

Správná praxe pro posouzení GMO aspektů klinických hodnocení léčivých přípravků s lidskými buňkami geneticky modifikovanými retrovirovými nebo lentivirovými vektory

I. Úvod

V Evropské unii musí klinická hodnocení léčivých přípravků, které sestávají z geneticky modifikovaných organismů (dále jen „GMO“)¹ nebo tyto organismy obsahují, splňovat požadavky legislativy upravující klinická hodnocení². Schvalovací procedura podle právních předpisů o klinických hodnoceních je zaměřená na zajištění práv, bezpečnosti, důstojnosti a kvality života subjektů hodnocení a též na spolehlivost a robustnost získaných údajů.

Klinická hodnocení léčivých přípravků, které sestávají z GMO nebo tyto organismy obsahují, musí též splňovat příslušné požadavky směrnice 2001/18/ES o záměrném uvolňování geneticky modifikovaných organismů do životního prostředí³ („pravidla uvádění do životního prostředí“) nebo požadavky směrnice 2009/41/ES o uzavřeném nakládání s geneticky modifikovanými mikroorganismy⁴ („pravidla uzavřeného nakládání“). Cílem právních předpisů o GMO je zajistit vysokou úroveň ochrany lidského zdraví a životního prostředí.

Nové poznatky v biomedicíně přinášejí naději, že díky léčivým přípravkům genové terapie bude možné řešit některé dosud neuspokojené potřeby současné medicíny anebo použít nové způsoby léčby onkologických onemocnění nebo neurodegenerativních poruch. Léčivé přípravky pro genovou terapii zahrnují široké spektrum produktů s různou mírou rizik pro lidské zdraví a životní prostředí. V této souvislosti vyvstala potřeba vypracování metodického pokynu k aplikaci předpisů o nakládání s GMO při klinických hodnoceních léčivých přípravků s lidskými buňkami modifikovanými retrovirovými nebo lentivirovými vektory. Metodický pokyn by měl zohledňovat specifické vlastnosti těchto hodnocených léčivých přípravků a jejich rizika pro lidské zdraví a životní prostředí.

¹ V tomto dokumentu se pod označením „GMO“ rozumí jak geneticky modifikované organismy definované v článku 2(2) směrnice 2001/18/ES, tak geneticky modifikované mikroorganismy definované v článku 2(a) směrnice 2009/41/ES. V právních předpisech České republiky uvedené pojmy stanoví § 2 písm. d) a e) zákona č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, ve znění pozdějších předpisů.

² Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 536/2014 ze dne 16. dubna 2014 o klinických hodnoceních humánních léčivých přípravků a o zrušení směrnice 2001/20/ES. Do doby, než nařízení nabyde účinnosti, platí směrnice 2001/20/ES (Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2001/20/ES ze dne 4. dubna 2001 o sbližování právních a správních předpisů členských států týkajících se uplatňování správné klinické praxe při provádění klinických hodnocení humánních léčivých přípravků).

³ Směrnice Evropského Parlamentu a Rady 2001/18/ES ze dne 21. března 2001 o záměrném uvolňování geneticky modifikovaných organismů do životního prostředí a o zrušení směrnice Rady 90/220/EHS. V ČR zákon č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, ve znění pozdějších předpisů.

⁴ Směrnice Evropského Parlamentu a Rady 2009/41/ES ze dne 6. května 2009 o uzavřeném nakládání s geneticky modifikovanými mikroorganismy. V ČR zákon č. 78/2004 Sb.

Tento dokument o správné praxi byl vypracován společně Evropskou komisí⁵ a kompetentními orgány členských států odpovědnými za implementaci právních předpisů o klinických hodnoceních a kompetentními orgány odpovědnými za implementaci právních předpisů o nakládání s GMO na základě dosavadních zkušeností s uvedeným typem léčivých přípravků. Dokument vychází z principů politik v oblasti výzkumu a inovací vyjádřených Radou EU, konkrétně z vyjádření o využití všech možností, které skýtá současná legislativa, k usnadnění investic do výzkumu a inovací. Podle závěrů Rady by za tímto účelem měly členské státy mimo jiné zvážit přehodnocení svých národních právních předpisů a implementace práva EU⁶.

Tento dokument o správné praxi je určen k použití společně s jednotným formulářem žádosti specificky vypracovaným pro daný typ hodnocených léčivých přípravků. (Formulář žádosti o klinické hodnocení léčivých přípravků s lidskými buňkami geneticky modifikovanými virovými vektory)

2. Rozsah použití dokumentu

Tento dokument poskytuje pokyny pro implementaci právních předpisů o nakládání s GMO při provádění klinických hodnocení s lidskými buňkami geneticky modifikovanými virovými vektory v těch případech, kdy žadatel prokáže, že:

Pro lidské buňky geneticky modifikované retrovirovými nebo lentivirovými vektory:

- i) nehrozí riziko vzniku viru schopného replikace nebo je toto riziko zanedbatelné, v souladu s částí 3(1) a
- ii) koncentrace zbytkových infekčních retrovirových nebo lentivirových částic v konečném produktu byla snížena na zanedbatelnou hodnotu, v souladu s částí 3(2), nebo riziko spojené s přítomností zbytkových infekčních virových částic v konečném produktu je vyhodnoceno jako zanedbatelné, v souladu s částí 3(3).

Pro účely tohoto dokumentu „retrovirový vektor“ znamená myší gama-retrovirové vektory. Pokud jde o lentivirové vektory, tento dokument byl vypracován na základě znalostí o lidských buňkách transdukováných lentivirovými vektory odvozenými od HIV viru. V případě lentivirových vektorů odvozených z jiných virů je doporučeno předem konzultovat hodnocení rizika s Ministerstvem životního prostředí.

Pro lidské buňky geneticky modifikované adeno-asociovanými virovými vektory (AAV):

- i) nehrozí riziko vzniku viru schopného replikace nebo je toto riziko zanedbatelné, v souladu s částí 3(1) a
- ii) pokud je v produkčním systému použit pomocný virus (helper virus), konečný produkt

⁵ Tento dokument je jedním z výstupů z jednání s národními kompetentními orgány o vzájemných souvislostech legislativy EU v oblasti nakládání s GMO a legislativy o klinických hodnoceních humánních léčivých přípravků, jak stanovil Akční plán pro léčivé přípravky pro moderní terapie, přijatý Evropskou komisí – GR pro zdraví a bezpečnost potravin a Evropskou agenturou pro léčivé přípravky.

⁶ Závěry Rady k právnímu prostředí příznivému pro výzkum a inovace, přijaté Radou EU na jejím 3470. zasedání dne 27. května 2019

neobsahuje zbytkové pomocné viry. To může být prokázáno na úrovni virového vektoru.

Požadavky stanovené v tomto dokumentu lze použít jak v případech, kdy klinické hodnocení spadá pod pravidla uvádění do životního prostředí, tak i v případech, kdy klinické hodnocení spadá pod pravidla uzavřeného nakládání.

Je třeba zdůraznit, že obsah tohoto dokumentu (včetně specifického hodnocení rizik pro životní prostředí) nelze vztáhnout na jiné produkty, než na výše specifikované geneticky modifikované lidské buňky.

3. Požadavky na údaje a na hodnocení rizika pro životní prostředí

Lidské buňky se v životním prostředí nemohou množit, neboť jsou schopny přežívat pouze v lidském těle nebo za specifických podmínek kultivace *in vitro*. Z toho plyne, že pokud hodnocený léčivý přípravek sestává z lidských buněk geneticky modifikovaných virovými vektory, jeho rizika pro životní prostředí a lidské zdraví jsou spojena především s možností vytvoření viru schopného replikace a s přítomností zbytkových infekčních částic virového vektoru v konečném produktu, které by se mohly uvolnit do životního prostředí (vztahuje se zejména na lidské buňky geneticky modifikované retrovirovými nebo lentivirovými vektory).

S ohledem na tyto skutečnosti a na základě zkušeností získaných členskými státy EU při posuzování nakládání s lidskými buňkami geneticky modifikovanými virovými vektory, by posouzení žádostí o klinické hodnocení léčivých přípravků, na něž se vztahuje tento dokument, mělo být založeno na popisu použitého virového vektoru, dále pak na prokázání, že nemůže vzniknout virus schopný replikace, a - v případě lidských buněk geneticky modifikovaných retrovirovými nebo lentivirovými vektory - na údajích, jimiž uživatel dokládá, že koncentrace zbytkových infekčních retrovirových nebo lentivirových částic byla snížena na zanedbatelnou hodnotu, nebo že množství zbytkových částic vektoru přítomných v konečném produktu nepředstavuje pro životní prostředí riziko vyšší než zanedbatelné. Za tímto účelem odsouhlasily kompetentní orgány členských zemí jednotný formulář žádosti o povolení klinického hodnocení léčivých přípravků, na něž se vztahuje tento dokument, z hlediska právní úpravy nakládání s GMO (viz formulář žádosti o klinické hodnocení léčivých přípravků s lidskými buňkami geneticky modifikovanými virovými vektory).

Vzhledem k tomu, že provádění klinických hodnocení léčivých přípravků, na něž se vztahuje tento dokument, nepřináší žádná rizika pro veřejné zdraví ani pro životní prostředí, lze pro účely hodnocení rizik pro životní prostředí použít specifický postup podle přílohy k tomuto dokumentu.

3.1. Prokázání skutečnosti, že nevzniká virus schopný replikace

Mělo by být minimalizováno riziko vzájemné rekombinace jednotlivých částí virového vektorového systému nebo jejich rekombinace s buněčnými sekvencemi, které by mohlo vést ke vzniku viru schopného replikace. Žadatelé by měli věnovat zvláštní pozornost následujícím aspektům:

- Produkční systém musí být nastaven tak, aby byla minimalizována přítomnost sekvencí

potřebných k vytvoření viru schopného replikace.⁷

- Každá šarže, která má být použita pro transdukci, je validovanou zkouškou testována na přítomnost viru schopného replikace, a to na úrovni virového produkčního systému⁸, popřípadě je testován konečný produkt (v případě, kdy neproběhlo testování na úrovni virového produkčního systému, musí být testována každá šarže konečného léčivého přípravku).

Další požadavky pro lidské buňky geneticky modifikované retrovirovými nebo lentivirovými vektory:

- Používaná produkční buněčná linie neobsahuje HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, SIV ani žádný jiný obdobný retrovirus nebo lentivirus, jehož přítomnost by mohla vést ke komplementaci anebo rekombinaci retrovirového, případně lentivirového vektoru.
- Používaný insert, případně inserty, nevedou ke komplementaci retrovirového nebo lentivirového vektoru.

Další požadavky pro lidské buňky geneticky modifikované AAV:

Pokud je v produkčním systému použit pomocný virus (helper virus), konečný produkt neobsahuje zbytkové pomocné viry. To může být prokázáno na úrovni virového vektoru.

3.2. Přítomnost zbytkových infekčních částic virového vektoru v konečném produktu (pouze pro lidské buňky geneticky modifikované retrovirovými nebo lentivirovými vektory)

Žadatelé by měli prokázat, že koncentrace zbytkových infekčních retrovirových nebo lentivirových částic byly sníženy na zanedbatelné hodnoty. Způsobů, jak to prokázat, může být více, včetně kvalitativních a kvantitativních metod. Může být použit vzorec uvedený v tabulce 1, nicméně lze akceptovat i další metody.

Pokud jsou v konečném produktu přítomny zbytkové infekční retrovirové nebo lentivirové částice ve větší než zanedbatelné koncentraci, žadatel poskytne údaje a doplňkové hodnocení rizika týkající se těchto zbytkových infekčních retrovirových nebo lentivirových částic v souladu s částí 3(3).

3. 3. Hodnocení rizika v případě, že v konečném produktu jsou přítomny zbytkové infekční částice virového vektoru (pouze pro lidské buňky geneticky modifikované retrovirovými nebo lentivirovými vektory)

V případech, kdy jsou v konečném produktu přítomny zbytkové infekční retrovirové nebo lentivirové částice ve větší než zanedbatelné koncentraci, žadatel poskytne v žádosti (žádost o klinické hodnocení léčivých přípravků s lidskými buňkami geneticky modifikovanými virovými vektory) informaci o odhadovaném počtu zbytkových infekčních retrovirových nebo lentivirových částic v konečném produktu a prokáže, že přítomnost zbytkových částic vektoru

⁷ V současné době např. self-inactivating (SIN) systémy 2. a 3. generace a translentivirové systémy 4. generace.

⁸ Validovaná metoda musí odpovídat dávce, která je podávána subjektu klinického hodnocení.

v konečném produktu s ohledem na opatření k minimalizaci rizika – tam, kde jsou přijata – popsána v Sekci 3 žádosti, nepředstavuje pro životní prostředí riziko vyšší než zanedbatelné.

4. Požadavky na výrobu a úrovně uzavření

Výroba hodnocených léčivých přípravků, na něž se vztahuje tento dokument, by měla probíhat za odpovídajících podmínek. Výroba virových vektorů a transdukce lidských buněk virovými vektory *ex vivo* tudíž spadá pod předpisy o uzavřeném nakládání s geneticky modifikovanými organismy. Výroba hodnocených léčivých přípravků (včetně geneticky modifikovaných lidských buněk) by zároveň měla probíhat podle správné výrobní praxe.⁹

Kategorie rizika uvedených činností (biosafety level, BSL) by měla být stanovena v závislosti na specifických vlastnostech vektorového systému. Pro zařazení do kategorie rizika (BSL level) je třeba vzít v úvahu následující:

Lidské buňky geneticky modifikované retrovirovými nebo lentivirovými vektory:

- i) Většina výrobních činností s buňkami, které zahrnují lentivirové systémy (systémy 2. a 3. generace a translentivirové systémy 4. generace) nebo (myší gama-) retrovirové systémy, může být prováděna v podmínkách druhé kategorie rizika (BSL-2).
- ii) Transdukce buněk by měla být prováděna za podmínek druhé kategorie rizika (BSL-2).
- iii) Pro následné činnosti výrobního postupu (down-stream, po transdukci) může být kategorie rizika snížena na první kategorii (BSL-1), pokud jsou splněny všechny podmínky uvedené v následující tabulce.

Tabulka 1- Kritéria pro snížení kategorie rizika na první kategorii rizika (BSL-1)

Kritérium	Podmínky (kumulativní výčet, všechny podmínky musí být splněny současně)
Molekulární charakterizace použitých vektorů	- Úplná charakterizace virového vektoru použitého k transdukci buněk (tj. úplná sekvence) a charakterizace kritických částí pomocných (helper) a sbalovacích (packaging) vektorů. - Mělo by být prokázáno, že nedošlo k žádným odchylkám od předpokládaných sekvencí.
V produkčním virovém systému nevzniká virus schopný replikace	- Produkční systém je nastaven tak, aby byla minimalizována přítomnost sekvencí potřebných k vytvoření viru schopného replikace.¹⁰ - Používaná produkční buněčná linie neobsahuje HIV-1, HIV-2, HTLV-1, HTLV-2, SIV ani žádný jiný obdobný retrovirus nebo lentivirus, jehož přítomnost by mohla vést ke komplementaci anebo k rekombinaci retrovirového, případně lentivirového vektoru.

⁹ https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-4/2017_11_22_guidelines_gmp_for_atmps.pdf

¹⁰ V současné době např. self-inactivating (SIN) systémy 2. a 3. generace a translentivirové systémy 4. generace.

	• Každá šarže retrovirů nebo lentivirů použitá pro transdukcii je validovanou zkouškou testována na přítomnost viru schopného replikace. • Používaný insert, případně inserty, nevedou ke komplementaci retrovirového, případně lentivirového vektoru.
Geneticky modifikované buňky neobsahují virus schopný replikace	• Jsou vyloučeny buňky od HIV a HTLV pozitivních pacientů nebo dárců. • Transdukované buňky byly validovanou zkouškou testovány na přítomnost retroviru, případně lentiviru schopného replikace. Výjimku tvoří případy, kdy žadatel zdůvodnil, že takové testování není nutné (např. když byla nepřítomnost viru schopného replikace prokázána na úrovni virového produkčního systému).
Po transdukcii nesmí být v geneticky modifikovaných buňkách přítomny zbytkové infekční virové částice	Koncentrace zbytkových infekčních částic byly sníženy na zanedbatelné hodnoty. Způsobů, jak to prokázat, může být více, včetně kvalitativních a kvantitativních metod. Je přípustné, aby žadatel poskytl teoretické výpočty, pokud odůvodní teoretická anebo empirická východiska pro použité parametry a odhady. Například níže uvedený vzorec¹¹ může být použit ke stanovení takzvaného „redukčního poměru“ (reduction ratio), aby bylo možno snížit kategorii rizika z druhé na první (z BSL-2 na BSL-1): $\text{Reduction ratio} = (R1^W \times R2^I \times 2F^T) / C^i$ <i>V tomto vzorci:</i> R1 udává, kolikrát se sníží počet virových částic v jednom promývacím kroku¹² W je počet promývacích kroků R2 udává, kolikrát se sníží počet virových částic inaktivačními promývacími kroky s trypsinem, toto snížení je třeba upravit podle obalu použitého pro pseudotypizaci I je počet inaktivačních promývacích kroků T je doba kultivace po transdukcii vyjádřená ve dnech F Faktor F ve vzorci vychází z biologického poločasu, vyjádřeného v hodinách, pro specifický pseudotypizovaný retrovirový nebo lentivirový vektor a závisí na obalu použitém pro pseudotypizaci a na podmínkách kultivace.¹³ Cⁱ je počáteční titr virů, použitý v inokulu.

¹¹ Tento vzorec je založen na vzorci vypracovaném Nizozemskou komisí pro genetické modifikace COGEM.

¹² Použitý redukční faktor by měl být podložen vysvětlením anebo validovanými údaji dodanými žadatelem.

¹³ Použitý faktor by měl být podložen vysvětlením anebo validovanými údaji dodanými žadatelem.

Virové sekvence v geneticky modifikovaných buňkách nemohou být rekonstituovány tak, aby vytvořily nové virové částice	Buňky jsou kultivovány za takových podmínek, aby se během kultivace předešlo (re-)infekci retroviry nebo lentiviry z jiných zdrojů.
---	---

Lidské buňky geneticky modifikované AAV:

Výrobní činnosti s buňkami s buňkami modifikovanými AAV vektory mohou být prováděny v podmínkách první nebo druhé kategorie rizika (BSL-1 nebo BSL-2), v závislosti na specifických vlastnostech daného případu.

Příloha

Specifické hodnocení rizika pro životní prostředí

1. Rozsah použití

Toto specifické hodnocení rizika pro životní prostředí může být použito pouze u hodnocených léčivých přípravků, které sestávají z lidských buněk geneticky modifikovaných virovými vektory, jsou aplikovány v klinických centrech v rámci povolených klinických hodnocení a splňují následující podmínky:

i) V případě lidských buněk geneticky modifikovaných retrovirovými nebo lentivirovými vektory žadatel prokázal, že nehrozí riziko vzniku viru schopného replikace a že koncentrace zbytkových infekčních retrovirových nebo lentivirových částic v konečném produktu byly sníženy na zanedbatelné hodnoty. Pokud jsou v konečném produktu přítomny zbytkové infekční retrovirové nebo lentivirové částice ve větší než zanedbatelné koncentraci, žadatel musel prokázat, že riziko pro životní prostředí lze považovat za zanedbatelné podle části 3 „Správné praxe pro posouzení GMO aspektů klinických hodnocení léčivých přípravků s lidskými buňkami geneticky modifikovanými virovými vektory“¹⁴.

ii) V případě lidských buněk geneticky modifikovaných AAV vektory žadatel prokázal, že nehrozí riziko vzniku viru schopného replikace.

V tomto dokumentu se pod pojmem „hodnocený léčivý přípravek“ rozumí produkt, který splňuje všechny tři výše uvedené podmínky.

2. Obecné faktory, které je třeba vzít v úvahu

Lidské buňky se v životním prostředí nemohou množit, neboť jsou schopny přežívat pouze v lidském těle nebo za specifických podmínek kultivace *in vitro*.

Je vysoce nepravděpodobné, že by exprese dárcovských genů změnila schopnost přežívání lidských buněk v životním prostředí, ale může změnit chování buněk, např. regulaci buněčného cyklu, apoptózu, množení a přežívání za podmínek *in vitro* nebo v lidském těle.

Z toho plyne, že možná nebezpečí plynoucí z klinického použití hodnoceného léčivého přípravku se vztahují jen k lidskému zdraví. Nebezpečí pro zdraví zvířat a životní prostředí nehrozí.

3.1. Identifikace a charakterizace nebezpečí

Nehrozí nebezpečí pro zdraví zvířat ani pro životní prostředí.

¹⁴ V případech, kdy jsou v konečném produktu přítomny zbytkové infekční retrovirové nebo lentivirové částice v koncentracích vyšších než zanedbatelných, by žadatel měl popsat v žádosti hodnocení rizika souvisejícího s přítomností těchto zbytkových infekčních částic virového vektoru. Všechny ostatní aspekty konečného produktu jsou pokryty Specifickým hodnocením rizika pro životní prostředí. Pokud tedy přítomnost zbytkových infekčních částic virového vektoru v konečném produktu nepředstavuje vyšší než zanedbatelné riziko pro životní prostředí, riziko hodnoceného léčivého přípravku pro životní prostředí může být také považováno za zanedbatelné.

Možná nebezpečí pro lidské zdraví

Nebezpečí plynoucí z persistence geneticky modifikovaných lidských buněk v populaci

Hodnocený léčivý přípravek je podáván pacientům za účelem ošetření, prevence nebo léčby určitého stavu. Persistence hodnoceného léčivého přípravku v těle ošetřovaného pacienta nepředstavuje nebezpečí pro lidské zdraví. Nicméně může existovat potenciální nebezpečí, pokud dojde k náhodnému podání hodnoceného léčivého přípravku jiné osobě, než je ošetřovaný pacient, jakkoli je takový případ nepravděpodobný.

Lidské buňky nejsou schopné kolonizovat imunokompetentní jedince. Ani v případech, kdy přítomnost konstruktů z virového vektoru nebo exprese dárcovských sekvencí ovlivňují fenotypické vlastnosti geneticky modifikovaných buněk, tím nezískají geneticky modifikované buňky u imunokompetentních jedinců žádnou konkurenční výhodu. Tudíž v případě náhodného podání hodnoceného léčivého přípravku jiné osobě, než je subjekt klinického hodnocení, budou geneticky modifikované buňky imunitním systémem zdravého jedince odstraněny.

V případě neúmyslného podání (např. poranění zdravotního personálu při aplikaci nebo podání léčivého přípravku omylem jinému pacientovi) jedinci se sníženou imunitou, může, teoreticky, nebezpečí hrozit. Možné následky takového náhodného podání budou záviset na účincích virového konstruktů (integrovaného do genomu nebo ve formě episomálních konkatemerů) a exprimovaných dárcovských sekvencí na fenotyp cílové buňky.

Nebezpečí spojená s rekombinací virového vektoru s viry nebo s mobilizací vložených sekvencí virového vektoru

Lidské buňky geneticky modifikované retrovirovými nebo lentivirovými vektory:

Potenciální nebezpečí může vzniknout, pokud by došlo k mobilizaci nebo rekombinaci integrovaného konstruktů, pocházejícího z retrovirového, případně lentivirového vektoru, v důsledku infekce transplantovaných buněk virem HIV nebo retroviry u pacientů s aktivní infekcí. Jiným scénářem možného vzniku nebezpečí by byla rekombinace dárcovských genů virového původu přítomných v retrovirovém, případně lentivirovém konstruktě, s příbuznými endogenními viry v případě infekce transplantovaných buněk vysoce příbuzným virem, což by vedlo ke vzniku nového geneticky modifikovaného viru (za předpokladu, že by rekombinace umožňovala replikaci rekombinovaných sekvencí).

Možné následky takové události by závisely na vlastnostech nově vzniklého geneticky modifikovaného viru, ale mohly by případně vést ke škodlivým účinkům na jiné osoby, pokud by došlo k horizontálnímu přenosu.

Lidské buňky geneticky modifikované AAV:

Potenciální nebezpečí může vzniknout, pokud by došlo k mobilizaci nebo rekombinaci AAV vektorového konstruktů v důsledku infekce transdukovaných buněk v těle pacienta aktivní volně se vyskytující AAV infekcí a současně koinfekcí AAV pomocným virem. Produktem rekombinace by byl AAV. Vzhledem k tomu, že není známa žádná patologie spojená s adeno-asociovanými viry a že v klinickém vektoru není přítomen žádný nebezpečný insert, nebezpečí spojené s uvolněním adeno-asociovaných virů do životního prostředí může být považováno za

velmi nízké.

3.2. Charakterizace expozice

Pravděpodobnost nepříznivých účinků spojených s perzistencí geneticky modifikovaných lidských buněk v populaci

Lze předvídat tři možné scénáře:¹⁵

- (1) Náhodný přenos na osoby se sníženou imunitou: Možným scénářem náhodného přenosu na jiné osoby, než je subjekt klinického hodnocení, může být případ poranění jehlou při aplikaci léčivého přípravku pacientovi. V takovém případě může dojít k přenosu geneticky modifikovaných buněk do těla náhodného příjemce. Perzistence ovšem může následovat jenom tehdy, kdyby měl náhodný příjemce oslabenou imunitu, neboť pravděpodobnost, že by pacient a náhodně poraněná osoba měly stejné MHC-haplotypy, je zanedbatelná.

Přesto, že transdukované lidské buňky mohou přetrvávat v těle člověka se sníženou imunitou a tato perzistence může být v závislosti na vlastnostech použitých buněk dlouhodobá, pravděpodobnost škodlivého účinku v případě náhodného přenosu je považována za zanedbatelnou, vzhledem k 1) nepřítomnosti virových částic schopných replikace a - v případě lidských buněk geneticky modifikovaných retrovirovými nebo lentivirovými vektory – také vzhledem k zanedbatelné přítomnosti zbytkových infekčních částic virového vektoru v konečném produktu, 2) malému množství buněk, které by se v případě náhodného přenosu dostaly do těla, a 3) vzhledem k tomu, že náhodný příjemce neprošel přípravným režimem.

- (2) Podání léčivého přípravku omylem jinému pacientovi: Stejně jako ve výše uvedeném scénáři, k perzistenci transdukovaných buněk by došlo pouze tehdy, když by pacient, který dostal hodnocený léčivý přípravek omylem, měl sníženou imunitu.

Pravděpodobnost vzniku škodlivých účinků je v tomto případě malá, vzhledem k nepřítomnosti virových částic schopných replikace a - v případě lidských buněk geneticky modifikovaných retrovirovými nebo lentivirovými vektory – také vzhledem k zanedbatelné přítomnosti zbytkových infekčních částic virového vektoru v konečném produktu. Navíc je vysoce nepravděpodobné, že by náhodný příjemce předem prošel přípravným režimem, který podporuje dlouhodobé přežívání transdukovaných buněk.

- (3) Darování krve, buněk, tkání nebo orgánů jiným osobám: Možným scénářem přenosu na jiné osoby je transfúze krve, transplantace buněk, tkání nebo orgánů od dárce, který byl léčen hodnoceným léčivým přípravkem.

Pravděpodobnost vzniku škodlivých účinků v případě, kdy by byly transdukované buňky od pacienta, léčeného hodnoceným léčivým přípravkem, přeneseny na jinou osobu prostřednictvím dárcovství, je považována za nízkou, vzhledem k nepřítomnosti

¹⁵ Možnost kontaminace přes vnější prostředí (krvácení pacienta) není považována za reálnou, protože buňky nejsou schopny přežít mimo lidské tělo.

infekčních částic virového vektoru a - v případě lidských buněk geneticky modifikovaných retrovirovými nebo lentivirovými vektory – také vzhledem k zanedbatelné přítomnosti zbytkových infekčních částic virového vektoru v konečném produktu. Navíc hodnocený léčivý přípravek je často podáván při léčbě takových stavů, které *de facto* znemožňují, aby se pacient v budoucnu stal dárce krve, buněk, tkání nebo orgánů.¹⁶ V těchto případech je pravděpodobnost výskytu škodlivých účinků zanedbatelná.

Pravděpodobnost rekombinace virového vektoru s viry nebo mobilizace vložených sekvencí virového vektoru

Rekombinace virového vektoru s jinými viry nebo mobilizace vložených sekvencí virového vektoru je obecně považována za nepravděpodobnou, vzhledem k deficientní struktuře vektorů běžně používaných pro výrobu léčivých přípravků genové terapie.

Lidské buňky geneticky modifikované retrovirovými nebo lentivirovými vektory:

V souvislosti se scénářem mobilizace vložených sekvencí retrovirového nebo lentivirového vektoru v důsledku infekce dárcovských buněk v pacientově těle virem HIV, HTLV nebo endogenními retroviry je třeba poznamenat, že i když možnost mobilizace nebo rekombinace byla identifikována za podmínek *in vitro*, nikdy nebyla zjištěna v klinických hodnoceních prováděných v uplynulých 20 letech, včetně klinických studií s HIV pacienty.

Pravděpodobnost mobilizace vložených sekvencí retrovirového nebo lentivirového vektoru v důsledku infekce dárcovských buněk v pacientově těle virem HIV, HTLV nebo endogenními retroviry je považována za zanedbatelnou z následujících důvodů:

- V případě lentivirových vektorů zabraňuje spontánní mobilizaci integrovaného vektoru z transdukovaných buněk to, že vektory nejsou schopny replikace. Pomocné funkce by mohly být dodány do transdukovaných buněk prostřednictvím superinfekce hostitele přirozeně se vyskytujícím virem. Sebe-inaktivující (self-inactivating, SIN) vlastnost vektoru LTR ale zabrání mobilizaci vektoru i v případě superinfekce transdukované buňky přirozeně se vyskytujícím virem.
- V případě gama-retrovirových vektorů je rekombinantní událost také vysoce nepravděpodobná vzhledem k tomu, že myší retroviry obecně neinfikují člověka. Mobilizace proviru nebo volného vektoru prostřednictvím rekombinace mezi genomem integrovaného vektoru a genetickými sekvencemi případných koinfikujících retrovirů je

¹⁶ Kritéria způsobilosti dárců krve a krevních složek jsou stanovena v příloze III Směrnice Komise 2004/33/ES ze dne 22. března 2004, kterou se provádí směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/98/ES, pokud jde o některé technické požadavky na krev a krevní složky, ve znění pozdějších předpisů.

Kritéria výběru dárců tkání a buněk jsou stanovena v příloze I Směrnice Komise 2006/17/ES ze dne 8. února 2006, kterou se provádí směrnice Evropského parlamentu a Rady 2004/23/ES, pokud jde o určité technické požadavky na darování, opatrování a vyšetřování lidských tkání a buněk, ve znění pozdějších předpisů.

Kritéria charakterizace orgánů a dárců orgánů jsou stanovena v příloze směrnice Evropského parlamentu a Rady 2010/45/EU ze dne 7. července 2010 o jakostních a bezpečnostních normách pro lidské orgány určené k transplantaci.

velmi teoretickým rizikem. Exogenní infekční gama-retroviry nebyly u člověka zjištěny a nedá se očekávat, že by rekombinací mezi sekvencemi vektoru a non-gama koinfikujícími retroviry vznikl retrovirus schopný replikace. Aby se z proviru stal retrovirus schopný replikace, musel by získat heterologní sekvence kódující jak *gag-pol*, tak *env* z jiných zdrojů uvnitř stejné buňky, kde je provirus. V lidské populaci nejsou známy žádné exogenní gama-retroviry, které by mohly zavést funkční sekvence kódující *gag-pol* a *env* do transdukovaných buněk.

Lidské buňky geneticky modifikované AAV:

Jediným mechanismem, jak by mohlo dojít k rekombinaci a následné mobilizaci, je současná infekce buňky klinickým vektorem, volně se vyskytujícím AAV a současně pomocným virem (trojnásobná infekce), což je považováno za velmi nepravděpodobné.

3.3. Charakterizace rizika

Riziko spojené s perzistencí geneticky modifikovaných lidských buněk v populaci

Možná rizika vyplývají jediné z neúmyslného přenosu dárcovských buněk na osoby se sníženou imunitou, což může nastat třemi scénáři:

- (1) Náhodný přenos na osoby se sníženou imunitou: Z výše popsanych důvodů je dosah škodlivých účinků spojených s náhodným přenosem hodnoceného léčivého přípravku na osoby se sníženou imunitou zanedbatelný. Kromě toho je hodnocený léčivý přípravek 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. Navíc možnost, že dojde k nehodě během podání přípravku nebo během zacházení s ním a zároveň že postižený zdravotník má sníženou imunitu, je považována za krajně nepravděpodobnou. Tudíž lze konstatovat, že riziko spojené s persistencí geneticky modifikovaných buněk je v případě scénáře náhodného přenosu zanedbatelné.
- (2) Podání léčivého přípravku omylem jinému pacientovi: Z výše popsanych důvodů je dosah škodlivých účinků spojených s podáním léčivého přípravku omylem osobě se sníženou imunitou zanedbatelný. Navíc podávání hodnoceného léčivého přípravku pacientům provádí školený personál ve vysoce zabezpečeném prostředí, což zahrnuje přísné požadavky na označování a sledovatelnost, aby se předešlo omylům při podání. Tudíž lze konstatovat, že riziko pro osoby se sníženou imunitou podle scénáře chybného podání je zanedbatelné.
- (3) Darování krve, buněk, tkání nebo orgánů osobám se sníženou imunitou: Z výše popsanych důvodů je pravděpodobnost škodlivých účinků spojených s náhodným přenosem hodnoceného léčivého přípravku na osoby se sníženou imunitou nízká. V případech, kdy mají geneticky modifikované lidské buňky léčit stav, který vylučuje, aby se pacient stal dárce, je riziko pro osoby se sníženou imunitou zanedbatelné. V ostatních případech by měl žadatel zvážit, zda předejít tomu, aby se pacienti poté, co

jim byly podány geneticky modifikované lidské buňky, stali dárce krve, buněk, tkání nebo orgánů.

Rizika spojená s rekombinací virového vektoru s viry nebo s mobilizací vložených sekvencí virového vektoru

Lidské buňky geneticky modifikované retrovirovými nebo lentivirovými vektory:

Jediná možná rizika jsou spojená s mobilizací integrovaných lentivirových sekvencí při aktivní infekci dárcovských buněk viry HIV nebo HTLV.

Jak je popsáno výše, pravděpodobnost mobilizace nebo rekombinace virového vektoru jinými viry je zanedbatelná. Tudíž riziko pro lidskou populaci je zanedbatelné.

Lidské buňky geneticky modifikované AAV:

V nepravděpodobném případě, že by buňky transdukované klinickým vektorem byly zároveň infikovány volně se vyskytujícím AAV a současně vhodným pomocným virem, by očekávaným výsledkem byla produkce volně se vyskytujících adeno-asociovaných virů a dalších virových částic, které by nebyly schopné replikace, jelikož by jim stále chyběly *rep* a *cap* geny. Tudíž riziko pro lidskou populaci je zanedbatelné.

3.4. Strategie řízení rizika

Žadatel by měl zvážit, zda předejít tomu, aby se pacienti poté, co jim byly podány geneticky modifikované lidské buňky, stali dárce krve, buněk, tkání nebo orgánů. Tuto otázku je třeba vyjasnit v Sekci 3 žádosti o klinické hodnocení.

Musí být přijata odpovídající opatření, aby se předešlo riziku náhodného přenosu na zdravotnický personál při podávání hodnoceného léčivého přípravku nebo při zacházení s ním. Tato opatření musí být popsána v Sekci 3 žádosti o klinické hodnocení.

Odpovídající opatření musí být uplatňována při skladování a přepravě hodnoceného léčivého přípravku a při odstraňování odpadů. Tato opatření musí být popsána v Sekci 3 žádosti o klinické hodnocení.

3.5. Stanovení celkového rizika a závěry

Nebylo zjištěno žádné riziko pro životní prostředí ani pro zdraví zvířat. Za předpokladu, že budou uplatňována opatření popsaná žadatelem (opatření k řízení rizika jsou uvedena v Sekci 3 žádosti o klinické hodnocení), celková rizika pro lidské zdraví byla vyhodnocena jako zanedbatelná.