



V Praze dne 15. září 2026
Č. j.: MZP/2026/940/2997
Sp. zn.: ZN/MZP/2023/750/6

Stanovisko České komise pro nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty k určování kategorie rizika při uzavřeném nakládání s geneticky modifikovaným buněčnými liniemi

Buněčná kultura/linie je in vitro udržovaná populace buněk živočišného, rostlinného nebo jiného eukaryotického původu; může jít o primární kulturu, konečnou buněčnou linii nebo kontinuální/immortalizovanou buněčnou linii.

Pojem geneticky modifikovaná buněčná linie není přímo definován v české legislativě o geneticky modifikovaných organismech (GMO), tedy v zákoně č. 78/2004 Sb., o nakládání s GMO a genetickými produkty, ve znění pozdějších předpisů a jeho prováděcí vyhlášce č. 209/2004 Sb., o bližších podmínkách nakládání s GMO a genetickými produkty, ve znění pozdějších předpisů. Je tedy nutné vycházet z obecné definice GMO:

„Geneticky modifikovaný organismus je organismus, kromě člověka, jehož dědičný materiál byl změněn genetickou modifikací provedenou některým z technických postupů stanovených zákonem.“ Z uvedeného plyne, že geneticky modifikovaná buněčná linie je buněčná linie, jejíž dědičný materiál byl úmyslně a cíleně změněn genetickým inženýrstvím.

GM buněčná linie je tedy **typ buněčné linie, která má vložený, odstraněný, pozměněný nebo regulovaný genetický materiál způsobem, jehož nelze dosáhnout přirozenou rekombinací** (např. použití CRISPR, vektorové přenosy DNA, transgenozé).

Riziko komerčně dostupných buněčných linií (včetně transgenních) je většinou vyjádřeno jako Biosafety Level, **BSL** (1 až 4), což odpovídá požadavkům na zabezpečení uzavřeného prostoru a požadavkům na pracovní postupy.

Podle zákona č. 78/2004 Sb., je uzavřené nakládání s GMO, tedy i **s buněčnými liniemi, zařazováno do kategorií rizika** (1 až 4, viz příloha 3 zákona) **na základě hodnocení rizika**.

Stanovení vhodných požadavků na ochranu, tj. odpovídající kategorie rizika, nelze zobecnit, liší se případ od případu a mělo by se opírat o důkladné posouzení rizik, včetně zohlednění vnitřních vlastností buněk (včetně rekombinantních vlastností), potenciální kontaminace patogeny a typu manipulace.

Konkrétní postupy hodnocení rizika jsou popsány ve vyhlášce č. 209/2004 Sb., která stanoví, že při hodnocení musí být zohledněny všechny potenciální škodlivé účinky, přímé i nepřímé, okamžité i opožděné, včetně srovnání s výchozím (nemodifikovaným) organismem. Hodnocení rizika probíhá ve čtyřech krocích:

1. Identifikace potenciálně škodlivých vlastností

Elektronický podpis
Alexandra Skopcová
Ministerstvo životního prostředí
02.10.2026 13:04



2. Posouzení závažnosti možných nepříznivých účinků
3. Posouzení pravděpodobnosti jejich výskytu
4. Stanovení konečné kategorie rizika a odpovídajících ochranných opatření

Hodnotí se zejména:

1. **Vlastnosti příjemce (hostitelské buněčné linie)**

- Původ buněčné linie a riziko latentních infekčních agens pro člověka (certifikace u sbírkových buněčných linií)
- Identita a status „bez infekce“ hostitelských buněk, aby se zabránilo vzniku replikačně schopných rekombinantních (retro-)virů.
- Ověření (z dostupných zdrojů), např. kontrola kvality buněčných linií, zkušební certifikáty o absenci patogenů, testování s negativním výsledkem na přítomnost/aktivitu reverzní transkriptázy).
- Zda buněčná linie vykazuje tumorogenní nebo jiný biologicky nežádoucí účinek při expozici člověka či zvířete.
- Zda buněčná linie produkuje toxiny nebo biologicky aktivní látky, které mohou představovat riziko pro člověka, zvířata nebo životní prostředí.
- Přítomnost integrovaných virových sekvencí, exprese virových transformačních/onkoaktivních proteinů a případná přítomnost replikace-kompetentního viru.
- Schopnost podporovat replikaci patogenů a sbalování virových částic.
- Potenciál k přenosu genetického materiálu (např. prostřednictvím virových částic nebo mobilních genetických elementů).
- Genetická stabilita buněčné linie.
- Její schopnost přežívání a šíření mimo laboratoř.
- Práce se zvířaty: je hostitel permissivní nebo nepermissivní? Byly zvířeti transplantovány lidské buňky, nebo se jedná o transgenní zvíře, např. nesoucí lidské receptory?
- Možnost přearžení virově infikovaných buněk nebo zvířat do nižší kategorie v případě, že nedochází k vylučování částic virového vektoru (zejména na základě testování buněčných supernatantů nebo zvířecích výkalů či důkazů z odborné literatury).

2. **Vlastnosti dárce genetického materiálu**

- Identifikace a původ: Přesná identifikace organismu, od kterého byl genetický materiál získán.



- Přesná identifikace cílové sekvence: zda může nová vlastnost zvýšit rizikovost příjemce.
- Historie bezpečného používání: Posuzuje se, zda je donor běžně využíván, zda má historii bezpečného laboratorního či průmyslového použití.
- Patogenita a toxicita: Zda je dárcovský organismus patogenní, toxický nebo zda produkuje toxiny či alergeny, které by mohly ohrozit zdraví lidí, zvířat nebo životní prostředí.

3. Vlastnosti vektoru

- Původ a typ vektoru (plazmid, adenovirus, lentivirus, retrovirus).
- Jeho hostitelský rozsah, tedy hostitelská a tkáňová specifita vektoru (tropismus): může se vektor replikovat v mnoha různých typech buněk, včetně lidských a zvířecích buněk?
- Mobilita vektoru, integrace do genomu spojená s možností aktivace buněčných onkogenů, mobilizovatelnost jinými pomocnými funkcemi.
- Přítomnost selečních markerů (např. antibiotická rezistence).
- Replikační kompetence.
- Schopnost tvorby infekčních částic.
- Charakter a rozsah delecí či inaktivací virových genů odpovědných za replikaci, virulenci a mobilizaci.
- Stabilita vektoru, použití samo-inaktivujících vektorů.
- Titr a celkové množství vektoru.

4. Vlastnosti insertu

- Funkce zaváděného genu (např. toxiny, biologicky aktivní látky např. růstové faktory, onkogeny).
- Úroveň exprese.
- Možnost neočekávaných účinků (např. aktivace onkogenů).
- Potenciál k horizontálnímu přenosu (pokud je insert mobilizovatelný (např. v rámci transpozonu nebo viru), zvyšuje riziko šíření genetické informace).

5. Charakteristiky výsledného GMO

- Stabilita vložené genetické informace.
- Fenotypové projevy buněčné linie (např. nežádoucí tumorigenita).



- Změna biologických vlastností (virulence, proliferace, citlivost na prostředí).
- Při hodnocení rizika je nutné zohlednit také možné dopady na životní prostředí, zejména schopnost GMO přežívat mimo kontrolované podmínky a potenciál horizontálního přenosu genetické informace v případě náhodného úniku.
- Povaha a rozsah uzavřeného nakládání.

Zařazení do kategorie rizik vychází z klasifikace pro uzavřené nakládání:

1. Kategorie 1 – nízké riziko

Pouze pokud celý systém (hostitel–vektor–insert) nepředstavuje **žádné nebo jen zanedbatelné riziko**, například:

- Nepatogenní, netumorigenní buněčné linie.
- Původ a zdravotní status buněčné linie jsou doloženy; buňky neprodukují ani neobsahují žádný infekční agens (doloženo producentem nebo certifikovaným testem).
- Vektor je **nereplikativní a bez prokázané schopnosti horizontálního přenosu**
- Vložený genetický materiál nekóduje toxické, onkogenní, imunomodulační ani jiné biologicky rizikové vlastnosti, genetická modifikace nevede ke zvýšení virulence, perzistence ani rozšíření hostitelského spektra.

Příklady doporučení nakládání v kategorii rizika 1

- GM buněčné linie, které přirozeně za běžných laboratorních podmínek neprodukují žádné toxiny, karcinogeny či funkční virové částice (i replikačně defektní) a neobsahují žádné jiné patogeny.
- Primární kultury a buněčné linie, kde může být s vysokou pravděpodobností vyloučena potenciální kontaminace (např. SPF chovy zvířat).
- Buněčné linie, které jsou identifikované a dobře charakterizované a u nichž je známo, že nejsou infikovány specifickými patogenními mikroorganismy (certifikováno buněčnou bankou (např. DSMZ, ECACC, ATCC atd. nebo dodavatelem).
- Buněčné linie, které byly uměle immortalizované pouze virovým fragmentem (např. HEK, HaCaT) a splňují výše uvedená kritéria.
- V Příloze 2, kde jsou popsány konkrétní příklady virových vektorů, jsou tyto buňky popisovány jako „skupina 1“.

2. Kategorie 2 – nízké až střední riziko

Pokud lze očekávat **omezené riziko** při použití standardní laboratorní praxe, například:



- Nelze zcela vyloučit latentní (subklinickou) přítomnost infekčních agens, zejména virů nebo mykoplazmat.
- **Buněčné linie s nízkým rizikem, u nichž existuje pravděpodobnost indukce nádorového bujení.**
- Výsledný GMO obsahuje **sekvence virového původu** (např. regulační nebo balicí elementy), přičemž vektor je navržen jako nereplikativní.
- Existuje teoretická možnost rekombinace vedoucí ke vzniku replikačně kompetentních virových částic, avšak s nízkou pravděpodobností.
- Geny bez známé toxicity, ale např. ovlivňující růst či diferenciaci.

Příklady doporučení nakládání v kategorii rizika 2:

- Živočišné buněčné linie a rostlinné kultury, kde nemůže být vyloučena potenciální kontaminace infekčním agens².
- S primárními lidskými kulturami a tkáněmi nutno zacházet ve většině případů jako s potenciálně infekčním materiálem. Negativní výsledek screeningu na specifické markery (HIV, HBV, HCV) nesnižuje úroveň biologického rizika na úroveň BSL-1, neboť neeliminuje riziko přítomnosti jiných latentních agens či adventivní kontaminace.²
- Buněčné linie transformované onkogenními viry nebo obsahující virové genomy.
- Buněčné linie uměle imortalizované celým virem (např. W12).
- V Příloze 2, kde jsou popsány konkrétní příklady virových vektorů, jsou tyto buňky popisovány jako „skupina 2“.

3. Kategorie 3 – významné riziko

Pokud GMO představuje **závažnější potenciální účinky na zdraví nebo životní prostředí**, ale je zvládnutelné při přísných opatřeních, například:

- Buněčné linie převádějící onkogeny, virulenci, imunomodulační faktory
- Použití virových vektorů schopných replikace nebo integrace

Při manipulaci s buněčnými kulturami představuje pro člověka přítomnost latentních infekčních agens hlavní riziko. Kontaminace může nastat zdrojem (např. infikovaná zvířata nebo tkáň) či během manipulace s buňkami. Při posuzování rizika je pak nutné zohlednit i konkrétní laboratorní postupy, jako je generování aerosolu nebo práce s vysokými koncentracemi buněk.

Při hodnocení rizik je nezbytné zohlednit následující inherentní vlastnosti buněčných linií: původ (druh a zdroj), typ buněk nebo tkáň a typ kultury. Lidské buněčné linie a linie odvozené od primátů jsou spojeny s vyšším rizikem přítomnosti virů vysoce patogenních pro člověka. Ani buněčné kultury odvozené od jiných živočišných druhů nelze považovat za nerizikové, protože mohou obsahovat viry se širokým spektrem hostitelů schopné infikovat člověka.



Kultury ne-lidských buněk však také nejsou bez rizika, protože mohou obsahovat viry s širším spektrem hostitelů schopné infikovat člověka.

Hodnocení dle původu buněčné linie - riziko stoupá následovně: ptačí a bezobratlé kultury < savčí buňky (jiné než lidské nebo primáty) < buňky nelidských primátů < lidské buňky.

Hodnocení dle typu buněk - při posuzování rizika se též zohledňuje biologická povaha buněčného typu, včetně jeho diferenciačního stavu, proliferační kapacity a případného tumorogenního potenciálu. Samotná tumorogenicita buněčné linie však nepředstavuje automaticky důvod pro zařazení do vyšší kategorie rizika.

Hodnocení dle typu kultury - riziko stoupá následovně - dobře charakterizované buněčné linie < kontinuální buněčné linie < primární buněčné kultury.¹

Závěr

Stanovení vhodných požadavků na ochranu při uzavřeném nakládání s geneticky modifikovanými buněčnými liniemi nelze zobecnit, liší se případ od případu a mělo by se opírat o důkladné posouzení rizik, včetně zohlednění vnitřních vlastností buněk (včetně rekombinantních vlastností), potenciální kontaminace patogeny a typu manipulace.

Literatura a další informace:

¹ Herman, P., & Pauwels, K. (2014). Biosafety recommendations on the handling of animal cell cultures. In Animal cell culture (pp. 689-716). Cham: Springer International Publishing.

² Meechan, P. J., & Potts, J. (2020). Biosafety in microbiological and biomedical laboratories.

https://www.bozp.cz/aktuality/biologicti-cinitele/#kap_7

<https://www.dsmz.de/> German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Welcome to the Leibniz Institute DSMZ

<https://www.efbs.admin.ch/en/homepage-1> Swiss Expert Committee for Biosafety SECB

Ing. Alexandra Skopcová

ředitelka odboru environmentálních rizik a ekologických škod

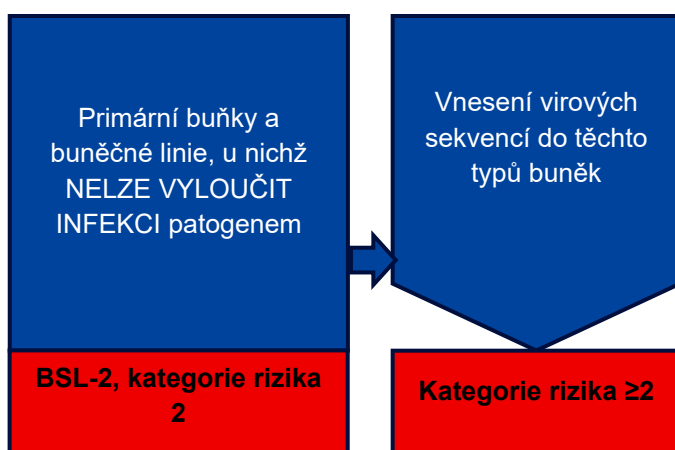
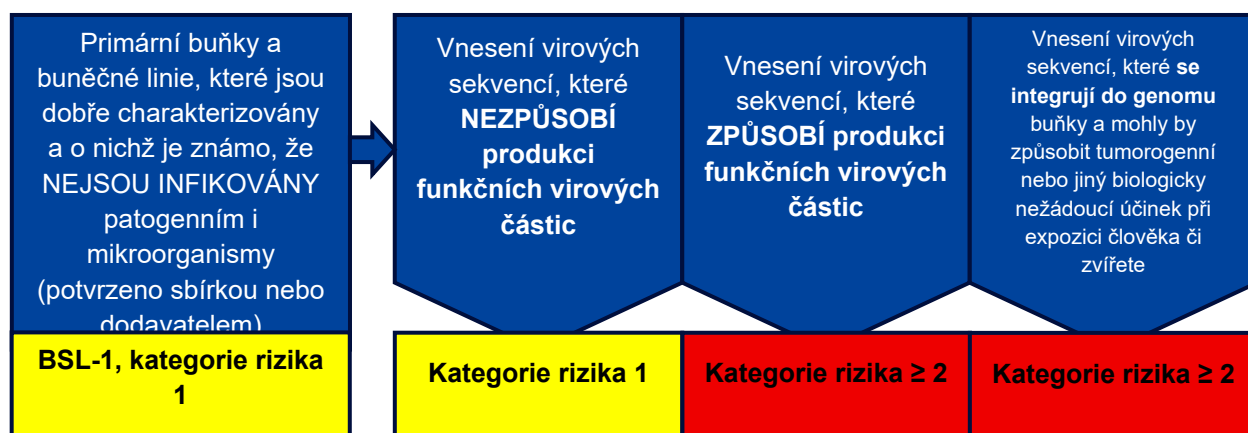
schváleno elektronicky



Příloha 1

Krátké schéma pro hodnocení rizika u buněčných kultur ve vztahu k virovým sekvencím

Primární buňky a buněčné linie, které jsou dobře charakterizovány a o nichž je známo, že nejsou infikovány patogenním i mikroorganismy (potvrzeno sbírkou nebo dodavatelem)		
→ BSL-1, kategorie rizika 1		
Vnesení virových sekvencí, které NEZPŮSOBÍ produkci funkčních virových částic	Vnesení virových sekvencí, které ZPŮSOBÍ produkci funkčních virových částic	Vnesení virových sekvencí, které se integrují do genomu buňky a mohly by způsobit tumorogenní nebo jiný biologicky nežádoucí účinek při expozici člověka či zvířete
→ Kategorie rizika 1	→ Kategorie rizika ≥ 2	→ Kategorie rizika ≥ 2
Primární buňky a buněčné linie, u nichž nelze vyloučit infekci patogenem		
→ BSL-2, kategorie rizika 2		
Vnesení virových sekvencí do těchto typů buněk		
→ Kategorie rizika ≥ 2		





Příloha 2

Příklady posouzení rizika při práci s virovými vektory

Zdroj:

Recommendation of the Swiss Expert Committee for Biosafety (SECB) on the classification of work with genetically modified viral vectors

https://www.efbs.admin.ch/inhalte/dokumentation/empfehlungen/Empfehlungen_aktuell/Virale_Vektoren_EFBS_E.pdf

Z tohoto důvodu jsou ponechány pojmy „skupina“ pro viry, ze kterých jsou vektory odvozeny, a „třída rizika“ pro práci s výslednými GMM.

Vektory na bázi retrovirů

Genom: RNA viry

Ekotropické retroviry jsou řazeny do rizika třídy 1, amfotropické a pseudotypové patří do rizika třídy 2.

Mohou infikovat pouze dělící se buňky.

V závislosti na typu buněk a použitých virů mohou vznikat rekombinantní virové částice s různým tropismem. Na základě tohoto jednoduchého parametru je možné zařadit konstrukty následovně:

- konstrukty ekotropické: vzniklý virus napadá pouze buňky myši a krys, **riziko třídy 1**
- konstrukty amfotropické: myši i nemyši buňky, včetně lidských, **riziko třídy 2**
- konstrukty pseudotypové: povrchové proteiny virových částic jsou buď modifikované nebo pocházejí z různých virů, např. arenavirů, hepadnavirů, flavivirů, viru vezikulární stomatitidy (G-glykoprotein, VSV-G). Důsledkem takových modifikací je vyšší stabilita nebo širší spektrum hostitelů. **Riziko třídy 2.**

Vektory na bázi lentivirů

Specifická skupina retrovirů. Mohou infikovat dělící se i nedělící se buňky.

Podle typu buněk, které infikují, je možné klasifikovat riziko do následujících kategorií:

1. Zavedená buněčná linie (Established cell line) (skupina 1) s retrovirovým vektorem, **třída 1**
= buněčná linie, která prošla tzv. immortalizací, tedy získala schopnost dlouhodobě se dělit v kultuře, často prakticky neomezeně. Je to stabilní, dobře charakterizovaná linie, která se chová konzistentně napříč pasážemi.
2. Buněčná linie komplementační (Complementing packaging cell line) (skupina 1) s retrovirovým vektorem



= speciálně upravená buněčná linie, která poskytuje virové proteiny nebo funkční geny, jež chybí v geneticky upraveném (defektním) virovém vektoru. Díky tomu může být takový vektor bezpečně množen, aniž by získal schopnost nekontrolovaně se replikovat.

- ekotropická, **třída 1**
- amfotropická, **třída 2**
- pseudotypová, **třída 2**

Zavedená buněčná linie (skupina 1) s transgenem už neuvolňující virové částice do okolního média, **třída 1**

3. Primární buňky (skupina 2) s transgenem, **třída 2**

Podrobná klasifikace vektorů na bázi retrovirů a lentivirů, zařazení do třídy rizika

Vektor, aktivita	Třída
Vektorová DNA v <i>E. coli</i>	
Transformace DNA retrovirového nebo lentivirového vektoru do <i>E. coli</i> K12 nebo jejích derivátů (produkce, amplifikace vektoru)	1
Transformace plasmidu obsahujícího gen <i>env</i> pro kapsidový protein nebo plasmidu kódujícího složky virové kapsidy, jako jsou <i>rev</i> , <i>gag</i> , <i>pol</i> atd. do <i>E. coli</i> K12 nebo jejích derivátů za účelem produkce a amplifikace příslušných plasmidů	1
Myší ekotropické retroviry	
Produkce replikačně defektních ekotropických vektorů (inert patří do třídy 1) v ekotropické komplementační buněčné linii (skupina 1) prostřednictvím transfekce DNA retrovirového vektoru	1
Rekombinantní replikačně defektní myší retroviry produkované ekotropickými komplementačními buněčnými liniemi	1
Replikačně kompetentní ekotropické myší retroviry	1
Buněčné linie (skupina 1) infikované replikačně defektními ekotropickými retroviry (neuvolňující viry s širším spektrem hostitelů)	1
Rekombinantní replikačně defektní ekotropické myší retroviry s onkogenem	1
Myší amfotropické retroviry	
Komplementační buněčné linie obsahující pouze sekvence kódující virové kapsidy amfotropického typu	1
Infekce amfotropických komplementačních buněk (skupina 1) replikačně defektními ekotropickými myšími retroviry	2
Produkce replikačně-defektních amfotropických vektorů v amfotropické komplementační buněčné linii (skupina 1) po transfekci DNA retrovirového vektoru	2
Transfekce kokultury ekotropických a amfotropických komplementačních buněčných linií s DNA retrovirového vektoru	2
Rekombinantní replikačně defektní myší amfotropické retroviry uvolňované amfotropickými komplementačními buněčnými liniemi	2
Lentivirové vektory	



Transfekce buněčných linií (skupina 1) DNA lentivirového vektoru a plasmidovou DNA obsahující geny nezbytné pro sbalení a vytvoření virové částice (<i>rev</i> , <i>gag</i> , <i>pol</i> a <i>env</i>)	2
Rekombinantní replikačně defektní lentivirové vektory uvolňované výše uvedenými buněčnými liniemi	2

Vektor, aktivita	Třída
Buněčné linie a primární buňky infikované rekombinantními retrovirovými nebo lentivirovými vektory	
Buněčné linie zařazené do skupiny 1 a infikované výše popsanými retrovirovými vektory skupiny 2 neschopnými replikace	2
Lze-li předpokládat, že po několika cyklech pasážování výše uvedené buňky již neuvolňují částice virového vektoru, lze je přeargovat do třídy 1 (za předpokladu, že nejsou schopny komplementovat defekt replikace a nejsou kontaminovány retroviry schopnými replikace)	1
Primární lidské a živočišné buňky jsou často zařazeny do skupiny 2 (viz doporučení SECB týkající se bezpečné manipulace s lidskými a živočišnými buňkami a buněčnými kulturami https://www.efbs.admin.ch/inhalte/dokumentation/empfehlungen/Empfehlungen_aktuell/Zellkulturen_EFBS_E.pdf . I v případě infekce retrovirovými nebo lentivirovými vektory neschopnými replikace zůstávají zařazené do třídy 2, a to i tehdy, když přestanou vylučovat virus.	2
Vektory s modifikovanými povrchovými proteiny	
Replikačně defektní retrovirovými a lentivirové vektory obsahující kapsidový protein z ekotropických myších leukemických virů	1
Infekce buněk skupiny 1 výše uvedenými retrovirovými a lentivirovými vektory (jsou-li použity buňky skupiny 2, pak zařadit do třídy 2)	1 (2)
Replikačně defektní retrovirové vektory obsahující obalové proteiny jiných virů, např. viru vezikulární stomatitidy (VSV), leukémie Gibonů (Gibbon ape leukemia virus, GaLV), virus RD 114	2
Replikačně defektní retrovirové vektory obsahující obalové proteiny jiných virů, např. viru vezikulární stomatitidy (VSV), leukémie Gibonů (Gibbon ape leukemia virus, GaLV), virus RD 114 nebo rekombinantní obalové proteiny viru myší leukémie (moloney murine leukemia virus, MoMLV) obsahující ligand pro buněčný povrchový protein	2
Infekce buněk skupiny 1 nebo 2 pomocí výše uvedených retrovirových nebo lentivirových vektorů	2
Infekce zvířat retrovirovými a lentivirovými vektory	
Dokud mohou zvířata infikovaná retrovirovými nebo lentivirovými vektory skupiny 2 vylučovat tyto virové částice v jakékoli formě, musí být chována v podmínkách bezpečnostní úrovně rizika třídy 2	2
Jakmile lze předpokládat, že infikovaná zvířata již nevylučují virové částice, mohou být chována na bezpečnostní úrovni rizika třídy 1	1
Lentivirové vektory obsahující onkogenní sekvence: Zvláštní pozornost je třeba věnovat pseudotypovým lentivirovým vektorům, které jsou stabilnější, vykazují hostitelskou specifitu pro lidské epiteliální buňky nebo je lidský komplementový	2-3



system nedokáže rozpoznat kvůli změněnému glykosylačnímu vzoru. Viz příslušné doporučení SECB týkající se posuzování rizik činností s onkogenními sekvencemi a sekvencemi kódujícími cytokiny.	
--	--

Vektory na bázi adenovirů

Genom: dsDNA

Adenoviry jsou zařazeny do rizika třídy 2.

Adenovirové vektory používané k přenosu genů jsou obvykle neschopné replikace v důsledku delece v časně oblasti E1. Nové generace obsahují více genomových delecí v dalších segmentech (E2, E3 i E4), proto je možné tyto vektory za specifických podmínek řadit i do třídy 1.

Některé adenoviry se mohou integrovat do genomu.

Podrobná klasifikace vektorů na bázi adenoviru typu 5, zařazení do třídy rizika

Vektor, aktivita	Třída
DNA vektoru	
Intaktní adenovirový genom, volně přítomný nebo vložený do plasmidu na bázi pBR322, v <i>E. coli</i> K12 nebo jejích derivátech (produkce, amplifikace intaktního adenovirového genomu)	2
Replikačně defektní genom adenoviru, volně přítomný nebo vložený do plasmidu na bázi pBR322, v <i>E. coli</i> K12 nebo jejích derivátech (produkce, amplifikace intaktního adenovirového genomu)	1
Transfekce nekomplementujících buněk ze skupiny 1 nebo 2 replikačně defektním genomem adenoviru, volně přítomným nebo vloženým do plasmidu na bázi pBR322: klasifikace podle recipientního organismu	1 nebo 2
Virové částice	
Komplementační buněčné linie, např. HEK293	1
Produkce replikačně kompetentního adenoviru prostřednictvím transfekce nekomplementujících buněk skupiny 1 nebo 2 intaktním adenovirovým genomem, a to buď ve volné formě, nebo vloženým do plasmidu na bázi pBR322	2
Produkce replikačně defektního rekombinantního adenoviru (s nebo bez inzertu) prostřednictvím transfekce komplementujících buněk skupiny 1 replikačně defektním adenovirovým genomem, a to buď ve volné formě, nebo vloženým do plasmidu na bázi pBR322	2
Produkce replikačně defektního rekombinantního adenoviru (s nebo bez inzertu) prostřednictvím transfekce buněk skupiny 1 nebo 2 několika plasmidy obsahujícími replikačně defektní subgenomické nebo subgenické sekvenční adenoviru, což může vést ke vzniku replikačně kompetentních virových částic adenoviru	2
Infekce cílových buněk skupiny 1 nebo 2 (ať už komplementujících či nikoli) nebo zvířat, která nejsou schopna kompenzovat defekt replikace pomocí výše zmíněného rekombinantního adenoviru s defektem replikace	2



Jakmile lze předpokládat, že cílové buňky (skupina 1) infikovaných zvířat již nevylučují virové částice, mohou být chována na bezpečnostní úrovni rizika třídy 1	1
Částice adenovirového vektoru bez genů (tzv. gutless adenoviral vector particles), u nichž byly odstraněny všechny adenovirové geny, neobsahují žádný transgen s potenciálním rizikem a byly vyprodukovány v pomocných buněčných liniích, kde se nepředpokládá homologní rekombinace mezi integrovanými pomocnými geny a pomocným virem, přičemž balení DNA pomocného viru je minimalizováno a částice adenovirového vektoru jsou zbaveny kontaminujících pomocných virů pomocí odstředivky s hustotním gradientem	1
Infekce cílových buněk ze skupiny 1 nebo zvířat výše uvedenými částicemi adenovirového vektoru bez genů (tzv. gutless adenoviral vector particles)	1

Vektory na bázi adeno-asociovaných virů

Genom: lineární ssDNA

Viry samotné jsou řazeny do rizika třídy 2. Pokud však není přítomen pomocný virus a pokud transgen nekóduje tumorigenní gen ani toxin, lze vektor zařadit do rizika třídy 1.

Adeno-asociované viry (AAV) jsou nepatogenní lidské a zvířecí Parvoviry. Jsou defektní a vyžadují koinfekci pomocnými viry jako jsou adenoviry nebo viry herpes simplex.

Replikace AAV je obvykle závislá na pomocných funkcích. Při hodnocení je nutné posoudit přítomnost helper viru nebo helper funkcí, produkční systém, přítomnost rep/cap, možnost vzniku replikačně kompetentního AAV, biologickou funkci insertu a cílový organismus.

Podrobná klasifikace vektorů na bázi AAV (bez ohledu na sérotyp), zařazení do třídy rizika

Vektor, aktivita	Třída
Vektor/pomocná DNA	
DNA rekombinantního vektoru AAV (obsahující pouze dvě virové sekvence ITR) nebo pomocný vektor na bázi plasmidu v <i>E. coli</i> K12 nebo jejích derivátech (produkce, amplifikace vektorových a pomocných plasmidů)	1
Virové částice odvozené z AAV	
Produkce vektoru na bázi AAV prostřednictvím kotransfekce hostitelské buněčné linie vektorem a pomocným plasmidem a infekce replikačně kompetentním pomocným virem	2
Infekce cílových buněk ze skupiny 1 nebo 2 nebo zvířat výše uvedenými vektorovými částicemi	2
Produkce vektoru na bázi AAV bez pomocného viru (tzv. helper virus-free) prostřednictvím kotransfekce komplementující buněčné linie (např. HEK293) s vektorem a pomocným plasmidem	1
Infekce cílových buněk ze skupiny 1 nebo zvířat výše uvedenými vektorovými částicemi	1
Infekce cílových buněk ze skupiny 2 nebo zvířat výše uvedenými vektorovými částicemi	2



Produkce vektoru na bázi AAV bez pomocného viru (tzv. helper virus-free), který obsahuje sekvenční potenciální rizikem, jako jsou onkogeny, sekvenční kódující cytogeny, integrázy nebo definované siRNA, miRNA nebo shRNA	2
Infekce cílových buněk ze skupiny 1 nebo 2 nebo zvířat výše uvedenými vektorovými částicemi	2
Jakmile lze předpokládat, že cílové buňky (skupina 1) nebo infikovaná zvířata již nevyvolávají virové částice, mohou být zařazeny do rizika třídy 1	1

Vektory na bázi Herpes simplex virus 1 a 2

Genom: dsDNA

Vektory na bázi HSV zůstávají v podobě extrachromozomálního epizomu, což snižuje pravděpodobnost inzerční mutace v genomu hostitele. Vektory jsou tedy bezpečnější než vektory integrující se.

V současné době se běžně používají dvě hlavní strategie pro vektory založené na viru, HSV, především viru HSV-1

- Rekombinantní viry HSV (rHSV) jsou replikačně defektní
- HSV amplikony jsou odvozeny z plasmidů

Vzhledem k přítomnosti kódujících virových sekvencí a z toho vyplývajících možných cytopatických účinků, jakož i s ohledem na jejich rozšířený tropismus, by se práce s rHSV a s amplikonovými částicemi kontaminovanými pomocným virem měly obecně provádět na bezpečnostní úrovni rizika třídy 2, a to bez ohledu na použité inzerty.

Pro posouzení rizika je důležité vědět, zda je defekt replikace u rHSV stabilní a nelze jej obnovit, a zda by se mohl objevit pomocný virus HSV nebo divoký typ HSV, který by produkoval cytotoxické proteiny.

Nakládání s HSV amplikony, které obsahují inzerty bez nebezpečného potenciálu, lze provádět na bezpečnostní úrovni rizika třídy 1. Práce zahrnující RNA interferenci (např. s využitím si/mi/shRNA) by měly být prováděny na bezpečnostní úrovni rizika třídy 2, jelikož o jejich modifikačních vlastnostech v buňkách je známo jen málo. Totéž platí pro sekvenční potenciální rizikem (např. onkogeny, sekvenční kódující cytokiny, integrázy). V případě, že je provedeno podrobné posouzení rizik prokazující, že použítá vložka si/mi/shRNA nepředstavuje žádné nebo jen zanedbatelné riziko, lze práci provádět také za podmínek bezpečnostní úrovně rizika třídy 1.

Podrobná klasifikace vektorů na bázi HSV, zařazení do třídy rizika

Vektor, aktivita	Třída
Vektor/pomocná DNA	
Replikačně defektní genom HSV nebo pomocné plasmidové vektory v <i>E. coli</i> K12 nebo jejich derivátech (produkce, amplifikace vektorových a pomocných plasmidů)	1
HSV amplikon v <i>E. coli</i> K12 (produkce, amplifikace HSV amplikonů)	1
Virové částice	



Produkce rekombinantního replikačně defektního viru rHSV prostřednictvím transfekce komplementační buněčné linie (stále je možné, že dojde k cytotoxickým účinkům)	2
Infekce cílových buněk ze skupiny 1 nebo zvířat vektorem rHSV	2
Produkce HSV-1 amplikonů prostřednictvím kotransfekce komplementující buněčné linie vektorovou DNA a pomocným replikačně defektním virem rHSV	2
Infekce cílových buněk ze skupiny 1 nebo 2 nebo zvířat výše zmíněnými HSV amplikony	2
Produkce HSV-1 amplikonů bez přítomnosti pomocného viru (helper virus free) v permisivních eukaryotických liniích (skupina 1)	1
Infekce cílových buněk ze skupiny 1 nebo zvířat výše zmíněnými HSV amplikony	1
Infekce cílových buněk ze skupiny 2 nebo zvířat výše zmíněnými HSV amplikony	2
Produkce HSV-1 amplikonů bez přítomnosti pomocného viru (helper virus free) obsahujících sekvenční potenciální riziko, jako jsou onkogeny, sekvenční kódující cytogeny, integrázy nebo definované siRNA, miRNA nebo shRNA	2
Infekce cílových buněk ze skupiny 1 nebo 2 nebo zvířat výše zmíněnými HSV amplikony	2
Jakmile lze předpokládat, že cílové buňky (skupina 1) nebo infikovaná zvířata již nevylučují virové částice, mohou být zařazeny do bezpečnostní úrovně rizika třídy 1	1

Vektory na bázi viru vztekliny

Genom Rhabdovirů: negativní ssRNA

Virus vztekliny je zařazen do rizika třídy 3

Virové vektory používané ve výzkumu pocházejí téměř výlučně z vakcinačního kmene SAD-B19. Tento oslabený živý kmen se v Evropě používá k očkování volně žijících zvířat prostřednictvím nakažené návnady. Pro širokou škálu živočišných druhů je nepatogenní.

Virové vektory SAD-B19 vykazují delecii v sekvenci kódující G-protein. Po infekci prochází virus SAD-B19ΔG jedním úplným cyklem intracelulární replikace a produkuje viriony, které jsou schopny se odštěpit z hostitelské buňky, i když postrádají G-protein. Tyto částice SAD-B19ΔG však nejsou schopny se navázat na sekundární hostitelskou buňku a proniknout do ní. Některé viry SAD-B19ΔG vykazují další delecii v genech N a P a v poly-U segmentech mezi N a P, což vede ke snížené expresi virových proteinů.

SAD-B19ΔG vznikají společnou transfekcí permisivních buněk genomovým ΔG-RNA plasmidem a plasmidy kódujícími G-protein viru vztekliny. Výsledné částice SAD-B19ΔG s G-proteinem viru vztekliny v povrchových strukturách jsou schopny infikovat buňky pouze jednou, nejsou však schopny podporovat tvorbu nových infekčních virových částic. V žádném stadiu tvorby ΔG vektoru viru vztekliny (RABV) není zapojen intaktní virus vztekliny. Nelze však vyloučit možnost rekombinace.

Podrobná klasifikace vektorů na bázi viru vztekliny, zařazení do třídy rizika



Vektor, aktivita	Třída
DNA plasmidy	
Rekombinantní DNA plasmidy s vyřazeným G-proteinem nebo pomocné plasmidy obsahující jednotlivé otevřené čtecí rámce viru vztekliny v <i>E. coli</i> K12 nebo jejich derivátech (výroba, amplifikace vektorového plasmidu a pomocných plasmidů)	1
Vektory na bázi viru vztekliny u zvířat nebo v živočišných buňkách	
Produkce vakcinačního kmene SAD-B19	2
Produkce částic SAD-B19ΔG prostřednictvím kotransdukce hostitelské buněčné linie plasmidem obsahujícím genom vektoru s vynechaným G-proteinem a pomocnými plasmidy kódujícími G-protein a další proteiny viru vztekliny	2
Kotransdukce cílových buněk skupiny 1 nebo 2 nebo infekce zvířat částicí SAD-B19ΔG a replikačně defektními virovými vektory, které společně zkompletují virový G-protein (skupina 1 nebo 2, tj. AAV-RB-G), ale nikoli další proteiny viru vztekliny	2
Produkce pseudotypových částic SAD-B19ΔG-EnvA prostřednictvím kotransdukce hostitelské buněčné linie s genomickým vektorem, který má odstraněný G-protein a pomocnými plasmidy kódujícími glykoprotein EnvA a další proteiny viru vztekliny	1
Transdukce cílových buněk skupiny 1 nebo infekce zvířat exprimujících receptor TVA s SAD-B19ΔG -EnvA	1
Transdukce cílových buněk skupiny 2 nebo infekce zvířat exprimujících receptor TVA s SAD-B19ΔG -EnvA	2
Buňky skupiny 1 u zvířat, kterým byly do mozku injikovány SAD-B19ΔG (jako aktivita spadající do třídy rizika 2) může být snížena na rizikovou skupinu 1 a udržována na bezpečnostní úrovni rizika třídy 1	1
Analýza buněk skupiny 1 a zvířecích tkání infikovaných SAD-B19ΔG dokud existuje možnost, že jsou přítomny infekční částice přenášející vzteklinu	2
Analýza infikovaných primárních buněk a tkání zvířat z kategorie SPF infikovaných SAD-B19ΔG-EnvA	1
Analýza infikovaných primárních buněk a tkání primátů infikovaných virem SAD-B19ΔG-EnvA (jako aktivita třídy rizika 1)	2

Vektory na bázi viru Pseudorabies (Aujeszkyho choroba)

Genom: lineární dsDNA

Klasifikován do třídy rizika 2

Virus je patogenní pro hospodářská a laboratorní zvířata

Kmen PRV „Bartha“ je atenuovaný kmen používaný jako vakcína pro prasata.

Geneticky modifikovanou formou viru PRV Bartha je kmen Ba2001. Ten není schopen replikace, pokud jeho genom není rekombinován pomocí cre-rekombinázy. Dalším kmenem s defektem replikace je kmen PRVΔIE180. Protein IE180 kóduje časný transkripční aktivátor virových genů potřebný pro replikaci DNA a transkripci RNA. Transkomplementace s IE180 může obnovit přechodnou infekčnost.



Glykoprotein gD obalu viru PRV je nezbytný pro infekci buněk. Mutanty PRV Δ gD se replikují v infikovaných buňkách, avšak potomkové viriony uvolněné z infikovaných buněk již nejsou infekční.

Podrobná klasifikace vektorů na bázi viru Pseudorabies, zařazení do třídy rizika

Vektor, aktivita	Třída
DNA plasmidy	
Rekombinantní DNA plasmidy nebo pomocné plasmidy obsahující OFR viru pseudorabies v <i>E. coli</i> K12 nebo jejích derivátech	1
Virové částice	
Produkce replikačně kompetentního vakcinačního kmene PRV Bartha nebo jiných atenuovaných replikačně kompetentních PRV na permisivních buňkách skupiny 1	1
Infekce cílových buněk skupiny 1 nebo zvířat replikačně kompetentním PRV Bartha nebo jiným atenuovaným PRV	1
Infekce cílových buněk skupiny 2 nebo zvířat replikačně kompetentním PRV Bartha nebo jiným atenuovaným PRV	2
Produkce replikačně defektního PRV na permisivní buněčné linii bez pomocného viru skupiny 2	1
Infekce cílových buněk skupiny 1 nebo zvířat replikačně defektním PRV	1
Infekce cílových buněk skupiny 2 nebo zvířat replikačně defektním PRV	2
Vektory na bázi viru pseudorabies u zvířat nebo v živočišných buňkách	
Zvířata, kterým byl do mozku injekčně podán replikačně kompetentní vakcinační kmen PRV Bartha nebo jiný atenuovaný replikačně kompetentní kmen PRV (anterográdní šíření PRV umožňuje jeho rozšíření do periferních neuronů)	2
Analýza infikovaných primárních buněk a zvířecích tkání infikovaných replikačně kompetentním vakcinačním kmenem PRV Bartha nebo jiným atenuovaným replikačně kompetentním PRV, pokud stále existuje možnost přítomnosti infekčních částic PRV	2
Zvířata, kterým byl do mozku injikován replikačně defektní virus PRV	1
Analýza transdukovaných primárních buněk nebo zvířecích tkání s replikačně defektním PRV	1

Vektory na bázi alfavirů - Semliki forest virus (SFV) a Sindbis (SIN) virus

Genom: pozitivní ssRNA

Třída rizika 2

Při použití takových vektorů obvykle dochází k tvorbě replikačně defektních virových částic. Porucha replikace systému je proto klíčovým prvkem posouzení rizik. Avšak při použití pomocného plasmidu s úplným a nemodifikovaným čtecím rámcem pro strukturální proteiny nelze vyloučit, že se po společné transfekci eukaryotických buněk s *in vitro* přepisovanou vektorovou RNA vytvoří infekční viry schopné replikace. Takováto aktivita představuje nízké riziko pro člověka a životní prostředí.



Podrobná klasifikace vektorů na bázi virů SFV a SIN, zařazení do třídy rizika

Vektor, aktivita	Třída
Expresní vektor nebo pomocný plasmidový vektor v <i>E. coli</i> K12 nebo jejich derivátech	1
Transfekce eukaryotických buněk skupiny 1 <i>in vitro</i> transkripty z expresních vektorů SFV nebo SIN za předpokladu, že buňky neobsahují sekvence kódující proteiny virového obalu a že heterologní protein nepředstavuje žádné riziko	1
Transfekce eukaryotických buněk skupiny 2 <i>in vitro</i> transkripty z expresních vektorů SFV nebo SIN	2
Kotransfekce eukaryotických buněk ze skupiny 1 nebo skupiny 2 <i>in vitro</i> transkriptem z expresního vektoru obsahujícího subgenomické virové nebo buněčné sekvence a transkriptem z pomocného vektoru, který obsahuje kompletní sekvence pro strukturální obalové proteiny: lze vytvořit infekční virové částice schopné replikace.	2
Infekce eukaryotických buněk skupiny 1 nebo 2 výše zmíněnými virovými částicemi	2
Kotransfekce eukaryotických buněk ze skupiny 1 nebo skupiny 2 <i>in vitro</i> transkripty s pomocnými funkcemi odvozenými z binárního systému (two-helper RNA system): mohou vznikat pouze infekční, avšak replikačně defektní virové částice: klasifikace je stejná jako u hostitelského organismu	1 nebo 2
Infekce eukaryotických buněk skupiny 1 nebo 2 výše zmíněnými virovými částicemi: klasifikace je stejná jako u hostitelského organismu	1 nebo 2
Kotransfekce eukaryotických buněk ze skupiny 1 nebo skupiny 2 <i>in vitro</i> transkriptem z expresního vektoru (transkript obsahuje subgenomické virové nebo buněčné sekvence) a transkriptem z pomocného vektoru s trojitou mutací v proteolytickém štěpném místě prekurzorového proteinu E3-E2: funkce odvozené od binárního systému (two-helper RNA system): jsou produkovány replikačně kompetentní, ale neinfekční virové částice: klasifikace je stejná jako u hostitelského organismu	1 nebo 2
Aktivace výše zmíněných virových částic prostřednictvím působení alfa-chymotrypsinu (tvorba infekčních virových částic, které se nemohou množit)	1
Infekce eukaryotických buněk skupiny 1 nebo 2 výše zmíněnými virovými částicemi: klasifikace je stejná jako u hostitelského organismu	1 nebo 2



Příloha 3

Příklady komerčně dostupných savčích buněčných linií imortalizovaných celým virem nebo jeho fragmenty

Název linie	původce	GMO	Virová komponenta	Třída rizika
15P-1	myš	ano	Gen pro velký T antigen myšího polyomaviru	1
B95-8	tamarín vatový	ano	Epstein-Barr virus	2
BEAS-2B	člověk	ano	replikačně defektním vícesložkový Ad12– SV40 hybridní virus	2
BV-2	myš	ano	Retrovirové geny v-raf/v-myc	1
CAP	člověk	ano	Geny E1A a E1B z Ad5	1
CAP-T	člověk	ano	Geny E1A a E1B z Ad5 + SV40 velký T-antigen	1
COS-1 + COS-7	kočkodan zelený	ano	replikačně defektní SV40 virus	2
GM12878	člověk	ano	Epstein-Barr virus	2
hCMEC/D3	člověk	ano	Gen pro velký T-antigen ze SV40	1
HEK293	člověk	ano	Geny E1A a E1B z Ad5	1
HeLa	člověk	ne	HPV18 virus	2
HK-2	člověk	ano	Geny E6/E7 z HPV16	1
HUDEP-1 + HUDEP-2	člověk	ano	Geny E6/E7 z HPV16	1
MIN6	myš	ano	Gen pro velký T-antigen ze SV40	1
MT-2	člověk	ano	HTLV-1 virus	3
PER.C6	člověk	ano	Geny E1A a E1B z Ad5	1
Raji	člověk	ne	Epstein-Barr virus	2
RAW264.7	myš	ano	defektní Abelson murine leukemia virus	2