

## 1. KRATEK OPIS IN NAMEN PROJEKTA

Namen projekta je zdravljenje bolnikov s CD19 pozitivnimi malignimi obolenji, pri katerih prejšnje metode zdravljenja niso bile neuspešne. Za zdravljenje bo uporabljen avtologni celični pripravek, ki vsebuje limfocite T z izraženimi himernimi antigenskimi receptorji, usmerjenimi proti antigenu CD19 (ang. *anti-CD19 chimeric antigen receptor*; aCD19 CAR). V okviru projekta bo potekalo namerno sproščanje gensko spremenjenih organizmov (GSO) - aCD19 CAR T v obliki aplikacije celičnega pripravka bolnikom. Pričakujemo, da se bodo po zdravljenju celice aCD19 CAR T ohranjale v krvnem obtoku bolnika in omogočile potencial uspešnega zdravljenja. Pri kandidatih za zdravljenje se bo preverilo vključitvene in izključitvene kriterije, seznanilo bolnika z informacijami zdravljenja in lastnostmi celičnega pripravka ter pridobilo informirano soglasje. Postopek aplikacije celičnega pripravka bo potekal v bolniški sobi 31 kliničnega oddelka za hematologijo (KOH) v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana (UKCL). Bolniška soba 31 je zaprti sistem vpisan v Register GSO pod registrsko številko 0009/2023. Po prejemu celičnega pripravka se bo pacienti v bolnišnici redno spremljalo glede znakov in simptomov neželenih učinkov. Spremljalo se bo tudi aCD19 CAR T celice v krvi bolnika in preverjalo njihovo obstojnost. Skladno s protokolom bodo vsi bolniki vključeni v dolgoročno spremljanje.

Celični pripravek aCD19 CAR T bo pripravilo osebje Obrata za proizvodnjo CAR T (LAB CAR T) na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo (IMI), UL MF v zaprtem sistemu za delo z GSO (vpisan v Register GSO pod registrsko številko 0003/2023). Priprava celic bo potekala v zaprtem, avtomatiziranem in dobro nadzorovanem sistemu CliniMACS Prodigy® (Miltenyi Biotec). Sistem je skladen z načeli dobre proizvodne prakse (ang. *Good manufacturing practice*; GMP) ter zagotavlja ponovljiv in standardiziran proizvodni postopek.

## 2. ZNAČILNOSTI GSO IN NAMERAVANEGA NAMERNEGA SPROŠČANJA V OKOLJE

### 2.1 Lastnosti prejemnega ali starševskega organizma

#### 2.1.1 Človeške celice T pomagalk (CD4) in citotoksični limfociti T (CD8)

Starševski organizem za proizvodnjo celic aCD19 CAR T je levkaferezni vzorec bolnika z ustrežno diagnozo, ki je po oceni konzilija zdravnikov na KOH, opravljenem pregledu in razgovoru z bolnikom, primeren za zdravljenje z avtolognim celičnim pripravkom aCD19 CAR T. V kolikor bolnik privoli v zdravljenje, se izvede proces pridobivanja mononuklearnih celic z levkaferozo na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino (ZTM). Levkaferaza je posebna oblika afereze, t.j. postopka pridobivanja različnih krvnih komponent na celičnem ločevalcu, pri čemer se levkociti s centrifugiranjem in filtracijo ločijo od preostalih krvnih komponent, ki se jih med postopkom ločevanja vrne nazaj v krvni obtok bolnika [1]. Darovalca se v skladu z Zakonom o kakovosti in varnosti človeških tkiv in celic, namenjenih za zdravljenje (ZKVČTC, Uradni list RS, št. [61/07](#) in [56/15](#) – ZPPDČT), testira na prisotnost virusa humane imunske pomanjkljivosti 1 in 2 (ang. *human immunodeficiency virus*; HIV), virusa hepatitisa B

(ang. *Hepatitis B virus*; HBV), virusa hepatitisa C (ang. *Hepatitis C virus*; HCV) in sifilisa. Aktivne okužbe z virusom HIV, HBV ali HCV so ene izmed izključitvenih meril protokola zdravljenja. Preveri se sterilnost levkaferznega pripravka.

Pripravljeni levkaferzni pripravek se uporabi za proizvodnjo celičnega pripravka aCD19 CAR T. Na aparatu CliniMACS Prodigy® se iz levkaferznega pripravka z magnetnimi kroglicami izolira CD4 in CD8 limfocite T, čemur sledi aktivacija CD4 in CD8 limfocitov, ki spodbudi rast CD4 in CD8 limfocitov T. Aktivirane limfocite T se nato transducira z lentivirusnim vektorjem in gensko spremenjene limfocite T, ki izražajo aCD19 CAR, namnoži do ustrezne količine celic [2].

## 2.2 Lastnosti vektorja

Za transdukcijo človeških limfocitov T *ex vivo*, z namenom izražanja himernega antigenskega receptorja aCD19 CAR, se bo uporabil vektor rLVVaCD19 CAR proizvajalca Lentigen, Miltenyi Biotec. Lentivirusni vektor je pakiran s strani proizvajalca, ki zagotavlja da je embalaža primerna za transport biološkega materiala 2. varnostne stopnje [3]. Lentivirusni vektor LAB CAR T IMI UL MF ne bo pripravljaj sam ali ga spreminjal, temveč bo v celoti pridobljen od podjetja Miltenyi Biotec.

Lentivirusi so RNA virusi, ki spadajo v družino Retroviridae. Nosijo zapis za encim reverzne transkriptaze, ki po vstopu virusa v celico virusno RNA prepíše v cDNA, ki se nato ob delovanju virusne integraze vključi v genom gostitelja. Lentivirusi so sposobni transducirati tako deleče kot nedeleče se celice, niso imunogeni in so zmožni prenosa večjih količin dednega materiala, zato veljajo za učinkovit dostavni sistem v genski terapiji.

Lentivirusni vektor, ki bo uporabljen za proizvodnjo celic aCD19 CAR T, je osnovan na podlagi sekvence HIV-1, ki pa je, zaradi več delecij v pomožnih genih HIV, replikativno inkompetenten. V procesu transdukcije se lentivirusni delci vežejo na celične receptorje na površini celice in internalizirajo. Nukleotidno zaporedje med dvema spremenjenima zaporedjema LTR, ki nosi zapis za aCD19 CAR, z reverzno transkripcijo prepíše v cDNA, ki se nato stabilno integrira v genom limfocitov T in se prepisuje s celičnim intrinzičnim transkripcijskim mehanizmom. Virusni vektor ne nosi zapisa za virusne proteine, zato ni nobene možnosti za nastanek infektivnih virusnih delcev. Kljub zapisu za začetno mesto replikacije bakterijskega izvora in za odpornost na kanamicin na plazmidih, ki se uporabljajo za proizvodnjo lentivirusnih vektorjev, se le-ta ne integrirata v genom gostiteljske celice, saj je zapis za odpornost proti antibiotikom izven dela plazmida, ki se vgradi v lentivirusni vektor [4].

Več lastnosti uporabljenega lentivirusnega vektorja je navedenih v Dodatku k Prilogi 1.

### 2.2.1 Rekombinantni lentivirusni vektor rLVVaCD19 CAR

Rekombinantni lentivirusni vektor aCD19 (rLVVaCD19 CAR), osnovan na podlagi sekvence HIV-1, sestavljajo naslednji vključki [4]:

- **Beljakovina ovojnice virusa vezikularnega stomatitisa-glikoprotein G (VSV-G)**  
Psevdotipizacija lentirusa s heterologno beljakovino ovojnice virusa vezikularnega stomatitisa-glikoproteinom G (VSV-G) omogoča učinkovitejšo transdukcijo različnih vrst sesalskih celic.

- **5' dolga terminalna ponovitev (LTR) HIV-1 s CMV promotorjem**  
5'LTR regija je ključnega pomena za integracijo vključka v genom gostitelja. U3 regijo 5' LTR nadomešča CMV promotor, ki omogoča transkripcijo neodvisna od gena tat.
- **Signal za pakiranje virusa  $\Psi$  (ang. *packaging signal  $\Psi$* )**  
Signal za pakiranje ( $\Psi$ ) je strukturna značilnost RNA, ki ima kompleksno strukturo v obliki steblo-zanka in se nahaja v prvih 400 nukleotidih na 5' koncu RNA genoma. Skupaj z nukleokapsidno (NC) regijo Gag sodeluje v procesu pakiranja, pri čemer se virusna RNA znotraj citoplazme zapakira v virusne delce.
- **gag**  
Gag je zapis za strukturne proteine virusnega vektorja, ki skupaj s  $\Psi$  sodeluje v procesu pakiranja virusne RNA znotraj citoplazme v virusne delce.
- **rev odzivni element (ang. *rev response element; RRE*)**  
Rev odzivni element (RRE) prepozna protein Rev, kar vodi v translokacijo celotne dolžine neizrezane ali delno izrezane RNA iz jedra v citoplazmo, pri čemer se z zaviranjem izrezovanja RNA nadzira izražanje virusnih genov.
- **Centralni polipurinski trakt (cPPT)**  
Centralni polipurinski trakt (cPPT) je ključnega pomena za sintezo komplementarne verige DNA ter translokacijo predintegracijskega kompleksa v jedro celice.
- **Promotor EF-1 $\alpha$**   
Promotor inicializira izražanje aCD19 CAR.
- **aCD19 CAR**  
aCD19 CAR je fuzijski protein, ki se specifično veže na protein CD19 na površini tako zdravih kot malignih limfocitov B. To sproži signalne poti, ki vodijo v oblikovanje efektivskih odzivov za odstranitev teh celic.
- **c-frag**  
c-frag je sintetično zaporedje na provirusni DNA, ki omogoča določanje transdukcijskega titra virusnega vektorja.
- **3' LTR**  
3'LTR regija je ključnega pomena za integracijo vključka v genom gostitelja. Zaradi delecije regije 3'LTR pride do samoinaktivacije lentivirusnega konstrukta po transdukciji.

## 2.2.2 aCD19 CAR

aCD19 CAR je fuzijski protein, ki ga sestavljajo naslednji sestavni deli [3]:

- **Signalni peptid (ang. *leader*) GM-CSF-R alpha**

Vodilni peptid omogoči ekspresijo proteina CAR na T-celični membrani po sekreciji iz Golgijevega kompleksa. Zaporedje vodilnega peptida je enako zaporedju podenote alfa receptorja za granulocitne makrofagne kolonije spodbujajoči dejavnik (ang. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) [3].

- **Lahka in težka veriga aCD19**

Lahka veriga variabilnega fragmenta (ang. *Light chain of single-chain variable fragment*; V<sub>L</sub>-scFv) protitelesa aCD19 je zunajcelična domena, ki skupaj s težko verigo prepozna in veže antigen CD19. Povezovallec je glicin-serinsko povezovalno zaporedje, ki povezuje lahko in težko verigo aCD19. Zaporedje je fleksibilno in prispeva k boljši vezavi in stabilnosti fuzijskih proteinov [5]. Težka veriga variabilnega fragmenta (ang. *Heavy chain of single-chain variable fragment*; V<sub>H</sub>-scFv) protitelesa aCD19 je zunajcelična domena, ki skupaj z lahko verigo prepozna in veže antigen CD19. Verigi V<sub>L</sub> in V<sub>H</sub> sta pridobljeni iz aCD19 scFv FMC-63 [6].

- **Vmesnik CD8 (ang. *CD8 spacer, hinge*)**

Vmesnik je zunajcelična povezovalna veriga, ki povezuje zunajcelični verigi scFv aCD19 s transmembransko domeno TNFRSF19 TM. Vmesnik je sestavljen iz aminokislin, ki omogočajo fleksibilnost za optimalno vezavo antigen prepoznavne domene na antigen. Zaporedje vmesnika je pridobljeno iz človeškega CD8 [3].

- **Transmembranska domena TNFRSF19 TM (ang. *TNF receptor superfamily member 19*)**

Transmembranska domena povezuje zunajcelični in znotrajcelični del aCD19 CAR ter prispeva k njegovi stabilnosti. Domena je vstavljena v fosfolipidni dvosloj in je sestavljena iz hidrofobnih aminokislin. Zaporedje transmembranske domene je identično aminokislinskemu zaporedju človeškega receptorja za dejavnik tumorske nekroze superdružine 19 (UniProt Q9NS68, aminokislina 167-196) in vključuje celotno transmembransko domeno, štiri sosednje aminokislinske zunanjske domene in pet sosednjih aminokislin citoplazemske domene TNFRSF19 [3], [7].

- **Kostimulatorna domena 4-1BB (CD137)**

Kostimulatorna domena 4-1BB je znotrajcelična domena CAR, ki spodbudi aktivacijo, proliferacijo in diferenciacijo limfocitov T ter sintezo citokinov. V primerjavi s celicami, ki vsebujejo alternativno kostimulatorno domeno CD28, se celice s konstruktom, ki vsebujejo kostimulatorno domeno 4-1BB, odzovejo počasneje ter obstanejo dlje časa v pogojih *in vivo* [3], [8].

- **Signalna domena CD3ζ (CD27)**

Signalna domena CD3ζ je znotrajcelična domena CAR in vsebuje zaporedja za rekrutiranje signalnih elementov, katerih naloga je posredovanje signala iz receptorja, kar posledično vodi v aktivacijo limfocitov T [3], [9].

Aminokislinska zaporedja domen konstrukta aCD19 CAR so poslovna skrivnost proizvajalca vektorja Lentigen, Miltenyi Biotec. V Dodatku k Prilogi 1, ki je zaupne narave, so navedene sekvence in njihove dolžine. Vključek aCD19 CAR je v uporabi v več kliničnih raziskavah v različnih državah sveta [10], [11], [12], [13], [14], [15].

### 2.3 Lastnosti novonastalega GSO (aCD19 CAR T)

S pomočjo lentivirusne transdukcije se v limfocite CD4 in CD8 vnese vključek aCD19 CAR. Celice pri tem ne pridobijo drugih zapisov za gene. Rezultat tega procesa so novonastali gensko spremenjeni limfociti T, ki na svoji površini izražajo aCD19 CAR, kar jim omogoča specifično prepoznavanje in vezavo na protein CD19. Antigen CD19 je prisoten na limfocitih B. Interakcija aCD19 CAR T s proteinom CD19 vzbudi združevanje molekul CAR na površini novonastalih celic, kar sproži znotrajcelično signalno kaskado [16]. Temelj znotrajcelične aktivacijske domene predstavlja CD3 ζ veriga, ki se ob vezavi liganda na CAR fosforilira in aktivira z verigo zeta povezano protein kinazo 70 (ang. *zeta-chain-associated protein kinase 70*; ZAP70) [17]. Ta signalizacija sproži serijo dogodkov, ki vodijo do aktivacije CAR T celic, njihove proliferacije, sproščanja citokinov in sproščanja citotoksičnih granul, ki učinkovito odstranjujejo limfocite B [18]. Namen zdravljenja s celičnim pripravkom aCD19 CAR T je odstranitev malignih celic pri bolnikih s CD19 pozitivnimi hematološkimi malignimi obolenji. Ker je antigen CD19 prisoten tudi na zdravih limfocitih B, zdravljenje privede tudi do zmanjšanja zdravih B limfocitov, predhodnikov plazmatskih celic, ki proizvajajo protitelesa. Zato se pri teh bolnikih intravenozno nadomeščajo imunoglobulini, da se preprečijo oportunistične okužbe.

Transdukcijo limfocitov T v LAB CAR T izvajajo v popolnoma zaprtem sistemu CliniMACS Prodigy®, ki zagotavlja nadzorovano okolje in omogoča popolnoma avtomatiziran proces priprave celic aCD19 CAR T, od označevanja, gojenja, aktivacije, transdukcije in namnožitve celic, spiranja in izmenjave medijev, do priprave končne formulacije pripravka. Vsi reagenti, ki jih uporabljajo v procesu proizvodnje celic aCD19 CAR T so komercialno dostopni in so pridobljeni od proizvajalca Miltenyi Biotec. Posamezne reagentne se na zaprt sistem priključi po infuzijskem sistemu z uporabo aseptične tehnike, kar varuje celice pred kontaminacijo in osebje pred neposredno izpostavitvijo GSO. Po okvirno 13 dnevih proizvodnje je končni celični pripravek pripravljen v popolnoma zatesnjeni infuzijski vrečki. Za nadzor kakovosti so iz končnega pripravka odvzeti vzorci za mikrobiološko testiranje, testiranje prisotnosti endotoksinov, mikoplazme, viabilnosti, replikacijsko kompetentnega lentirusa ter določitev števila vektorskih kopij. Avtentičnost organizma se preverja z metodo qPCR (ang. *quantitative polymerase chain reaction*), uspešnost transdukcije limfocitov T pa s fenotipizacijo celic in detekcijo CAR na površini transduciranih limfocitov T s pretočno citometrijo. Poleg tega se izvede še vizualni pregled. Število celic aCD19 CAR T v končnem pripravku je prilagojeno na telesno težo bolnika vsebuje do  $2 \times 10^6$  transduciranih celic aCD19 CAR T na kilogram telesne mase bolnika v 100 mL puferskega medija. Končni celični pripravek je pripravljen v infuzijskih vrečkah iz materiala etilen vinil acetata (EVA). Posamezna infuzijska vrečka se najprej temeljito površinsko dekontaminira z razkužili (70 % etanol ali drugo ustrezno sredstvo) v skladu z navodili sredstva, nato pa se jo za dodatno zaščito vstavi v transportno vrečko za biološki material z vpojno blazinico. Tako zapakiran celični pripravek se vstavi v nosilec za infuzijske vrečke in v neprodušno zaprto plastično posodo, ki je označena z ustrezno nalepko za GSO 2.VR. Transport pripravka od LAB CAR T do KOH poteka kontrolirano in v ustrezno

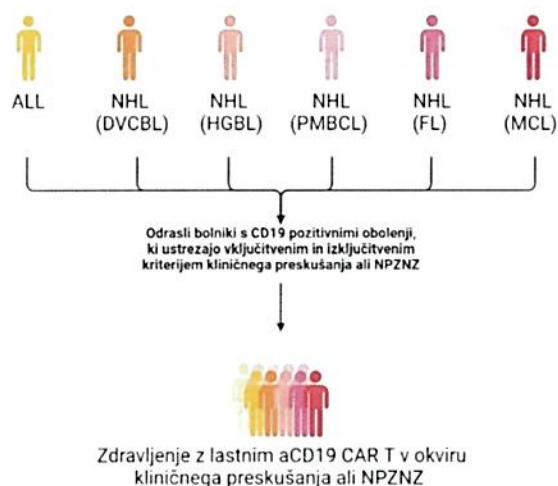
označeni, tesno zaprti in zaklenjeni transportni škatli z nadzorovano temperaturo, ki onemogoča sprostitve celic v okolje tudi ob večji zunanji sili (padec na tla ipd.).

Celični pripravek aCD19 CAR T uvrščamo v 2. varnostni razred GSO, saj se za transdukcijo bolnikovih limfocitov uporablja lentivirusni vektor (rLVVaCD19 CAR), ki spada v 2. varnostni razred.

## 2.4 Značilnosti nameravanega sproščanja v okolje in njegovega obsega

Namerno sproščanje GSO v okolje na UKCL vključuje proces zdravljenja z GSO celicami aCD19 CAR T. Gensko spremenjeni avtologni celični pripravek aCD19 CAR T bo na KOH intravenozno apliciran odraslim bolnikom s CD19 pozitivnimi malignimi obolenji. Z avtolognim celičnim pripravkom aCD19 lahko uspešno zdravimo različna maligna obolenja, pri katerih je na površini prisoten tarčni antigen CD19. Pri normalnih celicah B je antigen CD19 prisoten na površini B celic od njihovega zgodnjega do zrelega razvoja, njegovo izražanje se zmanjša na površini plazmatk. Zaradi močnega izražanja pri B-celičnih malignih obolenjih, kot so ne-Hodgkinovi limfomi (B-NHL) in B- akutno limfoblastno levkemijo (B-ALL), je CD19 ustrezna in široko uporabna tarča za imunsko terapijo s celicami CAR T [19]. B-NHL predstavlja heterogeno skupino bolezni celic B, pri kateri se podtipi razlikujejo v morfoloških, fenotipskih, genetskih in kliničnih lastnostih. Trenutno so s strani Evropske agencije za zdravila odobreni produkti [20] za zdravljenje naslednjih B-NHL, ki niso odzivni na zdravljenje ali pri katerih se je bolezen ponovila: difuzni velikocelični B-limfom (ang. Diffuse large B cell lymphoma; DVCBL), B-celični limfom visoke stopnje (ang. High grade B-cell lymphoma; HGBL), primarni mediastinalni velikocelični B-limfom (primary mediastinal large B-cell lymphoma; PMBCL). Folikularni limfom (FL), limfom plaščnih celic (mantle cell lymphoma; MCL) ter produkti za zdravljenje B-ALL. V KOH UCKL smo za vključitev bolnikov zdravljenja z aCD19 CAR T, kot uporabo nerutinsko pripravljenih zdravil za napredno zdravljenje (NPZNZ), pridobili soglasje št. 0120-412/2024-2711-7 Komisije za medicinsko etiko (KME)). V vlogi KME smo pripravili tudi podrobnejši opis načina izbire kandidatov, ki so primerni za vključitev v proces zdravljenja. Na tej osnovi lahko povzamemo, da bodo v procesu zdravljenja obravnavani bolniki s CD19-pozitivnimi malignimi obolenji, za katere indikacije so v EU na voljo komercialno odobreni CAR T produkti, vendar ti v Sloveniji niso razvrščeni na seznam zdravil, oziroma za njih ni odobreno financiranje. Na sliki 1 so prikazane različne diagnoze, s povzetim sistemom vključitve v zdravljenje z aCD19 CAR T, pripravljenim v LAB CAR T.

Pričakovano število pripravkov NPZNZ in uporaba GSO aCD19 CAR T na letni ravni je do 10.



Slika 1: Shema izbire zdravljenja bolnikov z lastnim aCD19 CAR T

CD19 CAR T infuzija poteka v zaprtem sistemu 2. varnostnega razreda, v bolniški sobi 31-intenziva na KOH UKCL po navodilih in pod nadzorom zdravnika, ki ima izkušnje in je usposobljen za apliciranje CAR T terapije. Pred infundiranjem aCD19 CAR T je potrebno preveriti, da se bolnikova identiteta ujema z identifikacijskimi podatki bolnika na infuzijskih vrečkah celičnega pripravka. Intravenska aplikacija celičnega pripravka poteka s pomočjo intravenskega sistema za infundiranje brez filtra. Celični pripravek vsebuje do  $2 \times 10^6$  transduciranih celic aCD19 CAR T na kilogram telesne mase bolnika v 100 mL pufrskega medija v infuzijski vrečki. Pripravljen je iz bolniku lastnih celic. Celična sestava in končno število celic v pripravku sta odvisna od lastnosti izvornega levkaferznega produkta in od telesne mase bolnika. Avtentičnost organizma se preverja z metodo qPCR, uspešnost transdukcije limfocitov T pa s fenotipizacijo celic in detekcijo CAR na površini transduciranih limfocitov T s pretočno citometrijo. Za vzpostavljanje pretoka v infuzijskem sistemu pred začetkom infundiranja uporabimo raztopino natrijevega klorida (NaCl) za injiciranje 9 mg/ml (0,9%). S težnostnim pretokom se aplicira celotna vsebina infuzijske vrečke. Postopek traja od 10 do 20 minut. V zdravstveno dokumentacijo je potrebno zabeležiti količino infundiranega celičnega pripravka, čas začetka in konca postopka. Vsako aplikacijo celičnega pripravka CAR T je potrebno zabeležiti v GSO obratovalni dnevnik, ki se hrani v predprostoru bolniške sobe 31. Pred, med in po infuziji je potrebno spremljati vitalne znake bolnika, ki se beležijo na ustreznem obrazcu. Bolnik bo v bolniški sobi 31 zadržan glede na njegovo zdravstveno stanje. Praviloma se bo v zaprtem sistemu za delo z GSO 2. varnostne stopnje po aplikaciji nahajal vsaj 1 dan. Prvih 14 dni po infuziji se bolnike spremlja v bolnišnični oskrbi zaradi simptomov morebitnega sindroma sproščanja citokinov, nevroloških dogodkov in drugih toksičnih učinkov. Podroben opis zdravljenja s CAR T celično terapijo je opisan v *SOP 0534 – Zdravljenje s CAR-T celično terapijo*.

Zaprti sistem za delo z GSO se nahaja v prostorih KOH v pritličju glavne stavbe UKCL, na Zaloški 7, 1000 Ljubljana. KOH je ločen na oranžno in modro cono. Del KOH, ki je klasificiran za delo z GSO 2. varnostne stopnje bolniška soba 31-intenziva, se nahaja znotraj oranžne cone KOH. Površina bolniške sobe znaša 15,68 m<sup>2</sup>. Bolniška soba ima predprostor, ki ga zaradi postopnega prehoda v naslednjo stopnjo, uvrščamo v 1. varnostni razred. Površina predprostora znaša 7,32 m<sup>2</sup>. Oznaka bolniške sobe 31 na tlorisu je 2.2.1, s pripadajočim predprostorom z oznako 2.2.2. Na vhodu v bolniško sobo 31 je nameščen znak za biološko

nevarnost, kot ga določajo predpisi, ki urejajo varovanje delavcev pred tveganjem zaradi izpostavljenosti biološkim dejavnikom pri delu. Vrata v sobo morajo biti vedno zaprta. Avtomatski sistem vrat s semaforjem v predprostoru bolniške sobe 31 onemogoča hkratno odpiranje vrat v in iz bolniške sobe ter s tem preprečuje nenadzorovano širjenje mikroorganizmov in GSO v okolje. Vstop v prostor je omejen in je v času trajanja dela z GSO dovoljen le pooblaščenim osebam. Bolniška soba 31-intenziva je enoposteljna soba. V sobi je dobro zatesnjeno okno s ključavnico, ki preprečuje njegovo odpiranje in razširjanje aerosolov. Pred vsakim delom z GSO, se je potrebno prepričati, da parametri prostorskega tlaka izpolnjujejo zahtevane vrednosti, ki so 0 Pa v bolniški sobi in 8 Pa v predprostoru. Za to imamo vzpostavljeno pot sodelovanja med osebjem v centralno komandnem prostoru UKCL, zaposlenimi na KOH, ki delajo z GSO in pooblaščen osebje za biološko varnost na KOH. Ves zrak je filtriran preko filtrov HEPA. V zaprtem sistemu 2. varnostne stopnje so vse površine (talne obloge, vrata, police) in oprema (postelja, stojalo) gladki in narejeni iz materialov, ki so pralni, odporni na čistila in vodo. Površine in oprema v sobi so skladne s prostorsko tehničnimi smernicami za zdravstvene objekte (Ministrstvo za zdravje RS). V zaprtem sistemu za delo z GSO 2. varnostne stopnje ni talnih odtokov.

Zdravstveni delavci morajo pri rokovanju s celičnim produktom upoštevati ustrezne previdnostne ukrepe in ob standardni zaščitni uniformi uporabljati še varnostno opremo (debelejše rokavice, maska, zaščitni plašč in zaščita za oči) za preprečevanje možnosti prenosa infekcijskih bolezni in za zaščito delavca pred neposrednim stikom z GSO.

Po prejemu gensko spremenjenih celic, bolnikovo telo deluje kot »zaprti sistem«, kar predstavlja dodatno bariero pred nenamernim sproščanjem GSO v okolje. Pričakuje se, da se bodo celice CAR T ohranjale v bolnikovem krvnem obtoku in namerno sproščanje GSO v okolje, izven človeškega organizma, ni predvideno. Bolnik, ki bo prejel celični pripravek avtolognih celic T, ima po odpustu iz bolnišnice vedno s sabo opozorilno kartico. Na kartici je navedeno, da bolnik ne sme darovati krvi, organov, tkiv ali celic. Kartica vsebuje tudi kontakt zdravnika, ki ga je potrebno poklicati pred uvedbo katerega koli zdravljenja. V protokolu zdravljenja so natančno opisani ključni parametri spremljanja in postavljen je časovni načrt, ki omogoča sistematično spremljanje bolnikov. Poleg standardnega pregleda in laboratorijske ocene se bo v krvi bolnika spremljalo tudi aCD19 CAR T celice in preverjalo njihovo obstojnost. V skladu s protokolom bodo vsi bolniki, ki prejmejo aCD19 CAR T vključeni v doživljenjsko spremljanje.

## 2.5 Značilnosti predvidenega prejemnega okolja in možnosti razširjanja

Avtologne celice aCD19 CAR T bodo v okviru procesa sproščanja v okolje intravenozno aplicirane bolnikom v sklopu kliničnega preskušanja ali uporabe NPZNZ. Pričakujemo, da bodo celice v krvnem obtoku posameznika krožile, se množile in učinkovito odstranjevale celice, ki na svoji površini izražajo CD19. Dolgoročna obstojnost in proliferacija celic aCD19 CAR T *in vivo* sta, v skladu z objavljenimi rezultati kliničnih preskušanj, povezani z učinkovitim odzivom na terapijo in trajno klinično remisijo [21]. V primeru sproščanja zadevnega GSO v okolje predstavlja človeško telo tudi učinkovit »zaprti sistem«, ki za GSO avtologne celice aCD19 CAR T pomeni dodatno bariero pred potencialnim nenamernim sproščanjem v okolje. Zaradi doslednega upoštevanja vseh varnostnih in zadrževalnih ukrepov in načel dobre klinične prakse v okviru projekta zato obstaja zanemarljiva verjetnost, da bi prišlo do nenamernega sproščanja zadevnega GSO v okolje. Dodatno izpostavljamo, da malo verjetno

nenamerno sproščanje avtolognih celic aCD19 CAR T izven bolnikovega telesa predstavlja zanemarljivo tveganje za okolje, ker se take celice ne morejo razmnoževati v zunanjem okolju, saj lahko preživijo le v človeškem telesu ali v dobro nadzorovanih pogojih gojenja *in vitro*, ob prisotnosti ustreznih hranil in kontrolirane atmosfere. Na tej podlagi je možnost razširjanja celic aCD19 CAR T v okolju izven posameznikovega telesa zanemarljiva.

## 2.6 Medsebojni vplivi

Pričakujemo, da bodo aCD19 CAR T v telesu posameznika specifično prepoznavale antigen CD19 na površini celic B in sodelovale v signalni kaskadi, ki bo privedla v odstranitev malignih celic pri bolnikih s CD19 pozitivnimi hematološkimi malignimi obolenji. CAR T celice prepoznavajo antigene na površini tumorskih celic neodvisno od poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (ang. major histocompatibility complex, MHC). Ob vezavi na ligand se tvori imunska sinapsa, ki je potrebna za efektorsko funkcijo. Opisanih je več mehanizmov ubijanja tarčnih celic, in sicer citotoksičnost preko grancima in perforina, receptorja smrti Fas in njegovega liganda ter sproščanja citokinov, ki delujejo neposredno citotoksično ali posredno preko kemotakse antigen predstavitev celic [18].

Na podlagi rezultatov obstoječih študij s celicami aCD19 CAR T presojamo, da obstaja verjetnost neželenih dogodkov pri osebah, ki prejmejo avtologni celični pripravek. Akutna toksičnost, ki jo pričakujemo je posledica aktivacije aCD19 CAR T celic in farmakokinetičnih ter farmakodinamičnih lastnosti celic CAR T, ki so potrebna za uničenje tumorskih celic. Pričakujemo sindrom sproščanja citokinov (ang. cytokine release syndrome; CRS), nevrotoksičnost in aplazijo celic B. Na podlagi rezultatov drugih kliničnih preizkušanj pričakujemo med različnimi podtipi B-NHL podobne toksične učinke. V literaturi so opisane nekatere razlike v stopnji CRS med različnimi kliničnimi preskušanji [22].

Omenjena tveganja bomo na KOH zmanjšali z doslednim nadzorom in hitrim ukrepanjem ob neželenih dogodkih. Po prejemu celičnega pripravka se bo bolnike v bolnišnici redno spremljalo glede znakov in simptomov CRS, nevroloških dogodkov in drugih toksičnih učinkov. Podroben opis, njihovo spremljanje in ukrepi za obvladovanje so navedeni v *SOP 0534 – Zdravljenje s CAR-T celično terapijo*. Ob standardnih hematoloških laboratorijskih preiskavah, se bo v krvi bolnika spremljalo tudi celice aCD19 CAR T in preverjalo njihovo obstojnost. V skladu s priporočili bodo vsi bolniki, ki prejmejo celično terapijo, vključeni v doživljenjsko spremljanje. Upoštevajo se priporočila za spremljanje varnosti in učinkovitosti ter obvladovanje tveganj zdravil za napredno zdravljenje, ki so objavljena na spletni strani Evropske agencije za zdravila [23]. Proizvajalec celičnega pripravka oziroma sponzor kliničnega preskušanja ima vzpostavljen sistem farmakovigilance NPZNZ.

## 3. OVREDNOTENJE MOŽNIH VPLIVOV NAMERNEGA SPROŠČANJA GSO V OKOLJE IN RAVNI TVEGANJA ZA OKOLJE IN ZDRAVJE LJUDI

### 3.1 Značilnosti GSO, povezane z gensko spremembo, ki lahko povzročijo škodljive učinke za okolje ali zdravje ljudi

Pri delu s celicami, ki so spremenjene z lentivirusnimi vektorji in njihovo namerno sproščanje v okolje, bi lahko v splošnem potencialno nevarnost in tveganje za okolje in zdravje ljudi predstavljal virus, ki je sposoben razmnoževanja ali prisotnost ostankov infektivnih virusnih delcev v končnem celičnem pripravku, ki bi se lahko sprostili v okolje. V tem okviru proizvajalec

lentivirusnega vektorja zagotavlja odsotnost replikativno kompetentnih virusnih delcev v vektorskem pripravku. Za vsako serijo vektorskega pripravka proizvajalec izda potrdilo o kakovosti izdelka, ki vključuje tudi informacije o varnosti pripravka in zagotovi odsotnosti replikativno kompetentnih virusnih delcev, ki je bila preverjena z ustreznimi metodami. V sklopu kontrole in nadzora kakovosti na LAB CAR T pa se s qPCR še dodatno preveri in potrdi odsotnost replikativno kompetentnih delcev v končnem pripravku. Uporabljeni virusni vektor tudi ne nosi zapisa za virusne proteine zato je verjetnost nastanka infektivnih virusnih delcev med procesom priprave celic aCD19 CAR T zanemarljiva, obenem pa pri transdukciji limfocitov T ne pride do vstavitve zaporedja za odpornost na antibiotike ali do nastanka proste DNA s funkcionalnimi zaporedji za odpornost proti antibiotikom. Zaporedje v lentivirusnem vektorju je okrnjeno do te mere, da v celicah aCD19 CAR T po administraciji onemogoča homologno rekombinacijo med vstavljenim provirusom in divjim tipom HIV, kakor tudi s človeškimi endogenimi retrovirusi [4]. Celice aCD19 CAR T pridobijo le zapis za receptor aCD19 in ne pridobijo drugih zapisov za gene, ki bi lahko povzročili bolezen pri ljudeh ali živalih, se spremenil njihov fenotip v škodljivega ali kakorkoli drugače toksičnega in imele škodljive posledice za okolje.

Na KOH UKCL ne bomo spreminjali, gojili ali kakorkoli drugače manipulirali celičnega pripravka, ki ga prejmemo iz LAB CAR T. V KOH UKCL se bo izvajalo namerno sproščanje GSO v okolje v okviru zaprtega sistema 2. varnostnega razreda v obliki infuzije celičnega pripravka v bolnika.

Namerno sproščanje GSO v okolje bo v okviru projekta potekalo v obliki infuzije celičnega pripravka, ki vsebuje ali je sestavljen iz gensko spremenjenih celic aCD19 CAR T v bolnika v katerem se bodo potencialno ohranjale v njegovem krvnem obtoku in mu omogočile možnost uspešnega zdravljenja. Izpostavljamo tudi, da je na osnovi ZRGSO človek izvzet iz definicije GSO. Ta pravi, da je GSO organizem, z izjemo človeka, katerega genski material je bil spremenjen na način, ki se ne pojavlja v naravi s križanjem in/ali naravno rekombinacijo. V našem projektu je tako namerno sproščanje celičnega pripravka in s tem gensko spremenjenih celic aCD19 CAR T v okolje vezano na njihovo ohranjanje v krvnem obtoku bolnika, katerega telo predstavlja še dodatno bariero zanemarljive možnosti nenamernega sproščanja celic aCD19 CAR T v okolje.

### **3.2 Potencialna verjetnost pojava škodljivih učinkov, ter njihov obseg in posledice**

#### **3.2.1 Za ciljne osebe - bolnike, ki prejmejo celični pripravek**

Celični pripravek je pripravljen v prijavljenem zaprtem sistemu za delo z GSO z upoštevanjem načel dobre laboratorijske in GMP prakse. LAB CAR T za vsak celični pripravek izda certifikat analize, ki vključuje identifikacijske podatke bolnika, čas proizvodnje in izdaje, serijsko številko materiala in rezultate kontrole kakovosti. Pripravek je primeren za aplikacijo le, če izpolnjuje zahtevane ter zastavljene kriterije kakovosti. Vrečka je označena v skladu s predpisi EU. Intravenozna aplikacija celičnega pripravka celic aCD19 CAR T bo potekala po navodilih in pod nadzorom zdravnika, ki ima izkušnje ter je usposobljen za apliciranje CAR T terapije. Pri delu z GSO bomo, ob standardni varnostni uniformi, uporabljali še dodatno osebno varovalno opremo (debelejše rokavice, maska, zaščitni plašč in zaščita za oči) in upoštevali smernice dobre klinične prakse.

Iz opisa v točki 2.6, ki obravnava medsebojne vplive izhaja, da obstaja visoko tveganje za pojav neželenih dogodkov povezanih z zdravljenjem bolnika. Za obvladovanje omenjenih tveganj bomo izvajali sistematičen nadzor in v primeru neželenih dogodkov nemudoma ukrepali. Zdravstveno osebje vključeno v ta projekt ima izkušnje in je usposobljeno tudi za obvladovanje neželenih dogodkov povezanih z zdravljenjem. Na osnovi medsebojnih vplivov in na podlagi rezultatov kliničnih raziskav s podobnimi pripravki aCD19 CAR T v tujini, se tveganja za bolnike (npr. CRS, nevrotoksičnost...) ocenjujejo skupaj s potencialnimi koristmi zdravljenja z avtolognim celičnim pripravkom aCD19 CAR T.

### **3.2.2 Za neciljne osebe**

V okviru tega poglavja obravnavamo nekaj okoliščin, katerih potencialna verjetnost pojava je sicer zanemarljiva, vendar bi teoretično lahko prišlo do nenamernega sproščanja in prenosa celic aCD19CAR T na neciljno osebo. Za posamezno potencialno verjetnost pojava smo ocenili tudi njegov obseg in posledice.

#### **a) Nenamerna aplikacija neciljnih oseb**

Okoliščina pri kateri bi lahko prišlo do nenamernega sproščanja in katere potencialna verjetnost pojava je minimalna je aplikacija celičnega pripravka aCD19 CAR T neciljni osebi. V tem primeru bi imunski sistem posameznika tuje celice aCD19 CAR T zaradi MHC neskladnosti odstranil. Imunski sistem ima zelo učinkovite mehanizme, ki omogočajo razlikovanje med telesu lastnimi in tujimi snovmi. V tem primeru bi bili morebitni škodljivi učinki odvisni od moči odziva imunskega sistema, ki pa je v veliki meri odvisen od količine celic, ki so bile vnesene neciljni osebi. Do pojava potencialno škodljivih učinkov bi lahko prišlo v primeru nenamerne aplikacije celic aCD19 CAR T imunsko oslabljeni neciljni osebi [24]. Ocenjujemo, da je verjetnost pojava da pride do take okoliščine minimalna, saj je celični pripravek namenjen za avtologno celično uporabo. Bolnik se bo po levkaferezi pripravljalo na prejem celične terapije v bolnišnici. S celičnim pripravkom se bo rokovalo skrbno. Njegova aplikacija bo potekala pod strogim nadzorom usposobljenih strokovnjakov ter v kontroliranem bolnišničnem okolju. Bolniška soba 31, kjer bo potekala aplikacija ima omejen dostop in izpolnjuje ostale zadrževalne kriterije za delo z GSO 2. varnostnega razreda. Pred apliciranjem bosta vsaj dve osebi neodvisno preverili, ali so informacije na celičnem produktu pravilno povezane z bolnikom, da se izključi možnost napake zato ocenjujemo, da je potencialna verjetnost tega pojava minimalna.

#### **b) Darovanje celic, tkiv ali organov**

Okoliščina pri kateri bi lahko prišlo do nenamernega sproščanja in katere potencialna verjetnost pojava je minimalna je transfuzija krvi ali presaditev celic, tkiv ali organov darovalca, ki je bil zdravljen s celičnim pripravkom aCD19 CAR T neciljni osebi. V skladu s strokovnimi kriteriji za ocenjevanje in izbor darovalcev se osebe z zgodovino hematoloških malignih obolenj, ki so prejele terapije v okviru kliničnih preskušanj ali NPZNZ obravnavajo kot neustrezne za alogenske darovalce. Bolniki s sabo nosijo opozorilno kartico, kjer je navedeno, da ne smejo darovati krvi, organov, tkiv ali celic. Tudi tukaj veljajo enaki principi, kot so opisani v primeru aplikacije neciljni osebi (a) zato ocenjujemo, da je potencialna verjetnost tega pojava minimalna.

### c) Izredni dogodek pri ravnanju z GSO

Okoliščina pri kateri bi lahko prišlo do nenamernega sproščanja in katere potencialna verjetnost pojava je minimalna je izredni dogodek pri ravnanju z GSO v primeru aplikacije celičnega pripravka aCD19 CAR T v procesu namernega sproščanja GSO v okviru zaprtega sistema 2. varnostne stopnje. Opis izrednih dogodkov in načrt ukrepov v primeru, da bi do dogodka prišlo, so opisani v dokumentu *Načrt ukrepov za primer izrednega dogodka pri delu z GSO v zaprtem sistemu KOH - bolniška soba 31*. Pri delu s celičnim pripravkom natančno izvajamo vse predvidene ukrepe za nadzor in varno delo ter zadrževalne ukrepe pri delu z GSO (*Načrt zadrževalnih ukrepov pri delu z GSO v zaprtem sistemu KOH - bolniška soba 31*). Zdravljenje bo izvedeno v skladu z načeli dobre klinične prakse. Delo z GSO 2. varnostnega razreda v prijavljenem zaprtem sistemu KOH - Bolniška soba 31, je odsvetovano nosečnicam in je dovoljeno le zdravim zaposlenim osebam na KOH. Na tej osnovi in ob upoštevanju vseh previdnostnih in zadrževalnih ukrepov je ocenjena potencialna verjetnost pojava škodljivih učinkov za zdravstveno osebje zaradi izrednih dogodkov pri ravnanju z GSO minimalna.

### d) Laboratorijsko osebje

Okoliščina pri kateri bi lahko prišlo do nenamernega sproščanja in katere potencialna verjetnost pojava je minimalna je v možnosti potencialnega nenamernega stika laboratorijskega osebja s krvjo pri analizah krvi preizkušanca. Vse osebje, ki dela v laboratorijski medicini slovenskega zdravstva, je dolžno upoštevati *Kodeks deontologije v laboratorijski medicini (Uradni list RS, št. 62/98)*. Laboratorijsko osebje mora poznati in upoštevati zahteve Kodeksa ter se po njem ravna pri svojem delu. V določbah kodeksa so navedeni odnosi laboratorijskega osebja do bioloških vzorcev. Laboratorijsko osebje se tudi zaveda dragocenosti, tveganosti in enkratnosti biološkega vzorca. Dolžni so skrbeti, da so vzorci ustrezno shranjeni do analize in po analizi, da je možno preverjanje rezultatov. Laboratorijsko osebje skrbi tudi za to, da sami in njegovi podrejeni ravnaajo z vsemi biološkimi vzorci kot s potencialno kužnim materialom. Pred okužbami morajo varovati bolnike, sebe in svoje sodelavce. Skrbeti morajo, da se ostanki bioloških vzorcev po opravljenih analizah zavržejo na strokoven in ekološko sprejemljiv način. Uporaba ustrezne osebne varovalne opreme onemogoča direktni stik z biološkim vzorcem. Zaradi omenjenih pogojev ter ob upoštevanju vseh previdnostnih in zadrževalnih ukrepov je ocenjena potencialna verjetnost pojava škodljivih učinkov za laboratorijsko osebje minimalna.

### e) Hematofagi

Okoliščina pri kateri bi lahko prišlo do nenamernega sproščanja in prenosa GSO v okolje in katere potencialna verjetnost pojava je zanemarljiva je primer živali, ki se prehranjujejo s krvjo (npr. komarji, klopi, itd.). Izpostavljamo, da hematofagi ne prenašajo krvnih celic med posamezniki. Kri je vir njihove prehrane in celice, ki jih zaužijejo, se v prebavnem sistemu ob prisotnosti encimov razgradijo [25], [26]. Krvne celice niso ohranjene v prebavnem traktu hematofagov in ne prehajajo med različnimi gostitelji. Na tej osnovi in osnovi podatkov iz literature ocenjujemo, da je potencialna verjetnost tega pojava zanemarljiva.

### f) Telesni izločki

Okoliščina pri kateri bi lahko prišlo do nenamernega sproščanja in prenosa GSO v okolje in katere potencialna verjetnost pojava je minimalna je obstoj celic v telesnih izločkih. Krvne celice se običajno ne izločajo s telesnimi izločki, kot so urin, blato ali znoj. Krvne celice opravljajo svoje funkcije v telesu posameznika, dokler ne pride do procesa celične smrti. V telesnih izločkih običajno najdemo samo presnovne produkte celic. V primeru prisotnosti

manjših količin celic v telesnih izločkih, le te zunaj telesa človeka in izven dobro nadzorovanega okolja niso sposobne preživeti. Na tej osnovi ocenjujemo, da je potencialna verjetnost za nenameren prenos celic aCD19 CAR T v okolje in na neciljne osebe ali živali preko telesnih izločkov minimalna.

#### g) Nosečnost in vpliv na plod

Okoliščina pri kateri bi lahko prišlo do nenamernega sproščanja in prenosa GSO v okolje in katere potencialna verjetnost pojava je majhna je nosečnost, ki je v okviru projekta eden izmed izključitvenih kriterijev zdravljenja s celičnim pripravkom. Pred prejemom terapije se pri osebah ženskega spola laboratorijsko preveri status nosečnosti. Prejem celičnega pripravka aCD19CAR T prav tako ni dovoljen doječim materam. Ker obstaja možnost, da terapija s CAR T celicami povzroči nepredvidena tveganja za dojenčke, je dojenje v tem primeru nujno prekiniti. V skladu s protokolom morajo ženske v rodni dobi in vsi moški udeleženci soglašati z uporabo visoko učinkovitih metod kontracepcije v obdobju enega leta po terapiji s CD19 CAR T. Glede dolgoročnega vpliva na plodnost in prenos na plod so na voljo omejene informacije. Spremenjeni limfociti T so somatske narave, kar pomeni, da ne prispevajo k genetskemu materialu, ki se deduje na potomce. Ker v končnem celičnem pripravku ni prisotnih replikativno kompetentnih delcev, ni verjetnosti, da bi se genski zapis prenesel na druge celice. Celična terapija CAR T se uporablja pri bolnikih z neodzivnimi in ponovljenimi malignimi obolenji, zato vprašanja glede plodnosti niso bila v ospredju. Po podatkih, ki so na voljo, je opisanih nekaj primerov nosečnosti z živorojenimi otroki [27]. Zaradi pomanjkljivih informacij, tveganja na plodnost in prenos na plod ne moremo izključiti. Na tej osnovi ocenjujemo, da je potencialna verjetnost za nenameren prenos celic aCD19 CAR T majhen.

#### h) Poškodbe in dogodki ter pojavi, ki lahko vključujejo krvavitve

Okoliščina pri kateri bi lahko prišlo do nenamernega sproščanja in prenosa GSO v okolje in katere potencialna verjetnost pojava je majhna so poškodbe ali okoliščine, ki bi vključevale krvavitev preizkušanca, ki je prejel celični pripravek, kjer bi lahko prišlo do omejenega sproščanja celic CAR T v okolje (npr. ureznine, prometne nesreče, menstrualne krvavitve ipd.). Te okoliščine ne predstavljajo večjega tveganja za okolje, saj celice CAR T niso sposobne preživetja izven človeškega telesa ali brez strogo nadzorovanih pogojev *in vitro*. Prav tako je izredno majhno tveganje za pojav škodljivih učinkov pri drugih ljudeh, ki bi lahko prišli v stik s krvjo. Kot že opisano celični pripravek aCD19 CAR T ne vsebuje replikativno kompetentnih delcev in zaradi opisanih lastnosti vektorja ni nobene možnosti za nastanek infektivnih virusnih delcev. Celice aCD19 CAR T v procesu lentivirusne transdukcije pridobijo samo zapis za aCD19 CAR in ne dobijo nobenih drugih genov, ki bi jim omogočale kompetitivno prednost ali izboljšano možnost preživetja. Na tej osnovi ocenjujemo, da je potencialna verjetnost za nenameren prenos celic aCD19 CAR T v okolje zanemarljiv.

### 3.2.3 Za okolje

Okoliščina pri kateri bi lahko prišlo do nenamernega sproščanja GSO v okolje in katere potencialna verjetnost pojava je minimalna vključuje pojav izrednega dogodka ali nesreče pri ravnanju z GSO. Obvladovanje izrednega dogodka ali nesreče pri ravnanju s celicami aCD19 CAR T, pri katerem bi lahko prišlo do nepredvidenega sproščanja GSO iz zaprtega sistema in omejitev ali preprečitev njenih posledic na okolje, je opisan v dokumentu *Načrt ukrepov za primer nesreče pri delu z GSO v zaprtem sistemu KOH - bolniška soba 31*.

Gensko spremenjene celice aCD19 CAR T zunaj dobro nadzorovanega okolja (ustrezni obogateni hranilni medij, nadzorovana atmosfera in temperatura) ne morejo preživeti, zato za razširitev v okolje ne predstavljajo tveganja in ne pričakujemo negativnih učinkov na rastline, živali in okolje. Ob upoštevanju vseh predpisanih previdnostnih in zadrževalnih ukrepov je ocenjena potencialna verjetnost za pojav škodljivih učinkov zanemarljiva.

#### 4. DOLOČITEV SKUPNE RAVNI TVEGANJA IN POTREBNIH ZADRŽEVALNIH IN DRUGIH VARNOSTNIH UKREPOV

##### 4.1 Določitev skupne ravni tveganja za zdravje ljudi in okolje

Ravnanje s celičnim pripravkom, ki vsebuje celice aCD19 CAR T vključuje natančno upoštevanje vseh previdnostnih in zadrževalnih ukrepov ter izvajanje vseh ukrepov za nadzor in varno delo ter opisanih zadrževalnih ukrepov pri delu z GSO (Povzetek dokumenta [SOP Načrt zadrževalnih ukrepov pri delu z GSO v zaprtem sistemu KOH - bolniška soba 31](#)).

Zdravljenje s celičnim pripravkom aCD19 CAR T in njihovo namerno sproščanje v okolje bo izvedeno v skladu z načeli dobre klinične prakse. Zaradi doslednega upoštevanja vseh varovalnih in zadrževalnih ukrepov in načel dobre klinične prakse kot tudi izredne občutljivosti in nezmožnosti preživetja gensko spremenjenih celic aCD19 CAR T izven vzdrževanih optimalnih pogojev, ter ob upoštevanju, da bolnikovo telo predstavlja še dodatno bariero pred nenamernim sproščanjem GSO v okolje, je verjetnost za pojav škodljivih učinkov za zdravje ljudi in okolja določena kot zanemarljiva.

Stopnja tveganja za vključitev bolnikov s ponovljenimi ali neodzivnimi malignimi obolenji, se za udeležence terapije oceni skupaj s pričakovanimi koristmi zdravljenja z avtolognim celičnim pripravkom aCD19 CAR T.

##### 4.2 Zadrževalni ukrepi

V prostorih KOH, ki ima dovoljenje za delo z GSO iz 2. varnostnega razreda, se izvajajo fizični, biološki, kemični in organizacijski zadrževalni ukrepi. V namen preprečevanja širjenja GSO v okolje in navzkrižnih kontaminacij imamo vzpostavljenih več ukrepov in sicer:

- Na KOH UKCL je imenovan pooblaščenec za biološko varnost, ki je odgovoren za opravljanje vseh nalog iz 22. člena Uredbe o merilih za uvrstitev dela z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtem sistemu v varnostni razred in o zadrževalnih ter drugih varnostnih ukrepih za posamezen varnostni razred (Uradni list RS, št. 71/11).
- Izobraževanje in usposabljanje osebja, ki delajo z GSO, poteka v skladu s 14. členom Uredbe o merilih za uvrstitev dela z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtem sistemu v varnostni razred in o zadrževalnih ter drugih varnostnih ukrepih za posamezen varnostni razred (Uradni list RS, št. 71/11).
- Vstop v bolniško sobo 31 je omejen in med delom z GSO omogočen le pooblaščenim osebam. Vstop je še dodatno omejen s kodnim dostopom.
- V zaprtem sistemu 2. varnostne stopnje so vse površine (talne obloge, vrata, police) in oprema (postelja, stojalo) gladki in narejeni iz materialov, ki so pralni, odporni na čistila in vodo. Površine in oprema v sobi so skladne s prostorsko tehničnimi smernicami za zdravstvene objekte (Ministrstvo za zdravje RS).
- Prostor in oprema se redno čisti in vzdržuje.
- V UKCL se vrši nadzor in preverjanje čistosti površin, da se zagotovi ustrezen nivo higiene v bolnišničnem okolju.

- V namen preprečevanja širjenja GSO v okolje in navzkrižnih kontaminacij je v predprostoru bolniške sobe 31 sistem vrat, ki onemogoča hkratno odpiranje vhodnih in izhodnih vrat iz predprostora.
- Pred vsakim delom z GSO, se je potrebno prepričati, da parametri prostorskega tlaka izpolnjujejo zahtevane vrednosti, ki so 0 Pa v bolniški sobi in 8 Pa v predprostoru. Za to imamo vzpostavljeno pot sodelovanja med osebjem centralno komandnih prostorov UKCL, zaposlenimi na KOH, ki delajo z GSO in pooblaščen osebo za biološko varnost na KOH.
- Vhod v bolniško sobo je med delom z GSO označen z znakom za biološko nevarnost, kot ga določajo predpisi, ki urejajo varovanje delavcev pred tveganjem zaradi izpostavljenosti biološkim dejavnikom pri delu
- Ves zrak v zaprtem prostoru 2. varnostnega razreda je filtriran preko filtrov HEPA.
- Vrata so zaprta, okna so zatesnjena in zaklenjena, da se jih ne da odpreti.
- V prostorih, kjer poteka delo z GSO 2. varnostnega razreda ni talnih odtokov, kar pomeni, da se v primeru razlitja celičnega pripravka aCD19 CAR T, GSO ne sprosti v kanalizacijsko omrežje.
- V bolniški sobi in predprostoru sta nameščena umivalnika z milom in razkužilom, razkužila za roke so nameščeni tudi drugod po KOH.
- Potrošni material, ki prihaja v stik z GSO, je za enkratno uporabo in se ga pred odstranitvijo kemično inaktivira.
- Zdravstveni delavci se ob prehodu v oranžno cono preoblečejo v ustrezno uniformo in preobujejo delovno obutev.
- Pri rokovanju s celičnim produktom osebje upošteva ustrezne previdnostne ukrepe in ob standardni zaščitni uniformi uporabljati še varnostno opremo (debelejše rokavice, maska, zaščitni plašč in zaščita za oči) za preprečevanje možnosti prenosa infekcijskih bolezni in za zaščito delavca pred neposrednim stikom z GSO.
- Delo z GSO 2. varnostnega razreda v zaprtem sistemu KOH - Bolniška soba 31, je dovoljeno le zdravim zaposlenim osebam na KOH in je odsvetovano nosečnicam.
- Ob razlitju GSO je potrebno takoj oceniti obseg dogodka, omejiti dostop in preprečiti širjenje GSO. Oseba, ki je prva prisotna na kraju nesreče uporablja ustrezno varovalno opremo. Manjše razlitje takoj prekrije z razkužilom za površine, pri čemer spoštuje predpisani kontaktni čas. Čistih površin se izogiba in zamenja rokavice. Po intervenciji obvesti za GSO odpadke usposobljeno čistilko za končno čiščenje.
- V primeru kontaminacije perila z GSO je potrebno perilo previdno odstraniti, politi del dobro razkužiti z etanolom ali drugim razkužilnim sredstvom in po ustreznem času dekontaminiran tekstil pospraviti v namensko belo PE vrečo in jo dobro speti. Odvoz perila je organiziran večkrat dnevno, da se nečisto perilo na oddelku zadržuje čim krajši čas. Zunanji ponudnik nato perilo očisti v skladu z veljavnimi predpisi.

Zadrževalni ukrepi po odpustu bolnika iz bolnišničnega okolja:

- Bolnik, ki bo prejel celični pripravek gensko spremenjenih avtolognih celic aCD19 CAR T, ima po odpustu iz bolnišnice vedno s sabo opozorilno kartico. Na kartici je navedeno, da bolnik ne sme darovati krvi, organov, tkiv ali celic. S tem se preprečuje namerni prenos GSO na neciljno osebo.

- Bolnikovo zdravstveno stanje se v skladu s protokolom redno spremlja. Proizvajalec celičnega pripravka oziroma sponzor kliničnega preskušanja ima vzpostavljen sistem farmakovigilance NPZNZ.

#### 4.2.1 Osebna varovalna oprema

Zdravstveni delavci vstopajo v oranžno cono preko prehoda, kjer si umijejo in razkužijo roke, se preoblečejo v oranžno uniformo in zamenjajo delovno obutev. Pri delu z GSO osebje upošteva ustrezne preventivne ukrepe in ob standardni zaščitni uniformi uporablja še dodatno varnostno opremo. Ta vključuje debelejša rokavice, masko, zaščitni plašč in zaščito oči za preprečevanje možnosti prenosa infekcijskih bolezni in za zaščito delavca pred neposrednim stikom z GSO. V bolniški sobi in v predprostoru je nameščen umivalnik z milom, v obeh prostorih so prisotna razkužila za roke in razkužila za površine, izbrana z razpisom UKCL. Zdravstveni delavci ob izhodu iz oranžne cone preoblečejo uniformo, zamenjajo delovno obutev in si pred izstopom umijejo in razkužijo roke. Pri spremljanju bolnika in delom s krvjo v kateri se potencialno ohranjajo celice CAR T, zdravstveni in laboratorijski delavci uporabljajo ustrezno osebno varovalno opremo.

#### 4.2.2 Ravnanje z odpadki

Vsi odpadki, ki nastanejo pri delu z GSO in so bili v direktnem stiku s CAR T celicami (infuzijska vrečka z intravenskim sistemom za infundiranje, rokavice ali drugi material) se pred odstranitvijo v ustrezni odpadni zbirnik kemično inaktivirajo. Celoten sistem za infundiranje se spere z vsaj 70% etanolom ali drugim ustreznim razkužilnim sredstvom z upoštevanjem kontaktnega časa. Rokavice ali drugi material, ki bi lahko prišel v direktni stik z GSO, se dobro razkuži. Takoj po koncu dela se inaktivirane odpadke hermetično zapre v plastični zabojnik iz trde plastike z možnostjo enkratnega hermetičnega zapiranja, ki je označen z znakom za biološko nevarnost. V nadaljevanju se postopa skladno z Načrtom za gospodarjenje z odpadki UKCL (Služba za varstvo in zdravje pri delu, enota Varstvo okolja). Odpadki se oddajo pooblaščenemu zbiralcu odpadkov, ki dnevno vrši odvoz odpadkov in poskrbi za njihovo varno odstranitev in uničenje. Specializirani hematološki laboratorij, ki deluje v okviru KOH v prostorih UKCL, je opremljen z avtoklavom.

### 5. ZAKLJUČEK OCENE TVEGANJA ZA NAMERNO SPROŠČANJE GENSKO SPREMENJENIH ORGANIZMOV V OKOLJE

S pomočjo lentivirusne transdukcije se v limfocite CD4 in CD8 vnese vključek aCD19 CAR. Celice pri tem ne pridobijo drugih zapisov za gene. Vključek aCD19 CAR jim ne daje morebitne selekcijske prednosti ali pomanjkljivosti, prav tako celice ne pridobijo dodatnih toksičnih ali škodljivih lastnosti, ki bi lahko predstavljale nevarnost in tveganje za zdravje ljudi, živali in okolja. Po lentivirusni transdukciji je zaporedje aCD19 stabilno integrirano v genom transduciranih celic T. Gensko spremenjene celice CAR T so gensko stabilne, kot izvorni limfociti T, pa so tudi te podvržene naravnim mutacijam, ki se lahko pojavijo pri delitvi celic.

Verjetnost, da GSO v pogojih nameravanega namernega sproščanja v okolje postane obstojen in invaziven v naravnih habitatih je zanemarljiva, saj človeški limfociti T, ki so bili transducirani z lentivirusnimi vektorji, niso sposobni preživetja zunaj zaprtega in zelo natančno nadzorovanega okolja.

Tveganj povezanih z lentivirusno spremembo celic ne pričakujemo, saj je uporabljen lentivirusni vektor replikativno inkompetenten. Pred injiciranjem v sklopu kontrole kakovosti za vsak celični pripravek na LAB CAR T pripravijo certifikat analize, kjer je določeno, da replikativno kompetentnih delcev ni prisotnih. Med transdukcijo limfocitov T ne pride do prenosa zapisa za odpornost proti antibiotikom. V celicah CAR T ni pričakovati homologne rekombinacije med vstavljenim provirusom lentivirusnega vektorja aCD19 CAR in divjim tipom HIV, prav tako ni pričakovati mobilizacije zaporedja aCD19 CAR provirusa lentivirusnega vektorja s človeškimi endogenimi retrovirusi. Uporabljen lentivirusni vektor je bil predhodno uspešno testiran v več kliničnih študijah [14], [22], [23]. Zaključimo lahko, da celice aCD19 CAR T pridobijo le zapis za receptor aCD19 CAR in ne pridobijo drugih zapisov za gene, ki bi lahko povzročili bolezen pri ljudeh, živalih ali rastlinah in bi povzročali škodljive vplive na okolje ter ogrožali biotsko raznovrstnost.

Možnosti za genski prenos na druge vrste je zanemarljiva. Za prenos genskega vključka bi morali biti v celičnem pripravku ostanki infektivnih virusov, kar v sklopu kontrole kakovosti v LAB CAR T dodatno preverijo s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo. Ker virusni vektor ne nosi zapisa za virusne proteine, ni nobene možnosti za nastanek infektivnih virusnih delcev med procesom priprave celic aCD19 CAR T ali kasneje.

Rezultati kliničnih študij s celicami CAR T navajajo, da sta obstojnost in množitev celic *in vivo* nujno potrebni za učinkovito delovanje terapije in dolgoročno remisijo [28]. Kljub številnim kliničnim študijam, v literaturi nismo našli podatkov, ki bi nakazovali morebitne škodljive vplive na okolje ali na druge neciljne osebe, ki niso prejemniki celične terapije.

Celični pripravek aCD19 CAR T bo apliciran v sklopu kliničnega preskušanja ali uporabe NPZNZ pri odraslih bolnikih s CD19 pozitivnimi malignimi obolenji, ki se ponovijo ali se na zdravljenje ne odzivajo. Na podlagi obstoječih študij s celicami aCD19 CAR T predvidevamo, da je pri preizkušancih precej visoka verjetnost za pojav neželenih dogodkov, povezanih z zdravljenjem. Pričakujemo tveganja povezana z aktivacijo celic aCD19 CAR T in z molekularnim delovanjem celic CAR T, ki je nujno za uničenje tumorskih celic. Najpogostejši dogodki, ki se pojavljajo pri zdravljenju s celicami aCD19 CAR T so sindrom sproščanja citokinov, nevrotoksičnost in aplazija celic B. Objavljeni rezultati kliničnih študij CAR T, usmerjenim proti CD19 kažejo, da se pri različnih CD19 pozitivnih malignih obolenjih pojavljajo podobni neželeni dogodki. Omenjena tveganja celične terapije bomo v UKCL zmanjšali z doslednim nadzorom in hitrim ukrepanjem ob neželenih dogodkih. Predvideno je redno spremljanje bolnikov. Poleg standardnega pregleda in laboratorijske ocene, se bo spremljalo tudi prisotnost in obstojnost celic aCD19 CAR T v krvi obravnavanega posameznika. V skladu s protokolom bodo vsi bolniki, ki prejmejo celični pripravek aCD19 CAR T vključeni v doživljenjsko spremljanje. Proizvajalec celičnega pripravka ima vzpostavljen sistem farmakovigilance NPZNZ.

Zaradi doslednega upoštevanja in izvajanja vseh varovalnih in zadrževalnih ukrepov, je tveganje za neposreden stik osebja, ki dela z GSO ali za nenamerno sproščanje GSO v zunanje okolje izredno majhno. V kolikor bi prišlo do nenamernega sproščanja GSO izven zaprtega sistema, pa zaradi nezmožnosti preživetja celic aCD19 CAR T izven dobro nadzorovanega okolja (ustrezni hranilni medij, nadzorovana atmosfera in temperatura), negativnih vplivov na ljudi in okolje ne pričakuje. Verjetnost za škodljive posledice za zdravje ljudi in okolje je zanemarljiva.

Človeške celice nimajo sposobnosti kolonizacije v imunokompetentnih posameznikih. Preučili smo nekaj potencialnih dogodkov in situacij, v katerih bi lahko prišlo do nenamernega prenosa

GSO na neciljne osebe. V vseh navedenih scenarijih je verjetnost za tak dogodek in posledično škodljive učinke za neciljne osebe izjemno majhna.

Zaključimo lahko, da terapija bolnikov s CD19 pozitivnimi malignimi obolenji z avtolognim celičnim pripravkom aCD19 CAR T predstavlja zanemarljivo tveganje za okolje.

## 6. POSTOPEK IZDELAVE OCENE TVEGANJA

Ocena tveganja je bila izdelana v skladu s *Pravilnikom o oceni tveganja za namerno sproščanje gensko spremenjenih organizmov v okolje (Uradni list RS, št. 32/21)*.

Pri pripravi ocene smo sledili evropskim smernicam opisanim v dokumentu: *Good Practice on the assessment of GMO-related aspects in the context of clinical trials with human cells genetically modified (version 5)* [24].

### 6.1 Specifičnost ocene tveganja

Oceno tveganja za okolje smo pripravili na znanstvenih osnovah glede na nam dostopne podatke za gensko spremenjene celice aCD19 CAR T za odrasle bolnike s CD19 pozitivnimi obolenji navedenimi v shemi 1. Zaradi varovanja intelektualne lastnine so nekateri podatki, ki niso bistveni za pripravo ocene tveganja znani samo proizvajalcu Miltenyi-ju. Zato ocena tveganja za okolje temelji tudi na že objavljenih rezultatih drugih kliničnih študij, kjer se je za pripravo celičnega pripravka aCD19 CAR T uporabljal vektor aCD19 proizvajalca Miltenyi Biotec. V procesu priprave ocene tveganja za okolje nam je bila poznana vrsta virusnega vektorja ter vloga vključkov vektorja. V tem okviru pa niso poznani vsi podatki določenih zaporedij virusnega vektorja, ki pa ne vplivajo na pripravo in presojo tveganja za zdravje ljudi in okolje celičnega pripravka aCD19 CAR T.

### 6.2 Utemeljitev določitve podatkov, ki naj se varujejo kot zaupni

Dodatek k Prilogi 1 vključuje podatke, ki se nanašajo na lastnosti lentivirusnega vektorja in so poslovna skrivnost podjetja Miltenyi Biotec, zato se varujejo kot zaupni.

## 7. VIRI

- [1] Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, 'Posebni odvzemi'. Accessed: Mar. 17, 2022. [Online]. Available: <http://www.ztm.si/krvodajalstvo/posebni-odvzemi/>
- [2] Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, 'CliniMACS Prodigy® T Cell Transduction System User Manual', 2017. [Online]. Available: [www.miltenyibiotec.com](http://www.miltenyibiotec.com)
- [3] Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, 'Regulatory Support File for Lentiviral Vector aCD19 CAR SF RSF-014, Version 06 Applicant's Part', 2020. Accessed: Mar. 18, 2022. [Online]. Available: [www.miltenyibiotec.com](http://www.miltenyibiotec.com)
- [4] Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG, 'General Information incl. Product Overview Lentiviral Vector aCD19 CAR SF Lentiviral Vector CD19 CAR'. [Online]. Available: [www.miltenyibiotec.com](http://www.miltenyibiotec.com)
- [5] J. S. Huston *et al.*, 'Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 85, no. 16, pp. 5879–5883, 1988, doi: 10.1073/pnas.85.16.5879.

- [6] I. C. Nicholson *et al.*, 'Construction and characterisation of a functional CD19 specific single chain Fv fragment for immunotherapy of B lineage leukaemia and lymphoma', *Mol Immunol*, vol. 34, no. 16–17, pp. 1157–1165, Nov. 1997, doi: 10.1016/S0161-5890(97)00144-2.
- [7] 'TNFRSF19 - Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19 - Homo sapiens (Human) | External links | UniProtKB | UniProt'. Accessed: Jul. 10, 2023. [Online]. Available: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q9NS68/external-links>
- [8] D. S. Vinay and B. S. Kwon, '4-1BB (CD137), an inducible costimulatory receptor, as a specific target for cancer therapy', *BMB Rep*, vol. 47, no. 3, pp. 122–129, 2014, doi: 10.5483/BMBREP.2014.47.3.283.
- [9] J. S. Bridgeman *et al.*, 'CD3 $\zeta$ -based chimeric antigen receptors mediate T cell activation via cis- and trans-signalling mechanisms: implications for optimization of receptor structure for adoptive cell therapy', *Clin Exp Immunol*, vol. 175, no. 2, pp. 258–267, Feb. 2014, doi: 10.1111/CEI.12216.
- [10] 'MB-CART19.1 in Patients With R/R ALL'. Accessed: Jul. 12, 2022. [Online]. Available: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03321123?term=plTG1563&draw=2&rank=1>
- [11] 'MB-CART19.1 r/r CD19+ B-cell Malignancies (BCM)'. Accessed: Jul. 12, 2022. [Online]. Available: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03853616?titles=cart19.1&draw=2&rank=2>
- [12] A. Mackensen *et al.*, 'Paper: A Phase I Open Label Dose Escalation Study of MB-CART19.1 in Relapsed and Refractory CD19+ B Cell Malignancies, Interim Preliminary Results in Pediatric ALL, Adult ALL Including CLL Cohorts', Accessed: Jul. 12, 2022. [Online]. Available: <https://ash.confex.com/ash/2021/webprogram/Paper152452.html>
- [13] H. K. Palani *et al.*, 'Decentralized manufacturing of anti CD19 CAR-T cells using CliniMACS Prodigy®: real-world experience and cost analysis in India', *Bone Marrow Transplant*, vol. 58, no. 2, pp. 160–167, Feb. 2023, doi: 10.1038/s41409-022-01866-5.
- [14] M. Maschan *et al.*, 'Multiple site place-of-care manufactured anti-CD19 CAR-T cells induce high remission rates in B-cell malignancy patients', *Nat Commun*, vol. 12, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41467-021-27312-6.
- [15] P. F. Caimi *et al.*, 'Final Results of a Phase 1 Study of AntiCD19 CAR-T Cells with TNFRSF19 Transmembrane Domain', *Blood*, vol. 138, no. Supplement 1, p. 3833, Nov. 2021, doi: 10.1182/BLOOD-2021-151155.
- [16] R. C. Larson and M. V. Maus, 'Recent advances and discoveries in the mechanisms and functions of CAR T cells', *Nature Reviews Cancer* 2021 21:3, vol. 21, no. 3, pp. 145–161, Jan. 2021, doi: 10.1038/s41568-020-00323-z.
- [17] J. Jayaraman *et al.*, 'CAR-T design: Elements and their synergistic function', *EBioMedicine*, vol. 58, p. 102931, Aug. 2020, doi: 10.1016/J.EBIOM.2020.102931.
- [18] M. R. Benmeharek, C. H. Karches, B. L. Cadilha, S. Lesch, S. Endres, and S. Kobold, 'Killing mechanisms of chimeric antigen receptor (CAR) T cells', *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 6, 2019, doi: 10.3390/ijms20061283.
- [19] S. Bailly *et al.*, 'Targeting CD19 in diffuse large B-cell lymphoma: An expert opinion paper', *Hematol Oncol*, vol. 40, no. 4, p. 505, Oct. 2022, doi: 10.1002/HON.3013.

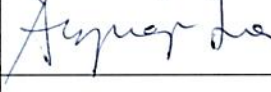
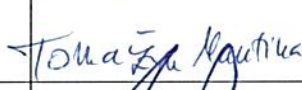
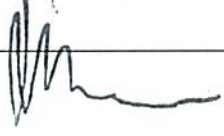
- [20] 'Search | European Medicines Agency (EMA)'. Accessed: Mar. 11, 2025. [Online]. Available: [https://www.ema.europa.eu/en/search?f%5B0%5D=ema\\_med\\_status%3Aauthorised&f%5B1%5D=ema\\_medicine\\_bundle%3Aema\\_medicine&f%5B2%5D=ema\\_medicine\\_name%3AAbecma&f%5B3%5D=ema\\_medicine\\_name%3ABreyanzi&f%5B4%5D=ema\\_medicine\\_name%3ACarvykti&f%5B5%5D=ema\\_medicine\\_name%3AKymriah&f%5B6%5D=ema\\_medicine\\_name%3ATecartus&f%5B7%5D=ema\\_medicine\\_name%3AYescarta&f%5B8%5D=ema\\_search\\_categories%3A83&f%5B9%5D=ema\\_search\\_entity\\_is\\_document%3ADocument&f%5B10%5D=ema\\_search\\_topics%3A42&landing\\_from=73303](https://www.ema.europa.eu/en/search?f%5B0%5D=ema_med_status%3Aauthorised&f%5B1%5D=ema_medicine_bundle%3Aema_medicine&f%5B2%5D=ema_medicine_name%3AAbecma&f%5B3%5D=ema_medicine_name%3ABreyanzi&f%5B4%5D=ema_medicine_name%3ACarvykti&f%5B5%5D=ema_medicine_name%3AKymriah&f%5B6%5D=ema_medicine_name%3ATecartus&f%5B7%5D=ema_medicine_name%3AYescarta&f%5B8%5D=ema_search_categories%3A83&f%5B9%5D=ema_search_entity_is_document%3ADocument&f%5B10%5D=ema_search_topics%3A42&landing_from=73303)
- [21] G. López-Cantillo, C. Urueña, B. A. Camacho, and C. Ramírez-Segura, 'CAR-T Cell Performance: How to Improve Their Persistence?', *Front Immunol*, vol. 13, p. 878209, Apr. 2022, doi: 10.3389/FIMMU.2022.878209/BIBTEX.
- [22] M. Al-Mansour, M. Al-Foheidi, and E. Ibrahim, 'Efficacy and safety of second-generation CAR T-cell therapy in diffuse large B-cell lymphoma: A meta-analysis', *Mol Clin Oncol*, vol. 13, no. 4, p. 33, Oct. 2020, doi: 10.3892/MCO.2020.2103.
- [23] 'Pharmacovigilance for advanced therapies | European Medicines Agency (EMA)'. Accessed: Mar. 11, 2025. [Online]. Available: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/post-authorisation/advanced-therapies-post-authorisation/pharmacovigilance-advanced-therapies>
- [24] 'Good Practice on the assessment of GMO-related aspects in the context of clinical trials with human cells genetically modified '.
- [25] J. Reyes, C. Ayala-Chavez, A. Sharma, M. Pham, A. B. Nuss, and M. Gulia-Nuss, 'Blood Digestion by Trypsin-Like Serine Proteases in the Replete Lyme Disease Vector Tick, *Ixodes scapularis*', *Insects 2020, Vol. 11, Page 201*, vol. 11, no. 3, p. 201, Mar. 2020, doi: 10.3390/INSECTS11030201.
- [26] A. J. O'Donoghue *et al.*, 'Comprehensive proteolytic profiling of *Aedes aegypti* mosquito midgut extracts: Unraveling the blood meal protein digestion system', *PLoS Negl Trop Dis*, vol. 19, no. 2, p. e0012555, Feb. 2025, doi: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0012555.
- [27] J. A. Ligon *et al.*, 'Fertility and CAR T-cells: Current practice and future directions', *Transplant Cell Ther*, vol. 28, no. 9, p. 605.e1, Sep. 2022, doi: 10.1016/J.JTCT.2022.06.002.
- [28] F. Korell, T. R. Berger, and M. V. Maus, 'Understanding CAR T cell-tumor interactions: Paving the way for successful clinical outcomes', *Med*, vol. 3, no. 8, pp. 538–564, Aug. 2022, doi: 10.1016/J.MEDJ.2022.05.001.

## 8. REFERENČNI DOKUMENTI

- Phase I/II Study of UMCF-LJU anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells In Adults with CD19 Positive Acute Lymphoblastic Leukemia
- SOP 0534 – Zdravljenje s CAR-T celično terapijo
- SD UKCL 0006 - Hišni red Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.
- Načrt gospodarjenja z odpadki UKCL za obdobje 2021-2025
- Kodeks deontologije v laboratorijski medicini (Uradni list RS, št. 62/98)



- GSO\_KOH\_Načrt ukrepov zadrževalnih ukrepov pri delu z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtem sistemu KOH-Bolniška soba 31
- GSO\_KOH\_Načrt ukrepov za primer nesreče pri delu z GSO v zaprtem sistemu KOH - bolniška soba 31
- GSO\_KOH\_Navodila za delo z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtem sistemu KOH Bolniška soba 31

|                  | Ime in priimek              | Podpis                                                                               | Datum      |
|------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Pripravil</b> | dr. Veronika Mikolič        |    | 14.3.2025  |
| <b>Pripravil</b> | dr. Irena Auersperger       |    | 13.03.2025 |
| <b>Pripravil</b> | Martina Tomažin             |    | 13.03.2025 |
| <b>Pregledal</b> | izr. prof. dr. Matjaž Sever |   | 13/03/25   |
| <b>Pregledal</b> | prof. dr. Samo Zver         |  | 17/3/25    |