

Správná praxe pro posouzení GMO aspektů klinických hodnocení léčivých přípravků, ve kterých jsou klinickými vektory adeno-asociované viry (AAV)

1. Úvod

Adeno-asociované virové vektory (AAV) mohou být použity k výrobě léčivých přípravků. Tyto vektory jsou odvozeny z adeno-asociovaného viru, jednovláknového DNA viru z čeledi Parvoviridae.

Adeno-asociované viry jsou rozšířeny u mnoha druhů zvířat i u lidí: odhaduje se, že přibližně 80 % dospělé lidské populace je séropozitivní nejméně na jeden AAV sérotyp. Přes „všudypřítomnost“ adeno-asociovaných virů a vysokou frekvenci imunity vůči nim, nejsou tyto viry spojovány s žádným onemocněním člověka nebo zvířat.

Adeno-asociované viry jsou schopné replikace pouze tehdy, je-li buňka zároveň infikována pomocným virem (helper virus). Replikaci přirozeně se vyskytujících („wild-type“) adeno-asociovaných virů umožňují adenoviry, herpes simplex virus, virus Aujeszkyho choroby (pseudorabies virus) a lidský papilloma virus. V přítomnosti pomocného viru proběhne produktivní infekce - dojde k aktivaci adeno-asociovaného viru, charakterizované replikací genomu, expresí virových genů a produkci virionů. Bez přítomnosti pomocného viru v infikované buňce může DNA adeno-asociovaného viru přetrvávat v buněčném jádru v epizomální formě, nebo se může integrovat do genomu hostitelské buňky, což vede k latentní infekci. Latentní infekce adeno-asociovaným virem může být reaktivována infekcí buňky pomocným virem. Integrace adeno-asociovaného viru do preferovaného lokusu DNA hostitelské buňky, jako např. integrace do AAVS1, je zprostředkována Rep proteinem adeno-asociovaného viru.

Adeno-asociované viry mohou infikovat jak dělící se, tak nedělící se buňky a mohou infikovat široké spektrum typů buněk, ačkoliv specifické sérotypy mohou být spojeny s účinnějším tkáňovým tropismem.

Adeno-asociované virové částice jsou neobalené a jsou vysoce stabilní v prostředí, i když jsou desikovány.

U vektorů používaných v klinické praxi je odstraněn téměř celý genom přirozeného viru, s výjimkou obrácených koncových repetit (inverted terminal repeats, ITR). To poskytuje kapacitu pro maximální velikost vloženého genetického materiálu (packaging capacity) obvykle od 4,4 do 4,7 kb, ačkoliv určitými produkčními postupy může být tato kapacita AAV vektoru zvýšena až na maximální hodnotu 6 kb.

K přípravě AAV klinických vektorů mohou být použity různé strategie, ale základní funkční prvky jsou následující:

- obrácené koncové repetice (ITR) adeno-asociovaného viru obklopující gen, který je předmětem zájmu (tento konstrukt obsahuje cis elementy nutné pro sbalování a replikaci jednovláknového DNA genomu),
- genetické sekvence (Rep a Cap), nezbytné pro replikaci adeno-asociovaného viru a proteiny

virové kapsidy (většinou jsou dodávány ve formě trans, a to v plazmidu, bakulovirovém vektoru nebo v pakázovací buněčné linii),

- funkce pomocného viru: zde je možné použít několik postupů, od dřívějšího použití ko-infekce pomocným virem ke ko-transfekci plazmidem nebo ko-transdukci vektory odvozenými z bakuloviru a kódujícími pomocné geny,
- buněčná linie schopná podpořit replikaci pomocného viru a adeno-asociovaného viru.

Vzhledem k výše uvedenému a s ohledem na zkušenosti získané posuzováním AAV klinických vektorů by posouzení žádostí o provádění klinického hodnocení léčivých přípravků s AAV klinickými vektory mělo být založeno na prvcích uvedených v žádosti (viz formulář žádosti o klinická hodnocení humánních léčivých přípravků obsahujících adeno-asociované virové vektory).

Klinické hodnocení s AAV klinickými vektory, prováděné v souladu s požadavky specifického hodnocení rizika podle Sekce 2, může probíhat v první kategorii rizika uzavřeného nakládání s geneticky modifikovanými organismy (BSL-1).

2. Specifické hodnocení rizika pro životní prostředí

Toto specifické hodnocení rizika pro životní prostředí může být použito pro AAV klinické vektory pouze tehdy, jestliže žadatel prokáže, že nemůže dojít k vytvoření viru schopného replikace a že transgen není škodlivý.

2.1. Identifikace a charakterizace nebezpečí

Možná nebezpečí pro lidské zdraví

- *Nebezpečí plynoucí z vylučování/uvolňování (shedding) adeno-asociovaných virů schopných replikace:* Existuje potenciální nebezpečí, že klinický vektor by získal schopnost replikace, jestliže by došlo k rekombinaci klinického vektoru v člověku, který by byl zároveň infikován přirozeně se vyskytujícím adeno-asociovaným virem a pomocným virem, a po této rekombinaci by následovalo uvolnění do životního prostředí. Produktem rekombinace by byl adeno-asociovaný virus. Vzhledem k tomu, že adeno-asociované viry nejsou spojovány s žádnou známou patogenitou a že v klinickém vektoru není žádný nebezpečný insert, lze považovat nebezpečí plynoucí z vylučování/uvolňování adeno-asociovaných virů schopných replikace za velmi nízké.
- *Nebezpečí plynoucí z dlouhodobé perzistence klinického vektoru v transdukovaných buňkách (latentní infekce):* Klinický vektor je podáván pacientům za účelem léčby určitého stavu. Perzistence klinického vektoru v buňkách léčeného pacienta je očekávána, žádoucí vlastnost vektoru a nepředstavuje nebezpečí pro lidské zdraví. Nicméně náhodný přenos klinického vektoru na jinou osobu, než je ošetřovaný pacient, může vést k transdukci AAV klinickým vektorem. V takovém případě se očekává, že DNA přeneseného klinického vektoru bude přetrvávat v transdukovaných buňkách necílového příjemce ve formě stabilních epizomů, nebo se AAV klinický vektor může – ve vzácných případech – integrovat (viz další bod).

Vzhledem k tomu, že adeno-asociované viry nejsou spojovány s žádnou známou patogenitou a že v klinickém vektoru není žádný nebezpečný insert, lze považovat nebezpečí plynoucí z dlouhodobé perzistence klinického vektoru v transdukovaných buňkách za velmi nízké.

- *Nebezpečí plynoucí z inzerční mutagenese:* Určité přirozeně se vyskytující adeno-asociované viry se mohou stabilně integrovat do specifického lokusu v genomu hostitelské buňky (AAVS1 do dlouhého raménka lidského chromozomu 19); v případě integrace zůstávají nepatogenní. Naproti tomu rekombinantní adeno-asociované viry ztratily schopnost integrovat se do specifického místa genomu hostitelské buňky.

Integrace klinického vektoru do nespecifického místa genomu infikovaných buněk může vést k inzerční mutagenезi u jedinců, kteří jsou vystaveni produktu v případě nehody nebo při jeho přítomnosti v prostředí (v důsledku vylučování/uvolňování - shedding). Jestliže by se riziko integrace do nespecifického místa realizovalo, lze důsledky pro postižené osoby považovat za středně závažné.

- *Nebezpečí plynoucí z vertikálního přenosu / přenosu po zárodečné linii:* Studie biodistribuce na zvířatech ukázaly, že DNA z AAV klinických vektorů může být detekována v DNA gonád po různě dlouhou dobu. Přítomnost rekombinantního adeno-asociovaného viru v gonádách tudíž nelze vyloučit.

V právních předpisech EU, které upravují provádění klinických hodnocení humánních léčivých přípravků, jsou stanovena pravidla pro předcházení nebezpečí spojených s vertikálním přenosem / přenosem po zárodečné linii (zákaz modifikace lidské zárodečné linie a omezení, pokud jde o provádění klinických hodnocení s těhotnými a kojícími ženami). Toto hodnocení rizika pro životní prostředí se tedy dále přenosem po zárodečné linii nezabývá.

Možná nebezpečí pro zvířata anebo pro životní prostředí

- *Nebezpečí pro zvířata:* Zvířata mohou být přirozenými hostiteli určitých adeno-asociovaných virů. Je tedy nutno zvážit i potenciální nebezpečí pro zvířata, která přijdou do styku s klinickým vektorem vyloučeným/uvolněným ze subjektu klinického hodnocení (shedding). Vzhledem k tomu, že adeno-asociované viry nejsou spojovány s žádnou známou patogenitou a že v klinickém vektoru není žádný nebezpečný insert, lze považovat nebezpečí pro zvířata za velmi nízké.

2.2. Charakterizace expozice

Pravděpodobnost nepříznivých účinků spojených s rekombinací / mobilizací

Rekombinované částice by měly geny *rep* a *cap*, stále by ale byly replikačně defektní (stejně jako přirozeně se vyskytující virus). Tudíž jediný mechanismus, jak by mohla nastat mobilizace je, že stejná buňka by byla současně infikována klinickým vektorem, přirozeně se vyskytujícím adeno-asociovaným virem a pomocným virem (trojitá infekce). Pravděpodobnost, že dojde simultánně k trojitě infekci, lze považovat za velmi nízkou.

Pravděpodobnost nepříznivých účinků spojených s dlouhodobou perzistencí klinického vektoru

v transdukovaných buňkách (latentní infekce)

Možné scénáře:

- (1) Náhodný přenos na necílové osoby: Možným scénářem náhodného přenosu na jiné osoby, než je subjekt klinického hodnocení, může být poranění jehlou při aplikaci léčivého přípravku pacientovi nebo expozice zdravotnického personálu při zacházení s produktem. Hodnocený léčivý přípravek je podáván školeným personálem ve vysoce zabezpečeném prostředí, což minimalizuje možnost, že by během podání léčivého přípravku nebo zacházení s ním mohlo dojít k náhodnému přenosu. Pravděpodobnost výskytu nepříznivých účinků lze tudíž považovat za velmi nízkou.
- (2) Přenos vylučováním/uvolňováním do prostředí (shedding): Osoby, které jsou v blízkém kontaktu se subjektem klinického hodnocení, mohou být kontaminovány AAV klinickým vektorem prostřednictvím např. slin, krve, slz, spermatu, moči nebo stolice subjektu klinického hodnocení. Pravděpodobnost vylučování/uvolňování klinického vektoru může být nízká nebo střední, v závislosti na jeho vlastnostech a na cestě podání. V každém případě bude kvantitativní expozice blízkých osob klinickému vektoru mnohem nižší, než je klinická dávka. Pravděpodobnost výskytu nepříznivých účinků lze tudíž považovat za nízkou.
- (3) Darování krve, buněk, tkání nebo orgánů: Vylučovací kritéria pro dárce omezují možnosti subjektů darovat krev, buňky, tkáň nebo orgány. Kdyby se pacient léčený AAV klinickým vektorem stal dárce krve, buněk, tkání nebo orgánů, příjemce by mohl být vystaven AAV klinickému vektoru. Kvantitativní expozice klinickému vektoru by ale při tomto scénáři byla mnohem nižší, než je klinická dávka. Pravděpodobnost výskytu nepříznivých účinků lze tudíž považovat za velmi nízkou.

Pravděpodobnost nepříznivých účinků spojených s inzerční mutagenezí

Příčinná souvislost mezi infekcí rekombinantními adeno-asociovanými viry a inzerční mutagenezí je teoretickou možností, která byla zkoumána v rámci preklinických studií, ale dosud nebyla žádná příčinná souvislost zjištěna. Obdobně v klinických hodnoceních s AAV klinickými vektory dosud nebyla zjištěna příčinná souvislost mezi podáním léčivých přípravků založených na adeno-asociovaných virech a inzerční mutagenezí.

Pravděpodobnost, že by k inzerční mutagenezi mohlo dojít v případě některého ze tří výše popsaných scénářů možné náhodné nebo neúmyslné expozice AAV klinickému vektoru, lze považovat za zanedbatelnou.

Pravděpodobnost nepříznivých účinků spojených s přenosem na zvířata

Zvířata mohou být vystavena částicím klinického vektoru vyloučeným/uvolněným subjektem klinického hodnocení (shedding). Možným scénářem je dítě léčené AAV klinickým vektorem, které si hraje se svým oblíbeným zvířátkem. Kvantitativní expozice klinickému vektoru by ale byla mnohem nižší, než je klinická dávka. Z toho plyne, že pravděpodobnost neúmyslného přenosu významného množství (rekombinantního) adeno-asociovaného viru na zvířata prostřednictvím vylučování lze považovat za velmi nízkou.

2.3. Charakterizace rizika

Riziko spojené s rekombinací / mobilizací

Pokud by nastal ten nepravděpodobný sled událostí, že buňky transdukované klinickým vektorem by byly současně infikovány přirozeně se vyskytujícím adeno-asociovaným virem a vhodným pomocným virem, lze očekávat, že výsledkem by byla produkce přirozeně se vyskytujícího adeno-asociovaného viru a více částic vektoru, které by nebyly schopné replikace, jelikož by stále neobsahovaly geny *rep* a *cap*. Tudíž riziko pro životní prostředí a lidskou populaci lze považovat za zanedbatelné.

Riziko spojené s dlouhodobou perzistencí klinického vektoru v transdukovaných buňkách (latentní infekce)

U necílových osob se může vyvinout latentní infekce AAV klinickým vektorem v důsledku těchto scénářů:

- (1) Náhodný přenos na necílové osoby: adeno-asociované viry nejsou spojovány s žádným onemocněním člověka přesto, že jsou v populaci značně rozšířené. V těle osob, které již mají vyvinutou imunitu vůči adeno-asociovaným virům z předchozí infekce (T buňky a Ab), budou molekuly klinického vektoru eliminovány imunitním systémem. Vzhledem k tomu, že transgen není spojen s žádnými patogenními vlastnostmi, nejsou ve spojitosti s podáním klinického vektoru necílovým osobám očekávány žádné nepříznivé účinky, případně budou nepříznivé účinky zanedbatelné.

Pokud jde o osoby se sníženou imunitou, je třeba mít na zřeteli, že mnoho pacientů před tím, než jim byla podána AAV terapie, prošlo přípravnou fází několikátýdenního nebo několikaměsíčního podávání steroidů, aby u nich byla potlačena imunitní odpověď na AAV klinický vektor. V těchto případech vyvolané imunosuprese nebylo zjištěno žádné ohrožení bezpečnosti (pacienta) spojené s podáním klinického vektoru.

S ohledem na výše uvedené a vzhledem k velmi malé pravděpodobnosti náhodného přenosu na necílové osoby, lze považovat riziko spojené s latentní infekcí v případě náhodného přenosu klinického vektoru na necílové osoby za zanedbatelné.

- (2) Přenos vylučováním/uvolňováním do prostředí (shedding): V důsledku nízké míry nakažlivosti rekombinantních adeno-asociovaných virů by pro účinnou transdukcí buněk byl potřeba vysoký titr. Tudíž je velmi nepravděpodobné, že by vylučované/uvolňované částice měly dostatečnou schopnost vyvolat u člověka nějakou významnou infekci.

Navíc není známo, že by adeno-asociované viry způsobovaly onemocnění lidí. Dále též díky tomu, že nebyly identifikovány žádné toxické nebo škodlivé vlastnosti v souvislosti s expresí transgenu, lze riziko spojené s latentní infekcí v případě vystavení částicím klinického vektoru, vylučovaným/uvolňovaným z těla subjektu klinického hodnocení, považovat za zanedbatelné. I kdyby blízke osoby, které přišly do styku s AAV klinickým vektorem vylučovaným/uvolňovaným z těla subjektu klinického hodnocení, měly sníženou imunitu, dá se předpokládat, že riziko bude zanedbatelné, vzhledem k nepatogenní povaze adeno-asociovaných virů a vzhledem k omezené kvantitativní expozici.

- (3) Darování krve, buněk, tkání nebo orgánů: V důsledku nízké míry nakažlivosti

rekombinantních adeno-asociovaných virů by pro účinnou transdukcí buněk by byl potřeba vysoký titr. Je tudíž nepravděpodobné, že by množství částic přenesené v případě transfúze nebo transplantace mohlo vyvolat nějakou významnou infekci u příjemce transfúze nebo transplantátu.

Vzhledem k nepatogenní povaze adeno-asociovaných virů a vzhledem k omezené kvantitativní expozici lze riziko spojené s možností latentní infekce necílových osob, které dostaly krev, buňky, tkáň nebo orgány pacienta léčeného AAV klinickým vektorem, považovat za zanedbatelné.

Riziko spojené s inzerční mutagenezí

K inzerční mutagenezí u jiných osob, než je subjekt klinického hodnocení, může dojít v důsledku expozice AAV klinickému vektoru podle jednoho ze tří scénářů: náhodným přenosem, vylučováním/uvolňováním z těla subjektu klinického hodnocení, darováním krve, buněk, tkání nebo orgánů.

Vzhledem k tomu, že:

- u pacientů léčených AAV klinickými vektory (včetně pacientů s potlačenou imunitou) nebyl pozorován vznik nádorů v souvislosti s AAV klinickými vektory,
- kvantitativní expozice ve výše popsáných třech scénářích nemůže být větší než klinická dávka a
- dá se očekávat, že molekuly klinického vektory budou eliminovány imunitním systémem dotyčné osoby,

Lze považovat riziko inzerční mutageneze u necílových osob za zanedbatelné.

Riziko spojené s přenosem na zvířata

Není známo, že by adeno-asociované viry byly patogenní pro zvířata. V důsledku nízké míry nakažlivosti rekombinantních adeno-asociovaných virů by pro účinnou transdukcí buněk byl potřeba vysoký titr. Tudíž je velmi nepravděpodobné, že by vylučované/uvolněné částice měly dostatečnou schopnost vyvolat u zvířete nějakou významnou infekci. Kromě toho v AAV klinickém vektoru není přítomen žádný nebezpečný produkt.

Riziko spojené s přenosem na zvířata lze tedy považovat za zanedbatelné.

3.4. Strategie řízení rizika

Žadatel by měl zvážit, zda přijmout strategie řízení rizika, aby byla minimalizována možnost náhodné expozice zdravotního personálu na pracovišti, kde probíhá klinické hodnocení. Tato opatření by měla být uvedena v sekci 3.6 žádosti o klinické hodnocení.

3.5. Stanovení celkového rizika a závěry

Za předpokladu, že budou uplatňována řídicí opatření popsaná žadatelem, celková rizika pro lidské zdraví lze považovat za zanedbatelná.