



STROKOVNO MNENJE

o uporabi nerutinsko pripravljenih zdravil za napredno zdravljenje:

»Uporaba aCD19 CAR T pri odraslih bolnikih s CD19 pozitivnimi malignimi obolenji«

Mandat znanstvenega odbora:

Na svoji 56. redni seji je Vlada Republike Slovenije dne 28. 6. 2023 pod točko 2.7 (sklep št. 01101-7/2023/3, ki se nadomesti s sklepom 01101-7/2023/6 z dne 3.7.2023) imenovala člane in namestnike v znanstveni odbor za namerno sproščanje gensko spremenjenih organizmov v okolje in dajanje izdelkov na trg (ZOOS) za mandatno dobo štirih let.

Izhodišča priprave strokovnega mnenja:

Znanstveni odbor je bil s strani odgovornega organa na podlagi 32. člena Zakona o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi¹ (številka prijave 35419-1/2025-2570-2) naprošen, da poda strokovno mnenje glede sproščanja celic aCD19 CAR T v okolje pri uporabi nerutinsko pripravljenih zdravil za napredno zdravljenje (NPZNZ) z naslovom projekta: »Uporaba aCD19 CAR T pri odraslih bolnikih s CD19 pozitivnimi malignimi obolenji«. Znanstveni odbor je na 47. redni seji dne 14.5.2025 obravnaval zadevo in sprejel strokovno mnenje.

1. OSNOVNI PODATKI O SEJI ODBORA

Številka: 35422-1/2025-2570-1

Datum: 14.5.2025

Kraj: Ljubljana

2. OSNOVNI PODATKI

Številka prijave: 35419-1/2025-2570-1

Prijavitelj: Univerzitetni klinični center Ljubljana

Naslov prijavitelja: Zaloška cesta 2, Ljubljana

Namen prijave:

- ☒ namerno sproščanje GSO v okolje (III. poglavje ZRGSO, B del Direktive 2001/18/ES)
- ☐ GSO za uporabo kot živilo
- ☐ živilo, ki vsebuje GSO ali je iz njega sestavljeno
- ☐ GSO za uporabo kot krma
- ☐ krma, ki vsebuje GSO ali je iz njega sestavljena
- ☐ uvoz in predelava (C del Direktive 2001/18/ES)
- ☐ dajanje izdelkov na trg (IV. poglavje ZRGSO, C del Direktive 2001/18/ES)

¹ ZRGSO - Zakona o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (Uradni list RS, št. 23/05 – uradno prečiščeno besedilo, 21/10 in 90/12 – ZdZPVHVVR)

- ☐ pridobitev dovoljenja za promet z zdravilom za veterinarsko uporabo, ki vsebuje GSO ali je iz njega sestavljeno (3.1 in 31.2 člen Uredbe (ES) 726/2004 in C del Direktive 2001/18/ES ter IV. poglavje ZRGSO)
- ☐ GSO za uporabo kot seme ali drug rastlinski material za razmnoževanje/pridelavo v EU (C del Direktive 2001/18/ES)
- ☐ nadzor GSO (VII. poglavje ZRGSO)

Naslov projekta: »Uporaba aCD19 CAR T pri odraslih bolnikih s CD19 pozitivnimi malignimi obolenji«

Trajanje projekta: 10 let (1.7.2025 – 1.7.2035)

Dokumentacija, ki jo je prejel znanstveni odbor:

- Priloga 1: Prijava namernega sproščanja GSO v okolje (razen sproščanja višjih rastlin)
- Ocena tveganja nameravanega namernega sproščanja GSO v okolje
- Dodatek k Prilogi I

3. OSNOVNI PODATKI O RAVNANJU Z GSO, POVZETI PO OCENI TVEGANJA

A. SPLOŠNE INFORMACIJE (GENERAL INFORMATION)

Namen projekta je zdravljenje bolnikov s CD19 pozitivnimi malignimi obolenji, pri katerih prejšnje metode zdravljenja niso bile uspešne. Pri bolnikih se bo preverilo vključitvene in izključitvene kriterije, seznanilo bolnike o informacijah vezano na terapijo in pridobilo informirano soglasje.

V okviru zdravljenja z NPZNZ bo potekalo namerno sproščanje gensko spremenjenih organizmov (GSO) spremenjenimi celicami T - aCD19 CAR T.

Celični pripravek aCD19 CAR T bo pripravilo osebje iz Laboratorija za napredna celična zdravljenja (LAB CAR T) na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo (IMI), UL MF v zaprtem sistemu za delo z GSO. 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.

B. INFORMACIJE O PREJEMNEM ALI (KJER JE PRIMERNO) STARŠEVSKEM ORGANIZMU (INFORMATION RELATING TO THE RECIPIENT OR (WHERE APPROPRIATE) PARENTAL ORGANISM)

Prijavitelj v oceni tveganja navaja kot starševski organizem levkaferezni vzorec bolnika z ustrezno diagnozo, ki je po oceni konzilija zdravnikov na Kliničnem oddelku za hematologijo UKC Ljubljana (KOH), opravljenem pregledu in razgovoru z bolnikom, ta bolnik primeren za zdravljenje z avtolognim celičnim pripravkom aCD19 CAR T.

C. INFORMACIJE O GENSKI SPREMEMBI (INFORMATION RELATING TO THE GENETIC MODIFICATION)

Za pripravo avtoloških gensko spremenjenih celic se uporablja replikacijsko nezmožen lentivirusni vektor, ki transducira T celice in izraža antiCD-19 himerni antigen receptor (CAR), ki se vgradi v celično membrano T celic in se zato lahko poveže z malignimi B celicami, ki

izražajo na svoji površini CD19 antigene. CD 19 se izraža na zdravih in malignih B celicah, ne pa na krvotvornih matičnih celicah in plazmatkah. 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 prepreči oportunistične okužbe.

D. INFORMACIJE O GSO (INFORMATION RELATING TO THE GMO)

1. Opis lastnosti in značilnosti, ki so bile vnesene ali spremenjene

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. Lentivirusni vektor LAB CAR T IMI UL MF ne bo pripravljala sam ali ga spreminjal, temveč bo v celoti pridobljen od podjetja Miltenyi Biotec.

2. Informacije o zaporedju, ki je bilo dejansko vneseno ali odstranjeno

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 prepiše 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. Vključitev v genom je naključen, tako, da je možna taka insercija, ki vodi tudi v prekomerno izražanje onkogenov, ali utišano izražanje tumorskih supresorskih genov oz. drugih genov, ki so lahko povezani s karcinogenezo.

3. Informacije o izražanju vključka (Information on the expression of the insert)

Rezultat transdukcije 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. 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). 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.

4. Informacije, kako se GSO razlikuje od prejemnega organizma v razmnoževanju razširjanju in preživetju (Information on how the GMO differs from the recipient organism: reproduction, dissemination, survivability)

Transducirani limfociti se ne razlikujejo v razmnoževanju, razširjanju ali preživetju od ostalih limfocitov.

5. Genska stabilnost vključka in fenotipska stabilnost GSO (Genetic stability of the insert and phenotypic stability of the GMO)

Celice so stabilno transducirane in se razmnožujejo tako kot druge celice v telesu z mitozo. Po prejemu celičnega pripravka se bo bolnike v bolnišnici redno spremljalo glede učinkov terapije in morebitnih neželenih učinkov. Ob standardnih hematoloških laboratorijskih

preiskavah, se bo v krvi bolnika spremljalo tudi aCD19 CAR T celice in preverjalo njihovo obstojnost. V skladu s protokolom bodo vsi preizkušanci vključeni v dolgoročno spremljanje. To bo trajalo 15 let, z namenom zaznavanja morebitnih neželenih učinkov, ki bi lahko bili povezani z zdravljenjem s celicami aCD19 CAR T.

6. Kakršnekoli spremembe v sposobnosti GSO za prenos genskega materiala v druge organizme (Any change to the ability of the GMO to transfer genetic material to other organisms)

Pri delu s celicami, ki so spremenjene z lentivirusnimi vektorji, bi v splošnem potencialno nevarnost lahko predstavljal virus, ki je sposoben razmnoževanja ali prisotnost ostankov infektivnih virusnih delcev v končnem izdelku, ki bi se lahko sprostili v okolje. Proizvajalec lentivirusnega vektorja zagotavlja, da vektorski pripravek ne vsebuje replikativno kompetentnih virusnih delcev. Za vsako serijo vektorskega pripravka proizvajalec izda potrdilo o kakovosti izdelka, ki vključuje tudi informacije o varnosti pripravka in rezultat, da je bila odsotnost replikativno kompetentnih virusnih delcev preverjena z ustreznimi metodami. V sklopu kontrole kakovosti v laboratoriju LAB CAR T s qPCR še dodatno preverijo, da končni pripravek ne vsebuje replikativno kompetentnih delcev. Ker virusni vektor ne nosi zapisa za virusne proteine, ni nobene možnosti za nastanek infektivnih virusnih delcev med procesom priprave celic aCD19 CAR T, 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.

7. Informacije glede patogenosti GSO (Information on pathogenicity of GMO)

Glede na to, da so transducirane celice lahko dolgoživeče, so podvržene mutacijam tako kot druge celice v telesu, poleg tega pa lahko pride do insercijske mutageneze, ki lahko vodi v karcinogenezo. FDA (U.S. Food & Drug Administration) je letos aprila dodala na seznam resnih neželenih učinkov tudi karcinogenezo, poleg neželenih učinkov samega zdravljenja. Resni neželeni učinki so nevrotoksičnost in sindrom sproščanja citokinov. Kljub velikemu tveganju pojava neželenih učinkov zaradi samega zdravljenja, se ocenjuje, da je dobrobit za bolnika večja od predvidenega tveganja ter da ne predstavlja tveganje za okolje.

8. Mehanizem interakcije med GSO in ciljnim organizmi (če je primerno) (Mechanism of interaction between GMO and the target organisms (if applicable))

Ciljni organizem bodo B celice, ki izražajo CD19. Celice aCD19 CAR T bodo v telesu bolnika specifično prepoznavale antigen CD19 na površini celic B in sodelovale v signalni kaskadi, ki bo privedla v odstranitev malignih celic. 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 predstavitvenih celic.

9. Potencialne spremembe interakcij med GSO in biotskim okoljem zaradi genske spremembe (Potential changes in the interactions of the GMO with the biotic environment resulting from the genetic modification)

Kot opisano zgoraj bodo interakcije med spremenjenimi T celicami in B celicami, ki izražajo CD19 zaradi genske spremembe.

10. Potencialne interakcije z abiotskim okoljem (Potential interactions with the abiotic environment)

Ni relevantno.

11. Metode odkrivanja in identifikacije GSO (Detection and identification techniques of GMO)

Kvantitativni PCR (qRT-PCR), pretočna citometrija.

12. Povzetek možnih vplivov na okolje zaradi sproščanja GSO (Summary of the potential environmental impact of the release of the GMOs)

Pri uporabi celic aCD19 CAR T kot NPZNZ za zdravljenje bolnikov s CD19 pozitivnimi malignimi obolenji ne bo prišlo do namernega sproščanja GSO v zunanje okolje. Avtologni celični pripravek aCD19 CAR T bo intravenozno apliciran odraslim bolnikom s CD19 pozitivnimi malignimi obolenji, pri katerih prejšnje metode zdravljenja niso bile uspešne. Čas projekta. Možni vplivi na ciljne osebe – bolnike, bi bili povezani z neželenimi učinki zdravljenja, na ne-ciljne osebe, pa bi bila morebitna nenamerna aplikacija napačni osebi, pri kateri bi najverjetneje imunski sistem odstranil transducirane celice, saj bi jih prepoznal kot tuje. Poleg tega, bi lahko prišlo do nenamernega razlitja pri poškodbi infuzijske vrečke. Glede na to, da gre za človeške celice, te zunaj strogo kontroliranih pogojev ne preživijo. Tako, da tudi ni možno pričakovati kakršnih koli vplivov na druge organizme ali okolje.

Celice bi teoretično lahko prišle v stik z zemljo oz. tlemi, vendar je glede na opis značilnosti celic verjetnost takega dogodka ničelna. Verjetnost negativnega vpliva transduciranih celic T aCD19 CAR T na okolje in zdravje ljudi je zaradi naštetih omejitev minimalna oziroma zanemarljiva.

4. OCENA O TEM, ALI OBSEG IN VSEBINA PRIJAVE ZADOŠČATA ZA SPREJEM STROKOVNEGA MNENJA

Prijavitelj (UKC Ljubljana, Zaloška 2, Ljubljana) je znanstvenemu odboru za sproščanje v okolje (ZOOS) posredoval potrebne dokumente in priloge z zahtevanimi informacijami, ki so vsebovale vse potrebne elemente: opis GSO ter namen sproščanja, opis postopkov, ki bodo omogočali varno sproščanje GSO ter oceno tveganja za okolje.

Priložena dokumentacija po obsegu in vsebini zadoščata za sprejem strokovnega mnenja.

5. STROKOVNO MNENJE (v SI in EN verziji)²

Strokovno mnenje/nasvet in dodatne pripombe iz 6.in 7. točke

Abstrakt

Za transdukcijo človeških limfocitov T »*ex vivo*«, z namenom izražanja himernega antigenškega receptorja aCD19 CAR, se bo uporabil vektor rLVVaCD19 CAR proizvajalca Lentigen, Miltenyi Biotec. 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 prepiše v cDNA, ki se nato stabilno integrira v genom limfocitov T in se prepisuje s celičnim intrinzičnim transkripcijskim mehanizmom. Ker je vključitev v genom naključna, lahko vodi do insercijske mutageneze in posledično tudi do karcinogeneze. 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.

Gensko spremenjeni limfociti T zunaj organizma ne morejo preživeti razen v strogo kontroliranih pogojih.

Prijava se nanaša na sproščanje v okolje z namenom uporabe celic aCD19 CAR T pri odraslih bolnikih, ki imajo CD19 pozitivno maligno obolenje. Znanstveni odbor meni, da ob upoštevanju trenutnega stanja znanosti in tehnike ter zagotavljanju predlaganih varnostnih ukrepov sproščanje transduciranih celic T - aCD19 CAR T, v okolje, v okviru uporabe kot nerutinsko pripravljenih zdravil za napredno zdravljenje (NPZNZ) za zdravljenje bolnikov s CD19 pozitivno maligno boleznijo ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi, živali ali okolje.

Abstract

² Na osnovi 8. člena Uredbe o delovanju znanstvenih odborov (Ur.l. RS 66/03 in 95/11) v strokovnem mnenju ne smejo biti navedeni podatki iz prijave, ki se skladno z zakonom v postopku za izdajo dovoljenja varujejo kot zaupni

The rLVVaCD19 CAR vector from Lentigen, Miltenyi Biotec will be used to transduce human T lymphocytes "ex vivo" to express the chimeric antigen receptor aCD19 CAR. The lentiviral vector to be used for the production of aCD19 CAR T cells is based on an HIV-1 sequence which, due to several deletions in HIV helper genes, is replicationally incompetent. During the transduction process, lentiviral particles bind to cell surface receptors and are internalised. The nucleotide sequence between the two modified LTR sequences carrying the transcript for the aCD19 CAR is transcribed by reverse transcription into cDNA, which is then stably integrated into the T lymphocyte genome and transcribed by a cell-intrinsic transcriptional machinery. Since integration into the genome is random, it can lead to insertional mutagenesis and, consequently, carcinogenesis. The viral vector does not carry a transcript for viral proteins, so there is no possibility of generating infectious viral particles. Despite the bacterial replication start site and kanamycin resistance transcripts on the plasmids used to produce lentiviral vectors, these are not integrated into the host cell genome, as the antibiotic resistance transcript is outside the part of the plasmid that is incorporated into the lentiviral vector.

Genetically modified T lymphocytes cannot survive outside the organism except under strictly controlled conditions.

The application relates to the release into the environment for the purpose of the use of Advanced Therapy Medicinal Product (ATMPs) aCD19 CAR T cells, in adult patients with CD19-positive malignant disease. The Scientific Committee is of the opinion that, taking into account the current state of the art and ensuring the proposed safety precautions, the release of transduced T cells - aCD19 CAR T cells - into the environment in the context of the conduct of the hospital exemption for advanced therapy medical products (ATMPs) does not pose a risk to human health, animal health or the environment.

6. UTEMELJITEV MNENJA

6.1. Uvod

Namen prijavitelja je uporaba aCD19 CAR T celic kot NPZNZ za zdravljenje bolnikov, ki imajo CD19 pozitivno maligno obolenje. V okviru uporabe NPZNZ bo potekalo namerno sproščanje gensko spremenjenih organizmov (GSO) - aCD19 CAR T.

Pred zdravljenjem bolnika z NPZNZ se bo pridobilo informirano soglasje in preverilo vključitvene in izključitvene kriterije. Uporabo NPZNZ se bo izvajala pri bolnikih pri katerih so bile prejšnje metode zdravljenja neuspešne. Postopek aplikacije celičnega pripravka bo potekal v bolniški sobi 31 kliničnega oddelka za hematologijo (KOH) v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana (UKCL), ki je registriran kot zaprt sistem za delo z GSO. 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. Po aplikaciji celičnega pripravka se bo preizkušance 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. V skladu s protokolom bodo vsi preizkušanci vključeni v dolgoročno spremljanje, ki bo trajalo 15 let.

Celični pripravek aCD19 CAR T bo pripravilo osebje iz Laboratorija za napredna celična zdravljenja (LAB CAR T) na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo (IMI), UL MF v zaprtem sistemu za delo z GSO. 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.

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

6.2. Vidiki organizma

S pomočjo lentivirusne transdukcije se bo v limfocite CD4 in CD8 vneslo vključek aCD19 CAR. Celice pri tem ne pridobijo drugih zapisov za gene. Rezultat tega procesa bodo novonastali gensko spremenjeni limfociti T, ki na svoji površini izražajo aCD19 CAR, kar jim omogoča specifično prepoznavanje in vezavo na protein CD19, ki je prisoten tudi na maligno spremenjenih limfocitih B. Interakcija aCD19 CAR T s proteinom CD19 vzbudi združevanje molekul CAR na površini novonastalih celic, kar sproži znotrajcelično signalno kaskado, ki

sproži serijo dogodkov, ki vodijo do aktivacije CAR T celic, njihove proliferacije, sproščanja citokinov in sproščanja citotoksičnih granul, ki učinkovito odstranjujejo limfocite B.

6.3. Molekularna karakterizacija

Transdukcijo limfocitov T v Laboratoriju 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 lentivirusa 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 2×10^6 transduciranih celic aCD19 CAR T na kilogram telesne mase bolnika v 100 mL pufrskega medija. Končni celični pripravek je pripravljen v infuzijskih vrečkah iz materiala etilen vinil acetata (EVA).

6.4. Ocena tveganja za okolje

Celični pripravek bo pripravljen v zaprtem sistemu z upoštevanjem načel dobre laboratorijske in GMP prakse. Laboratorij, kjer se bo pripravljalo celice CAR T bo za vsak celični pripravek izdal certifikat analize, ki bo vključevalo identifikacijske podatke bolnika, čas proizvodnje in izdaje, serijsko številko materiala in rezultate kontrole kakovosti. Pripravek bo prenesen v vrečko, ki bo označena v skladu s predpisi EU. Transport pripravka od Laboratorija do KOH bo potekal 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.).

Intravenozna aplikacija celičnega pripravka (število celic aCD19 CAR T v končnem pripravku bo prilagojeno na telesno težo bolnika in bo vsebovalo do 2×10^6 transduciranih celic aCD19 CAR T na kilogram telesne mase bolnika v 100 mL pufrskega medija) bo potekala po navodilih in pod nadzorom zdravnika, ki ima izkušnje ter je usposobljen za apliciranje CAR T terapije. Pri delu z GSO bodo, 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. Postopek bo trajal od 10 do 20 minut. Vsi odpadki, ki bodo nastali 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 bodo pred odstranitvijo v ustrezni odpadni zbirnik kemično inaktivirali. Takoj po koncu dela se bodo inaktivirani odpadki hermetično zaprli v plastični zabojnik iz trde plastike, ki je označen z znakom za biološko nevarnost. V nadaljevanju se bo postopalo skladno z Načrtom za gospodarjenje z odpadki UKCL (Služba za varstvo in zdravje pri delu, enota Varstvo okolja).

6.5. Splošni nadzor po sproščanju

Uporaba gensko spremenjenih limfocitov CD4 in CD8, ki izražajo aCD19 CAR (ang. chimeric antigen receptor; CAR), ki se bo izvajala v okviru opisane uporabe kot NPZNZ, ne predstavlja tveganja, ki bi zahteval dodaten nadzor in obvladovanje tveganja od

predlaganega. V kolikor bi prišlo do nenamernega sproščanja GSO izven zaprtega sistema, pa se zaradi nezmožnosti preživetja celic aCD19 CAR T izven dobro nadzorovanega okolja (ustrezni hranilni medij, nadzorovana atmosfera in temperatura), negativnih vplivov na ljudi, živali in okolje ne pričakuje.

6.6. Mnenje

Znanstveni odbor ugotavlja, da je bilo v preteklosti že prijavljeno namerno sproščanje enakega GSO v drugih državah, vendar pa navedeno študije še ne rekrutirajo bolnikov, so pa aktivne. Z napravo Clinimacs je aktivnih kar nekaj študij po podatkih EU Clinical trials Register (<https://www.clinicaltrialsregister.eu/>).

Znanstveni odbor meni, da ob upoštevanju trenutnega stanja znanosti in tehnike ter ob zagotovitvi predvidenih varnostnih ukrepov, sproščanje gensko spremenjenih limfocitov CD4 in CD8, ki izražajo aCD19 CAR (ang. chimeric antigen receptor; CAR), ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi, živali ali okolje.

6.7. Reference

- Direktiva 2001/18/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 12. marca 2001 o namernem sproščanju gensko spremenjenih organizmov v okolje in razveljavitvi Direktive Sveta 90/220/EGS.
- Pravilnik o vsebini prijave namernega sproščanja gensko spremenjenih organizmov v okolje
- Pravilnik o oceni tveganja za namerno sproščanje gensko spremenjenih organizmov v okolje (Uradni list Republike Slovenije Številka 32/2021 z dne 8.3.2021)
- Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (Uradni list RS, št. [23/05](#) – uradno prečiščeno besedilo, [21/10](#) in [90/12](#) – ZdZPVHVVR)
- [Clinical Trials register - Search for clinimacs](#) dostopano 12.5.2025.
- <https://trialbulletin.com/lib/entry/ct-06189157>
- *"FDA Requires Boxed Warning for T cell Malignancies Following Treatment with BCMA-Directed or CD19-Directed Autologous Chimeric Antigen Receptor (CAR) T cell Immunotherapies". U.S. Food and Drug Administration (FDA). 18 April 2024.*

7. ZAKLJUČKI O MOŽNEM VPLIVU SPROŠČANJA ALI DAJANJA GSO V PROMET ZA OKOLJE IN PRIPOROČILA

Prijava se nanaša na sproščanje v okolje z namenom uporabe celic aCD19 CAR T kot NPZNZ pri odraslih bolnikih s CD19-pozitivnim malignim obolenjem, kjer so predhodne metode zdravljenja bile neuspešne.

Po pregledu prijave in ob upoštevanju trenutnega stanja znanosti in tehnike ter ob zagotovitvi predvidenih varnostnih ukrepov Znanstveni odbor ugotavlja, da sproščanje gensko spremenjenih limfocitov CD4 in CD8, ki izražajo aCD19 CAR (ang. chimeric antigen receptor; CAR), ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi, živali ali okolje.

Dr. Jelka Zabavnik Piano
PRESEDNICA ZOOS