



EUROPEAN MEDICINES AGENCY  
SCIENCE MEDICINES HEALTH

## AGENCE EUROPÉENNE DU MÉDICAMENT

26 janvier 2024  
EMA/CVMP/IWP/365817/2022  
Comité des médicaments vétérinaires (CMV)

### Directive sur les vaccins à ADN plasmidique à usage vétérinaire

|  |                  |
|--|------------------|
| Projet approuvé par le groupe de travail Immunologie             | 22 novembre 2022 |
| Adopté par le CMV pour publication pour consultation             | 15 février 2023  |
| Début de la consultation publique                                | 24 février 202   |
| Fin de la consultation (délai pour les commentaires)             | 23 juin 2023     |
| Approuvé par le groupe de travail Immunologie                    | 15 novembre 2023 |
| Adopté par le CMV ( <i>Comité des médicaments vétérinaires</i> ) | 17 janvier 2024  |
| Date d'entrée en vigueur   | 17 juillet 2024  |

Cette ligne directrice remplace la "Note d'orientation : Vaccins à ADN non amplifiables dans une cellule eucaryote pour usage vétérinaire" (CVMP/IWP/07/98-FINAL).

|                  |   |
|------------------|---|
| <b>Mots-clés</b> | <b>Vaccins à ADN plasmidique, vaccins à usage vétérinaire</b> |
|------------------|---|

**Adresse officielle** Domenico Scarlattiilaan 6 • 1083 HS Amsterdam • Pays-Bas  
Une agence de l'Union européenne

**Adresse pour les visites et les livraisons** Voir [www.ema.europa.eu/how-to-find-us](http://www.ema.europa.eu/how-to-find-us)

**Nous poser une question** Rendez-vous sur [www.ema.europa.eu/contact](http://www.ema.europa.eu/contact) **Téléphone** +31 (0)88 781 6000

© Agence européenne des médicaments, 2024. Reproduction autorisée moyennant mention de la source.

# Directive sur les vaccins à ADN plasmidique à usage vétérinaire

## Table des matières

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Résumé analytique</b> .....   | <b>3</b>  |
| <b>1. Introduction (contexte)</b> .....                                | <b>3</b>  |
| <b>2. Champ d'application</b> .....                                    | <b>3</b>  |
| <b>3. Base juridique</b> .....   | <b>4</b>  |
| <b>4. Considérations générales</b> .....                               | <b>4</b>  |
| <b>5. Exigences en matière de données</b> .....                        | <b>5</b>  |
| 5.1. Exigences en matière de données pour la partie 2 Qualité .....    | 5         |
| 5.2. Exigences en matière de données pour la partie 3 Sécurité .....   | 10        |
| 5.3. Exigences en matière de données pour la partie 4 Efficacité ..... | 11        |
| <b>Définitions</b> .....   | <b>11</b> |
| <b>Références</b> .....  | <b>11</b> |

## Résumé

L'objectif de ces lignes directrices est de présenter les informations à inclure pour les vaccins à ADN plasmidique dans le dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) des vaccins vétérinaires, conformément à la section IIIb (Exigences relatives aux médicaments immunologiques vétérinaires) du règlement délégué (UE) 2021/805 de la Commission modifiant l'annexe II du règlement (UE) 2019/6 du Parlement européen et du Conseil du 11 décembre 2018 relatif aux médicaments vétérinaires (abrogeant la directive 2001/82/CE), dénommé annexe II du règlement (UE) 2019/6 dans l'ensemble du document.

Cette directive aborde les aspects à prendre en compte pour les vaccins vétérinaires à ADN plasmidique et fournit des orientations sur les informations à inclure dans les parties 2, 3 et 4 de l'AMM.

Cette directive remplace la "Note explicative : Vaccins à ADN non amplifiables dans une cellule eucaryote à usage vétérinaire" (CVMP/IWP/07/98-FINAL).

## 1. Introduction (contexte)

L'utilisation de l'ADN pour la vaccination a progressé ces dernières années et plusieurs essais utilisant des produits de ce type pour la vaccination sont en cours.

La vaccination par l'ADN implique l'inoculation d'un (de) gène(s) codant pour un ou plusieurs antigènes contre lesquels une réponse immunitaire est souhaitée. Le(s) gène(s) peut(vent) être sous le contrôle d'un promoteur, qui permettra son expression chez l'animal vacciné. Ce gène peut être contenu, à des fins de manipulation et de fabrication, dans de l'ADN plasmidique (ADN plasmidique bactérien ou ADN synthétique de novo). Pour les termes de référence de cette directive les "plasmides d'ADN bactérien" sont considérés comme des molécules d'ADN extrachromosomiques, autorépliquatives et à double brin, présentes à l'état naturel.

Ces plasmides pertinents pour les vaccins ADN sont généralement partiellement modifiés par des moyens synthétiques.

Aux fins de la présente ligne directrice, les "plasmides à ADN synthétique" sont des plasmides artificiels conçus et synthétisés en laboratoire à l'aide de techniques de synthèse génique de-novo, de clonage et de mutagenèse, dans le but d'introduire de l'ADN étranger dans une autre cellule par le biais d'une transformation. On considère que les plasmides d'ADN bactériens et synthétiques peuvent être fabriqués dans des cellules hôtes bactériennes ou par des moyens synthétiques.

Les vaccins à ADN présentent des avantages potentiels par rapport à l'inoculation directe de l'antigène lui-même, par exemple ils peuvent stimuler le système immunitaire de manière beaucoup plus large, y compris la stimulation d'une réponse des lymphocytes T cytotoxiques. Les vaccins ADN peuvent également présenter des avantages par rapport à l'utilisation d'un micro-organisme vivant atténué, par exemple en évitant le risque potentiel de retour à la virulence. En outre, la fabrication d'un vaccin à ADN plasmidique peut, dans certains cas, être plus simple, plus rapide, plus adaptable et plus rentable que les formes de vaccins plus traditionnelles, tout en offrant un champ d'application plus large pour englober d'autres modes d'administration.

Les vaccins à ADN peuvent être utilisés comme technologie de plate-forme vaccinale. Si l'utilisation d'un dossier permanent de technologie de plate-forme vaccinale est demandée pour autorisation, il convient également de se référer aux orientations relatives aux exigences en matière de données pour les dossiers permanents de technologie de plate-forme vaccinale

La "Note explicative : Vaccins ADN non amplifiables dans des cellules eucaryotes à usage vétérinaire" (CVMP/IWP/07/98-FINAL) est entrée en vigueur en 2001. Compte tenu des développements scientifiques et de l'expérience acquise entre-temps, le CMV a recommandé la révision et le développement en une directive.

## 2. Champ d'application

Ce document fournit des conseils aux fabricants qui souhaitent obtenir une autorisation de mise sur le marché pour des vaccins à acide nucléique destinés à être utilisés chez les animaux, lorsque le vaccin consiste en un ou plusieurs plasmides d'ADN (a) bactériens ou (b) synthétiques.

Ce document s'applique aux vaccins à ADN, tels que définis dans le document, constitués d'ADN plasmidique non amplifiable dans les cellules eucaryotes. Les vaccins à ADN plasmidique peuvent être composés d'un ou de plusieurs plasmides codant pour différents immunogènes dérivés d'un seul ou de différents agents pathogènes (virus, bactérie ou parasite) ou d'antigènes endogènes (virus, bactérie ou parasite) ou d'antigènes endogènes.

Les développements impliquant de l'ADN plasmidique délivré par des vecteurs vivants (par exemple, bactéries/virus) ou capable d'amplification chez l'animal vacciné par quelque mécanisme que ce soit n'entrent pas dans le champ d'application du présent document. Toutefois, ces lignes directrices peuvent servir de référence pour d'autres vaccins à ADN en cours de développement, par exemple lentiDNA, minicircle DNA, constructions d'expression minimaliste (par exemple MIDGE DNA et Doggybone DNA) et les vecteurs (par exemple, les micelles lipidiques).

### 3. Base juridique

Cette directive doit être lue conjointement avec l'introduction et les principes généraux de l'annexe II du règlement (UE) 2019/6 et de tous les autres règlements de l'UE et toutes les autres directives pertinentes de l'UE et du VICH, ainsi que les directives pertinentes de la Pharmacopée européenne (Ph. Eur.).

Règlement délégué (UE) 2021/805 de la Commission du 8 mars 2021 modifiant l'annexe II du règlement (UE) 2019/6 de l'Union européenne.

(UE) 2019/6 du Parlement européen et du Conseil

Ph. Eur. 0062 Vaccins à usage vétérinaire

Ph. Eur. 5.2.5 Gestion des agents étrangers dans les médicaments vétérinaires immunologiques

Ph. Eur. 5.2.6 Évaluation de la sécurité des vaccins et immunosérums vétérinaires

Ph. Eur. 5.2.7 Évaluation de l'efficacité des vaccins et immunoglobulines vétérinaires

### 4. Considérations générales

Nous recommandons de prendre en considération plusieurs aspects de l'utilisation d'un vaccin à ADN plasmidique :

1. L'ADN plasmidique qui est internalisé par les cellules de l'animal vacciné peut s'intégrer dans les chromosomes de l'animal vacciné et perturber l'état réplcatif normal de cette cellule, provoquant une division cellulaire incontrôlée et une oncogénèse :

Après l'injection d'ADN dans un animal, une petite partie des molécules d'ADN pénètre dans les cellules. La probabilité qu'une molécule d'ADN s'intègre dans le chromosome est faible et, étant donné que l'oncogénèse est un événement multifactoriel, le risque de mutagenèse insertionnelle est extrêmement faible.

Les études d'intégration, le cas échéant, doivent être entreprises avec le produit fini et le pourcentage de plasmide super enroulé utilisé doit être indiqué. Jusqu'à présent, l'intégration de l'ADN plasmidique plasmidique dans l'ADN chromosomique d'un animal vacciné n'a pas été observée (EFSA, EFSA Journal 2017). Cependant, l'intégration (par exemple dans les cellules musculaires entourant le site de vaccination ou dans les cellules de la lignée germinale dans les gonades) ne peut pas être écartée<sup>1</sup>.

Les méthodes d'essai actuelles ne sont pas suffisamment sensibles pour détecter systématiquement une intégration réelle qui peut être inférieure de plusieurs ordres de grandeur aux limites de détection des méthodes. Par conséquent, chaque produit doit être évalué au cas par cas, en tenant compte des limites de détection spécifiques, de la voie d'administration, du tissu cible, de la quantité de plasmide administrée et de l'âge de l'animal vacciné. Les informations doivent être compilées dans une évaluation des risques. .

---

<sup>1</sup> Le contenu de cette directive porte sur les exigences requises pour obtenir une autorisation de mise sur le marché d'un vaccin à ADN plasmidique. Les aspects liés à l'application éventuelle de la législation sur les OGM aux animaux traités ou à leur progéniture en cas d'intégration du plasmide ne sont pas couverts par cette ligne directrice.

Ligne directrice sur les vaccins à ADN plasmidique à usage vétérinaire

EMA/CVMP/IWP/365817/2022

L'évaluation des risques prendra en considération les données probantes provenant de plates-formes de vaccins à base de plasmide ou d'ADN comparables et enregistrées.

2. La réponse immunitaire aux antigènes exprimés par l'ADN injecté pourrait susciter des inquiétudes quant à d'éventuels effets indésirables sur le système immunitaire, y compris des réactions auto-immunes. Le mimétisme moléculaire et l'activation des témoins peuvent être attribués à la vaccination en général ; il n'y a toutefois guère de preuves que ce risque est accru en réponse aux vaccins ADN spécifiquement.

Bien que l'ADN ait généralement un très faible potentiel immunogène, l'ADN bactérien peut avoir un effet mitogène ou immunostimulant. L'ADN double brin (ds) peut à lui seul induire des réponses immunitaires innées et médiées par les lymphocytes T par le biais d'un certain nombre de voies de signalisation. Bien que cela puisse être bénéfique en raison d'un effet adjuvant, l'ADN double brin d'un effet adjuvant, il est possible que cela déclenche une activation auto-immune. L'incorporation spécifique de séquences immunostimulantes doit être appliquée avec précaution et doit faire l'objet d'une évaluation des risques et d'une justification appropriées.

3. Des gènes supplémentaires codant pour des molécules co-stimulatrices (cytokines/chimiokines) peuvent présenter des risques supplémentaires :

L'introduction de gènes codant pour des molécules co-stimulatrices, visant à renforcer la réponse immunitaire déclenchée chez l'animal vacciné, pourrait avoir des effets néfastes, en particulier, par exemple, si la cytokine a été introduite dans un plasmide dont l'expression ne peut être interrompue. L'introduction de gènes co-stimulateurs devrait être justifiée du point de vue de la sécurité et de l'efficacité.

4. L'antigène exprimé peut potentiellement avoir lui-même une activité biologique indésirable :

Un antigène codé peut présenter une activité biologique indésirable. Dans ce cas, il peut être nécessaire de prendre des mesures appropriées (par exemple, mutagenèse par délétion) pour éliminer l'activité tout en conservant la réponse immunitaire souhaitée.

5. La présence de gènes de résistance aux antibiotiques dans le produit fini doit être évitée dans la mesure du possible. La présence de gènes de résistance aux antibiotiques dans le produit fini doit être évitée dans la mesure du possible ; s'ils sont utilisés à des fins de sélection dans l'hôte bactérien, il convient de s'assurer que toute résistance aux antibiotiques ou tout autre gène résiduel dans le produit fini n'est pas fonctionnel chez les animaux vaccinés et n'est pas transférable à d'autres organismes.

## 5. Exigences en matière de données

Les exigences en matière de données pour les vaccins vétérinaires doivent être prises en compte dans le dossier de demande. Les informations doivent être présentées conformément au format défini à l'annexe II du règlement (UE) 2019/6). Les points suivants doivent être abordés, le cas échéant, dans les différentes sections du dossier.

### 5.1. Exigences en matière de données pour la partie 2 Qualité

#### Composition qualitative et quantitative (IIIb.2.A1.)

Le nom de la substance active, la quantité par dose, la fonction et la référence aux normes doivent être indiqués (sous forme de tableau). Le terme "ADN" n'est pas une description adéquate de la substance active. Le titre complet (identité) du plasmide codant pour l'antigène/la protéine d'intérêt doit être indiqué. La concentration minimale de plasmide utilisée pour établir l'efficacité doit être indiquée (si de l'ADN super enroulé est utilisé, le pourcentage d'ADN super enroulé doit être indiqué).

#### Développement de produits (IIIb.2.A2.)

La justification de la sélection du ou des gènes codés dans le ou les plasmides doit être discutée et la séquence du gène de type sauvage ainsi que les propriétés antigéniques de la protéine codée à l'état naturel doivent être décrites et justifiées. Cette description doit inclure des détails sur le(s) gène(s) codant pour la(les) protéine(s) contre laquelle(lesquelles) la réponse immunitaire est recherchée, des informations sur la construction du(des) plasmide(s) entier(s) et de la(des) cellule(s) bactérienne(s) hôte(s) et, si un ADN plasmidique synthétique de novo est utilisé, les détails de la synthèse du plasmide doivent être fournis.

Pour les plasmides à ADN bactérien, l'origine du gène d'intérêt doit être décrite en détail, par exemple le nom du micro-organisme ou de la cellule dont le gène est issu, la source d'origine, son espèce, l'historique du passage, le sous-type et la stratégie d'isolement suivie.

Dans le cas d'un plasmide d'ADN synthétique, les étapes de la synthèse doivent être indiquées ; la synthèse de gènes de-novo, le clonage et le mutage doivent être décrits. Les détails de l'optimisation des séquences et de la conception des oligos doivent être fournis le cas échéant.

La vérification de la séquence, y compris une carte plasmidique détaillée, est requise.

Les étapes de la construction de l'ensemble du plasmide du vaccin doivent être décrites, y compris la source du ou des plasmide(s) utilisé(s) et les sous-clones générés au cours de la procédure de clonage. Les diagrammes de flux de toutes les procédures de clonage de l'ADN recombinant intermédiaire doivent être fournis.

Les composants fonctionnels tels que les séquences régulatrices (par exemple, origines de réplication, promoteurs viraux/eucaryotes, amplificateurs, introns, séquences de terminaison) et les marqueurs de sélection (s'ils sont utilisés) doivent être clairement indiqués et des informations sur la source et la fonction de ces éléments doivent être fournies. Les données de séquençage, y compris un certificat d'analyse de séquençage, sur l'ensemble du plasmide (ou sur l'ensemble des plasmides dans le cas de vaccins multivalents) seront exigées et l'utilisation de tous les éléments ou régions spécifiques de l'ADN devra être justifiée. Des contrôles d'homologie de la séquence d'ADN du plasmide avec les données de la séquence d'ADN de l'espèce cible doivent être effectués et les informations fournies dans le dossier de demande.

Une carte de restriction informative du plasmide vaccinal doit être présentée. Une attention particulière doit être accordée à la nature du marqueur de sélection, s'il est utilisé. L'utilisation de certains marqueurs de sélection, tels que la résistance aux antibiotiques, ainsi que de certaines séquences telles que les longues répétitions terminales (LTR) de type rétroviral et les oncogènes doit être évitée.

La justification du choix de la cellule bactérienne hôte utilisée pour la production de plasmides doit être fournie avec une description de sa source, de son phénotype et de son génotype. Une approche fondée sur le risque peut être utilisée pour démontrer que la cellule hôte est exempte de contamination par des bactériophages et d'autres agents étrangers, conformément aux exigences de la Ph. Eur. L'identité du plasmide vaccinal après transfection dans la cellule bactérienne à utiliser pour la production et le phénotype de la cellule transfectée doivent être confirmés. Les réarrangements du plasmide étant inacceptables, des données sur la stabilité (rétention du plasmide et homologie de séquence) du plasmide dans la cellule bactérienne seront requises. En fonction des risques, l'expression de gènes procaryotes, tels qu'un marqueur de sélection, dans une lignée cellulaire eucaryote doit être étudiée. Une évaluation des risques doit être fournie pour justifier l'inclusion d'un gène marqueur particulier, le cas échéant. La probabilité d'une contamination croisée, par exemple par recombinaison avec des séquences endogènes dans le substrat cellulaire, doit être évaluée. avec des séquences endogènes dans le substrat cellulaire utilisé lors de la construction ou de la production du plasmide ADN doit être évaluée. Cela peut être démontré par le séquençage de l'ADN plasmidique du lot de semences principal.

### **Description de la méthode de fabrication (IIIb.2B.)**

Les procédures et les matériaux utilisés en général doivent être décrits en détail, par exemple, dans le processus de fermentation (et/ou de culture) et de récolte. Un organigramme complet du processus de fabrication des vaccins à ADN plasmidique à usage vétérinaire EMA/CVMP/IWP/365817/2022 Page 7/11 de fabrication doit être fourni. Des informations sur les paramètres du procédé (par exemple, les conditions de fermentation et de récolte) doivent être présentées, les contrôles pertinents en cours de fabrication

doivent être identifiés et les critères d'acceptation doivent être établis. Ceux-ci peuvent inclure, sans s'y limiter, le nombre de passages, les taux de croissance et la viabilité des cultures, la charge biologique et l'endotoxine, l'identité, la pureté et le rendement en plasmides.

Pour les procédés de fermentation, il convient de définir les niveaux minimum et maximum de croissance cellulaire acceptés pendant la production et de se fonder sur les informations relatives à la stabilité du système cellule hôte/plasmide jusqu'au niveau maximum de fermentation utilisé. À la fin de la fermentation et de la récolte, les caractéristiques des cellules/plasmides bactériens doivent être étudiées. Cela peut inclure l'analyse des fragments de restriction et le rendement des cellules et du plasmide.

Toute méthode utilisée pour extraire l'ADN plasmidique et éliminer et/ou réduire la concentration de contaminants ou d'impuretés liés au procédé et au produit doit être décrite en détail et le procédé doit être expliqué et validé.

La capacité d'élimination des contaminants sera établie pour le procédé de purification par la différence entre les niveaux de contaminants avant et après les étapes critiques de la purification. L'acceptation des lots sera établie sur la base du respect des limites supérieures d'acceptation définies pour chaque contaminant. Des études de validation de la capacité d'épuration seront nécessaires.

Il convient de mettre au point des contrôles appropriés en cours de processus pour tout contaminant potentiellement préoccupant et d'établir des limites supérieures d'acceptation pour les essais de routine par lots, sur la base de données provenant d'essais montrant l'innocuité de cette concentration.

### **Production et contrôle des matières premières (IIIb.2C.)**

#### Semences cellulaires

La production de vaccins à ADN plasmidique doit reposer, dans la mesure du possible, sur un système bien défini de semences de cellules maîtresses (lot de semences maîtresses) et de semences de cellules de travail (lot de semences de travail). Les procédures de clonage et de culture utilisées pour l'établissement du lot de semences maître doivent être décrites. L'origine, la forme, le stockage et l'utilisation doivent être décrits en détail pour toutes les semences cellulaires. Le lot de semences principal doit être entièrement caractérisé et les caractéristiques phénotypiques spécifiques qui constituent la base de l'identification doivent être décrites. Les tests potentiels effectués sur les lignées de cellules productrices (organisées dans un système de banque de cellules) comprennent l'identité, la pureté, le nombre de cellules, la viabilité, la caractérisation de la souche, le génotypage/phénotypage et, le cas échéant, la vérification de la structure du plasmide/de la séquence transgénique/de la séquence auxiliaire (par exemple, analyse de restriction ou séquençage), la stabilité génétique, le nombre de copies, l'identité et l'intégrité des séquences introduites, selon le cas.

La séquence de l'ensemble du plasmide doit être confirmée au stade du lot de semences principal et du lot de semences de travail ou aux stades critiques de la synthèse de novo. La stabilité du plasmide doit être démontrée tout au long du processus jusqu'au produit fini, c'est-à-dire que l'alignement des résultats de la séquence d'ADN à chaque étape, depuis le lot de semences principal/les molécules de départ de la synthèse de novo jusqu'au produit fini inclus, doit être fourni et doit être identique à 100 % (les lots de consistance peuvent être utilisés pour le démontrer). Les lots de semences de travail/produits intermédiaires doivent également être caractérisés de manière adéquate et répondre aux critères d'acceptation établis.

Pour les processus de fermentation, il convient de déterminer la viabilité du système hôte-vecteur dans le lot de semences principal et le lot de semences de travail dans des conditions de stockage et de récupération. L'intégrité de la séquence d'ADN plasmidique pourrait être démontrée en validant les conditions de stockage et de récupération proposées pour le lot de semences de travail en tant que scénario le plus défavorable, c'est-à-dire à des périodes/températures de stockage plus extrêmes que celles proposées, sauf justification contraire.

Le risque d'agents étrangers potentiels du lot de semences principal et du lot de semences de travail/molécules de départ doit être évalué conformément aux exigences de la pharmacopée européenne. Il convient de démontrer que les plasmides bactériens sont exempts de toute contamination potentielle, par exemple par des virus endogènes, y compris les formes de type sauvage de tout vecteur viral, par exemple par séquençage de l'ADN plasmidique du lot de semences principal.

L'absence de contamination bactérienne et fongique, ainsi que de mycoplasmes et de spiroplasmes, le cas échéant, doit être déterminée.

### **Essais de contrôle au cours du processus de fabrication (IIIb.2D.) et essais de contrôle sur le produit fini (IIIb.2E.)**

Les spécifications de la substance active et du produit fini doivent être établies et justifiées. Des descriptions des méthodes analytiques et des limites d'acceptation pour les essais en cours de fabrication et sur le produit fini, y compris des informations sur la qualification ou la validation des essais, doivent être fournies. Il est recommandé que les spécifications comprennent une évaluation de l'identité, de la forme moléculaire et de la quantité du plasmide, de la pureté, de l'activité, de la teneur en endotoxines et de la stérilité. Une justification des spécifications doit être fournie.

Un résumé des résultats des tests effectués sur tous les lots pertinents produits doit être fourni. L'opportunité d'effectuer des tests sur le plasmide purifié en vrac par rapport au vaccin formulé doit être examinée au cas par cas et justifiée.

Au moins trois lots de vaccins, y compris la forme galénique finale, doivent être caractérisés de la manière la plus complète possible afin de déterminer la cohérence du processus de fabrication et de démontrer la conformité aux spécifications. Toute différence entre les lots doit être notée.

#### Identité

Tests en cours de fabrication :

L'identité de chaque lot de plasmide purifié doit être confirmée par une technique appropriée (par exemple, analyse PCR, séquençage, analyse des enzymes de restriction), y compris la confirmation de la forme moléculaire du plasmide (par exemple, par électrophorèse sur gel d'agarose).

La confirmation de l'identité de l'antigène exprimé doit également être documentée au moins pendant la phase de développement par l'utilisation de tests spécifiques, tels que le Western Blot ou le test d'immunofluorescence (IFA).

Pour les vaccins contenant des plasmides codant pour des molécules biologiquement actives non antigéniques, la confirmation de l'identité de la molécule exprimée doit être évaluée à l'aide d'un test biologique approprié, bien qu'il ne soit pas forcément nécessaire d'effectuer le test de routine pour déterminer l'identité. D'autres tests, le cas échéant et en fonction de la méthode de production, de la purification et de la nature du plasmide, doivent également être appliqués.

Tests sur les produits finis :

Conformément aux exigences de la Ph. Eur., des tests d'identification sont effectués sur chaque lot à l'aide de méthodes appropriées. Bien qu'une méthode appropriée pour les tests d'identité de routine puisse différer du test effectué pendant le développement, elle doit être jugée appropriée.

#### Quantification de l'ADN

Un test quantitatif de la teneur en ADN plasmidique doit être effectué sur chaque lot de produit fini. La quantité de substance active (par exemple, le plasmide super enroulé) doit être déterminée et des spécifications doivent être établies. Ces tests quantitatifs doivent être validés de manière appropriée.

Les formes potentiellement dégradées ou non fonctionnelles de l'ADN doivent être prises en considération afin de garantir une teneur efficace en ADN plasmidique.

#### Pureté

La pureté de chaque lot de vaccin plasmidique doit être évaluée. Des limites précises doivent être fixées pour déterminer le niveau de contaminants d'origine bactérienne considéré comme acceptable. Des tests supplémentaires peuvent être nécessaires en fonction du processus de production utilisé, des résultats

obtenus lors de la purification, de la validation du processus et des études de sécurité (par exemple, des tests pour la concentration d'ARN résiduel, la concentration d'ADN génomique résiduel de la cellule hôte, la teneur en protéines résiduelles).

Chaque lot de produit doit également être soumis à un test d'endotoxine, à moins que l'omission de ce test ne puisse être justifiée de manière satisfaisante.

Pour toutes les impuretés, les critères d'acceptation basés sur des lots cohérents et des études de sécurité doivent être établis par quantité d'ADN total par ml de produit final, ou par UE/ml pour les endotoxines (conformément aux exigences de la Ph. Eur.).

#### Test de puissance des lots

La puissance de chaque lot de produit fini doit être établie à l'aide d'un test validé de manière appropriée. L'approche la plus appropriée variera en fonction de la composition du vaccin, de la nature de la maladie, du ou des antigènes exprimés et de la réponse immunitaire recherchée. Par conséquent, la conception d'un test d'activité devra être soigneusement étudiée et sera évaluée au cas par cas.

Dans la mesure du possible, il convient d'établir une préparation de référence interne approuvée, à partir d'un lot de vaccins caractérisé de manière appropriée et dont l'efficacité a été démontrée (ou de la même qualité que les lots efficaces).

Un niveau approprié d'activité fonctionnelle du plasmide ADN doit être démontré au moins pendant la phase de développement. Un essai qualitatif peut être utilisé pour détecter l'expression de la protéine d'intérêt dans une lignée cellulaire de l'espèce cible ; il n'est pas forcément nécessaire d'effectuer cet essai en routine pour tester l'activité des lots.

Un essai quantitatif visant à déterminer la quantité d'ADN (sc), par exemple par CLHP ou par d'autres essais validés de manière appropriée, doit être établi lorsque l'ADN superenroulé est utilisé pour mesurer l'activité. Ce test doit être effectué régulièrement et peut suffire au moment de la libération si un test qualitatif a été dûment vérifié au cours du développement du produit et lié à l'activité fonctionnelle attendue du plasmide d'ADN.

Il convient de fournir des informations concernant les réactifs utilisés et leur remplacement par des méthodes validées d'essai d'activité. validées doivent être fournies.

#### **Constance d'un lot à l'autre (IIIb.2F.)**

Les résultats de trois lots consécutifs de produits finis provenant de trois séries de production représentatives de la production de routine doivent être fournis ou justifiés d'une autre manière. Les trois lots de vaccins doivent être préparés à partir d'au moins deux lots différents de substance active. Les protocoles de fabrication de chacun des lots doivent être fournis.

Il convient de démontrer que le plasmide est stable tout au long du processus de production jusqu'au produit fini, c'est-à-dire que les résultats du séquençage de l'ADN doivent être alignés. Il convient de fournir une stratégie de contrôle justifiée jusqu'au produit fini inclus et de démontrer que les résultats sont identiques.

#### **Tests de stabilité (IIIb.2G.)**

##### Stabilité de la substance active

Il convient de fournir des données relatives à des lots de la récolte en vrac (culture de production) stockés à une température donnée et démontrant que le stockage proposé n'a pas d'effet préjudiciable sur l'ADN plasmidique.

##### Stabilité du produit fini

Les données relatives à la stabilité d'au moins trois lots de produits finis fabriqués selon le procédé proposé doivent être fournies afin de déterminer une durée de conservation appropriée pour le produit. Pour évaluer l'intégrité physique de l'ADN plasmidique (supercoiled) contenu dans le produit fini au fil du temps, la teneur en ADN plasmidique (supercoiled) peut être mesurée à l'aide d'une combinaison de différentes méthodes :

par exemple, électrophorèse sur gel d'agarose et chromatographie (par exemple, HPLC). Le test d'activité doit être utilisé pour déterminer si le produit est efficace pendant la durée de conservation proposée.

## **5.2. Exigences en matière de données pour la partie 3 Sécurité**

Les essais de sécurité doivent être réalisés conformément aux exigences de la "section IIIb.3. partie 3 : Documentation relative à l'innocuité (tests d'innocuité et de détection des résidus)" de l'annexe II du règlement (UE) 2019/6 et conformément aux exigences de la Ph. Eur. 5.2.6 "Évaluation de l'innocuité des vaccins et immunosérums vétérinaires". Vous trouverez ci-après des exemples de points spécifiques, qui doivent être abordés de manière appropriée dans les rubriques indiquées. Sauf justification contraire, il convient d'utiliser les lots présentant la dose maximale (c'est-à-dire le titre, la teneur en antigènes ou l'activité maximale, compte tenu également du niveau maximal d'impuretés pertinentes, par exemple les endotoxines).

### **Études de distribution**

Des données sur la distribution doivent être produites pour les vaccins à ADN.

La voie d'inoculation de l'ADN ainsi que la quantité d'ADN administrée peuvent influencer la distribution de l'ADN dans l'organisme. Des études de localisation doivent être conçues pour déterminer la distribution de l'ADN après administration par la voie proposée et en utilisant la méthode d'inoculation proposée. En utilisant des méthodes suffisamment sensibles, l'étendue de la distribution de l'ADN plasmidique à la cible et aux tissus environnants, y compris les ganglions lymphatiques de drainage, doit être analysée à différents moments (par exemple, le jour 1, le jour 7 et un mois après la vaccination ou à un moment plus éloigné, le cas échéant). Le choix du moment de l'échantillonnage doit tenir compte des informations sur la biodistribution et la persistance de l'ADN dans le corps de l'animal vacciné.

Les données de distribution obtenues avec un type de plasmide devraient également être applicables à tous les autres plasmides partageant le même squelette et ne différant que par le gène antigénique cloné, à condition que les inserts soient approximativement de la même taille.

### **Intégration et oncogénèse**

Ces études, le cas échéant, doivent être entreprises avec le produit fini.

Une analyse étape par étape doit être effectuée. Il convient de rechercher la présence d'ADN plasmidique au site d'administration et dans le ganglion lymphatique drainant. Si l'ADN plasmidique est détecté, il convient d'utiliser des méthodes suffisamment sensibles pour rechercher une éventuelle intégration de l'ADN plasmidique dans le génome de l'hôte. Si l'intégration est détectée ou suspectée, et qu'un risque d'oncogénicité dû à l'espérance de vie des animaux cibles est identifié, un test d'oncogénicité dans un système d'animaux de laboratoire sensibles pourrait être effectué. Par ailleurs, l'incidence des tumeurs chez l'espèce cible, en particulier au site d'injection et dans le tissu cible, pourrait être enregistrée à la fin des études pivotales sur la sécurité des animaux cibles et des études d'efficacité pertinentes (par exemple, la durée de l'immunité). Si des résultats indésirables sont obtenus chez l'animal de laboratoire, une étude chez l'animal cible est nécessaire. Après la mise sur le marché, tout signalement de tumeur chez l'espèce cible doit faire l'objet d'un suivi attentif dans le cadre de la pharmacovigilance.

### **Toxicité pour la reproduction**

Des études standard sur l'impact sur les performances reproductives doivent être menées pour les vaccins ADN comme pour les autres types de vaccins.

La possibilité de migration de l'ADN vers les tissus gonadiques et le transfert potentiel de l'ADN dans les cellules de la lignée germinale des animaux mâles et femelles vaccinés, et donc la transmission potentielle à la progéniture, doivent être pris en considération. Si nécessaire, les études de distribution mentionnées ci-dessus doivent être étendues pour fournir des informations sur ce point.

### **Examen des fonctions immunologiques**

Des études spécifiques doivent être menées pour examiner la possibilité d'effets indésirables sur le système immunitaire, en particulier si des cytokines ou d'autres gènes immunomodulateurs sont utilisés comme adjuvants. Une étude appropriée peut être une comparaison côte à côte évaluant un éventuel impact négatif (du vaccin en cours de développement) sur une réponse sérologique induite par un autre vaccin chez l'espèce cible.

### **5.3. Exigences en matière de données pour la partie 4 Efficacité**

Les données doivent être soumises conformément aux exigences de la "Section IIIb.4. Partie 4 : Documentation relative à l'efficacité (études précliniques et essais cliniques)" de l'annexe II du règlement (UE) 2019/6 et conformément aux exigences de la Ph. Eur. 5.2.7 "Évaluation de l'efficacité des vaccins et immunosérums vétérinaires".

Les exigences standard pour les tests d'efficacité des vaccins vétérinaires sont applicables à ces produits. L'efficacité doit également être démontrée avec des lots contenant la quantité minimale efficace de la substance active. substance active.

### **Définitions**

#### **Vaccin à ADN plasmidique :**

Vaccin dont la substance active est un ou plusieurs plasmides génétiquement modifiés contenant des séquences d'ADN codant pour un ou plusieurs antigènes contre lesquels une réponse immunitaire est recherchée.

### **Références**

EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments), Houston, R et al. "Assessment of the potential integration of du vaccin plasmidique à ADN CLYNAV dans le génome du saumon". EFSA Journal 2017;15(1):4689, 15 pp  
Ph. Eur. 0784 Technologie de l'ADN recombinant, produits de