vuoksi, koodausalue vastaa odotettua sekvenssiä, jossa NS2:n deleetio ja suunniteltu deleetio $\Delta 1313$, mutaatio kohdassa I1314L.

RSV-genomin sekvensointi

RSV $\Delta NS2/\Delta 1313/I1314L$ -viruksessa olevan RSV-genomin sekvensoinnilla seurataan mahdollisia variantteja, joita saattaa ilmetä rokotteen eri tuotantovaiheissa. RSV-genomin sekvensointi korkean suoritustehon sekvensoinnilla (HTS) mahdollistaa koko genomin arvioinnin ilman vääristymää kohti olemassa olevia variantteja. HTS-sekvensoinnilla voidaan tuottaa miljoonia sekvenssejä rinnakkain ja arvioida kunkin nukleotidin sijaintia laajalla peittoalueella. Sisäinen laskentatyökalu on kehitetty erityisesti vertaamaan HTS-dataa odotettuun RSV-genominsekvenssiin, jotta voidaan havaita yli 10 %:lla kynnyksarvon ylittävät variantit. Kaikki variantit arvioidaan tarkemmin varianttien varmentamiseksi ja vahvistamiseksi.

Master-kantaerän (MSL) genomisekvensoinnin ja lääkeaine (Drug Substance, DS) -erien tulokset esitetään taulukossa 3. MSL- ja DS-erien genomin sekvenssien vertailussa käytetty viitesekvenssi perustuu sekvenssiin, joka saatiin, kun RSV $\Delta NS2/\Delta 1313/I1314L$ Pre-MSL sekvensoitiin. Tämä viitesekvenssi sisältää suunnitellun deleetion $\Delta 1313$ ja mutaation I1314L:ssä. NS2:n deleetio ja suunniteltu deleetio $\Delta 1313$, mutaatio kohdassa I1314L vastaavat odotettua sekvenssiä.

Taulukko 3: RSV $\Delta NS2/\Delta 1313/I1314L$ -genomin sekvensointitulokset

Lopullinen MSL-kantaerä	Lääkeaineen kehityserä	Lääkeaineen kliininen (cGMP) erä (vaihe ½)
Ei havaittuja variantteja	Ei havaittuja variantteja	Ei havaittuja variantteja

MSL 1.0 luotiin tukemaan vaiheen I/II kliinisten tutkimusten materiaaleja ja uusi MSL (2.0) luotiin tukemaan vaihetta 3 ja kaupallista lanseerausta. Valmistusmenetelmä MSL:lle, jota käytetään vaiheen I/II2 kliinisten tutkimusten materiaalien tuottamiseen ja valmistusmenetelmä MSL:lle, jota käytetään vaiheen 3 tarpeisiin poikkeavat kaupallisesta valmistuksesta vain yhdessä vaiheessa eli suuren määrän jäädytys-

/sulatusvaiheessa, joka on poistettu uuden MSL:n kohdalla. Jäädytys-sulatusvaiheen poistamisella ei odoteta olevan vaikutusta viruksen geneettiseen stabiilisuuteen, koska tämä ei ole vaihe, joka mahdollistaa viruksen replikoitumisen, ja näin ollen muutoksia ei voi tapahtua nukleotidisekvenssissä. Muita eroja ei näiden kahden MSL-valmistusprosessin välillä ole. Prosessivalidointia/kaupallista lanseerausta varten käyttökantaerä (working seed lot, WSL) on skaalattava vastaamaan tuotannon vaatimuksia.

Vaihetta ½ tukeva MSL, vaihetta 3, tukeva MSL, ISL (tarvittaessa), WSL ja vaiheen 3 DS-erä testataan virusvarianttien ilmentymisen varalta seuraavilla menetelmillä:

- Geenitestaus HTS-sekvensoinnilla > 5 %:lla populaatiosta esiintyvien varianttien havaitsemiseksi
- Fenotyyppitestaus plakkikoolla, infektiivisyydellä Vero-soluissa ja ihmissoluissa (CCID₅₀) ja viruksen infektiivisyydellä eri lämpötiloissa. Ne vahvistavat MSL- ja DS-vaiheissa tuotetun viruksen heikennetyn fenotyypin.

Parhaillaan on kehitteillä uusi geneettisen stabiilisuuden strategia vaiheen 3 ja kaupallisen valmistuksen tueksi. Tähän strategiaan sisältyy vähimmillään, alkaen MSL:stä ja kattaen DS:n raakavirussadon jälkeisten pasaasien testaaminen varianttien syntymisen varalta käyttäen sekä geneettisiä (HTS) että fenotyyppisiä menetelmillä..

In vivo -tutkimukset

Ihmisillä:

NIH arvioi RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L:n geneettistä stabiilisuutta lapsilla RSV. Nenähuuhtelu (nasal wash, NW) -isolaateista 18 RSV-seronegatiivisen rokotteen aiheuttaman erityksen ollessa huipussaan tehty RT-PCR- ja osasekvenssianalyysi vahvistivat NS2-deletion ja Δ1313- ja I1314L-mutaatioiden esiintymisen (26). Lyhyesti, heikentävien osien läsnäolon ja geneettisen stabiilisuuden varmistamiseksi saatiin virus-RNA:ta yhdestä NW-huuhteeseen pasasoinnista Vero-soluissa. NS2-geenin deleetio varmennettiin agarosigeelielektrofooresilla, mikä vahvisti deleetion kattavan 855 emäsparin RT-PCR-amplikonin. Deleetio 1313 ja I1314L-mutaatio vahvistettiin sekvenssianalyysillä, jossa käytettiin L-geenin 758 emäsparin PCR-fragmenttia.

15 GMM:n lopulliseen rakenteeseen jäävän vektori- ja luovuttajaorganismien nukleinihapon rakenne ja määrä:

Ei sovellu: GMO:n genomisessa nukleotidisekvenssissä ei havaittu plasmidi- tai tuntemattomia sekvenssejä (ks. Kohta II.14.).

16 Uuden perintöaineksen ilmentymisnopeus ja -taso, mittausmenetelmä ja -herkkyys; ilmentyneen proteiinin/proteiinien aktiivisuus:

Uuden geneettisen materiaalin ilmentymisnopeus ja taso, mittausmenetelmän herkkyys

Uuden geneettisen materiaalin (RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L) ilmentymistä voidaan arvioida havaitsemalla infektiokykyisiä viruspartikkeleita. Tuotetun viruksen määrä on suoraan yhteydessä uuden geneettisen materiaalin ilmentymiseen.

Sanofi Pasteurilla käytettävä määrittäminen, jolla mitataan infektiokykyisen RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L:n määrä on Vero-solujen titraus (ks. Kohta II.17).

RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L:n määrää seurataan kullakin pasasoinnilla tuotantoprosessin aikana kohdassa II.14 kuvatulla tavalla.

Ilmennetyn proteiinin (proteiinien) aktiivisuus

RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L on elävä, heikennetty, lämpötilaherkkä rokote. Pääasiassa F- ja G-geenien (27) (28) (koodaamat virusproteiinit, joita ilmennetään, sisältävät antigeenideterminantteja neutralointia varten. Näin ollen nämä proteiinit toimivat immunogeeninä ja niiden ilmentyminen RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L-viruksen kautta saa aikaan suojaavan immuunivasteen villityyppi-RSV:tä vastaan.

- 17 Tunnistus- ja havaitsemismenetelmien kuvaus mukaan lukien siirretyn sekvenssin ja vektorin tunnistus- ja havaitsemismenetelmät; menetelmien herkkyys, luotettavuus kvantitatiivisesti mitattuna sekä spesifisyys:

Kuvaus tunnistus- ja havaitsemistekniikoista, mukaan lukien tekniikat, joilla tunnistetaan ja havaitaan insertoitu sekvenssi ja vektori

RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L -rokote-ehdokas voidaan tunnistaa virusnukleiinihappojen perusteella esimerkiksi genomien havaitsevalla kvantitatiivisella PCR-menetelmällä, ja tunnistaa heikennetyn fenotyypin perusteella *in vitro* -testillä. Se voidaan havaita myös replikaatiokykyisten virusten perusteella virusviljelmällä, esimerkiksi viruksen infektiivisyyden eri lämpötiloissa perusteella (plakkimääritys). PCR-menetelmä on spesifisempi, koska se vahvistaa RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L -rokote-ehdokkaan kodonin 1313 deleetion ja isoleusiinin (ATA) korvaamisen leusiinilla (CTG) kodonissa 1314. *In vitro* -testi heikennetyille fenotyypille ja virustartunnan testaus eri lämpötiloissa (plakkimääritys) voivat erottaa RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L -rokote-ehdokkaan villityyppi-RSV:stä.

Jäljempänä kuvataan PCR-menetelmää käyttävä tunnistaminen, *in vitro* -testi heikennetyille fenotyypille ja viruksen infektiivisyyden testaus eri lämpötiloissa (plakkimääritys).

Tunnistaminen (qRT-PCR)

Viruksen erittymisen kvantifioimiseksi (RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L-ehdokas) kehitettiin qRT-PCR-määritys, joka erityisesti havaitsisi ja kvantifioisi RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L:n nenästä otettavista vanupuikkonäytteistä. NS2-geenin deleetion lisäksi RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L:n ja villityyppi-RSV A2:n välillä on vielä muutamia muita eroja. Näin ollen RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L:n qRT-PCR-määritys suunniteltiin käyttäen Sigman Light Cycler Probe -järjestelmää. Tämä järjestelmä koostuu kahdesta hybridisaatiokoestimesta, jotka on suunniteltu siten, että ne sitovat kohteen 1–5 nukleotidin päähän toisistaan. Koetin 1 (luovuttaja) on merkitty 3'-päässä luovuttajailmaisimella. Koetin 2 (vastaanottaja) on merkitty 5'-loppupäässä vastaanottajailmaisimella. Yhdistymisvaiheen aikana PCR-alukkeet ja LightCycler-koettimet hybridisoituvat tiettyihin kohdealueisiinsa tuoden koettimet lähelle toisiaan. Kun näin tapahtuu, LightCycler virittää luovuttajaväriaineen ja energia siirtyy luovuttajalta vastaanottajalle. LightCycler havaitsee vastaanottajailmaisimen purkauksen aallonpituudella 640 nm. Jos koettimet sitoutuvat, mutta eivät ole lähekkäin, signaalia ei tuoteta. LightCyclerissa käytetyt koettimet RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L:n qRT-PCR-määritystä varten kohdentuvat RSV Δ NS2:n NS2-geenin deleetiokohtaan. Koetin 1 kiinnittyy deleetiokohtaa edeltävään sekvenssiin ja koetin 2 kiinnittyy itse deleetiokohtaan. Vaikka alukkeet ja anturit saattavat sitoutua villityypin RSV A:an hyvin

samankaltaisen sekvenssin vuoksi, molemmat koettimet eivät kiinnittyisi riittävän lähelle toisiaan signaalin luomiseksi, koska NS2-geeni on yli 500 nukleotidia pitkä, mikä tekee tästä menetelmästä erittäin spesifisen. Jos koettimet eivät ole lähekkäin, kuten ne ovat villityypin RSV:ssä, signaalia ei tuoteta.

***In vitro* -testi heikentyneen fenotyypin testaamiseen**

Tällä testillä voidaan vahvistaa RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L -ehdokkaan heikentävä fenotyyppi. Kaksi maljallista konfluentteja MRC-5-soluja inokuloidaan 25 ml:n testikohteella/malja, ja adsorptiojakson jälkeen siirrosaine poistetaan ja korvataan elatusaineella. Seuraavana päivänä solut irrotetaan TrypLE Selectillä ja siirretään sitten tuoreisiin, konfluentteihin MRC-5-monokerroksiin. Maljoja inkuboidaan 14 päivän ajan, ja havainnot ja elatusaineen vaihto tehdään 6–7 päivän kuluttua.

14 päivän jälkeen viljelyneiteitä inokuloidaan tuoreisiin konfluentteihin MRC-5-soluihin, maljoja inkuboidaan vielä toiset 14 päivää, ja havainnot ja elatusaineen vaihto tehdään 6–7 päivän kuluttua.

Lopulliset havainnot tehdään toisen pasasoinnin päivänä 14 (testin päivänä 29). Kaikki inkubaatiot suoritetaan 36 °C:n lämpötilassa ± 1 °C, 5 %:n ± 2 % hiilidioksidipitoisuudessa. Maljat tarkastetaan silmämääräisesti valomikroskoopilla sytopaattisten vaikutusten (cytopathic effects, CPE) esiintymisen tai puuttumisen varalta monokerroksessa. Testin lopussa testimaljoissa ei saa olla merkkejä viruksen CPE:stä. Kuhunkin analyysiin sisältyy solukontrollimalja, positiivinen kontrollimalja (viljelmä, johon on lisätty 3 x havaitsemisrajan (limit of detection, LOD) verran villityypin RSV:tä) ja matriisikontrolli (testikohde, johon on lisätty 3 x LOD:n verran villityypin RSV:tä). Testin raportoitava arvo on vahvistaa heikentyneen fenotyypin.

Viruksen infektiivisyys eri lämpötiloissa (plakkimääritys)

RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L -ehdokkaan lämpötilaherkkyys todetaan kohtalaiseksi korkeissa lämpötiloissa. Tässä testissä arvioidaan virusten replikoitumista eri lämpötiloissa (esim. 34 °C, 36 °C ja 38 °C) plakkianalyysillä viruksen lämpötilaherkän fenotyypin luonnehtimiseksi. RSV-rokote titrataan 24-kuoppaisiin levyihin, joissa on eri viruslaimennuksin infektioituja Vero-soluja. Viruksen adsorptiota tunnin, kuoppiin lisätään 1-prosenttista metyyliiselluloosaa sisältävää elatusainetta. Kun levyjä on inkuboitu neljä päivää 34 °C:een, 36 °C:een ja 38 °C:een lämpötilassa, Vero-solut fiksoidaan ja immunovärjätään piparjuuriperoksidaasikonjugoidulla, puhdistetulla monoklonaalisella RSV-vasta-aineella (F-glykoproteiini). Plakit visualisoidaan kaupallisesti saatavilla olevalla 3,3',5,5'-tetrametyylilibentsidiini (TMB) -blottausliuoksella, ja automaattinen plakin laskenta suoritetaan kaupallisesti saatavilla olevalla kuvantamisjärjestelmällä. Infektioitiitteri lasketaan ja ilmaistaan muodossa \log_{10} PFU/ml MSL:lle ja DS:lle ja \log_{10} PFU/annos lääketuotteelle.

Sisäinen RSV-kontrolli (RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L) valmistellaan omassa laboratorioissa, säilytetään lämpötilassa ≤ -60 °C, ja sitä käytetään joka kerta, kun plakkimääritys tehdään. Sisäinen kontrolli todettiin päteväksi 30:lla itsenäisellä titrauksella, ja keskimääräinen tiitteri määritettiin. Sisäisen kontrollitiitterin on oltava $\pm 0,5 \log_{10}$ PFU/ml vakiinnutetun tiitterin molemmiin puolin.

Testi on pätevä, jos:

- negatiiviset kontrollikuopat ovat tyydyttäviä

- validiteettikontrollinäytteen tiitteri on $\pm 0,5 \log_{10}$ PFU/ml vakiinnutetun tiitterin molemmin puolin
- raportoitavat arvot määritettävissä vähintään kahdesta laimennuksesta.

Herkkyyks, luotettavuus (kvantitatiivisesti) ja havaitsemis- ja tunnistustekniikoiden spesifisyys

Tunnistaminen (qRT-PCR)

RT-qPCR-testi kehitettiin RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L -genomikopioiden määrän määrittämiseen. Se on RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L -spesifinen, eivätkä muut hengitystiepatogeenit, kuten villityypin RSV A2, vaikuta spesifisyyteen, mikä mahdollistaa eron tekemisen villityypin RSV:n ja Δ NS2/ Δ 1313/I1314L:n välillä. Määrityksen herkkyys määrityksen alarajalla (LLOQ) on $3,71 \log_{10}$ genomikopiota/ml. LLOQ:n rajamailla oleva laimennustarkkuusanalyysi osoitti, että absoluuttinen ero oli enintään $0,43 \log_{10}$ kopiota/ml havaittujen ja odotettujen arvojen välillä.

Määrityksen sisäisen tarkkuuden keskihajonta on 0,2625 ja välitarkkuus on 0,2959, \log_{10} genomikopiota/ml. Näin ollen määrittäminen on herkkä, luotettava ja spesifinen.

In vitro -testi heikentyneen fenotyypin testaamiseen

Testi validoitiin skaalaamalla kahta maljaa per testi edellyttävä testi vain yhteen maljaan per testi. Havaitsemisraja määritettiin virushuipuksi, jossa 6/6 riippumattomasta rinnakkaisnäytteestä havaittiin positiiviseksi. Määritettiin 200 PFU:n havaitsemisraja villityypin RSV A2:lle, jota oli lisätty 25 ml:aan raakasatoa.

Virusen infektiivisyys eri lämpötiloissa (plakkimääritys)

Eri lämpötiloissa suoritettavaa infektiivisyydestä varten inkuboitiin plakkimäärityslevyt 34°C :ssa ja lisäksi 36°C :ssa ja 38°C :ssa. Aluksi plakkimääritys 34°C :ssa osoittautui hyväksyttäväksi. Lineaarisuuden arvioinnilla saatiin $R^2 = 0,9950$, kun useita pitoisuuksia testattiin. Tarkkuus, joka mitattiin useista eri pitoisuuksista saaduista määristä (%), laskettiin $96,08\text{--}101,49\%$:n vaihteluvälinä kullekin ajolle. Välitarkkuudella osoitettiin %CV-arvojen vaihtelevan välillä $3,99\text{--}29,20$, kun ne laskettiin useista formulaatiopitoisuuksista. Kahta muuta lämpötilaa, nimittäin 36°C ja 38°C , käytettiin hyväksi plakkimäärityksen kvalifointiin 34°C :ssa. Jotta voitiin osoittaa kyky erottaa villityypin ja rokotekannasta, titrattiin plakkimääritykseen käytettävät rokotekannan kontrolli ja villityypin RSV A2 -kontrolli lämpötiloissa 34°C , 36°C ja 38°C . Vastaavat tiitterit havaittiin villityypin RSV A2:lle 34°C :ssa ja 36°C :ssa, ja mahdollinen vähäinen tiitterin nousu 38°C :ssa.

Rokotekannan kontrollissa sitä vastoin havaittiin hiukan alentuneita tiitterejä 36°C :ssa verrattuna 34°C :een, ja tiitterin alentuminen arvolla $> 1 \log_{10}$ PFU/ml havaittiin 38°C :ssa verrattuna 34°C :een ja 36°C :seen. Sen vuoksi määrittäminen pidetään herkkänä, luotettavana ja spesifisenä sen käyttötarkoituksen kannalta.

18 Tiedot GMM:n aiemmista levittämistä ja käytöistä:

Tämän raportin laatimishetkeen mennessä RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L:ää on arvioitu NIH:n toimesta suoritettussa vaiheen I ja vaiheen I/II kliinisissä tutkimuksissa, joissa yli 100 vauvaa ja pikkulasta sai RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L (26) (29). Sanofi Pasteurin RSVt-rokotetta on arvioitu 259 vauvalla ja pikkulapsella vaiheen I/II tutkimuksessa (VAD00001 (30), 18 japanilaisella osallistujalla vaiheen I tutkimuksessa (VAD00012), 80 osallistujalla vaiheen II tutkimuksessa (VAD00014 (31) ja yli 4 000 osallistujalla

kahdessa vaiheen III tutkimuksessa (VAD00004 (32) ja VAD00016 (33)). Julkaistussa tutkimuksessa RSV-seronegatiiviset 6–24 kuukauden ikäiset lapset sietivät hyvin RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L:ää sekä matalilla (5,0 log₁₀ PFU) että korkeilla (6,0 log₁₀ PFU) annoksilla. Vaikka replikoiva virus havaittiin nenähuuhteluista (NW) plakkimäärityksellä ja/tai RT-PCR:llä 73 %:lla pienannoksisen ja 90 %:lla suurannoksisen rokotteen saaneista, ylähengitystieinfektioiden, kuumeen, yskän ja välikorvatulehduksen esiintymistiheys oli verrattavissa lumelääkettä saaneisiin kummassakin annosryhmässä. Alahengitystieinfektiota ei esiintynyt rokotettujen joukossa kummallakaan annoksella. Nenän vuotamista esiintyi useammin rokotettujen joukossa kuin lumerokotteen saaneilla, mutta erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Korkean annoksen saaneiden RSV-seropositiivisten 12–59 kuukauden ikäisten lasten nenähuuhteluista ei havaittu replikoivaa virusta plakkimäärityksellä ja/tai RT-PCR:llä, ja ylähengitystieinfektioiden, kuumeen, yskän ja välikorvatulehduksen esiintymistiheys oli saman tasoista kuin lumelääkettä saaneiden joukossa. Alahengitystieinfektiota ei esiintynyt RSV-seropositiivisilla lapsilla, jotka saivat suuren rokoteannoksen.

- 19 GMM:n ja sen aineenvaihduntatuotteiden toksiset tai allergeeniset vaikutukset sekä patogeenisuus (ihmisille/eläimille/kasveille) verrattuna vastaanottaja- ja luovuttajaorganismiin; kolonisaatiokyky:

GMO:iden ja/tai näiden metabolisten tuotteiden toksiset tai allergeeniset vaikutukset

Villityypin RSV hakeutuu huomattavissa määrin hengitysteihin ilman luontaista taipumusta replikoitumiselle keuhkojen ulkopuolella(4). Lisäksi RSV-rokote Δ NS2/ Δ I1313/I1314L rakennettiin rationaalisesti suunnitellulla geenideleetiolla ja mutaatioilla, jotka on tutkittu hyvin näiden heikentävän vaikutuksen ja immunogeenisuuden osalta. RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L:n ei-kliinisen turvallisuustutkimuksen arviointi keskittyy näin ollen hengitysteiden lisäksi systeemiseen toksisuuteen ja sisäelimiin kohdistuvaan affiniteettiin jäljempänä kuvatulla tavalla. Heikentämistä arvioivien in vivo -tutkimusten tulokset esitetään tarkemmin alla.

Heikennystaso on rokotteen kriittinen parametri, sillä RSV-tauti ja reaktogeenisuus ovat suhteessa viruksen replikaatiotasoon. Tähän mennessä arvioiduista koe-eläimistä replikoituu RSV helpoiten lapsuusikäisissä simpansseissa, joiden ruumiinlämpötila on myös sama kuin ihmisillä.

NIH arvioi RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L -rokotteen erittymisen(1). Kaksi simpanssia infektoitiin RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L:n inokulaatioilla intranasaalisesti (IN) tai intratrakeaalisesti (IT) annoksella 106 PFU per kohta. Eläimiä seurattiin kahdesti päivässä kliinisten oireiden varalta. Nenänpesuja suoritettiin päivittäin 12 päivän ajan inokuloinnin jälkeen. Päivinä 2, 4, 6 ja 8 otettiin bronkoalveolaariset huuhtelunäytteet (bronchoalveolar lavage, BAL) ja päivinä 10 ja 12 henkitorven huuhtelunäytteet (tracheal lavage, TL). Viruksen erittymistä hengitysteissä arvioitiin suorittamalla nenähuuhteluita, BAL ja TL. Virustititrit nenähuuhtelusta, BAL-nesteessä ja TL-aspiraateissa saadut virustititrit määritettiin Vero-solujen plakkimäärityksellä 32 °C:een lämpötilassa.

RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L havaittiin yhden eläimen nenähuuhteelussa päivinä 2–8 ja toisen eläimen päivinä 4–8, tiittereiden huippuarvojen ollessa 2,3 log₁₀ PFU/ml ensimmäisessä ja 2,0 log₁₀ PFU/ml toisessa eläimessä. Virus havaittiin eläimen 1 yhdistetyissä BAL/TL-näytteissä päivinä 2, 4 ja 6 ja huippuarvoksi mitattiin 2,9 log₁₀ pfu/ml ja eläimen 2 näytteissä päivinä 2, 4, 6 ja 8, jolloin huippu oli 3,3 log₁₀ pfu/ml. Vaikka villityypin RSV:tä ei sisällytetty vertailtavaksi tutkimukseen, muut tutkimukset

ovat osoittaneet, että kokeellisesti villityypin RSV-annoksella $\sim 4 \log_{10}$ PFU infektoidut eläimet erittivät suuria virusmääriä, ts. 5 ja 6 \log_{10} PFU/ml nenänielunäytteestä ja henkitorven huuhteesta, vastaavasti (34, 35). Tulokset osoittavat, että Δ NS2/ Δ I1313/I1314L on erittäin heikentynyt ja replikoituu matalilla tasoilla vain 5–7 päivän ajan apinamallissa.

Eettiseltä kannalta huomioon otettavien seikkojen vuoksi Institute of Medicine on suosittelut, että simpanssien käyttö RSV-tutkimuksiin keskeytetään. Jaavanmakaki on vakiintunut toksikologian (36) ja RSV-immunogeenisuusmalli (37). Sen vuoksi RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L:n heikentymistä arvioitiin edelleen jaavanmakakeilla SP:n toimesta.

Yhteensä 24 eläintä (noin 50 %:n uros-naaras-jakauma), joilla ei ole ilmeisiä terveysongelmiin viittaavia poikkeavuuksia, olivat testissä seronegatiivisia sitovien RSV-fuusioproteiinin vasta-aineiden suhteen, ja joilla ei ollut lähtötilanteessa RSV-neutraloivia tiitterejä (komplementista riippuvainen PRNT), valittiin mukaan tutkimukseen. Eläimet immunisoitiin intranasaalisesti Δ NS2/ Δ I1313/I1314L-annoksella 1×10^6 PFU. Haittatapahtumia ei kirjattu. Rokotevirus havaittiin qRT-PCR:llä nenästä otettavista vanupuikkonäytteistä ja henkitorven huuhtelunäytteissä huomattavasti alemmilla tasoilla, mikä osoittaa, että RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L:n replikoituminen oli heikentynyt enemmän alahengitysteissä kuin ylähengitysteissä. Viruksia ei havaittu plakkititrauksella NS- tai TL-näytteissä missään eläimessä minään ajankohtana.

RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L:n yleinen toksisuus, paikallinen toleranssi (ylähengitysteiden historiapatologinen arviointi) ja sisäelimiin kohdistuva affiniteetti arvioitiin intranasaalisen annostelun MAD130-laitteella jälkeen keskeisessä GLP-yhteensopivassa toistuvan annoksen toksisuustutkimuksessa.

Näin ollen kahdessa ryhmässä annettiin jaavanmakakeille (*Cynomolgus*) kolme kertaa (päivinä 1, 22 ja 43) intranasaalisesti MAD130-laitetta käyttäen joko RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L -rokote, joka sisälsi $6,9 \log_{10}$ PFU/annos tai suolaliuoskontrolli annoksella 0,1 ml/sierain (kokonaismäärä 0,2 ml). Toksikologinen arviointi sisälsi seuraavat luennat: yleiset kliiniset merkit, paikalliset reaktiot nenäkanavassa, kliininen patologia ja hengitysteiden (mukaan lukien nenä ja nenäkuorikot), imusolmukkeiden ja muiden tärkeiden elinten histopatologinen tutkimus. Tutkimuksessa pyrittiin myös osoittamaan hengitysteihin kohdistuva affiniteetti virus-RNA:n havaitsemisella nenänäytteistä annon jälkeen sekä virus-RNA:n havaitsemisella seeruminäytteistä.

Kuolleisuutta tai sairastavuuteen viittaavia kliinisiä merkkejä ei ilmennyt, antopaikassa ei esiintynyt paikallisia reaktioita, myöskään harmillisia hengitystieoireita tai odottamattomia silmään liittyviä havaintoja ei tehty missään hoitoryhmässä (eikä kontrolliryhmässä) koko tutkimusjakson aikana. Tutkimuksessa hoidettujen eläinten joukossa ei havaittu hoitoon liittyviä muutoksia painossa, peräsuolesta mitatussa lämmössä, hematologiassa, hyytymisessä, seerumin kemiallisissa parametreissa, mukaan lukien CRP:ssä. Elinten painoissa ei havaittu muutoksia eikä rokotteeseen liittyviä makroskooppisia tai mikroskooppisia haitallisia muutoksia havaittu tutkituissa elimissä, mukaan lukien hengitystiet. Lymfaattinen hyperplasia alueellisissa imusolmukkeissa ja lisääntynyt solukkuus pernassa olivat yhdenmukaisia löydöksiä odotetun, rokotteen antamista seuranneen immuunijärjestelmän systeemisen stimulaation kanssa.

Viremiaa pidetään sisäelimiin kohdistuvan affiniteetin biomarkkerina, ja koska intranasaalisesti annetun RSV-rokotteen jälkeen useina ajankohtina kerätyistä

seeruminäytteistä ei löytynyt RSV RNA:aa havaittavilla tasoilla, varmistui systeemisen jakautumisen puuttumisen. Lisäksi rokotteen turvallisuusprofiilin vahvistaa se, ettei rokotteen annon jälkeisissä kliinis-patologisissa turvallisuusmarkkereissa ollut poikkeamia eikä viremiaa ja ettei systeemisistä elimistä löytynyt rokotteeseen liittyviä muutoksia. Nenänäytteiden RSV-RNA:n määrän todettiin qRT-PCR-määrityksellä olevan kvantifiointitason yläpuolelle vain 2 päivää kunkin intranasaalisen annon jälkeen, mikä osoitti RSV:n hengitysteihin kohdistuvan affiniteetin, ja määrä laski asteittain havaitsemisrajan alapuolelle ennen seuraavaa intranasaalista annostelua, mikä varmistaa rokote-ehdokkaan heikentyneen luonteen.

Yhteenvetona voidaan todeta, että kolme jaavanmakakeille intranasaalisesti kolmen viikon välein MAD130-laitteella annettua RSV-rokotetta annostasolla $6,9 \log_{10}$ PFU/annos, joka kattoi aiotun suurimman kliinisen annoksen ($6,2 \log_{10}$ PFU/annos) oli hyvin siedettyjä eivätkä ne aiheuttaneet paikallisia tai systeemisiä haitallisia muutoksia.

Kapasiteetti kolonisaatiota varten

24 kuukauden ikään mennessä lähes kaikki lapset ovat saaneet RSV-tartunnan ja saavat toistuvia tartuntoja elämän aikana. RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L on lämpötilaherkkä, heikennetty rokote-ehdokas, joka NIH:n testaamana RSV-seropositiivisilla tutkittavilla ei aiheuttanut sairautta eikä erittyvää virusta. Vaikka RSV-seronegatiiviset osallistujat erittivät pieniä määriä RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L:ää, kukaan heistä ei sairastunut alahengitysteiden (LRT) sairauksiin, mikä viittaa siihen, että RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L ei pysty replikoitumaan ylähengitysteiden (URT) ulkopuolella, ja se puhdistuu nopeasti isännästä.

20 Jos organismi on patogeeninen immunokompetenteille ihmisille, seuraavat tiedot GMM:stä on ilmoitettava:

- a) aiheutuvat sairaudet ja patogeenisuuden mekanismi mukaan lukien invasiivisuus ja virulenssi

NIH:n vaiheen I kliinisessä tutkimuksessa nenän vuotamista esiintyi useammin RSV-seronegatiivisilla rokotetuilla kuin lumelääkettä saaneilla, mutta nämä erot eivät olleet tilastollisesti merkitseviä. Muita muuntogeenisestä organismista johtuvia tauteja ei havaittu.

- b) tarttuvuus

Rokotetut erittävät RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L:ää alhaisilla tasoilla verrattuna villityypin virukseen, joten tartunta on epätodennäköistä.

- c) infektoiva annos

NIH on käyttänyt kahta annostasoa, eli 10^5 ja 10^6 PFU, 6–18 kuukauden ikäisille pienille lapsille.

- d) isäntäkirjo ja sen muuttumisen mahdollisuus

Isäntäpiiri rajoittuu ihmisiin ja simpansseihin, ks. Kohdat II.9.

- e) elossa säilyminen ihmisisännän ulkopuolella

RSV on hauras, lipidivaippainen virus, joka on herkkä kuivumiselle ja jolla on sytoplasman sisäinen replikaatiosykli. Se ei replikoidu isännän ulkopuolelle, ja sen infektiopotentiali pienenee nopeasti ulkoisessa ympäristössä (ks. Kohta II.9).

f) vektoreiden läsnäolo ja leviämiskeinot

RSV:n levittäytymiseen ei kuulu vektoria. RSV voi levitä, kun tartunnan saanut henkilö yskii tai aivastelee vapauttaen kontaminoituneita pisaroita ilmaan (ks. Kohta II.9).

g) biologinen pysyvyys

GMO:n stabiilisuus geneettisten piirteiden osalta kuvataan kohdassa II.14. RSV:n GMP-erät, jotka sekvensoitiin viiden pre-Master-kannan pasasoinnin jälkeen, eivät osoittaneet mutaatioita eivätkä heikennetyn fenotyypin vaarantumisia.

GMO:n geneettinen stabiilisuus arvioitiin myös *in vivo* -tutkimuksilla kohdassa II.14 kuvatulla tavalla, ja heikentävien mutaatioiden todettiin olevan geneettisesti stabiileja.

In vitro- ja *in vivo* -tutkimusten tulosten mukaan RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L voidaan katsoa biologisesti stabiiliksi.

h) antibioottiresistenssin kuvaus

GMO ei sisällä antibioottiresistenssigeenejä.

i) allergeenisuus

Vaikka allergisen reaktion riski on mahdollinen, kuten minkä tahansa rokotteen yhteydessä, riskin katsotaan olevan pieni prekliinisten tutkimusten perusteella, ks. Kohta II.19.

j) asianmukaisten hoitokeinojen olemassaolo

Ei sovellu

III KOEJÄRJESTELYJÄ KOSKEVAT TIEDOT

HUOM! Osiossa III on tarpeen antaa pyydytyistä tiedoista vain ne, jotka ovat oleellisia kyseessä olevassa tapauksessa. Tietojen yksityiskohtaisuus riippuu ehdotetun kenttäkokeen luonteesta ja laajuudesta.

1 Suunnitellun kenttäkokeen kuvaus mukaan lukien levittämistarkoitus ja markkinoille saatettavaksi tarkoitetut tuotteet:

Vapautuksen tarkoitus on ihmisillä tehtävät kliiniset tutkimukset, joissa tutkitaan RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L:n turvallisuutta, infektiivisyyttä, immunogeenisuutta ja tehoa vauvoilla ja pikkulapsilla RSV-serotilasta riippumatta. RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L -rokote on tarkoitettu käytettäväksi ennaltaehkäisevänä rokotteenä RS-viruksen aiheuttamaa hengitystiesairautta vastaan. Kliinisiä tutkimuksia vauvoilla ja pikkulapsilla edellytetään tukemaan kliinistä kehitystä kohti profylaktista rokotetta, jolla suojellaan vauvoja ja pikkulapsia RS-viruksen aiheuttamalta hengitystiesairaudelta. RSV:n vastaisen rokotuksen tulisi vähentää akuuttien alahengitystieinfektioiden, vakavien RSV-tapausten ja näistä johtuvien lääkarissa käyntien, sairaalahoitojen ja kuolemien määrää.

Kenttäkokeen suunniteltu aloittamis- ja lopettamispäivä ja kokeen aikataulu mukaan lukien kokeen taajuus ja kesto

Tämän hakemuksen kirjoitushetkellä RSVt-rokotetta on annettu yli 10 maassa Yhdysvalloissa, Chilessä, Honduraksessa, Argentiinassa, Kolombiassa, Meksikossa, Puerto Ricossa, Nepalissa, Thaimaassa, Yhdistyneessä kuningaskunnassa, Suomessa ja Espanjassa suoritetuissa kliinisissä tutkimuksissa tutkittaville ja 6–24 kuukauden ikäisille vauvoille ja pikkulapsille, riippumatta aiemmasta altistuksesta villityypin RSV:lle.

RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L -rokotteen antoaikataulu koostuu yhdestä tai kahdesta intranasaalisesta sumukeannostuksesta sierainta kohti, ja jos kaksi annosta annostelu tapahtuu 56 päivän välein. RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L -viruksen huippueritys arvioitiin seitsemän päivän kuluttua kunkin annostelun jälkeen otetusta nenänäytteestä vaiheen I/II VAD00001-tutkimuksessa ja joka 3. tai 4. päivä 21 päivää ensimmäisen rokotteen annostelun jälkeen tutkimuksessa VAD00014.

Tutkimukseen kirjaamisen odotetaan alkavan EU:ssa huhtikuussa 2025 ja päättyvän toukokuuhun 2028 mennessä.

- 3 Koealueen koko ja ennen koetta tehtävä levittämisalueen valmistelu; muut levittämisalueeseen kohdistuvat toimenpiteet:

Tutkimuspaikan valmistelu ennen vapautusta

Nykyisissä kliinisissä tutkimuksissa oletetaan, että tuotteen tai näytteen säilyttämiselle on varattu pakastin tutkimuspaikassa, jos mahdollista, ja se tulee tunnistaa vain tätä tarkoitusta varten. Jos tämä ei ole mahdollista, näytteiden ja tuotteen asianmukainen erillään pitäminen on säilytettävä. Lukollinen pakastin, oveen asennettavalla salvalla varustettu pakastin tai pakastin, joka on suojatussa huoneessa, jotta voidaan

- ehkäistä luvaton pääsy lääkeaineita sisältäviin pakastimiin; pääsy on rajoitettava tutkimuspaikan henkilökuntaan
- varmistaa, että ovi sulkeutuu kunnolla joka kerta, eikä se jää raolleen vahingossa.
- Jos pakastimen lukitseminen on mahdotonta, tulee käyttää rokotteen suojaavaa lukittavaa laatikkoa pakastimen sisällä.

Sanofi Pasteurin kliinisen logistiikan on hyväksyttävä tuotteiden ja preparaattien siirto samassa toimipaikassa sijaitsevien eri sijaintipaikkojen välillä.

Tuotteen siirtoa eri tutkimuspaikkojen välillä (mukaan lukien satelliittitutkimuspaikat) ei suositella, ja se edellyttää Sanofi Pasteurin kliinisen logistiikan ja laadunvarmistusosastojen hyväksyntää.

Kun pakastetut preparaattit lähetetään toiseen paikkaan varastointia, käsittelyä tai testausta varten, ne on pakattava tutkimuskeskuksen nimeämän koulutetun henkilön toimesta. Seerumilähetys lähetetään yleensä ”luokan B” tai ”Muut kuin ihmisnäytteet” - IATA-ohjeistuksen mukaisesti (40)(38).

Kullakin kliinisellä tutkimuspaikalla koulutetaan pätevä henkilöstö antamaan tuotteen kohdassa III.4 kuvatulla tavalla. Muuntogeenistä organismia jakeleva tai annosteleva henkilöstö koulutetaan hyvään kliiniseen käytäntöön, ja sen odotetaan noudattavan toimintakäsikirjaa, soveltuvia paikallisia GMO-määräyksiä ja WHO:n yleisiä varotoimia. Kliinisten tutkimusten tutkimuspaikkojen henkilökunnan odotetaan olevan aikuisia ja

noudattavan toimintaohjekäsikirjassa määritettyjä käyttämättömän tuotteen palauttamis- tai tuhoamisohjeita. Jos rokotteen tai tutkimusintervention sisältävä injektiopullo on rikkoutunut tai se vuotaa, tutkimushenkilökunnan odotetaan noudattavan toimenpidekäsikirjassa määritettyjä puhdistusmenetelmiä.

4 Levittämismenetelmät ja kenttäkokeessa käytettävien GMM:ien määrät:

Vapautuksessa käytettävät menetelmät

Rokote on tarkoitettu valmisteltavaksi ja annosteltavaksi kliinisissä tutkimuksissa koulutettujen ja pätevien sokkouttamattomien kolmannen osapuolen tutkijoiden toimesta. Rokotetta säilytetään tutkimuspaikoilla niille varatuissa -70 °C:n pakastimissa huoneissa, joihin pääsy on rajoitettu. Rokotteen sisältävä jäädytetty injektiopullo on sulatettava huoneenlämmössä vähintään 10 minuutin ajan ennen annostelun valmistelua. Kutakin rokotteen/lumelääkkeen antamista varten toimitetaan kertakäyttöinen MAD Nasal™ 130 -laite yksilöllisesti suljetussa läpinäkyvässä muovipussissa.

Yksilöllisesti suljettu pussi sisältää (i) 1 ml:n vakiomallisen luer-lock-ruiskun, johon on kiinnitetty sininen muovikanyyli, joka on suojattu läpinäkyvällä muovisuojuksella, (ii) yksiosaisen MAD Nasal™ -laitteen (sumutin) valkoisella vaahtomuovikartiolla.

Intranasaalilaitteen käyttöohjeet ovat seuraavat:

- Vaihe 1: Poista kirkas suojakorkki sinisestä injektiopullon läpäisykanyylistä.
- Vaihe 2: Kääntelee sulatetun rokotteen/lumelääkkeen sisältävää injektiopulloa ylösalaisin viisi kertaa. Lävistä injektiopullon kumitulppa sinisellä muovikanyylillä. Vedä ehdokasrokoteformulaatiota lävistyskanyylillä upottamalla kanyyli suoraan alas injektiopullon sisältöön.
- Vaihe 3: Käännä injektiopullo ylösalaisin ja ota tarvittava annosmäärä. Poista kuplat ja aspiroi ruiskulla.
- Vaihe 4: Irrota (kierrä irti) injektiopullon lävistyskanyyli ruiskusta. Hävitä kanyyli terävien esineiden keräysastiaan tai tutkimussuunnitelman ohjeiden mukaisesti. Liitä MAD Nasal™ -laite ruiskuun luer lock -liittimen välityksellä.
- Vaihe 5: Esitäytä MAD Nasal™ -laite painamalla mäntää varovasti ja täyttämällä hitaasti MAD Nasal™ -laitteen tyhjä tila. Lopeta esitäyttö, kun nestetaso on saavuttanut ruiskun tavoiteasteikkomerkin.
- Vaihe 6: Pidä päätä vakaana ja noin 45 asteen kulmassa vapaalla kädellä. Aseta MAD Nasal™ -laitteen kärki juuri sieraimen sisään vaahtomuovikartioon asti. Suihkuta rokote tutkittavan sieraimiin yhdellä liikkeellä. Paina mäntää mahdollisimman nopeasti.

Rokotteen antamisen jälkeiset ohjeet MAD Nasal™ 130 -laitteen hävittämiseen ovat seuraavat:

- MAD Nasal™ 130 -laite on tarkoitettu kertakäyttöön. Älä käytä laitejärjestelmää uudelleen.
- Hävitä valmisteltu laite, jos sitä ei käytetä 6 tunnin kuluessa valmistelusta.
- Valmisteltua preparaattia ei saa pakastaa uudelleen tai käyttää uudelleen.

Kaikki käytetyt ruiskut ja neulat tuhotaan tutkimuspaikalla, erityisissä säiliöissä, kunkin rokotuksen lopussa.

Tutkimusassistentti (Clinical Research Associate, CRA) valvoo osittain käytettyjä ja tyhjiä pakkauksia. Pakkaukset selvine tunnistuneen säilytetään tutkimuspaikalla turvallisessa paikassa, ja CRA hävittää ne tutkimuspaikalla valvonnan päätyttyä kunkin kohortin lopussa. Hävitys dokumentoidaan tutkimuspaikalla.

Jos hävitys tutkimuspaikalla ei ole mahdollista, injektiopullot palautetaan hävitettäväksi toimeksiantajalle tai tarvittaessa kolmannen osapuolen palveluntarjoajalle huoneenlämpötilassa yhdessä CRA:n toimittaman soveltuvan lomakkeen kanssa.

Ennen käyttämättömien ja käyttökelvottomien tuotteiden (vanhentuneet, kylmäketjun katkeaminen) palauttamista vastuuhenkilöt tekevät inventaarion kaikista tutkimusrokotteista ja CRA valvoo tuotevastuullisuutta tutkimusvalmisteen jakelu- ja täsmäytyslomakkeella.

Vapautettavien GMO:iden määrät

Nykyisessä kliinisessä tutkimuksessa (VAD00001) pikkuvauvoille ja pikkulapsille annetaan yksi tai kaksi 0,2 ml:n annosta, joiden PFU on 5,0 log₁₀ tai 6,0 log₁₀ (annos valitaan vaiheen 1/2 jälkeen). Määrät, jotka pääsevät ympäristöön tutkittavista, ovat hyvin pieniä, koska heikennetyn viruksen infektiivisyys on alhainen.

- 5 Toimenpiteet työntekijöiden suojelemiseksi kokeen aikana:
Rokotteen hallintaan, antamiseen ja hävittämiseen osallistuva pätevä henkilö noudattaa Sanofi Pasteurin toimintaohjeita ja soveltuvia paikallisia muuntogeenisiä organismeja koskevia määräyksiä sekä WHO:n yleisiä varotoimia/soveltuvia paikallisia ohjeita.
- 6 Koealueen käsittely tarkoituksellisen levittämisen jälkeen:
Katso kohta III.4.
- 7 Menetelmät, joilla on tarkoitus tuhota tai inaktivoida GMM:t kenttäkokeen päättyessä:
Katso kohta III.4.
- 8 **Tiedot ja tulokset erityisesti eri mittakaavassa ja erilaisissa ekosysteemeissä tehdyistä saman GMM:n aiemmista kenttäkokeista:**
Tämän raportin laatimishetkeen mennessä yli 100 6–59 kuukauden ikäistä tutkittavaa on saanut vähintään yhden RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L -rokotteen, minä tahansa formulaationa, jo päättyneissä tai meneillään olevissa vaiheen I–II kliinisissä tutkimuksissa. Sanofi Pasteurin tutkimuksissa liki 5 000 6–24 kuukauden ikäistä osallistujaa on saanut RSVt-rokotteen enimmäisannosvahvuuksilla 7,2 log₁₀PFU/annos.
Luettelo kaikista päättyneistä ja meneillään olevista tutkimuksista on esitetty alla olevassa [taulukossa 4](#).

Taulukko 2: Yhteenvedo kliinisistä tutkimuksista

Tutkimus-numero	Pää-tavoitteet	Tutkimus-asetelma	Tuote, annokset, antoreitti, tutkimusryhmät	Kirjattujen tutkittavien määrä	Maat (tutkimusjakso)	Tutkimuksen tila
NIH:n sponsoroimat tutkimukset						
CIR 288 (NCT01893554)	Elävää heikennettyä RSV:tä sisältävän rokotteen, ΔNS2/Δ1313/I1314L, tai lumelääkkeen yksittäisannoksen turvallisuus ja immunogeenisuus	Vaiheen 1 satunnaistettu, kaksoissokkoutettu, lumelääkekontrolloitu tutkimus vauvoilla ja pikkulapsilla	NIH ΔNS2/Δ1313/I1314L, 10 ⁵ tai 10 ⁶ PFU ja lumelääke annettiin nenätippoina (0,5 ml); noin 0,25 ml/sierain	<u>Yhteensä: 88</u>	Yhdysvallat	Meneillään, rekrytointi ei käynnissä Osittaista tietoa saatavilla (2)
IMPAACT 2018 (NCT03227029)	Elävää heikennettyä -RSV:tä sisältävien rokotteen ΔNS2/Δ1313/I1314L tai RSV 276 tai lumelääkkeen nenätippoina annetun yksittäisannoksen infektiivisyys, turvallisuus ja immunogeenisuus	Vaiheen 1 satunnaistettu, kaksoissokkoutettu, lumelääkekontrolloitu tutkimus RSV-seronegatiivisillä 6–24 kuukauden ikäisillä lapsilla	NIH ΔNS2/Δ1313/I1314L 10 ⁶ PFU, RSV 276 10 ⁵ PFU ja lumelääke annettiin nenätippoina (0,5 ml); noin 0,25 ml/sierain	<u>Yhteensä: 62</u>	Yhdysvallat	Suoritettu loppuun (4)
IMPAACT 2021 (NCT03916185)	Elävää heikennettyä RSV:tä sisältävien rokotteen tai lumelääkkeen yksittäisannoksen turvallisuus ja immunogeenisuus	Vaiheen 1/2 satunnaistettu, kaksoissokkoutettu, lumelääkekontrolloitu tutkimus RSV-seronegatiivisillä 6–24 kuukauden ikäisillä lapsilla	NIH ΔNS2/Δ1313/I1314L 10 ⁶ PFU, RSV 6120/ΔNS2/1030s 10 ⁵ PFU, RSV 276 10 ⁵ PFU ja lumelääke annettiin yksittäisannoksena nenätippojen muodossa (0,5 ml); noin 0,25 ml/sierain	<u>Yhteensä: 160</u>	Yhdysvallat	Suoritettu loppuun
Sanofin sponsoroimat tutkimukset						

Tutkimus-numero	Pää-tavoitteet	Tutkimus-asetelma	Tuote, annokset, antoreitti, tutkimusryhmät	Kirjattujen tutkittavien määrä	Maat (tutkimusjakso)	Tutkimuksen tila
VAD00001 (NCT04491877)	Nenätippoina annoksen määrittävässä tutkimuksessa annetun RSVt-rokotteen tai lumelääkkeen turvallisuus, immunogeenisuus ja infektiivisyys	Vaiheen 1/2 satunnaistettu, havainnoitsijalta sokkoutettu, lumelääkekontrolloitu annoksen määrittävä monikeskustutkimus kirjaushetkellä 6–18 kuukauden ikäisillä vauvoilla ja lapsilla RSV-serostatuksesta riippumatta	RSVt-rokote, 2 annostasoja vs. lumelääke, intranasaali, 1 tai 2 annostelua (noin 0,1 ml/sierain), 56 päivän välein	<u>Yhteensä: 259</u>	Yhdysvallat, Chile ja Honduras	Suoritettu loppuun
VAD00012	Elävän heikennetyn RSVt-rokotteen turvallisuus ja immunogeenisuus verrattuna lumelääkkeeseen	Vaiheen 1 havainnoitsijalta sokkoutettu, lumelääkekontrolloitu monikeskustutkimus kirjaushetkellä 6 - <24 kuukauden ikäisillä terveillä lapsilla	RSVt-rokote, intranasaali (0,2 ml); noin 0,1 ml/sierain Verrokki: lumelääke	<u>Yhteensä: 18</u> RSVt: 12 Lumelääke: 6	Japani	Suoritettu loppuun
VAD00014 (NCT05687279)	Rokoteviruksen erittyminen, tarttuminen ja geneettinen vakaus sekä elävän heikennetyn RSVt-rokotteen immunogeenisuus ja turvallisuus	Vaiheen 2 satunnaistettu, havainnoitsijalta sokkoutettu, lumelääkekontrolloitu monikeskustutkimus kirjaushetkellä 6 - <24 kuukauden ikäisillä vauvoilla ja lapsilla RSV-serostatuksesta riippumatta	RSVt-rokote vs. lumelääke, intranasaali, 2 annostelua (noin 0,1 ml/sierain), 56 päivän välein Verrokki: lumelääke	<u>Yhteensä: 80</u> RSVt: ~40 Lumelääke: ~40	Yhdysvallat, Puerto Rico	Meneillään
VAD00004 (PEARL) (NCT06252285)	RSVt-rokotteen teho, immunogeenisuus ja turvallisuus	Vaiheen 3 satunnaistettu, havainnoitsijalta sokkoutettu, lumelääkekontrolloitu useassa maassa suoritettava monikeskustutkimus (kirjaushetkellä 6 - <22kuukauden ikäisillä) vauvoilla ja lapsilla	RSVt-rokote vs. lumelääke, intranasaali, 2 annostelua (noin 0,1 ml/sierain), 56 päivän välein Verrokki: lumelääke	<u>Yhteensä: 6 000 (suunniteltu)</u> RSVt: 3 000 (suunniteltu) Lumelääke: 3 000 (suunniteltu)	Pohjoisen ja eteläisen pallonpuoliskon maat	Meneillään
VAD00016 (CORAL) (NCT06397768)	RSVt-rokotteen vasta-aineresponssin yhdenvertaisuus, kun se annetaan samanaikaisesti normaalirokotusohjelmaan kuuluvien rokotusten kanssa, sekä 6 kuukauden iässä	Vaiheen 3 satunnaistettu, yksittäissokkoutettu, lumelääkekontrolloitu monikeskustutkimus terveillä vauvoilla ja lapsilla, jotka ovat	RSVt-rokote vs. lumelääke, intranasaali, 2 annostelua (noin 0,1 ml/sierain), 56 päivän välein Lumelääke	<u>Yhteensä: 2 226 (suunniteltu)</u>	Yhdysvallat, Puerto Rico ja Meksiko	Meneillään

Tutkimus- numero	Pää- tavoitteet	Tutkimus- asetelma	Tuote, annokset, antoreitti, tutkimusryhmät	Kirjattujen tutkittavien määrä	Maat (tutkimusjakso)	Tutkimuksen tila
	<p>(kurkkumätä- ja jäykkäkouristusbakteerien toksiineja sisältävät rokotteet ja soluton hinkuyskärokote, inaktivoitu poliorokote, Haemophilus influenza tyyppi b -konjugaatti- ja hepatiitti B -rokote [Vaxelis® tai Pentacel® ja Recombivax HB®] Prevnar 20® ja RotaTeq®) että 12 kuukauden iässä (M-P-R II, VARIVAX ja Prevnar 20 tai maakohtaisten paikallisten suositusten mukaisesti) verrattuna sen ei-samanaikaiseen antoon</p>	<p>kirjaushetkellä 6 kuukauden ikäisiä kohorttiin 1 ja 12 kuukauden ikäisiä kohorttiin 2 kirjaamista varten</p>	<p><u>6 kuukauden iässä annettavat lastenrokotteet:</u> Vaxelis tai Pentacel ja Recombivax HB, Prevnar 20 ja RotaTeq <u>12 kuukauden iässä annettavat rokotteet:</u> M-P-R II, VARIVAX ja Prevnar 20</p>			

Koealueen/-alueiden koko, maantieteellinen sijainti ja koordinaatit:

Koska rokote on tarkoitettu annettavaksi pisaroina intranasaalisella laitteella, seuraavat vastaanottavat ympäristöt ovat mahdollisia:

1. Ensisijaisena vastaanottavana ympäristönä toimisi tutkimukseen osallistuvan nenä, nenäkuorikot ja nenänielu, jonne anto tapahtuu pisaroina nenäsumuttimen (MAD 130) kautta.
2. Toissijainen vastaanottava ympäristö olisi huone ja kliininen tutkimuspaikka, jossa GMO annostellaan, annetaan ja hävitetään jätteenä. Kaikki tutkimuksessa mukana olevat kliiniset tutkimuspaikat varustettaisiin tartuntavaarallisten aineiden käsittelyä varten, ja toimenpiteet suoritettaisiin noudattaen yleisiä vakiovarotoimenpiteitä (39) ja kaikkia soveltuvia paikallisia määräyksiä.
3. Pääasiallinen reitti, jota kautta GMO voi kulkeutua laajempaan ympäristöön, on vapautuminen rokotetuista tutkimukseen osallistuvista, kun he poistuvat kliinisestä tutkimuspaikasta ja palaavat kotiin. Näin ollen kolmas vastaanottava ympäristö kattaa tutkimukseen osallistujien kodit ja paikat, jossa he käyvät aikana, jolloin GMO replikoituu ja erittyy.

Tutkimuspaikan (-paikkojen) maantieteellinen sijainti ja ruudukkoalue (jos vapautuspaikka (-paikat) osan C mukaisten ilmoitusten mukaan on tuotteen ennakoitu käyttöalue)

Ei sovellu

Fyysinen tai biologinen läheisyys ihmisiin ja muihin merkittäviin eliöihin

Ihmiset ja simpanssi ovat ainoat lajit, jotka ovat luontaisesti RSV- tartunnan kohteita. Vaikka rokotetut tulevat läheiseen biologiseen kosketukseen muiden ihmisten kanssa lähdettyään tutkimuspaikasta ja palattuaan kotiin, GMO:n tarttumisen todennäköisyys katsotaan merkityksettömän alhaiseksi.

Läheisyys merkittäviin biotooppeihin, suojattuihin alueisiin tai juomavesilähteisiin

Ei sovellu

Todennäköisesti vaikutuksen kohteena olevan alueen (alueiden) ilmasto-ominaisuudet

Ei sovellu

Maantieteelliset, geologiset ja pedologiset ominaisuudet

Ei sovellu

Floora ja fauna, mukaan lukien viljelykasvit, karjaeläimet ja vaeltavat ja muuttavat lajit

Ei sovellu

Kuvaus kohde- ja ei-kohde-ekosysteemeistä, joihin GMO todennäköisesti vaikuttaa

Ei sovellu

Vastaanottavan organismin luonnollisen elinympäristön vertaus ehdotettuun vapautuspaikkaan (tai -paikkoihin)

Ei sovellu

Kaikki tiedossa olevat suunnitellut maankäytön muutokset tai muutokset alueella, jotka voivat vaikuttaa vapautuksen ympäristövaikutuksiin

Ei sovellu

- 10 Ihmisten ja muun merkittävän eläimistön/kasviston fysikaalinen tai biologinen läheisyys; merkittävien biotooppien, suojelualueiden tai juomavesivarantojen läheisyys:

Fyysinen tai biologinen läheisyys ihmisiin ja muihin merkittäviin eliöihin

Ihmiset ja simpanssi ovat ainoat lajit, jotka ovat luontaisesti RSV- tartunnan kohteita. Vaikka rokotetut tulevat läheiseen biologiseen kosketukseen muiden ihmisten kanssa lähdettyään tutkimuspaikasta ja palattuaan kotiin, GMO:n tarttumisen todennäköisyys katsotaan merkityksettömän alhaiseksi (ks. kohdat IV.1 ja IV.2).

Läheisyys merkittäviin biotooppeihin, suojattuihin alueisiin tai juomavesilähteisiin

Ei sovellu

- 11 Ilmasto-olosuhteet alueella, johon levittäminen todennäköisesti vaikuttaa; maantieteelliset, geologiset ja maaperään liittyvät ominaisuudet:

Ei sovellu

- 12 Kasvisto ja eläimistö mukaan lukien viljelykasvit, kotieläimet ja muuttavat lajit; levityksen kohteena olevien ja sellaisten muiden ekosysteemien kuvaus, joihin kenttäkoe todennäköisesti vaikuttaa:

Ei sovellu

- 13 Vastaanottajaorganismien luonnollisen elinympäristön ja suunniteltujen levittämialueiden vertailu;

Ei sovellu

- 14 Tiedossa olevat kehittämis- ja muutossuunnitelmat, jotka koskevat levittämialueen maankäyttöä ja jotka voivat vaikuttaa tarkoituksellisen levittämisen ympäristövaikutuksiin:

Ei sovellu

IV GMM:N JA YMPÄRISTÖN VUOROVAIKUTUS

HUOM! Osiossa IV on tarpeen antaa pyydetyistä tiedoista vain ne, jotka ovat oleellisia kyseessä olevassa tapauksessa. Tietojen yksityiskohtaisuus riippuu ehdotetun kenttäkokeen luonteesta ja laajuudesta.

- 1 GMM:n elossasäilymiseen, lisääntymiseen ja leviämiseen vaikuttavat biologiset ominaisuudet; tunnetut tai ennustetut ympäristöolosuhteet, jotka voivat vaikuttaa em. ominaisuuksiin (tuuli, vesi, maaperä, lämpötila ja pH); herkkyys tietyille tekijöille:

Biologiset ominaisuudet, jotka vaikuttavat selviytymiseen, lisääntymiseen ja leviämiseen

Selviytyminen:

RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L ei replikoidu isännän ulkopuolella, ja se on erittäin hauras (ks. kohdat II.9 ja II.20).

Lisääntyminen ja leviäminen:

RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L oli heikentynyt rokotetussa simpanssissa(1). Yksityiskohdat on kuvattu kohdassa II.19.

Lisäksi NIH selvitti yhdessä vaiheen I tutkimuksessa virusten erittymistä (26). Tässä tutkimuksessa nenähuuhtelunäytteet (NW-näytteet) otettiin kaikilta tutkittavilta rokotuksen jälkeen, ja RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L -tasot määritettiin sekä immunoplakkimäärityksellä käyttäen kolmen monoklonaalisen RSV F vastaisen monoklonaalisen vasta-aineen sekoitusta että qRT-PCR:llä. Sairauksien ilmetessä nenähuuhtelunäytteet testattiin muiden virusten ja mykoplasman varalta RT-PCR:n avulla.

RSV-seropositiivisilla tutkittavilla havaittiin ylähengitystiesairaus (URI) kahdella ja yskää havaittiin yhdellä 10 rokotetusta immunisaatiota seuraavien 28 päivän mittaisen raportointijakson aikana; jokaisessa tapauksessa havaittiin rinovirus NW-näytteissä sairauden hetkellä. Kukaan näistä rokotetuista ei erittänyt RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L:ää.

RSV-seronegatiivisilla tutkittavilla URI, yskä ja kuumesairaudet ilmenivät samalla taajuudella sekä rokotetuissa että lumekontrolleissa (nuhaa esiintyi useammin rokotetuissa kuin lumelääkettä saaneilla, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä). Muita viruksia havaittiin 10:llä 22:sta ja 7:llä 12 oireellisesta RSV-seronegatiivisesta rokotetusta ja lumelääkkeen saaneesta, mukaan lukien rinovirus, enterovirus, adenovirus, koronavirus, bokavirus ja tyypin 3 parainfluenssavirus. NW-näytteet, jotka otettiin kolmen päivän kuluessa sairauden alkamisesta 22 oireelliselta rokotetulta, paljastivat rokoteviruksen vain 5 lapsella.

Rokotevirus havaittiin 10^6 PFU:n immunisaation jälkeen 16:lla 20 rokotetusta viljelyllä ja 18:lla 20:stä RT-qPCR:llä. Useimpien rokotettujen kohdalla rokotteen erittymishuippu oli havaittavissa viljelmällä ja RT-qPCR-menetelmällä päivinä 5 ja 10. Päivänä 12 rokotevirusta ei enää havaittu NW-näytteessä yhdelläkään tutkittavalla virusviljelmällä. Rokoteviruksen replikoituminen oli hyvin rajoittunut (keskimääräinen huipputitteri viljelemällä oli $10^{1,8}$ PFU; keskimääräinen huippukopionumero RT-qPCR:llä oli $10^{3,5}$ infektoitujen joukossa). Immunisaation jälkeen ei havaittu alahengitystiesairautta (LRI), eikä mitään vakavia haittatapahtumia raportoitu yhdenkään tutkittavan kohdalla.

Tunnetut tai ennakoitavat ympäristöolosuhteet, jotka voivat vaikuttaa selviytymiseen, lisääntymiseen ja leviämiseen (tuuli, vesi, maaperä, lämpötila, pH jne.)

RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L ei replikoidu ympäristössä. Se replikoituu vain rokotetussa isännässä ja viruksen erittyminen rokotetusta isännästä ympäristöön on vähäistä. Mitkään ympäristöolosuhteet eivät siten voi merkittävästi tehostaa niiden lisääntymistä ja leviämistä.

Herkkyyksiä tietyille aineille

RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L:llä on sama rakenne ja fyysiset ominaisuudet kuin emo-RSV:llä, joka on hauras, lipidivaippainen virus, joka on herkkä kuivumiselle ja jonka replikaatiosykli tapahtuu sytoplasmassa. Kuten kaikki vaipalliset virukset, RSV on herkkä pesuaineille ja liuottimille. Kuten kaikki virukset, RSV ei replikoidu eikä selviydy isäntäsolun ulkopuolella, ja se on herkkä kuumuudelle ja ultravioletisäteilylle. RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L, kuten emo-RSV, on altis yleisille desinfiointiaineille, kuten 70-prosenttiselle etanolille, erilaisille pesuaineille, kuten 0,1-prosenttiselle

natriumdeoksikolaatille, natriumdodekyylisulfaatille ja Triton X-100:lle, sekä 1-prosenttiselle natriumhypokloriitille, formaldehydille (5 % formaliinia), 2-prosenttiselle glutaraldehydille, 1-prosenttiselle jodille, ja kuumuus inaktivoi sen (40).

- 2 GMM:n oletettu elinympäristö; GMM:n käyttäytymistä, ominaisuuksia ja ekologisia vaikutuksia koskevat tutkimukset, jotka on tehty simuloituissa luonnonolosuhteissa kuten mikrokosmoksissa, kasvihuoneissa:

GMO:iden ennakoitu elinympäristö

RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L:n erittämän RSV-viruksen määrä nenäeritteissä on vähäinen ja ohimenevää (yleensä < 12 päivää). Rokotettujen ihmisisäntien lisäksi ei ole muita vektoreita, joita RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L voisi käyttää leviämiseen. Se ei jää pysyvästi ihmiseen, joten rokotteelle ei ole ennakoitua elinympäristöä.

Tutkimukset GMO:iden käyttäytymisestä ja ominaisuuksista sekä niiden ekologisesta vaikutuksesta simuloituissa luonnonympäristöissä, kuten mikrokosmeissa, kasvihuoneissa, kasvihuoneissa

Ei sovellu Biologisten ominaisuuksiensa vuoksi RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L esiintyy pieninä määrinä ja ohimenevä luonnonympäristössä. Siksi rokotteen käyttäytymisen ja ominaisuuksien tutkimiseen ei voida käyttää stimuloitua luonnonympäristöä.

- 3 Kenttäkokeen jälkeen tapahtuva perintöaineen siirtyminen GMM:sta kyseisten ekosysteemien organismeihin ja ympäristön luontaisten organismien perintöaineen siirtyminen GMM:iin:

GMO:n geneettisen aineiston siirtyminen organismeihin ekosysteemeissä, joissa se esiintyy

Luonnollisessa ympäristössä villityypin RSV leviää ihmisestä toiseen infektoituneiden pisaroiden kautta. Ihmiset ja simpanssi ovat ainoa organismi, joihin rokotetuista vapautunut geneettinen materiaali voisi siirtyä.

RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L -virus vapautetaan ihmisiin rokottamisen yhteydessä RSV:tä vastaan.

Seikkoja, joiden on täytyttävä, jotta rokotteessa käytettävän organismin geneettinen materiaali voisi, osittain tai kokonaan, sulautua ihmisisännän genomiin:

- GMO-geenimateriaalin on oltava samassa osassa solua kuin missä ihmisen tai eläimen geneettinen materiaali on, eli tumassa. Geneettisen materiaalin siirto edellyttää vuorovaikutusta genomien välillä.
- Paikalla oleva käänteiskopioijaentsyymi, joka transkriboi (muuntaa) kimeerisen RNA-genomin DNA:ksi ennen sen ujuttamista isäntägenomiin.

Mutta koska GMO on ortopneumovirus ja,

- kuten kaikki ortopneumovirukset, RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L -viruksen replikointisyklit tapahtuvat isäntäsolujen sytoplasmassa, ei tumassa. Näin ollen ei ole mahdollista, että syntyisi yhteisvaikutusta ihmisen genomien kanssa.
- RSV RNA -genomi ei koodaa käänteiskopioijaentsyymiä.

Tämän vuoksi on mahdotonta, että rokotteessa käytettävän organismin geneettinen materiaali voisi, osittain tai kokonaan, sulautua ihmisessä minkään solun sisältämään genomiin.

Vapautuksen jälkeinen geneettisen materiaalin siirtyminen luonnollisista organismeista GMO:ihin

Organismit, joihin geneettistä materiaalia voisi siirtyä homologisen rekombinaation kautta luonnollisissa olosuhteissa, ovat samaan sukuun kuuluvat virukset eli ortopneumovirukset. Rokotetut ihmiset saattavat saada jonkin muun RSV-kannan aiheuttaman tartunnan RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L -rokotteen inokulaation aikoihin. Kuten kohdassa IV.3 kuitenkin todetaan, RSV:n homologinen rekombinaatio on hyvin harvinainen tapahtuma myös optimoiduissa kokeellisissa olosuhteissa. Näin ollen, ja koska esiintyminen luonnossa on hyvin vähäistä tai olematonta, geneettisen materiaalin siirtymisriski villityypin RSV:n ja muuntogeenisen organismin välillä on merkityksettömän alhainen.

- 4 Todennäköisyys, että valikoituminen johtaa kenttäkokeen jälkeen ennakoimattomien/epätoivottujen ominaisuuksien ilmentymiseen GMM:ssa: Apinoilla ja ihmisillä saatujen turvallisuustulosten (ks. Kohta II.19) mukaan vapautuksen jälkeisen luonnonvalinnan riski, joka johtaisi odottamattomien ja/tai ei-toivottujen ominaisuuksien ilmentymiseen modifioituissa organismeissa, pidetään merkityksettömän alhaisena. Tällainen tapahtuma saattaisi kuitenkin saada alkunsa mutaatioina tai geneettisen materiaalin siirtymisenä, mikä voisi vahvistaa RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L:n patogeenisuutta.

RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L:n geneettinen stabiilius on jo arvioitu *in vivo* rokotetuissa, mikä on varmistanut NS2:n ja kodonin 1313 deleetiomutaation sekä kodonin I1314L mutaation (ks. Kohta II.14).

Lisäksi *in vitro* -tutkimukset vahvistivat rokotevirusten geneettisen stabiilisuuden; tutkimuksissa löytyi viiden pasoinnin jälkeen vain yksittäisen nukleotidin muutos koodaamattomalla alueella (ks. kohta II.14).

Geneettisen materiaalin siirtymisen ja materiaalinvaihdon mahdollinen riski villityypin RSV:n ja GMO:n välillä homologisen rekombinaation kautta on merkityksettömän alhainen, kuten kohdassa IV.3 keskusteltu..

Koska mutaatio- ja rekombinaatiotapahtumien riskiä, jotka voisivat vahvistaa RSV Δ NS2/ Δ I1313/I1314L:n patogeenisuutta, pidetään merkityksettömän alhaisena, pidetään myös todennäköisyyttä, joka johtaisi vapautuksen jälkeiseen odottamattomien ja/tai ei-toivottujen ominaisuuksien ilmentymiseen muunnellussa organismissa, merkityksettömän alhaisena.

- 5 Toimenpiteet geneettisen pysyvyyden varmistamiseksi ja todentamiseksi selkä pysyvyyden todentamismenetelmät:

Kaksi mekanismia, jotka voivat vaikuttaa geneettiseen stabiilisuuteen: homologinen rekombinaatio ja mutaatiomuutosten kertyminen valintapaineen vuoksi.

Geenimateriaalin siirtymisriskin rekombinaatiolla on kuvattu olevan merkityksettömän alhainen kohdassa IV.3.

Toinen mekanismi, joka voi vaikuttaa geneettiseen stabiilisuuteen, on RNA-virusgenomien virhealtis replikoituminen. Mutaationopeudet vaihtelevat RNA-virusten välillä, vaihteluvälin ollessa $10^{-6} - 10^{-4}$ per nukleotidikohta per soluinfektio, riippuen RNA-viruksesta ja käytetyistä menetelmistä(11).

Vero-soluilla tehtiin *in vitro* -tutkimuksia RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L:n geneettisen stabiilisuuden arvioimiseksi. Näissä tutkimuksissa, jotka on kuvattu kohdassa II.14, ja käyttämällä korkeatehoista sekvensointia virusmutanttien mahdollisten alapopulaatioiden havaitsemiseksi 5 %:n kynnyksellä, vahvistavat GMO:n geneettisen stabiilisuuden.

Muuntogeenisen organismin geneettinen stabiilisuus *in vivo* on arvioitu vahvistamalla, että rokotettujen nenähuuhteista eristetty virus kantaa heikentäviä mutaatioita (ks. Kohta II.14). Koska RSV-rungon ei odoteta olevan epävakaa ϵ , tämä on tehty keskittymällä vaimentaviin mutaatioihin.

- 6 Sellaisten geneettisten ominaisuuksien kuvaus, jotka voivat estää perintöaineksen leviämisen tai vähentää sitä:

Biologisten ominaisuuksiensa vuoksi RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L on epävakaa eikä pysty replikoitumaan isännän ulkopuolella.

Sen lisääntyminen isännässä on vähäistä ja ohimenevää, eikä se siten todennäköisesti leviä tehokkaasti ympäristössä (ks. Kohta II.19).

- 7 Biologisen leviämisen väylät, tunnetut/mahdolliset vuorovaikutustavat levittävän tekijän kanssa (esim. sisäänhengittäminen, nauttiminen, pintakosketus ja tunkeutuminen):

RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L -rokote ei replikoidu isännän ulkopuolella. Lisäksi sen selviytyminen isännän ulkopuolella on hyvin lyhytaikaista, koska monet ympäristöparametrit vaikuttavat siihen ja se on herkkä tavallisille desinfiointi- ja puhdistusaineille (ks. Kohta IV.1).

Arviointi RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L -erittymisen suhteen on tehty ja se osoittautui vähäiseksi ja ohimeneväksi (ks. Kohta I The RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L vaccine is for human vaccination use only V.1).

Luonnollisessa ympäristössä villityypin RS-virus siirtyy ihmisten välillä nenän tai suun eritteiden välityksellä, joko suoraan suurten pisaroiden (ja todennäköisesti pisaroiden) kautta tai epäsuorasti kontaminoitujen käsien ja ympäröivien pintojen kosketuksen välityksellä (esim. vauvansänkyjen, lelujen, ovinuppien, pöytälevyjen) kautta.

RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L vapautetaan antamalla sitä MAD300-sumutinlaitteen kautta, jossa on pehmeä, kartiomainen, sieraimen tiiviisti sulkeva kärkitulppa, mikä estää nesteiden karkaamisen. Pätevät henkilöt käsittelevät vapautuksen ja siitä syntyneet jätteet tällaisen tahattoman leviämisen välttämiseksi (ks. kohdat V.3 ja V.4).

- 8 Kuvaus ekosysteemeistä, joihin GMM voi levitä; mahdollisuus populaation liikkasvuun ympäristössä; GMM:n kilpailuetu verrattuna muuntamattomiin vastaanottajaorganismeihin:

Kuvaus ekosysteemeistä, joihin GMO:t voivat levitä

RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L:n vapautuksen tarkoitus rokotus, joka suojaa ihmislapsia RSV-taudilta ympäri maailmaa.

RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L -viruksen määrällinen erittyminen rokotettujen nenä-eritteistä alhainen ja ohimenevä (ks. Kohta IV.2) eikä virus voi replikoitua tai selviytyä pitkään isännän ulkopuolella. Sen vuoksi vapauttaminen ei koske mitään tiettyä ekosysteemiä.

Mahdollinen liiallinen populaation lisääntyminen ympäristössä

Liiallinen GMO-populaation lisääntyminen ympäristössä vaatisi viruksen voimakasta lisääntymistä rokotetussa isännässä ja erittäin tehokasta leviämisreittiä rokotetuista rokottamattomiin ihmisiin.

Huomioiden:

- isännän ulkopuolisen replikoitumisen ja selviytymisen puuttumisen,
- RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L:n heikentymisen seronegatiivisessa isännässä
- replikoitumisen seropositiivisessa isännässä puuttumisen,

voidaan GMO-populaation mahdollinen liiallinen lisääntyminen ympäristössä sulkea pois.

GMO:iden kilpailuetu suhteessa muuntamattomaan vastaanottaja- tai emo-organismiin

Superinfektio eri RSV-kannoilla on mahdollista (41). Koska GMO on heikennetty ja lämpöherkkä, kilpailuetua suhteessa emo-organismiin ei odoteta.

- 8 Tarvittaessa kohdeorganismien tunnistaminen ja kuvaus; GMM:n ja kohdeorganismien vuorovaikutuksen ennakoitu mekanismi ja tulos; muiden kuin kohdeorganismien tunnistaminen ja kuvaus, jos kenttäkoe voi vaikuttaa ko. organismeihin haitallisesti sekä tunnistettujen haitallisten vuorovaikutusten ennakoitu mekanismi:

Kohdeorganismien tunnistaminen ja kuvaus soveltuessa

RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L -rokote on suunniteltu suojaamaan ihmisiä RSV-taudilta. Kohdeorganismi on ihminen.

Odotettu GMO:iden ja kohdeorganismien (-organismien) välinen vuorovaikutusmekanismi ja tulokset soveltuessa

RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L on suunniteltu rokottamaan ihmisiä RSV-infektiota vastaan. Näin ollen GMO tullaan vapauttamaan ihmisiin immuunivasteen aikaansaamiseksi. Inokuloinnin jälkeen RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L replikoituu, jonka aikana virusgeenin transkriboidaan ja translatoidaan. Tämän tuloksena *de novo* -syntetisoituja proteiineja esitetään immuunijärjestelmälle, joka kehittää immuniteetin seuraavaa RSV-infektiota vastaan. Kliininen tutkimus osoitti, että RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L oli immunogeeninen ihmisvauvoilla, ja sillä oli hyvä turvallisuusprofiili (26).

Muiden kuin kohdeorganismien tunnistaminen ja kuvaus, joihin muuntogeenisen organismin vapautuminen voi vaikuttaa haitallisesti, sekä kaikkien tunnistettujen haittavaikutusten ennakoitut mekanismit

Ihmiset ja simpanssit ovat RSV:n ainoa luonnollinen isäntä ja ainoa luonnollinen säilymö. On erittäin epätodennäköistä, että RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L:llä tulee olemaan vaikutus muihin organismeihin. RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L:n selviytyminen on lyhytkestoista.

Ainoa ei-kohdeorganismi, johon muuntogeenisen organismin vapautuminen voi vaikuttaa haitallisesti, on simpanssi. RSV tunnistettiin uudeksi virukseksi vuonna 1956 viruksen tultua löydettyksi simpanssiyhdyksunnasta siinä puhjenneen flunssainfektion jälkeen.

RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L on kuitenkin voimakkaasti heikentynyt simpanssissa (kohta II.4), eikä se ole aiheuttanut vakavia haittatapahtumia. Tästä huolimatta tahaton siirtyminen simpanssiin on kuitenkin epätodennäköistä, koska vapautuksen kohteena oleva organismi on ihmisvauva.

RSV ei aiheuta sairautta missään muussa eläinjärjestelmässä. Infektio olisi itsestään rajoittuva ja sen viremia alhainen, ja se johtaisi vasta-aineiden kehittymiseen RSV:tä vastaan, mikä tekee toistuvista tartuntasykleistä epätodennäköisen.

- 9 Biologisen vuorovaikutuksen tai isäntäkirjon muuttumisen todennäköisyys tarkoituksellisen levittämisen jälkeen; tunnetut/ennustetut vuorovaikutukset ympäristön muiden kuin kohdeorganismien kanssa ml. kilpailijat, saaliit, isännät, symbiontit, saalistajat, loiset ja patogeenit:

Vapautuksen jälkeisten siirtymien todennäköisyys biologisissa yhteisvaikutuksissa tai isäntäryhmässä

Ei sovellu

Tunnetut tai ennakoitut vuorovaikutukset ei-kohdeorganismien kanssa ympäristössä, mukaan lukien kilpailijat, saaliit, isännät, symbiontit, saalistajat, loiset ja patogeenit

RSV on hyvin hauras vaipallinen virus, joka ei replikoidu eikä selviydy isäntiensä ulkopuolella. Vaikka RSV:n siirtyminen ihmiseltä simpanssiin on dokumentoitu, läheinen kosketus simpanssien kanssa on erittäin epätodennäköistä, koska rokotteen kohderyhmä on ihmisvauvat

- 10 Tunnettu tai ennustettu osallistuminen biokemiallisiin prosesseihin; muut mahdolliset vuorovaikutukset ympäristön kanssa:

Ei sovellu: RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L ei osallistu mihinkään biogeokemialliseen prosessiin.

V TIEDOT SEURANNASTA, VALVONNASTA JA JÄTTEIDEN KÄSITTELYSTÄ SEKÄ HÄTÄTILANTEIDEN VARALLE LAADITUISTA SUUNNITELMISTA

- 1 Menetelmät, joilla GMM jäljitetään ja sen vaikutusta seurataan; niiden seurantamenetelmien spesifisyys/herkkyys/luotettavuus, joiden avulla GMM

tunnistetaan ja erotetaan luovuttaja- ja vastaanottajaorganismeista; menetelmät, joilla havaitaan siirretyn perintöaineksen siirtyminen toisiin organismeihin:

Menetelmät GMO:iden jäljittämiseksi ja niiden vaikutusten seuraamiseksi

RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L -viruksen huippueritys arvioidaan seitsemän päivän kuluttua kunkin annostelun jälkeen otetusta nenänäytteestä. RT-PCR-testi voi erityisesti jäljittää RSV-NS2/-1313/I1314L-testissä, joka erottaa sen villityypistä RSV (ks. Kohta II.17).

Seurantatekniikoiden spesifisyys (GMO:iden tunnistamiseksi ja erottamiseksi luovuttajasta, vastaanottajasta tai tarvittaessa emo-organismeista) herkkyys ja luotettavuus

Katso kohdat I.3 ja II.17

Menetelmät, joilla havaitaan luovutetun geneettisen materiaalin siirtyminen muihin organismeihin

Luovutetun geneettisen materiaalin siirtymisriskiä muihin organismeihin pidetään merkityksettömän alhaisena. RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L voidaan kuitenkin spesifisesti jäljittää ei-kohdeorganismeissa RT-PCR:llä, joka tunnistaa eron villityypin RSV:hen nähden (ks. Kohta II.17).

2 Seurannan kesto ja laajuus:

Sekä ihmiseen että ympäristöön kohdistuvaa riskiä pidetään kokonaisuudessaan merkityksettömän alhaisena. Siksi seurantaa ei tarvita.

3 Menetelmät ja menettelyt, joilla estetään tai minimoidaan GMM:ien leviäminen koealueen ulkopuolelle; menetelmät/menettelyt, joilla suojellaan koealuetta asiattomien henkilöiden pääsylvä; menetelmät/menettelyt, joilla estetään muiden organismien pääsy koealueelle:

Menetelmät ja toimenpiteet GMO:iden leviämisen estämiseksi ja/tai minimoimiseksi vapautusalueen tai määritetyn käyttöalueen ulkopuolelle

RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L -rokote on tarkoitettu vain ihmisten rokotukseen (lääkärin määräyksen ja valvonnan alaisena).

Lisäksi siihen kohdistuu valvonta useilla turvatasoilla. Rokote säilytetään ilmatiiviisti suljetuissa injektiopulloissa, ja lääke annetaan MAD300-sumutinlaitteen kautta, joka rakenteellisesti estää annetun nesteen karkaamisen. Pätevät henkilöt käsittelevät RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L:n vapautuksen ja siitä syntyneet jätteet käsitellään tahattoman leviämisen välttämiseksi (ks. Kohta V.4). GMO:n leviäminen vapauttamisalueen tai käyttötarkoitukseen varattujen alueiden ulkopuolelle on erittäin epätodennäköistä.

Menetelmät ja toimenpiteet, joilla tutkimuspaikka suojataan luvattomalta pääsylvä

Katso kohta III.3.

Menetelmät ja toimenpiteet, joilla estetään muiden organismien pääsy tutkimuspaikalle.

Ei sovellu

- 4 Syntyvän jätteen laatu ja arvioitu jätemäärä sekä kuvaus suunnitellusta jätteen käsittelystä:

Tuotetun jätteen tyyppi

Katso kohta III.4

Tuotettu jäte koostuu seuraavista:

- injektiopullo, joka sisältää jäljellä olevaa rokotetta
- ruiskut
- injektiopullon läpäisykanyylit
- MAD Nasal™ -laite
- mikä tahansa muu kulutusmateriaali, joka on suoraan kosketuksissa rokotteen kanssa.

Odotettu jätemäärä

Katso kohta III.4

Suunnitellun hoidon kuvaus

Kuten kohdassa IV.1 selitetään, RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L voidaan dekontaminoida samalla tavalla kuin mitä tahansa muu vaipallinen virus. Dekontaminaatioon voidaan käyttää lämpöä tai kemikaaleja (valkaisuaine, etanoli/isopropyylialkoholi, puhdistusaineet). Muutama minuutti 100 °C:ssa tai kosketuksissa kemikaalien kanssa on osoitettu riittäväksi täydellisen inaktivoitumisen aikaansaamiseksi (katso lisätietoja kohdasta IV.1). Näin ollen autoklavointi tai polttaminen, joita käytetään yleisesti dekontaminointiin, soveltuvat täysin RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L -rokotteenkin inaktivointiin.

- 5 Menetelmät ja menettelyt GMM:ien hallitsemiseksi ennakoimattoman leviämisen tapahtuessa:

Katso kohta IV.1.

- 6 GMM:lle altistuneen alueen puhdistamiseen liittyvät menetelmät kuten GMM:ien hävittäminen:

Katso kohta IV.1.

- 7 Menetelmät, joilla kenttäkokeen aikana tai sen jälkeen GMM:lle altistuneet kasvit / eläimet / maa-ainekset / muu vastaava materiaali hävitetään tai puhdistetaan:

Ei sovellu Koska vapautuminen suoritetaan suojatuissa kliinisissä toimipaikoissa, kasvit, eläimet ja maaperä eivät altistu GMO:lle.

- 8 Suunnitelmat ihmisten ja eläinten terveyden ja ympäristön suojelemiseksi epätoivottujen vaikutusten ilmetessä:

RSV ΔNS2/Δ1313/I1314L GMO on rokote, joka on kehitetty suojaamaan ihmisiä RSV-infektiolta.

Vaiheen I kliinisistä tutkimuksista saadut tiedot osoittavat, että RSV

ΔNS2/Δ1313/I1314L oli hyvin siedetty, ja ylähengitystieoireiden esiintymistiheydet

olivat verrattavissa lumelääkkeeseen, eikä rokotettujen joukossa havaittu yhtäkään alahengitystieinfektiotapausta (ks. kohta II.19).

Sanofi Pasteur jatkaa RSV Δ NS2/ Δ 1313/I1314L -rokotteen turvallisuusprofiilin seuranta tulevilla kliinisissä tutkimuksissa ja tuotteen markkinoille tulon jälkeen seuraavin keinoin:

- rokotettujen turvallisuusprofiilin intensiivinen seuranta kliinisten tutkimusten aikana
- rutiininomaiset lääketurvatoimintakäytännöt, jotka mahdollistavat kattavan, jatkuvan ja maailmanlaajuisen kuvan saamisen lisensoinnin jälkeisestä turvallisuusprofiilista.

Lähdeluettelo

1. Luongo C, Winter C, Collins P, Buchholz U. Respiratory Syncytial Virus Modified by Deletions of the NS2 Gene and Amino Acid S1313 of the L Polymerase Protein Is a Temperature-Sensitive, Live-Attenuated Vaccine Candidate That Is Phenotypically Stable at Physiological Temperature. *Journal of Virology*. 2012;87(4):1985-1996.
2. Jeffree CE, Rixon HW, Brown G, Aitken J, Sugrue RJ. Distribution of the attachment (G) glycoprotein and GM1 within the envelope of mature respiratory syncytial virus filaments revealed using field emission scanning electron microscopy. *Virology*. 2003 Feb 15; 306(2):254-67.
3. Lewis FA, Rae ML, Lehmann NI, Ferris AA. A syncytial virus associated with epidemic disease of the lower respiratory tract in infants and young children. *Med. J. Aust.* 1961;48:932-933.
4. Collins PL et al. Production of infectious human RSV from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995;92:11563-11567.
5. Woolums AR, Lee S, Moore ML. Animal Models of Respiratory Syncytial Virus Pathogenesis and Vaccine Development: Opportunities and Future Directions. [(accessed on 5 May 2019)] and 2011., RSV. Available online: <https://www.intechopen.com/download/pdf/24392>.
6. Blount RE, Morris JA, Savage RE. 1956. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92: 544-549.
7. Channock R, Roizman B, Myers R. (1957) Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). *Am. J. Hyg.* 66: 281-290.
8. Hall CB, Douglas RG, Schnabel KC, Geiman JM. (1981) Infectivity of respiratory syncytial virus by various routes of inoculation. *Infect. Immun.* 33: 779-783.
9. Chare ER, Gould EA, Holmes EC. Phylogenetic analysis reveals a low rate of homologous recombination in negative-sense RNA viruses. *J. Gen. Virol.* 2003, 84, 2691-2703.
10. Spann KM, Collins PL, Teng MN. Genetic recombination during coinfection of two mutants of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 2003, 77, 11201-11211.
11. Peck KM, Lauring AS. Complexities of Viral Mutation Rates. *J Virol.* 2018 Jun 29 and 92(14):e01031-17.
12. Directive 2000/54/EC on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work. [Online] September 18, 2000. <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2000:262:0021:0045:EN:PDF>.
13. Hall CB, Douglas RG Jr, Geiman JM *J Infect Dis.* 1980 Jan; 141(1):98-102.
14. Drysdale SB, Green CA, Sande CJ. Best practice in the prevention and management of paediatric respiratory syncytial virus infection. *Therapeutic Advances in Infectious Disease.* 2016 April; 3 (2): 63-71.
15. Broberg EK, Waris M, Johansen K, Snacken R, Penttinen P; European Influenza Surveillance Network. Seasonality and geographical spread of respiratory syncytial virus epidemics in 15 European countries, 2010 to 2016. *Euro Surveill.* 2018 Feb;23(5):17-00284.
16. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med* 2009; 360:588-98.
17. Shi T, McAllister DA, O'Brien KL, et al. RSV Global Epidemiology Network. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet* 2017; 390:946-58.
18. Bukreyev A, Belyakov IM, Berzofsky JA, Murphy BR, Collins PL. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expressed by recombinant respiratory syncytial virus attenuates viral replication and increases the level of pulmonary antigen-presenting cells. *J Virol.* 2001 Dec;75(24):12128-40.
19. Teng M, Collins P. Altered Growth Characteristics of Recombinant Respiratory Syncytial Viruses Which Do Not Produce NS2 Protein. *Journal of Virology.* 1999;73(1):466-473.
20. Jin H, Zhou H, Cheng X, Tang R, Munoz M, Nguyen N. Recombinant Respiratory Syncytial Viruses with Deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 Genes Are Attenuated in Vitro and in Vivo. *Virology.* 2000;273(1):210-218.
21. Whitehead S, Bukreyev A, Teng M, Firestone C, St. Claire M, Elkins W et al. Recombinant Respiratory Syncytial Virus Bearing a Deletion of either the NS2 or SH Gene Is Attenuated in Chimpanzees. *Journal of Virology.* 1999;73(4):3438-3442.
22. Whitehead S, Juhasz K, Firestone C, Collins P, Murphy B. Recombinant Respiratory Syncytial Virus (RSV) Bearing a Set of Mutations from Cold-Passaged RSV Is Attenuated in Chimpanzees. *Journal of Virology.* 1998;72(5):4467-4471.
23. Spann K, Tran K, Chi B, Rabin R, Collins P. Suppression of the Induction of Alpha, Beta, and Gamma Interferons by the NS1 and NS2 Proteins of Human Respiratory Syncytial Virus in Human Epithelial Cells and Macrophages. *Journal of Virology.* 2004;78(8):4363-4369.
24. Wright P, Karron R, Madhi S, Treanor J, King J, O'Shea A et al. The Interferon Antagonist NS2 Protein of Respiratory Syncytial Virus Is an Important Virulence Determinant for Humans. *The Journal of Infectious Diseases.* 2006;193(4):573-581.
25. IND015465. *General Properties. RCHSB_NIAID_NIH.*
26. Karron RA, Luongo C, Mateo JS, Wanionek K, Collins PL, Buchholz UJ. Safety and Immunogenicity of the Respiratory Syncytial Virus Vaccine RSV/ANS2/A1313/I1314L in RSV-Seronegative Children. *J Infect Dis.* 2020 Jun 16;222(1):82-91.
27. Cortjens B et al. 2017. Broadly Reactive Anti-Respiratory Syncytial Virus G Antibodies from Exposed Individuals Effectively Inhibit Infection of Primary Airway Epithelial Cells. *Journal of Virology* 91, e02357-02316.

28. Ngwuta JO et al. 2015. Prefusion F-specific antibodies determine the magnitude of RSV neutralizing activity in human sera. *Science Translational Medicine* 7, 309ra162.
29. Evaluating the Infectivity, Safety, and Immunogenicity of Recombinant Live-Attenuated RSV Vaccines RSV ΔNS2/Δ1313/11314L or RSV 276 in RSV-Seronegative Infants 6 to 24 Months of Age. *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03227029*. [Online] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT03227029?view=results>.
30. Study of a Live-Attenuated Respiratory Syncytial Virus Vaccine in Infants and Toddlers (VAD00001). *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04491877*. [Online] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04491877>.
31. Study on a Live-attenuated Respiratory Syncytial Virus Vaccine for Assessment of Safety, Transmissibility, and Genetic Stability of the Vaccine Virus Among Close Contacts in Infants and Toddlers 6 to < 24 Months of Age in Puerto Rico (USA). . *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT05687279*. . [Online] <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05687279>.
32. Efficacy, Immunogenicity, and Safety Study of a Respiratory Syncytial Virus Vaccine in Infants and Toddlers (PEARL). . *ClinicalTrials.gov Identifier NCT06252285*. . [Online] <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06252285>.
33. Co-administration Study of an Investigational Live-Attenuated Respiratory Syncytial Virus Vaccine in Infants and Toddlers (CORAL). . *ClinicalTrials.gov Identifier NCT06397768*. . [Online] <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06397768>.
34. Belshe RB, et al. Experimental respiratory syncytial virus infection of four species of primates. *J Med Virol*. 1977;1(3):157-62.
35. Crowe JE Jr, and al. A comparison in chimpanzees of the immunogenicity and efficacy of live attenuated respiratory syncytial virus (RSV) temperature-sensitive mutant vaccines and vaccinia virus recombinants that express the surface glycoproteins of RSV. *Vaccine*. 1993 Nov;11(14):1395-404.
36. Clark M, Steger-Hartmann T. A big data approach to the concordance of the toxicity of pharmaceuticals in animals and humans. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018 Jul;96:94-105.
37. Grandin C, Evidence for an intranasal immune response to human respiratory syncytial virus infection in cynomolgus macaques. *J Gen Virol*. 2015 Apr;96(Pt 4):782-792.
38. (IATA), International Air Transport Association. [Online] <https://www.iata.org/en/publications/standards-manuals/>.
39. World Health Organization. 2007. Standard precautions in health care. http://www.who.int/csr/resources/publications/EPR_AM2_E7.pdf. [Online]
40. World Health Organization. 1993. Disinfection and Sterilization. *Laboratory Biosafety Manual* (2nd ed., pp. 60-70).
41. Gamiño-Arroyo AE et al. Mexico Emerging Infectious Diseases Clinical Research Network (La Red). Epidemiology and clinical characteristics of respiratory syncytial virus infections among children and adults in Mexico. *Influenza Other Respir Viruses*. 2017 Jan;11(1):48-56.

28th February 2025



A handwritten signature in blue ink, appearing to be a stylized name, is written over a faint, illegible stamp or watermark.

Päiväys ja vastuuhenkilön allekirjoitus