

1. KRATEK OPIS IN NAMEN PROJEKTA

Namen projekta je preučiti izvedljivost, učinkovitost in varnost terapije z avtolognim celičnim pripravkom, ki vključuje limfocite T z izraženimi himernimi antigenskimi receptorji, usmerjenimi proti antigenu CD19 (ang. *anti-CD19 chimeric antigen receptor*; aCD19 CAR). Izvedeno bo klinično preskušanje faze I/II s celicami aCD19 CAR T, pri odraslih bolnikih s ponovljeno ali neodzivno CD19-pozitivno akutno limfoblastno levkemijo (ALL). V okviru kliničnega preskušanja bo potekalo namerno sproščanje gensko spremenjenih organizmov (GSO) - aCD19 CAR T v obliki aplikacije celičnega pripravka preizkušancem. Pričakujemo, da se bodo po zdravljenju celice aCD19 CAR T ohranjale v krvnem obtoku bolnika. Pred vključitvijo preizkušanca v študijo se bo pridobilo informirano soglasje in preverilo vključitvene in izključitvene kriterije protokola kliničnega preskušanja. 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 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.

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.

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). Levkafereza 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), 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 kliničnega preskušanja. 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 antigenškega 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 pripravljal 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 celico 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)**
Pseudotipizacija 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 Ψ (ang. *packaging signal* Ψ)**
Signal za pakiranje (Ψ) 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 Ψ 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 α**
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 efektorskih 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_L-scFv) protitelesa aCD19 je zunajcelična domena, ki skupaj s težko verigo prepozna in veže antigen CD19. Povezovalc 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_H-scFv) protitelesa aCD19 je zunajcelična domena, ki skupaj z lahko verigo prepozna in veže antigen CD19. Verigi V_L in V_H 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 zunajcelične 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].

Točna aminokislinska zaporedja domen konstrukta aCD19 CAR so poslovna skrivnost proizvajalca vektorja Lentigen, Miltenyi Biotec. V Dodatku k Prilogi 1 so navedene sekvence in njihove dolžine. Vključek aCD19 CAR je v uporabi v več kliničnih raziskavah v različnih državah sveta [10]–[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 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). Posamezna infuzijska vrečka se najprej temeljito površinsko dekontaminira z razkužili (70 % etanol ali drugim ustreznim sredstvom) v skladu z navodili, 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 ustrežno 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

V kliničnem preskušanju s celicami aCD19 CAR T ne bo prišlo do namernega sproščanja GSO v zunanje okolje. Avtologni celični pripravek aCD19 CAR T bo intravenozno apliciran odraslim bolnikom s ponovljeno/neodzivno CD19-pozitivno akutno limfoblastno levkemijo (ALL). Namen projekta je preučiti izvedljivost, učinkovitost in varnost terapije z avtolognim celičnim pripravkom aCD19 CAR T v kliničnem preskušanju z naslovom *Phase I/II Study of UMCF-LJU anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells In Adults with Relapsed/Refractory CD19 Positive Acute Lymphoblastic Leukemia* (Raziskava Faza I/II UMCF-LJU s celicami T z izraženim himernim antigenskim receptorjem, usmerjenim proti CD19 pri odraslih bolnikih s ponovljeno/neodzivno CD19-pozitivno akutno limfoblastno levkemijo). V omenjeno študijo bo predvidoma vključenih 12 odraslih preizkušancev. Pred vključitvijo preizkušanca v študijo se bo bolnika seznanilo s potekom zdravljenja in lastnostmi celičnega pripravka. Preverilo se bo vključitvene in izključitvene kriterije protokola kliničnega preskušanja in pridobilo njegovo informirano soglasje.

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 infuzija poteka preko centralnega venskega katetra s pomočjo intravenskega sistema za infundiranje brez filtra. Celični pripravek vsebuje do 2×10^6 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 levkaferезnega 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. S težnostnim pretokom se aplicira celotna vsebina infuzijske vrečke. Infuzijsko vrečko s povratnim pretokom se izpere z 10-30 ml raztopine NaCl 9 mg/ml (0,9%) za injiciranje. 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. 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* in protokolu kliničnega preskušanja (*Phase I/II Study of UMCF-LJU anti-CD19 Chimeric Antigen Receptor T Cells In Adults with Relapsed/Refractory CD19 Positive Acute Lymphoblastic Leukemia*).

Zaprta 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 m². Bolniška soba ima predprostor, ki ga zaradi postopnega prehoda v naslednjo stopnjo, uvrščamo v 1. varnostni razred. Površina predprostora znaša 7,32 m². 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 mogoč le pooblaščenim osebam s kodnim dostopom. 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 osebo 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, deluje kot zaprti sistem posameznikovo telo. Pričakuje se, da se bodo celice CAR T ohranjale v bolnikovem krvnem obtoku in namerno sproščanje GSO izven človeškega organizma ni predvideno. Preizkušane celice, 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 kliničnega preskušanja so natančno opisani ključni parametri spremljanja in postavljen je časovni načrt, ki omogoča sistematično spremljanje preizkušancev. 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 preizkušanci vključeni v dolgoročno spremljanje. To bo trajalo 15 let, z namenom zaznavanja morebitnih neželenih učinkov, ki bi lahko bili povezani z zdravljenjem z aCD19 CAR T celicami. Za zagotovitev bolnikove varnosti so postavljena stroga merila za prekinitev študije.

2.5 Značilnosti predvidenega prejemnega okolja in možnosti razširjanja

Avtologne celice aCD19 CAR T celice bodo intravenozno aplicirane bolnikom v sklopu kliničnega preskušanja. Pričakujemo, da bodo celice v krvnem obtoku posameznika krožile, se množile in učinkovito odstranjevale celice, ki na svoji površini izražajo CD19. Dolgoročno

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 [19]. Človek predstavlja učinkoviti zaprti sistem za avtologne celice aCD19 CAR T. Zaradi doslednega upoštevanja vseh varnostnih ukrepov in načel dobre klinične prakse, predvidevamo, da je verjetnost, da bi v tem projektu prišlo do sproščanja v zunanje okolje izredno majhna. Poleg tega, se človeške celice ne morejo razmnoževati v zunanjem okolju, saj lahko preživijo le v človeškem telesu ali v dobro nadzorovanih kultivacijskih pogojih *in vitro*, ob prisotnosti ustreznih hranil in kontrolirane atmosfere. Posledično je možnost razširjanja celic aCD19 CAR T 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 pglavitnega 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. Omenjena tveganja bomo zmanjšali z doslednim nadzorom in hitrim ukrepanjem ob neželenih dogodkih. Celični pripravek, proizveden z avtomatiziranim sistemom Miltenyi CliniMACS Prodigy®, bo apliciran v sklopu kliničnega preskušanja, kjer bomo ocenjevali izvedljivost, učinkovitost in varnost uporabe celic aCD19 CAR T pri odraslih bolnikih s ponovljeno/neodzivno CD19-pozitivno ALL. Po prejemu celičnega pripravka se bo paciente 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 protokolu klinične študije. 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. Za zagotovitev bolnikove varnosti so postavljena stroga merila za prekinitev študije. Klinično preskušanje je ob pojavu resnih neželenih dogodkov mogoče kadarkoli ustaviti, kar presoja in odobri imenovani Institucionalni odbor za varnost in spremljanje podatkov (ang. Institutional Data Safety and Monitoring Board; IDSMB).

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 vekorji, 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 na 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 [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, na KOH UKCL se bo vršilo izključno delo z GSO v 2. varnostnem razredu v obliki infuzije celičnega pripravka v pacienta.

Po definiciji iz Direktive 2001/18/EC 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. Posledično o GSO v našem projektu govorimo o celičnem pripravku in celicah aCD19 CAR T, ki se ohranjajo v krvnem obtoku preizkušanca.

3.2 Potencialne posledice škodljivih učinkov, njihov obseg in verjetnost pojava

3.2.1 Za preizkušance, vključene v klinično preskušanje – ciljna oseba

Celični pripravek je pripravljen v zaprtem sistemu 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 zastavljene kriterije kakovosti. Vrečka je označena v skladu s predpisi EU. Intravenozna aplikacija celičnega pripravka 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.

Kot je opisano v točki 2.6 tega dokumenta, ki obravnava medsebojne vplive, obstaja visoko tveganje za pojav neželenih dogodkov, ki so povezani z zdravljenjem. Za obvladovanje omenjenih tveganj bomo izvajali sistematičen nadzor in v primeru neželenih dogodkov nemudoma ukrepali. Zdravstveno osebje ima izkušnje in je usposobljeno tudi za obvladovanje neželenih dogodkov povezanih z zdravljenjem. Glede na opisano in na podlagi rezultatov kliničnih raziskav s pripravki aCD19 CAR T iz tujine, se tveganja za preizkušance (CRS, nevrotoksičnost...) ocenjujejo skupaj s potencialnimi koristmi zdravljenja z avtolognim celičnim pripravkom aCD19 CAR T.

3.2.2 Za neciljne osebe

Predvideli smo nekaj okoliščin, v katerih bi teoretično lahko prišlo do nenamernega sproščanja in prenosa celic aCD19CAR T na tretjo osebo. Za posamezno okoliščino smo ocenili verjetnost in obseg.

Nenamerna aplikacija napačni osebi

Ena izmed predvidenih situacij, pri kateri bi lahko prišlo do nenameravanega sproščanja je aplikacija celičnega pripravka aCD19 CAR T neciljni osebi. V tem primeru bi imunski sistem posameznika tuje celice 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 tuji osebi. Do škodljivih učinkov bi lahko prišlo v primeru nenamerne aplikacije imunsko oslajeni osebi [20]. Ocenjujemo, da je verjetnost, da pride do omenjene situacije izredno majhna. Celični pripravek je namenjen za avtologno celično uporabo. Bolnika se po levkaferezi pripravlja 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 infuzija 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 s pacientom, da se izključi možnost napake.

Darovanje celic, tkiv ali organov

Drugi izmed teoretično možnih okoliščin za prenos tretji osebi, bi se lahko zgodil pri transfuziji krvi ali presaditvi celic, tkiv ali organov darovalca, ki je bil zdravljen s celičnim pripravkom aCD19 CAR T. 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, obravnavajo kot neustrezne za alogenske darovalce. Bolniki s sabo nosijo opozilno kartico, kjer je navedeno, da ne smejo darovati krvi, organov, tkiv ali celic. Hkrati veljajo enaki principi, kot so opisani v primeru aplikacije napačni osebi. Verjetnost, da pride do opisane situacije je izredno majhna.

Izredni dogodek pri delu z GSO

Do nenamernega prenosa GSO bi lahko prišlo v primeru izrednih dogodkov pri delu z GSO. Opis izrednih dogodkov in načrti 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 3*. Pri delu s celičnim pripravkom natančno izvajamo vse 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). Klinično preskušanje bo izvedeno v skladu z načeli dobre klinične prakse. 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. Verjetnost za škodljive učinke za zdravstveno osebje, ki dela z GSO je izredno majhna.

Laboratorijsko osebje

V potencialni stik s krvjo, bi lahko prišlo laboratorijsko osebje pri analizah krvi preizkušanca. Vso osebje, ki dela v laboratorijski medicini slovenskega zdravstva, je dolžno upoštevati *Kodeks deontologije v laboratorijski medicini (Uradni list RS, št. 62/98)*. Ti ga morajo poznati in se po njem ravnati pri svojem vsakdanjem delu. V določbah kodeksa so navedeni odnosi laboratorijskega osebja do bioloških vzorcev. Laboratorijsko osebje se mora zavedati dragocenosti biološkega vzorca, tveganosti in enkratnosti vzorca. Dolžni so skrbeti za to, da so vzorci ustrezno shranjeni do analize in po analizi, da bi bilo mogoče preverjanje rezultatov. Osebje v laboratoriju mora skrbeti 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, je verjetnost prenosa GSO na laboratorijsko osebje izredno majhna.

Hematofagi

Živali, ki se prehranjujejo s krvjo, kot so na primer komarji, ne predstavljajo tveganja za prenos GSO. Hematofagi namreč ne prenašajo krvnih celic med posamezniki. Kri je vir njihove prehrane in celice, ki jih zaužijejo, se v prebavnem sistemu ob prisotnosti encimov razgradijo. Krvne celice niso ohranjene v prebavnem traktu hematofagov in ne prehajajo med različnimi gostitelji, tako da je prenos GSO in možnost za pojav škodljivih pojavov po tovrstni poti minimalna.

Telesni izločki

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 prisotnost manjših količin celic v telesnih izločkih, le te zunaj izven dobro nadzorovanega okolja niso sposobne preživeti. Verjetnost za prenos celic aCD19 CAR T na neciljne osebe preko telesnih izločkov in posledično škodljivih učinkov je zato minimalna.

Nosečnost in vpliv na plod

Nosečnost je eden izmed izključitvenih kriterijev kliničnega preskušanja. 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 kliničnega preskušanja 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 neozdravljivimi 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 [21]. Zaradi pomanjkljivih informacij, tveganja na plodnost in prenos na plod ne moremo izključiti.

Poškodbe in dogodki ter pojavi, ki lahko vključujejo krvavitve

V primeru poškodb ali okoliščin, ki bi vključevale krvavitev preizkušanca, ki je prejel celični pripravek bi lahko prišlo do omejenega sproščanja celic CAR T v okolje. Primeri dogodkov, bi lahko bile ureznine, prometne nesreče, menstrualne krvavitve ipd. Slednje ne predstavlja 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.

3.2.3 Za okolje

Obvladovanje nesreče pri delu z GSO, pri kateri 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*.

Novonastali GSO zunaj dobro nadzorovanega okolja (ustrezni obogateni hranilni medij, nadzorovana atmosfera in temperatura) ne morejo preživeti, zato za razširitev v okolje niso nevarni in ne pričakujemo negativnih učinkov na rastline in okolje. Verjetnost za pojav škodljivih učinkov je zanemarljiva.

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

4.1 Določitev skupne ravni tveganja za zdravje ljudi in okolje

Pri delu s celičnim pripravkom natančno izvajamo vse ukrepe za nadzor in varno delo ter spodaj opisane zadrževalne ukrepe pri delu z GSO (Povzetek dokumenta *SOP Načrt zadrževalnih ukrepov pri delu z GSO v zaprtem sistemu KOH - bolniška soba 31*). Klinično preskušanje bo izvedeno v skladu z načeli dobre klinične prakse. Zaradi doslednega upoštevanja vseh varovalnih ukrepov in načel dobre klinične prakse ter izredne občutljivosti uporabljenih GSO, ki izven vzdrževanih optimalnih pogojev niso zmožni preživeti, predvidevamo, da je verjetnost pojava škodljivih učinkov na zdrave ljudi in okolje izredno majhna.

V kliničnem preskušanju, ki preučuje izvedljivost, učinkovitost in varnost terapije z avtolognim celičnim pripravkom aCD19 CAR T, se stopnja tveganja za udeležence oceni skupaj s pričakovanimi koristmi zdravljenja.

4.2 Zadrževalni ukrepi

V prostorih KOH, ki so klasificirani 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 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 osebje 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 uporablja 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 preizkušanca iz bolnišničnega okolja:

- Preizkušanec, ki bo prejel celični pripravek gensko spremenjenih 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. S tem se preprečuje namerni prenos GSO na neciljno osebo. Kartica vsebuje tudi kontakt zdravnika, ki ga je potrebno poklicati pred uvedbo katerega koli zdravljenja. Bolnikovo telo deluje kot zaprti sistem.
- Bolnikovo zdravstveno stanje se v skladu s protokolom kliničnega preskušanja redno spremlja.

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 izbrane 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 s sežigom. 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 limfociti T, so tudi gensko spremenjene celice CAR T 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 [22]. Kljub številnim kliničnim preskušanjem, v literature nismo našli podatkov, ki bi nakazovali morebitne škodljive vplive na okolje ali na druge neciljne osebe, ki niso prejemniki celične terapije.

Celični pripravek bo apliciran v sklopu kliničnega preskušanja, kjer ocenjujemo izvedljivost, učinkovitost in varnost uporabe aCD19 CAR T celic pri odraslih bolnikih s

ponovljeno/neodzivno CD19 pozitivno akutno limfoblastno levkemijo. 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. V tem kliničnem preskušanju bomo tveganja celične terapije zmanjšali z doslednim nadzorom in hitrim ukrepanjem ob neželenih dogodkih. V sklopu klinične študije je natančno določeno 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 preizkušanci vključeni v dolgoročno spremljanje. To bo trajalo 15 let, z namenom zaznavanja morebitnih neželenih učinkov, ki bi lahko bili povezani z zdravljenjem z aCD19 CAR T celicami. Za zagotovitev bolnikove varnosti so postavljena stroga merila za prekinitev klinične študije.

Zaradi doslednega upoštevanja in izvajanja vseh varovalnih 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 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 tretje osebe. V vseh navedenih scenarijih je verjetnost za tak dogodek in posledično škodljive učinke za neciljne osebe izjemno majhna.

Zaključimo lahko, da terapija 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)* [20].

6.1 Pomanjkljivosti ocene tveganja

Oceno tveganja smo pripravili glede na nam dostopne podatke. Nekateri podatki so, zaradi varovanja intelektualne lastnine znani samo Miltenyi-ju, zato smo se pri oceni tveganja zanašali tudi na že objavljene rezultate drugih kliničnih študij, kjer so za pripravo celičnega pripravka aCD19 CAR T uporabljali vektor aCD19 proizvajalca Miltenyi Biotec. Poznana nam je vrsta vektorja ter vrsta vseh vključkov vektorja, nepoznani so podatki določenih zaporedij virusnega vektorja, ki pa ne vplivajo na presojo tveganja in zmožnosti izdelave ocene tveganja.

6.2 Utemeljitev določitve podatkov, ki naj se varujejo kot zaupni

V Dodatku k Prilogi 1 so vključeni podatki, ki se nanašajo na lastnosti lentivirusnega vektorja in so poslovna skrivnost podjetja Miltenyi Biotec.

7. VIRI

- [1] Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, 'Posebni odvzemi'. Accessed: Mar. 17, 2023. [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
- [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
- [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
- [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.
- [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.
- [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.
- [9] J. S. Bridgeman *et al.*, 'CD3ζ-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.
- [10] 'MB-CART19.1 in Patients With R/R ALL'. Accessed: Jul. 12, 2023. [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, 2023. [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.
- [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.
- [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.
- [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.
- [17] J. Jayaraman *et al.*, 'CAR-T design: Elements and their synergistic function', *EBioMedicine*, vol. 58, p. 102931, Aug. 2020.
- [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.
- [19] 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.
- [20] 'Good Practice on the assessment of GMO-related aspects in the context of clinical trials with human cells genetically modified '. Accessed: Jul. 17, 2023. [Online]. Available: https://health.ec.europa.eu/system/files/2021-11/gmcells_gp_en_0.pdf
- [21] 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.
- [22] 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.

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
Pripravil	Veronika Mikolič		
Pripravil	dr. Irena Auersperger		
Pripravil	Martina Tomažin		
Pregledal	izr. prof. dr. Matjaž Sever		
Pregledal	prof. dr. Samo Zver		