

**VILNIAUS UNIVERSITETO LIGONINĖ
SANTAROS KLINIKOS
HEMATOLOGIJOS ONKOLOGIJOS IR TRANSFUZIOLOGIJOS CENTRAS**

**PRANEŠIMAS APIE VEIKLĄ, SUSIJUSIĄ SU GENETIŠKAI MODIFIKUOTŲ
MIKROORGANIZMŲ (GMM) RIBOTU NAUDOJIMU
PAGAL 1-OS ir 2-OS KLASĖS RIBOTO NAUDOJIMO REIKALAVIMUS**

2020 m. spalio mėn. 16 d., Nr.
Vilnius

Priedas Nr. 1.

RIZIKOS ŽMOGAUS SVEIKATAI BEI APLINKAI ĮVERTINIMAS

1. GMM rizikos vertinimas

1.1. GMM aprašymas

Chimerinio antigeno receptoriaus T limfocitų (toliau – CART) aprašas pateiktas šio pranešimo 9 punkte. Genetinė modifikacija laikantis visų tokių veiklų numatytų reikalavimų atliekama VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų, Hematologijos, onkologijos ir transfuziologijos centro esančiose adresu Santariškių g. 5, Vilnius, Lietuva. Patalpos, kuriose vyks gamyba: IMC501, IMC501A, IMC501B, IMC507, IMC509. CART suleidimas pacientui bus atliekamas VšĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų, Hematologijos, onkologijos ir transfuziologijos centro patalpose esančiose adresu Santariškių g. 2, Lietuva.

1.2. GMM panaudojimo tikslai

GMM, įsigyti komerciniu būdu arba pagaminti VUL Santaros klinikose, būtų skirti onkohematologiniams pacientams, kurių liga recidyvavo arba buvo atspari taikytam imunochemoterapiniam gydymui.

VERTINIMO PROCEDŪRA I

1.3. GMM sukiamų pavojų identifikavimas

Etapai:

1. Vektoriaus (lentivirusinis vektorius) gamyba.
2. GMM (CART) gamyba – genetinės medžiagos įterpimas į T limfocitus vektoriumi.
3. CART klinikinis panaudojimas

1.3.1. Recipientai/motininis organizmas

CART pradinė medžiaga yra žmogaus kraujo ląstelės (T limfocitai). T limfocitai renkami iš žmogaus (šaltinis). Žmogaus kraujo ląstelės nepatogeniškos. Prieš kraujo ląstelių surinkimą (leukaferезę) pacientai bus ištiriami dėl virusinių infekcijų: ŽIV, HBV, HCV. Nustačius HBV, HCV, ŽIV infekciją, leukaferезė nebus atliekama. Žmogaus kraujo ląstelės negali išgyventi ne žmogaus organizme, išskyrus tuos atvejus kai tenkinamos specialios sąlygos laboratorijose (specifinės

terpės, temperatūra, deguonies kiekis). Aplinkoje žmogaus kraujo ląstelės neturi sąlygų išgyventi dėl temperatūros, pH, UV, fizinių ir biocheminių sąlygų. Žmogaus kraujo ląstelės negali pasklisti aplinkoje dėl greitos ląstelių žūties kitomis nei žmogaus organizme esančios sąlygos.

1.3.2. Įterpiama genetinė medžiaga

Įterptos genetinės medžiagos aprašymas pateiktas Pranešimo 9.6. punkte. Chimerinio antigeno receptoriaus (CAR) antigenų prisijungimo sritis sudaryta iš specifinių viengrandžių imunoglobulinų variabiliųjų dalių fragmentų (pvz., CD19, CD20 fragmentų pagrindu) sujungtų vidugrandininiu tarpikliu. Antigenų prisijungimo sritis per tarpiklį (pvz., CD8 fragmento pagrindu) sujungta su transmembraniniu regionu (pvz., TNFRSF19 pagrindu), kostimuliaciniu regionu (pvz., 4-1BB pagrindu) ir signaliniu regionu (pvz., CD3zeta pagrindu). Prieš CAR seką įterpta žmogaus lyderinė (signalinė) seka (identiška žmogaus granuliocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus alfa subvieneto signalinei sekai) padidina CAR ekspresiją ląstelės paviršiuje.

1.3.3. Vektoriai

Planuojami naudoti GMM nepatogeniški, netoksiški, nepavojingi žmogui, gyvūnams ir augalams. Vektorių stabilumas kambario temperatūroje yra trumpalaikis. Jie gana greitai degraduoja ir praranda savo savybes dėl fizikocheminių poveikių ar aplinkoje esančių nukleazų. Ilgesniam išlaikymui jie turi būti laikomi nemažesnėje nei -80°C temperatūroje.

Lentivirusinis vektorius, sukurtas ŽIV-1 pagrindu (šeima: retrovirusai; rūšis: žmogaus imunodeficitas virusas; gentis: ŽIV-1). Modifikacija: genetinės medžiagos įterpimas (insercija). Inserciją atlieka lentivirusinis vektorius (3-ios kartos, nesireplikuojantis, išgautas iš ŽIV-1 genties). Įterpimo metodas: transdukcija. Įterpta genetinė medžiaga stabiliai integruojama į chromosomas. Genetinės medžiagos transdukcijai į žmogaus T limfocitus naudojamas lentivirusinis vektorius negali replikuotis (po transdukcijos nesigamina funkcionalios virusinės dalelės, kadangi vektorius jų nekoduoja), todėl nebėra patogeniškas žmogaus organizmui. Jeigu lentivirusinis vektorius nebus įsigytas komerciniu būdu, gamyba bus vykdoma VUL Santaros klinikų gamybos patalpose.

Vektoriaus (lentivirusinis vektorius) gamybai naudojamos pagrindinės medžiagos:

- Plazmidės: CAR vektoriaus plazmidė ir 3 pagalbinės plazmidės: VSVg plazmidė koduojanti lentivirusinio vektoriaus apvalkalo baltymą, Rev plazmidė skirta CAR transgeno ir kitų reikalingų transkriptų eksportui į citoplazmą (užtikrina transliaciją) ir gag/pol plazmidė koduojanti reikiamus fermentinius aktyvumus ir struktūrinį peptidą, kurie yra būtini funkcionaliai CAR lentivirusiniam vektoriumi. Plazmidės įsigijamos iš komercinių tiekėjų.
- Ląstelių linija (HEK 293, jos kultivarai) įgalina pasigaminti virusinių dalelių, kurios gali infekuoti žmogų ir gyvūnus, laikantis tinkamų darbo saugos reikalavimų. Ląstelių linijos įsigijamos iš autorizuotų komercinių tiekėjų. Gamyba vyksta laikantis darbo saugos reikalavimų.

1.3.4. Gauta GMM

CART gamybai naudojamos pagrindinės medžiagos:

- Genetinė medžiaga.
- Vektorius – naudojamas įterpti GMM į recipientą/motininį organizmą.
- Recipientas/motininis organizmas – T limfocitai genetinės medžiagos įterpimas į T limfocitus pasinaudojant lentivirusiniu vektoriumi

Planuojami naudoti recipientas/motininis organizmas, vektoriai, GMM bus auginami, dauginami *in vitro* kultūrose laikantis tokiai veiklai numatytų sąlygų uždaroje patalpoje, neturinčiose kontakto su aplinka ir patekimas į jas leidžiamas magnetines praėjimo korteles turintiems darbuotojams.

CART pasižymi įprastinėmis T limfocitų savybėmis: susidūrę su ląstele-taikiniu yra aktyvuojami ir atlieka T limfocitams būdingas funkcijas. Aktyvuoti CART išskiria uždegiminius citokinus (pvz. interferoną gama (IFN-gama) ir interleukiną (IL)-2). Paraleliai vyksta CART proliferacija. Tikslinius antigenus ekspresuojančios ląstelės sunaikinamos – vyksta citolizinė degranuliacija, granzimų/perforinų išskyrimas, FAS/FAS-ligando sąveika su CART. Ląstelių-taikinių žūtis ir uždegiminių citokinių išsiskyrimas gali sukelti antrinį imuninį atsaką – pritraukiamos įgimto ir įgyto imuniteto ląstelės, kurios gali prisidėti prie ląstelių-taikinių žūties. Aktyvuoti CART migruoja po visą organizmą ieškodami ir naikindami tikslines molekules ekspresuojančias ląsteles.

1.3.4.1. Galimas poveikis žmogaus sveikatai

Priklausomai nuo pacientui suleistų CART ir specifines CD molekules ekspresuojančių ląstelių-taikinių kiekio gali kilti dvi gerai žinomos reakcijos: a.) lengvo – sunkaus laipsnio citokinių išsiskyrimo sindromas (dažnai pasitaikanti reakcija) ir/ar imuninių efektorinių ląstelių sukeltas neurotoksiškumo sindromas ir b) naviko lizė. Pirmoji reakcija susijusi su imuninės sistemos aktyvacija. Po sąveikos su ląstelėmis taikiniaus CART išskiria uždegiminius citokinus, kurie aktyvuoja įgimto imuniteto ląsteles (ypač makrofagus). Aktyvintos ląstelės išskiria IL-6, kuris sukelia visos imuninės sistemos aktyvaciją. Šią reakciją galima kontroliuoti vaistiniu preparatu tocilizumabu (neutralizuojančiu interleukino-6 efektą) ir/ar steroidais. Naviko lizės sindromo rizika sumažinama prieš ląstelių terapiją sumažinus ląstelių-taikinių kiekį. Abejoms reakcijoms suvaldyti numatytas toksiškumo valdymo planas (VUL SK patvirtintas gydymo protokolas GP145 „Imunoterapijos komplikacijų gydymas: citokinių išsiskyrimo sindromas, neurotoksiškumas, traukulinis sindromas, intrakranijinė hipertenzija, B aplazija“). CART sukelia sveikų B limfocitų žūtį. Šis šalutinis poveikis turi būti įvertintas numatytame gydymo plane: numatytas toksiškumo valdymas, ilgalaikė paciento stebėseną ir sudarytas gydymo planas (pavyzdžiui imunoglobulino skyrimas visą gyvenimą). Lentiviruso sistema modifikuoti limfocitai iki šiol yra skirti daugeliui pacientų gydyti, todėl įrodytas šios genetinė modifikacijos saugumas, mažas insercinės mutagenės bei T ląstelių piktybinės transformacijos potencialas.

1.3.4.2. Galimas poveikis aplinkai

CART gali išgyventi tik šeimininko organizme. GMM yra stabili, integruota į ląstelių chromosomas. Kitoje aplinkoje neišgyvena, nesugeba replikuotis, nėra infektabili. CART gydyti pacientai neišskiria į aplinką nei CART, nei lentivirusinio vektoriaus. CART patekus į aplinką (pvz. išsipylimas, kraujavimas) ląstelės greitai žūva dėl fizinės inaktyvacijos (dehidracija ir karštis) ir/ar dezinfektantų poveikio. Genetinė modifikacija neturi įtakos CART išgyvenamumui, kitoje negu šeimininko organizmas aplinkoje. CART neturi įtakos aplinkai.

1.3.5. Sukurtų GMM klasifikacija

Vektorius (lentivirusinis vektorius) ir GMM (CART) priskiriami 2-ai apribojimo klasei. CART klinikiniam panaudojimui priskiriami 1-o apribojimo klasei.

1.3.6. Galimų pavojų įvertinimas.

Vektoriaus (jeigu nebus įsigijamas komerciniu pagrindu) ir GMM gamyba atliekama VŠĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų, Hematologijos, onkologijos ir transfuziologijos centro, Audinių banko ir ląstelių terapijos skyriaus kontroliuojamose laboratorinės paskirties patalpose priklausančioms esančiose adresu Santariškių g. 5, laikantis tokių veiksnių reikalavimų, vadovaujantis geros gamybos praktikos gairėmis.

GMM suleidimas pacientui bus atliekamas VŠĮ Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų, Hematologijos, onkologijos ir transfuziologijos centro, Kaulų čiulpų transplantacijos skyriaus patalpose esančiose adresu Santariškių g. 2.

1.3.6.1. Sąlygos, kurių privaloma laikytis

Dirbant su GMM bus laikomasi tiek bendrųjų darbo saugos reikalavimų, tiek specifinių standartinių darbo procedūrų, kurios apriboja tiek žmonių, tiek medžiagų patekimą į specializuotas gamybos patalpas bei reglamentuoja GMM saugumą ir saugų atliekų utilizavimą.

Gamyba: Lentivirusinis vektorius (jeigu nebus įsigijamas komerciniu pagrindu) ir CART gamyba bus vykdoma vadovaujantis geros gamybos praktikos gairėmis ir Santaros klinikų patvirtintomis procedūromis, kuriose aprašytos gamybos patalpos, patalpų priežiūra, įėjimo kontrolė, darbuotojų ir medžiagų judėjimas patalpose, darbo aplinkos sąlygos, jų kontrolė, atliekų tvarkymas, CART gamybos procesai (VUL Santaros klinikų generalinio direktoriaus 2020-02-17 įsakymas V-112 „Dėl aplinkos (patalpų, daiktų) paviršių valymo, dezinfekcijos plano patvirtinimo“, ABLTS P5 „Audinių banko ir ląstelių terapijos skyriaus patalpų ir aplinkos sąlygų valdymas“, P248 „Chimerinio antigeno receptoriaus T limfocitų (CART) gamyba ir kokybės kontrolė, CART gamybos byla ir sertifikavimas“ ir kt. aktualūs dokumentai). Darbuotojai bus pasirašytinai supažindinti su CART klinikinio tyrimo protokolu, supažindinti su Aplinkos ministro įsakymu Nr.431 „Genetiškai modifikuotų mikroorganizmų riboto naudojimo Lietuvos Respublikoje tvarkos aprašas“.

Klinikinis panaudojimas bus vykdomas toje pačioje įstaigoje VŠĮ Vilniaus universiteto ligoninė Santaros klinikos. VUL Santaros klinikų įgaliotas asmuo pristatys CART pagal nustatytas ir kontroliuojamas sąlygas. CART bus vienkartinėje sterilioje pakuotėje, kuri paženklinta pagal pažangios terapijos vaistinio preparato reikalavimus, su lydinčiais dokumentais. CART bus laikomi (jeigu reikės) VUL SK kontroliuojamose aplinkos sąlygose, atskirai paženklintoje vietoje, žmonių patekimas į laikymo patalpą bus apribotas. Gydymas CART bus atliekamas saugioje ligoninės aplinkoje. Darbuotojai bus pasirašytinai supažindinti su CART klinikinio tyrimo protokolu, supažindinti su Aplinkos ministro įsakymu Nr.431 „Genetiškai modifikuotų mikroorganizmų riboto naudojimo Lietuvos Respublikoje tvarkos aprašas“. Į vienietę paciento palatą bus įleidžiami tik su paciento

gydymu susiję asmenys. Prieš suleidžiant CART recipiento identifikaciniai duomenys su bus sutikrinti su etiketėje nurodytais duomenimis, dviejų atsakingų personalo darbuotojų. Su CART dirbantis personalas laikysis Santaros klinikose patvirtintų procedūrų: gydytojo saugos ir sveikatos instrukcija (DSSI91), bendrosios praktikos slaugytojo saugos ir sveikatos instrukcija (DSSI32), higienos reikalavimų (IKS P1 „Rankų higiena“). Įvykus darbuotojo ekspozicijai krauju ar kūno skysčiais, vadovaujamas procedūra IKS P 4 „Darbuotojų ekspozicijos krauju ir (ar) kūno skysčiais incidentų pranešimo, registravimo ir poveikio sveikatai stebėjimo bei profilaktikos priemonių taikymas“. CART suleidime (GMM laikoma specialioje saugioje vienkartinėje pakuotėje) dalyvaus pacientą gydantis gydytojas ir bendrosios praktikos slaugytoja. Infuzinis maišas, infuzinė sistema ir priediniai elementai bus utilizuojami vadovaujantis VUL SK patvirtinta procedūra P149 „Medicininų atliekų saugus tvarkymas“.

1.3.6.2. GMM kiekiai ir auginimo tūriai

Iki 10 L vienam kartui.

1.3.6.3. Auginimo sąlygos.

Lentivirusinio vektoriaus (jeigu nebus išigijama komerciniu pagrindu) ir CART gamyba bus vykdomas adresu Santariškių g. 5 (501, 501A, 501B, 507, 509) kontroliuojamose patalpose vadovaujantis geros gamybos praktikos gairėmis. Aplinkos sąlygos aprašytos Santaros klinikų patvirtintoje procedūroje ABLTS P5 „Audinių banko ir ląstelių terapijos skyriaus patalpų ir aplinkos sąlygų valdymas“ ir VUL Santaros klinikų generalinio direktoriaus 2020-02-17 įsakyme V-112 „Dėl aplinkos (patalpų, daiktų) paviršių valymo, dezinfekcijos plano patvirtinimo“.

1.3.6.3.1. Poveikis į darbo aplinką

CART ir lentivirusinis vektorius neišgyventų kitoje nei šeimininko organizmas aplinkoje. Įvykus fiziniam CART ir lentivirusiniu kontaktui su paviršiais, bus vadovaujamas Santaros klinikų patvirtintomis procedūromis ABLTS P5 „Audinių banko ir ląstelių terapijos skyriaus patalpų ir aplinkos sąlygų valdymas“ ir P149 „Medicininų atliekų saugus tvarkymas“.

1.3.6.3.2. Jautrių planuojamiems GMM rūšių buvimas aplinkoje

Modifikuota genetinė medžiaga yra stabili, integruota į CART chromosomas. CART neišgyventų kitoje nei šeimininko organizmas aplinkoje, nesugeba replikuotis, nėra infektabilūs. Pacientai gydyti CART neišskiria į aplinką nei CART, nei lentivirusinio vektoriaus.

1.3.6.3.3. Ar aplinka gali padėti išgyventi sukurtiems GMM?

Negali.

1.3.6.3.4. Fizinis poveikis į aplinką

Nenumatomas joks fizinis poveikis aplinkai. CART, lentivirusiniui vektoriui, transfektuotoms HEK293 gamybos ląstelėms patekus į aplinką (pvz. išsipylimas, kraujavimas) dalelės greitai žūva dėl fizinės inaktyvacijos (dehidracija ir karštis) ir/ar dezinfektantų poveikio.

1.3.6.4. Atliekų nukenksminimas ir utilizacija

Personalas dalyvaujantis lentivirusinio vektoriaus ir CART gamyboje privalo laikytis visų saugumo priemonių vadovaujantis VŠĮ VUL

Santaros klinikų patvirtintomis procedūromis ABLTS P5 „ABLTS P5 „Audinių banko ir ląstelių terapijos skyriaus patalpų ir aplinkos sąlygų valdymas“, higienos reikalavimų (IKS P1 „Rankų higiena“), P90 „Aplinkos (patalpų, daiktų, įrenginių), medicinos priemonių paviršių valymas ir dezinfekcija“ ir VUL Santaros klinikų generalinio direktoriaus 2020-02-17 įsakymu V-112 „Dėl aplinkos (patalpų, daiktų) paviršių valymo, dezinfekcijos plano patvirtinimo“.

Personalas lašinantis pacientui CART privalo dėvėti vienkartinę chalata, vienkartinę pirštines vadovaudamasis Santaros klinikose patvirtintomis procedūromis: gydytojo saugos ir sveikatos instrukcija (DSSI91) bendrosios praktikos slaugytojo saugos ir sveikatos instrukcija (DSSI32), higienos reikalavimų (IKS P1 „Rankų higiena“). Įvykus darbuotojo ekspozicijai krauju ar kūno skysčiais, vadovaujama procedūra IKS P 4 „Darbuotojų ekspozicijos krauju ir (ar) kūno skysčiais incidentų pranešimo, registravimo ir poveikio sveikatai stebėjimo bei profilaktikos priemonių taikymas“. Ligoninės patalpų valymas atliekamas vadovaujantis Santaros klinikų procedūra P90 „Aplinkos (patalpų, daiktų, įrenginių), medicinos priemonių paviršių valymas ir dezinfekcija“ ir P243 „Ligoninės patalpų ir objektų (inventoriaus) valymo ir dezinfekavimo paslaugos organizavimas ir vykdymas“. Atsitiktinai pasklidusi aplinkoje (išsipylusi) medžiaga bus nukenksminama vadovaujantis Santaros klinikų P149 „Medicininį atliekų saugus tvarkymas“. Panaudotos medžiagos (infuziniai maišai, infuzinės sistemos) tvarkomos vadovaujantis Santaros klinikų patvirtinta procedūra P149 „Medicininį atliekų saugus tvarkymas“.

VERTINIMO PROCEDŪRA II

1.4. Galutinis apribojimo klasės nustatymas

CART ir lentivirusinio vektoriaus gamyba priskiriami 2-o apribojimo klasei. CART klinikiniam panaudojimui priskiriami 1-o apribojimo klasei.

1.5. Galutinės išvados patvirtinimas

Galutinė išvada patvirtinama remiantis:

- LR Aplinkos ministro įsakymu „Dėl genetiškai modifikuotų mikroorganizmų riboto naudojimo Lietuvos Respublikoje tvarkos aprašo patvirtinimo“, 2003-08-04, Nr.413.Nustatyta GMM riboto naudojimo klasė pagal GMM klasifikavimo kriterijus, patvirtintus Lietuvos Respublikos aplinkos ministro, Lietuvos Respublikos sveikatos apsaugos ministro ir Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2004 m. gruodžio 28 d. įsakymu Nr. D1-693/V-954/B1-1107 „Dėl genetiškai modifikuotų mikroorganizmų klasifikavimo kriterijų“.
- LR Socialinės apsaugos ir sveikatos apsaugos ministrų įsakymu „Dėl darbuotojų apsaugos nuo biologinių medžiagų poveikio darbe nuostatų patvirtinimo“, 2001-06-21, Nr. 80/353.