

Ministerstvo životního prostředí ČR  
**Ing. Václav Routa**  
Odbor enviromentálních rizik  
Vršovická 65  
100 10 Praha 10

1. Věc: Žádost zdravotnického zařízení **Fakultní nemocnice Olomouc** o udělení povolení k uvádění GMO do životního prostředí v rámci klinického hodnocení BNIT-PRV-301

Název: Randomizované dvojitě zaslepené klinické hodnocení, fáze III., jehož cílem je zhodnotit účinnost přípravku PROSTVAC-V/F ± GM-CSF u mužů s asymptomatickým nebo minimálně symptomatickým metastatickým karcinomem prostaty bez efektu kastrace.

Vážený pane inženýre,

Zasíláme Vám „Žádost zdravotnického zařízení Fakultní nemocnice Olomouc\_o udělení povolení k uvádění GMO do životního prostředí v rámci klinického hodnocení BNIT-PRV-301“ vypracované ve smyslu zákona 78/2004 Sb., ve znění zákona 346/2005 Sb.

Pracoviště jsou pro práci s GMO vybavena způsobem odpovídajícím požadavkům vyhlášky 209/2004 Sb. Personál je pro práci s GMO vyškolen.

Vlastní „Žádost zdravotnického zařízení Fakultní nemocnice Olomouc\_o udělení povolení k uvádění GMO do životního prostředí v rámci klinického hodnocení BNIT-PRV-301“ i všechny přílohy posíláme v písemné – listinné formě a ve formě elektronické.

Přílohy:

Žádost zdravotnického zařízení Fakultní nemocnice Olomouc\_o udělení povolení k uvádění GMO do životního prostředí v rámci klinického hodnocení BNIT-PRV-301:

- Hodnocení rizika
- Provozní řád
- Havarijní plán
- Plánek pracovišť

S pozdravem,

MUDr. Radomír Maráček, ředitel

V Olomouci dne: \_\_\_\_\_

## Část A

### VŠEOBECNÉ NÁLEŽITOSTI ŽÁDOSTI

Datum podání: .....

#### 1. Název projektu

**BNIT-PRV-301; Randomizované dvojité zaslepené klinické hodnocení, fáze III., jehož cílem je zhodnotit účinnost přípravku PROSTVAC-V/F ± GM-CSF u mužů s asymptomatickým nebo minimálně symptomatickým metastatickým karcinomem prostaty bez efektu kastrace.**

#### 2. Žadatel

(+) **ověřená základací listina:** Zřizovatelem Fakultní nemocnice Olomouc je Ministerstvo zdravotnictví ČR. Fakultní nemocnice Olomouc je státní příspěvkovou organizací v přímé řídicí působnosti Ministerstva zdravotnictví ČR. Přiložen výpis z obchodního rejstříku.

2.1. -

2.2. **Název organizace:** Fakultní nemocnice Olomouc

2.3. -

2.4. **Sídlo:** I. P. Pavlova 6; 775 20 Olomouc

2.5. Identifikační číslo (IČO): 00098892

2.6. **DIČ:** CZ00098892

2.7. **Předmět činnosti (podle zakladatelského dokumentu nebo zápisu v obchodním rejstříku):** zdravotnické zařízení

2.8. **Statutární orgán uživatele:**

**Jméno, příjmení, titul:** MUDr. Radomír Maráček

**Funkce:** ředitel

#### 3. Odborný poradce

(+) **výpis z rejstříku trestů:** přiložen

(+) **doklad o dosaženém vzdělání a délce praxe:** přiloženo

3.1. **Jméno, popřípadě jména, příjmení, titul:** Soňa Peková, MUDr., PhD.

**3.2. Povolání, případně zaměstnavatel a funkce:** vedoucí Laboratoře molekulární diagnostiky, Laboratoře CHAMBON, s.r.o.

**3.3. Vzdělání:** LF UK v Hradci Králové, obor všeobecné lékařství, ukončeno 1998;  
Postgraduální studium, obor Molekulární biologie, virologie a genetika, ukončeno 2006;  
Atestace v oboru Molekulární genetika a vyšetřovací metody v genetice, složena 2006

**3.4. Odborné kurzy:** Mikroinjekce a detekce fluorescenčně značených biomolekul v buňkách tkáňových kultur, Kurz správné laboratorní praxe a zacházení s laboratorními zvířaty, Státní rigorózní zkouška z oboru Molekulární biologie, genetika a imunologie, Atestace v oboru Molekulární genetika a vyšetřovací metody v molekulární genetice

**3.5. Dosavadní praxe:**

- |  |        |
|--|--------|
| • Ústav Molekulární Genetiky AV ČR     | 7 let  |
| • Ústav Hematologie a Krevní Transfuze |        |
| - oddělení PCR diagnostiky leukémií    | 3 roky |
| • Nemocnice Na Homolce                 |        |
| - Laboratoř Molekulární Diagnostiky    | 2 roky |
| z toho práce s GMO:                    | 7 let  |

**3.6. Adresa bydliště:** 5. Května 23, Pchery, 27308, okr. Kladno

**3.7. Kontaktní adresa:** Laboratoř molekulární diagnostiky,  
Laboratoře CHAMBON, s.r.o.  
Evropská 176/16  
160 00 Praha 6

**3.8. Telefon:** 221 985 475

**3.9. Fax:** -

**3.10. E-mail:** pekovas@post.cz

#### **4. Charakteristika nakládání s geneticky modifikovaným organismem**

##### **4.1. Účel uvádění do životního prostředí**

Účelem uvádění GMO do životního prostředí je klinické hodnocení vakcíny BNIT-PRV-301 u mužů s asymptomatickým nebo minimálně symptomatickým metastatickým karcinomem prostaty.

##### **4.2. Předpokládaný výsledek uvádění do životního prostředí**

Výsledky studie a klinického hodnocení v režimu uvádění GMO do životního prostředí budou použity jako jedny z podkladů pro registraci hodnoceného přípravku PROSTVAC-V/F

mezinárodními úřady (FDA/EMA) jako léčivého přípravku pro muže s asymptomatickým nebo minimálně symptomatickým metastatickým karcinomem prostaty.

## **5. Doba uvádění do životního prostředí**

### **5.1. Celková doba uvádění geneticky modifikovaného organismu do životního prostředí a datum jeho předpokládaného zahájení**

Předpokládá se, že nábor do klinického hodnocení BNIT-PRV-301 v EU bude zahájen v lednu roku 2012; dokončení se předpokládá v říjnu roku 2013. Vlastní ukončení klinického hodnocení ve smyslu podávání GMO by nemělo přesáhnout **polovinu roku 2014**.

### **5.2. Závazný harmonogram (rozpis jednotlivých dílčích etap, datum jejich předpokládaného zahájení a doba jejich trvání)**

V České republice se předpokládá zařazení 60 pacientů - Viz synopse protokolu

## **6. Plánuje žadatel uvádění stejného geneticky modifikovaného organismu do životního prostředí v některém členském státě Evropských společenství nebo mimo jeho území?**

Ano, klinické hodnocení se plánuje v zemích EU

### **6.1. Stát, v němž žadatel uvádění do životního prostředí plánuje**

Rakousko (AT), Belgie (BE), Česká Republika (CZ), Dánsko (DK), Německo (DE), Španělsko (ES), Estonsko (EE), Francie (FR), Litva (LT), Nizozemí (NL), Polsko (PL), Velká Británie (GB)

### **6.2. Předpokládanou dobu zahájení a trvání uvádění do životního prostředí**

Předpokládá se, zahájení klinického hodnocení v **prvním čtvrtletí roku 2012**, nábor vhodných se plánuje do konce roku 2013. Vlastní ukončení klinického hodnocení ve smyslu podávání GMO by nemělo přesáhnout **polovinu roku 2014**.

## **7. Podal žadatel žádost pro uvádění stejného geneticky modifikovaného organismu do životního prostředí v některém členském státě Evropských společenství?**

7.1. Stát, ve kterém byla žádost podána - GB (19. říjen 2011)

7.2. Datum podání a číslo nebo jiné označení žádosti – B/GB/11/R44/01

7.3. Datum a označení povolení, bylo-li vydáno – povolení dosud nebylo vydáno

7.4. Období, na které se povolení vztahuje - povolení dosud nebylo vydáno

## **8. Podal žadatel žádost pro uvádění stejného geneticky modifikovaného organismu do životního prostředí nebo do oběhu mimo území Evropských společenství?**

Žadatel této žádosti podává žádost pouze na území CZ.

### **8.1. Stát, ve kterém byla žádost podána**

Vakcína, která je podkladem žádosti již byla schválena v USA, dne 2. listopadu 2011, pod č. jednacím FDA 13946. V dalších zemích mimo EU je k datu podání žádosti v CZ následující stav:

Austrálie – žádost byla předložena, číslo jednací není známo

Canada – žádost byla předložena, číslo jednací není známo

Chile – žádost byla předložena. Žádost nepodléhá schválení, nebude přiděleno žádné číslo jednací

Island – žádost byla předložena 22.11.2011 – Schválení Ministerstvem životního prostředí se nevyžaduje, číslo jednací nebylo přiděleno

Izrael – žádost byla předložena Ministerstvu zdravotnictví je v procesu posuzování. Schválení Ministerstvem životního prostředí se nevyžaduje, číslo jednací není přiděleno

Mexiko - žádost je posuzována - Schválení Ministerstvem životního prostředí se nevyžaduje, číslo jednací není přiděleno

Panama - žádost je posuzována - Schválení Ministerstvem životního prostředí se nevyžaduje, číslo jednací není přiděleno

Rusko – žádost byla předložena 18.11.2011. Schválení Ministerstvem životního prostředí se nevyžaduje, číslo jednací není přiděleno

Švýcarsko – v současné době jsou vyhledávána vhodná centra pro provádění klinického hodnocení. Předpokládá se předložení žádosti. Přesný termín prozatím není znám.

8.2. **Datum podání a číslo nebo jiné označení žádosti** – viz výše

8.3. **Datum a označení povolení, bylo-li vydáno** – viz výše

8.4. **Období, na které se povolení vztahuje** – viz výše

## 9. **Hodnocení rizika uvádění geneticky modifikovaného organismu do životního prostředí**

**(+) Hodnocení rizika dle § 7 zákona včetně dokumentace výsledků předchozích uvádění do životního prostředí:** viz samostatná příloha 1

### 9.1. **Shrnutí hodnocení rizika: Geneticky modifikovaný organismus pro uvádění do životního prostředí**

Předpokládá se, že šíření a dopad PROSTVAC-V/F na ekosystémy jsou omezené vzhledem k tomu, že podání vakcíny probíhá v klinickém centru, za kontrolovaných podmínek. Podání PROSTVAC-V/F subkutánně, použití bandáže, která omezí výskyt viru na místo podání vakcíny, a komplexní poučení zdravotnických pracovníků a pacientů – to vše jsou opatření, která slouží k minimalizaci expozice jiných než cílových živočišných druhů.

Neočekává se tudíž, že uvolnění PROSTVAC-V a PROSTVAC-F tak, jak je v této žádosti popsáno, bude mít nežádoucí dopad na prostředí. Toto posouzení lze podepřít mimo jiné následujícími daty:

- Srovnatelnost rodičovských a rekombinantních virů. PROSTVAC-V a PROSTVAC-F jsou srovnatelné s jejich příslušnými, nerekombinantními rodičovskými viry, pokud jde o charakteristiky růstu a stability v prostředí. Přidané

lidské transgeny nevedly k zásadní změně základních vlastností virů. Proto PROSTVAC-V a PROSTVAC-F ne získaly žádné známé fenotypické vlastnosti, které by zvyšovaly jejich riziko pro prostředí nad rámec rizika, jež je spojené s použitím odpovídajících, nerekombinantních rodičovských virů.

- Minimální riziko genového přenosu. PROSTVAC-V a PROSTVAC-F nemohou infikovat mikroby, hmyz, studenokrevné obratlovce ani rostlinné buňky. S GMO bude nakládáno výlučně v k tomu určených nemocničních prostorech a je zcela nepravděpodobné, že se dostane do styku s jinými živočišnými druhy. Rovněž viry neštovic nejsou schopné propagace bez permissivního hostitelského organismu. U permissivního hostitele jsou infekce virem neštovic přechodné a trvají několik týdnů ([Fenner, 1988](#)). Celý proces replikace viru neštovic probíhá v cytoplazmě; DNA PROSTVAC V/F je tudíž extrachromozomální a není integrovaná ([Moss, 1996](#)). To znamená, že nepodléhá rekombinaci v cílových či jiných než cílových organismech. Viry neštovic z hostitele vymizí během několika dnů v případě PROSTVAC-F a několika týdnů v případě PROSTVAC-V.
- Minimální riziko šíření viru. Klinická hodnocení virového šíření PROSTVAC-V a souvisejících virů neštovic, které vznikly s využitím stejného rodičovského viru jako v případě PROSTVAC-V, ukazují, že k virovému šíření dochází přechodně v místě podání vakcíny. Virové šíření viru neštovic z jiných míst než z místa podání vakcíny je vzácné a nebylo u žádného rekombinantního viru neštovic prokázáno. Subkutánní vakcinace, která je zamýšlenou cestou podávání PROSTVAC-V, snižuje četnost virového šíření v porovnání s běžnou cestou skarifikace, která se používá v případě použití viru kravských neštovic pro vakcínu proti neštovicím. Virové šíření v místě podání vakcíny se zadržuje pomocí bandáže, což ještě více minimalizuje možnost uvolnění do prostředí ([Arlen 2007](#); [Hepburn 2004](#)).
- Minimální riziko přenosu kontaktem. Přenos vakcíny proti neštovicím na bázi viru kravských neštovic kontaktem je vzácný. U člověka nebyl hlášen žádný sekundární přenos rekombinantních virů neštovic včetně PROSTVAC-V a PROSTVAC-F. Riziko přenosu je sníženo uplatňováním všeobecných opatření na straně zdravotnických pracovníků a poučením pacientů o řádné hygieně a řádné péči o místo podání vakcíny.
- Minimální riziko perzistence v životním prostředí. Přestože jsou viry neštovic relativně stabilní, jsou-li uchovávány ve zmražené nebo lyofilizované formě za pečlivě kontrolovaných podmínek ([Fenner, 1988](#)), životaschopnost za normálních podmínek prostředí ztracení během několika dnů nebo týdnů ([Essbauer, 2007](#); [Mahnel, 1987](#); [Mahl, 1975](#); [McDevitt, 2007](#); [Newman, 2003](#); [Pastoret, 1996](#); [Sidwell, 1966](#)). Dále, viry neštovic lze snadno deaktivovat pomocí celé řady čisticích prostředků ([Eterpi, 2009](#)); v případě nahodilého rozlití lze tedy látku účinně eliminovat a není pravděpodobné, že by jeho následkem došlo k šíření PROSTVAC-V nebo PROSTVAC-F do prostředí. Není pravděpodobné, že běžné prostředí bude podporovat propagaci těchto virů, které pro replikaci vyžadují specifické eukaryotické buňky; tyto viry při teplotách prostředí hynou.

- Precedens pro environmentální působení rekombinantních virů neštovic. Rekombinantní viry kravských a ptačích neštovic jsou v současné době komerčně dostupné a v životním prostředí jsou široce distribuovány jako veterinární vakcíny (Meeusen 2007). V souvislosti s používáním těchto rekombinantních vakcín nebyly hlášeny žádné problémy postihující životní prostředí.

## ČÁST B

### DALŠÍ NÁLEŽITOSTI ŽÁDOSTI PRO GENETICKY MODIFIKOVANÉ ORGANISMY JINÉ NEŽ VYŠŠÍ ROSTLINY

#### **1. Charakteristika geneticky modifikovaného organismu**

- 1.1. **Geneticky modifikovaný organismus je:** DNA virus
- 1.2. **České a latinské rodové a druhové jméno geneticky modifikovaného organismu:** Orthopox virus/Virus vakcínie; Avipox virus/Virus ptačích neštovic
- 1.3. **Genetická stabilita**
  - 1.3.1. Opatření k zajištění genetické stability, faktory, které tuto stabilitu ovlivňují  
Vakcína není integrativní, virus se propaguje pouze intracytoplasmaticky, není tedy riziko rekombinace s genetickým materiálem recipientního organismu. Genetická informace viru je stabilní.
  - 1.3.2. Metody ověřování genetické stability  
Nerelevantní, genetickou identitu a stabilitu vakcíny zajišťuje akreditovaným způsobem výrobce vakcíny
  - 1.3.3. Popis dědičných vlastností, které mají vyloučit nebo omezit rozšíření genetického materiálu  
Nerelevantní; vakcína je neintegrativní, virus je v environmentálních podmínkách silně kompromitován.

#### **2. Údaje o příjemci a rodičovském organismu a jejich charakteristika**

- 2.1. **Rodičovský organismus je:** DNA virus
- 2.2. **České a latinské rodové a druhové jméno organismu:** Orthopox virus/Virus vakcínie; Avipox virus/Virus ptačích neštovic
- 2.3. **Původ:** virus Vakcínie a Virus ptačích neštovic
- 2.4. **Plasmidy:** nerelevantní
- 2.5. **Bakteriofágy:** nerelevantní
- 2.6. **Fenotypové a genetické signální znaky:** neintegrativní, cytoplasmaticky se propagující virus
- 2.7. **Stupeň příbuznosti mezi dárcovským organismem a příjemcem:** nulový
- 2.8. **Výskyt a životní podmínky**
  - 2.8.1. **Geografické rozšíření**
    - původní nebo usídlený v České republice – Vaccinia vaccine; Fowlpox vaccine
    - původní nebo usídlený v zemích Evropského společenství - Vaccinia vaccine; Fowlpox vaccine
    - ekosystémy ve kterém se nachází :



Atlantický – Ano, Středozevní – Ano, Boreální – Ano, Alpínský – Ano, Kontinentální – Ano

**2.8.2.** Je organismus běžně používán v České republice? ANO - Vaccinia vaccine; Fowlpox vaccine

**2.8.3.** Je organismu běžně kultivován v České republice? – ANO - Vaccinia vaccine; Fowlpox vaccine

**2.8.4.** Habitat (přirozené výskytíště) organismu: u zvířat

Zástupci Avipoxvirus (APV) se nacházejí na celém světě. Škála hostitelů APV je omezena *in vivo* na určité ptačí druhy. Jeden druh, a sice virus ptačích neštovic, infikuje drůbež a vyvolává u ní onemocnění. Rodičovský virus ptačích neštovic, který byl použit k získání PROSTVAC-F, je nevirulentní vakcinační kmen.

Rodičovský virus kravských neštovic, který byl použit pro vytvoření PROSTVAC-V, představuje kmen New York City Board of Health (NYCBH), s nímž je spojován nejnížší výskyt klinických komplikací po imunizaci ([Fenner, 1988](#)). Otázka vzniku viru kravských neštovic v přírodě a jako vakcíny zůstává zahalena tajemstvím. V době kampaně za eliminaci neštovic se uznávalo dogma, že vakcinační kmeny nedokáží v přírodě přežít, a že divoký typ viru kravských neštovic zanikl. I když ale virus kravských neštovic nemá žádné známé přírodní rezervoáry u zvířat, u viru buvolích neštovic, který byl poprvé izolován v Indii a dosud je kladen do souvislosti se sporadickými propuknutími nemoci v Pákistánu, v Indii, Bangladéši, Rusku, Indonézii, Egyptě a Itálii, byl předložen návrh, že se jedná o poddruh viru kravských neštovic. A dále, po celé Brazílii bylo izolováno několik kmenů viru kravských neštovic. V nedávných studiích byla formulována možnost nezávislého původu severoamerických izolátů VACV, které jsou odlišné od vakcinačních kmenů, jež se na tomto kontinentu používaly během kampaně za eliminaci neštovic ([Trindade, 2007](#)).

## **2.9. Metody identifikace a detekce organismu**

### **2.9.1. Metody detekce včetně údajů o jejich citlivosti, spolehlivosti a specifičnosti**

Detekce a identifikace PROSTVAC-V a PROSTVAC-F se provádí pomocí těchto zkoušek:

- Kvantitativní zkouška FACS pro měření titrů infekčního viru
- Polymerázová řetězová reakce (PCR) vložených genů a spojek rekombinace pro identitu viru
- Transgenní exprese podle Western Blot

Kvantitativní zkouška FACS. Zkouška FACS je kvantitativní zkouška *in vitro*, která potvrzuje expresi virových produktů, TRICOM<sup>®</sup> (B7.1, ICAM-1 a LFA-3) a PSA.

V této zkoušce se provádí inkubace buněk *in vitro* při postupném ředění viru, následuje současný vyhodnocení exprese virových proteinů i transgenních produktů.

Transgenní produkty a virové antigeny se v jednotlivých buňkách detekují pomocí



specifických protilátek konjugovaných s fluorofory, které se detekují pomocí FACS. Vazba protilátek na jejich specifické cíle probíhá po fixaci a permeabilizaci infikovaných buněk. Analýza FACS ukazuje procentuální zastoupení buněk, které jsou infikovány virem, z čehož se počítá titr infekčních jednotek (Inf. U.). Ukazuje také podíl buněk, které exprimují transgeny, z nichž se počítá titr transdukčních jednotek (Txg. U.). Tato zkouška představuje plně validovanou zkoušku síly, která se používá při uvolňování klinických materiálů.

Polymerázová řetězová reakce (PCR) vložených genů a spojek rekombinace. Identita PROSTVAC-V a PROSTVAC-F se prokazuje pomocí kvalitativního testu PCR. Postup lze stručně popsat tak, že pro každý test se provádí extrakce DNA z testovaného vzorku, která se podrobí amplifikaci PCR s využitím specifických primerů, jež jsou homologní vůči sekvencím obklopujícím vložené geny PSA-TRICOM. Výsledné amplikony PCR se vizualizují pomocí elektroforézy na agarózovém gelu a barvení ethidium bromidem a porovnávají se s DNA markery známých velikostí fragmentů. Analýza rekombinantních virů se provádí souběžně s analýzou referenčních standardů PROSTVAC-V/F.

PCR zkoušky identity PROSTVAC-V a PROSTVAC-F byly validovány vzhledem ke spodnímu detekčnímu limitu, specifičnosti, opakovatelnosti (vnitřní přesnost zkoušky) a přechodové přesnosti.

Analýza Western Blot. Tato analýza, která využívá protilátek specifických pro PSA, B7.7, ICAM-1 a LFA-3, slouží ke zkoumání molekulové hmotnosti a identity těchto polypeptidů, které jsou exprimovány savčí buněčnou linií po absorpci rekombinantního viru. Analýza rekombinantních virů se provádí souběžně s analýzou referenčních standardů PROSTVAC-V a PROSTVAC-F. Tato zkouška představuje plně validovanou zkoušku identity, která se používá při uvolňování klinických materiálů.

#### **2.9.2. Metody identifikace včetně údajů o jejich citlivosti, spolehlivosti a specifičnosti**

Viz předchozí bod.

#### **2.10. Je organismus klasifikován podle platných právních předpisů ČR nebo ES týkajících se ochrany zdraví zaměstnanců při práci? Uveďte klasifikaci a příslušný právní předpis**

ANO

Virus kravských neštovic: podle klasifikace Evropského hospodářského prostoru (EHS) pro ochranu pracovníků pracujících s biologickými látkami {směrnice 2000/54/EC} klasifikován jako biologická látka skupiny 2

Virus ptačích neštovic: organismus úrovně 1 biologické bezpečnosti (jak definují Kritéria úrovní laboratorní biologické bezpečnosti amerického Centra pro kontrolu a prevenci nemocí [United States Center for Disease Control and Prevention, Laboratory Biosafety Level Criteria])

- 2.11. Uved'te, zda je organismus patogenní nebo jiným způsobem škodlivý vzhledem k lidem, zvířatům, rostlinám nebo jinak. Týkají se patogenní nebo škodlivé vlastnosti sekvencí použitých při genetické modifikaci?

### **Virus kravských neštovic (PROSTVAC-V)**

**Virus kravských neštovic se používá již déle než 200 let jako vakcína proti neštovicím a jeho bezpečnostní profil je dobře znám.** Podle zkušeností ze Spojených států, publikovaných v roce 1968, je popisováno osm případů úmrtí, k nimž došlo v rámci programu více než 14 miliónu primárních a sekundárních vakcinací proti neštovicím ([Lane, 1969](#)). **Normální reakce na vakcinaci proti neštovicím jsou mírné** a vlastní povahou omezené a patří mezi ně horečka, myalgie, bolest hlavy, únava, zimnice, nevolnost, bolestivost a erytém v místě podání vakcíny, místní lymfadenopatie. Mezi mírné nežádoucí reakce, k nimž může po vakcinaci dojít, jsou bakteriální superinfekce v místě podání vakcíny, erythema multiforme a generalizované kravské neštovice. Mezi velmi vzácné, ovšem závažné a potenciálně život ohrožující nežádoucí příhody patří progresivní kravské neštovice (PV), eczema vaccinatum (EV) a postvaccinační encefalitida (PVE).

Replikace viru kravských neštovic *in vivo* je omezena na určité hostitele z řad teplokrevných obratlovců včetně člověka a živočišných druhů, jako je dobytek, kočky, hlodavci, králíci a prasata. **Nezdá se ovšem, že se tento virus vyskytuje přirozeně u člověka, a také nemá žádný známý rezervoár u zvířat.**

**Virus kravských neštovic vyvolává přechodnou infekci, přičemž k eliminaci virových komponent dochází v průběhu několika týdnů.** Hostitelské buňky infikované virem kravských neštovic přežívají krátce (dny) a odumírají smíšenou formou apoptózy / nekrózy. Virus kravských neštovic se replikuje v cytoplazmě infikovaných buněk a virová DNA se neintegruje do DNA hostitelské buňky. **Tento virus není schopen kolonizovat hostitelské organismy, které infikuje.**

Rodičovský virus kravských neštovic, který byl použit pro vytvoření PROSTVAC-V, byl získán z plakového izolátu (označeného TBC-Wy) z očkovacího roztoku viru, který použila společnost Wyeth Pharmaceuticals k výrobě licencované vakcíny Dryvax<sup>®</sup> proti neštovicím. Tato vakcína představuje kmen New York City Board of Health (NYCBH), s nímž je spojován nejnížší výskyt klinických komplikací po imunizaci ([Fenner, 1988](#)). TBC-Wy i PROSTVAC-V jsou značně více oslabené než Dryvax, měřeno na základě zkoušky neurovirulence u hlodavců (viz bod 5); tyto výsledky ukazují, že **vložení cizích sekvencí do TBC-Wy nezvyšuje virulenci výsledného rekombinantního viru.**

**Pokud jde o toxigenicitu a alergenicitu, ve studiích bezpečnosti na hlodavcích či u non-humánních primátů nebyly zaznamenány žádné biologicky významné změny ani známky nepříznivých toxikologických účinků.** A dále, PROSTVAC-V byl v minulosti podán více než 300 subjektům v osmi klinických hodnoceních fáze 1 a 2 (viz bod 32), přičemž nebyly hlášeny žádné toxické ani alergenní účinky. Nejčastější AE v souvislosti s PROSTVAC-V, které byly dosud pozorovány, zahrnují reakce v místě podání injekce, z nichž všechny vykazovaly stupeň závažnosti  $\leq 2$ .

### **PROSTVAC-F**

Produktivní infekce virem ptačích neštovic je omezena *in vivo* na určité druhy ptactva, k nimž se řadí kuřata, krůty a holubi, a dále *in vitro* na buňky získané od ptačích druhů. V infikovaných, jiných než ptačích buňkách sice dochází ke genové expresi mediované virem ptačích neštovic, ovšem infekce savčích druhů onemocnění nevyvolává. **Virus ptačích neštovic není schopen replikace u savčích druhů a tedy kolonizovat tyto druhy.**

Rodičovský virus ptačích neštovic, který byl použit pro vytvoření PROSTVAC-F, označený TBC-FPV, představoval plakový izolát z vakcinačního kmene FPV (POXVAC-TC<sup>®</sup>) upraveného pomocí tkáňové kultury. POXVAC-TC je vakcína určená pro drůbež na základě licence USDA, kterou vyrábí Schering-Plough Corporation. Na základě používání POXVAC-TC **nebyly hlášeny žádné nepříznivé účinky na životní prostředí, jiné ptačí druhy ani osoby zacházející se zvířaty.**

V rámci zkoušky neurovirulence u hlodavců jsou TBC-FPV i PROSTVAC-F významně více oslabené než vakcína Dryvax proti neštovicím. Pokud jde o **toxigenicitu a alergenicitu**, ve studiích bezpečnosti na hlodavcích či u non-humánních primátů nebyly zaznamenány žádné biologicky významné změny ani známky nepříznivých toxikologických účinků. A dále, PROSTVAC-F byl v minulosti podán více než 300 subjektům v osmi klinických hodnoceních fáze 1 a 2 (viz bod 32), přičemž nebyly hlášeny žádné toxické ani alergenní účinky.

## **2.12. Rozmnožování**

### **2.12.1. Generační doba v přirozeném prostředí**

**Virus kravských neštovic:** nerelevantní, virus bez známých přírodních zvířecích rezervoárů

**Virus ptačích neštovic:** Virus ptačích neštovic, který byl použit pro vytvoření PROSTVAC-F je celosvětově užívaný v prevenci onemocnění drůbeže virem ptačích neštovic. Není virulentní a nezpůsobuje onemocnění.

Standardní virus ptačích neštovic způsobuje pomalé šíření virové infekce kuřat a krůt. Onemocnění trvá u jednotlivých ptáků 3-5 týdnů. U infikovaných ptáků se virus replikuje v cytoplazmě buněk, v nichž vyvolává charakteristické změny 4-6dnů od počátku infekce.

### 2.12.2. Generační doba v ekosystému, do kterého má být geneticky modifikovaný organismus uváděn

GMO (Prostac- F/V) bude užito pouze v rámci výše uvedeného klinického hodnocení do nějž se předpokládá zařazení přibližně 60 pacientů na území České republiky.

U člověka nebyl hlášen žádný sekundární přenos rekombinantních virů neštovic včetně PROSTVAC-V a PROSTVAC-F při kontaktu. Potenciální cestou uvolnění PROSTVAC do prostředí je nicméně šíření viru během klinických hodnocení. **Šíření viru kravských neštovic je přechodné a dochází k němu primárně v místě vakcinace; nebylo prokázáno, že by k němu docházelo na jiných místech včetně nosu, krku, moči a stolice. Četnost šíření viru je snížena po subkutánní vakcinaci rekombinantním virem kravských neštovic, což je zamýšlená cesta podávání PROSTVAC-V; dále se virus omezuje na místo vakcinace pomocí bandáže.**

**Šíření rekombinantního viru avipox po vakcinaci nebylo zjištěno v krvi, ve slinách, v moči ani v rektálních výtěrech.** DNA viru byla zjištěna v místě podání injekce, ovšem přítomnost živého viru nebyla stanovena. Proto se zdá, že šíření viru avipox u člověka, pokud k němu dojde, je omezeno na místo vakcinace.

Na základě vylučovacích kritérií klinického hodnocení, která jsou nastíněna v protokolu, jsou pacienti vyloučeni z účasti tehdy, pokud je u nich potenciál, že se dostanou do kontaktu s jednotlivci, kteří se z hlediska sekundárního přenosu PROSTVAC-V/F považují za rizikové v případě, že by subjekt vakcinační virus šířil. Tato vylučovací kritéria skýtají pravidla pro rozsah kontaktu, kterému je třeba zabránit, aby bylo minimalizováno riziko přenosu na tyto populace. Vylučovací kritéria, spolu se zaškolením očkovanych jedinců v tom, jak mají o místo vakcinace řádně pečovat, jak mají řádně dodržovat hygienu rukou, a že se mají vyvarovat kontaktu s rizikovými osobami, nabízejí přiměřenou a účinnou profylaxi před nahodilým kontaktem s virem kravských neštovic.

### 2.12.3. Způsob rozmnožování

viry neštovic nejsou schopné propagace bez permissivního hostitelského organismu. U permissivního hostitele jsou infekce virem neštovic přechodné a trvají několik týdnů ([Fenner, 1988](#)). Celý proces replikace viru neštovic probíhá v cytoplazmě; DNA PROSTVAC V/F je extrachromozomální a není integrovaná ([Moss, 1996](#)), nepodléhá procesům jež by mohly vést ke změně jejího uspořádání nebo rekombinaci v cílových či jiných než cílových organismech.

### 2.12.4. Specifické faktory, které ovlivňují rozmnožování

Virus kravských i ptačích neštovic je rychle inaktivován běžnými dezinfekčními prostředky. Kromě chemických léků jsou viry inaktivovány rovněž UV zářením a působením ke zvýšení teploty. Například při skladovací teplotě 25 ° C, viry ztrácejí životaschopnost v průběhu týdnů, při skladování ve vodě, a po dobu dní při sušení.

## **2.13. Schopnost přežití**

### 2.13.1. Schopnost vytvářet odolné přežívající formy - nerelevantní

## 2.14. Šíření v prostředí

### 2.14.1. Způsob a rozsah šíření

Kontaktní přenos rekombinantního viru vakcinie včetně PROSTVAC-V, nebyl u člověka hlášen. Přenos rekombinantního viru vakcinie mezi zvířaty v těsném kontaktu byl prokázán po orální vakcinaci, nikoliv po subkutánní vakcinaci.

Kontaktní přenos rekombinantního viru avipox, včetně PROSTVAC-F nebyl u člověka hlášen. Přenos rekombinantní vakcíny založené na kmenech viru avipox je vzácný a byl pozorován pouze u kuřat.

### 2.14.2. Specifické faktory ovlivňující šíření

Potenciál pro únik, šíření či zabudování přípravků PROSTVAC-V nebo PROSTVAC-F v životním prostředí je nízký. Poxviry nelze reprodukovat bez vnímavé hostitelské buňky. Replikace viru Vakcinie je omezena na specifické hostitelské teplokrevné obratlovce. Virus vakcinie nemá žádné známé přirozené zvířecí rezervoáry. Rozsah hostitelů viru Avipox je omezen *in vivo* na určité druhy ptáků.

Viry neštovic nejsou schopny tvořit spory nebo jiné specializované struktury ke zvýšení přežití v životním prostředí. Rovněž je zcela zanedbatelné riziko jejich replikace v životním prostředí, neboť pro replikaci vyžadují specifické eukaryotické buňky a při běžné laboratorní teplotě hynou.

Minimální riziko šíření viru: Klinická hodnocení virového šíření PROSTVAC-V a souvisejících virů neštovic, které vznikly s využitím stejného rodičovského viru jako v případě PROSTVAC-V, ukazují, že k virovému šíření dochází přechodně v místě podání vakcíny. Virové šíření viru neštovic z jiných míst než z místa podání vakcíny je vzácné a nebylo u žádného rekombinantního viru neštovic hlášené. Subkutánní vakcinace, která je zamýšlenou cestou podávání PROSTVAC-V, snižuje četnost virového šíření v porovnání s běžnou cestou skarifikace, která se používá v případě použití viru kravských neštovic pro vakcínu proti neštovicím. Virové šíření v místě podání vakcíny se zadržuje pomocí bandáže, což ještě více minimalizuje možnost uvolnění do prostředí ([Arlen 2007](#); [Hepburn 2004](#)).

Minimální riziko přenosu kontaktem. Přenos vakcíny proti neštovicím na bázi viru kravských neštovic kontaktem je vzácný. U člověka nebyl hlášen žádný sekundární přenos rekombinantních virů neštovic včetně PROSTVAC-V a PROSTVAC-F. Riziko přenosu je sníženo uplatňováním všeobecných opatření na straně zdravotnických pracovníků a poučením pacientů o řádné hygieně a řádné péči o místo podání vakcíny.

Minimální riziko perzistence v životním prostředí. Přestože jsou viry neštovic relativně stabilní, jsou-li uchovávány ve zmražené nebo lyofilizované formě za pečlivě kontrolovaných podmínek ([Fenner, 1988](#)), životaschopnost za normálních podmínek prostředí ztrácí během několika dnů nebo týdnů ([Essbauer, 2007](#); [Mahnel, 1987](#); [Mahl, 1975](#); [McDevitt, 2007](#); [Newman, 2003](#); [Pastoret, 1996](#); [Sidwell, 1966](#)). Dále, viry neštovic lze snadno deaktivovat pomocí celé řady čisticích prostředků ([Eterpi, 2009](#)); v případě nahodilého rozlití lze tedy látku účinně eliminovat a není pravděpodobné, že by jeho následkem došlo k šíření PROSTVAC-V nebo PROSTVAC-F do prostředí. Není pravděpodobné, že běžné prostředí

bude podporovat propagaci těchto virů, jelikož pro replikaci vyžadují specifické eukaryotické buňky a při teplotách prostředí hynou.

Precedens pro environmentální působení rekombinantních virů neštovic. Rekombinantní viry kravských a ptačích neštovic jsou v současné době komerčně dostupné a v životním prostředí jsou široce distribuovány jako veterinární vakcíny (Meeusen 2007). V souvislosti s používáním těchto rekombinantních vakcín nebyly hlášeny žádné problémy postihující životní prostředí.

**2.15. Přirození predátoři, symbionti a hostitelé - nerelevantní**

**2.16. Další možnosti interakce s jinými organismy - nerelevantní**

**2.16.1. Další specifické faktory umožňující přežití – viz bod 2.14.2**

**2.16.2. Schopnost přežití v jednotlivých ročních obdobích – viz bod 2.14.2**

**2.17. Možný mezibuněčný přenos genetického materiálu mezi dárce (rodičovským organismem) a dalšími organismy**

Mezi dárcovským organismem (*Homo sapiens*) a organismem příjemců (virus kravských a ptačích neštovic) k žádné přirozené výměně genetického materiálu nedochází. Životní cyklus viru neštovic probíhá v cytoplazmě (Moss, 1996); viry neštovic se neintegrují do genomu infikované buňky. Vzhledem k fyzikálnímu oddělení lidského genomu a genomu viru je přirozená výměna genetického materiálu mezi dárce a příjemcem nepravděpodobná. Pokud jde o virus ptačích neštovic, je výskyt genetické výměny rovněž vyloučen vzhledem k chybějící schopnosti replikace viru ptačích neštovic u savčích druhů.

**2.17.1. Způsob přenosu - nerelevantní**

**2.17.2. Organismy, se kterými probíhá přirozená výměna genetického materiálu - nerelevantní**

**2.18. Ověření genetické stability organismu a faktory, které tuto stabilitu ovlivňují**

Genetická stabilita PROSTVAC-V a PROSTVAC-F byla stanovena s využitím řady různých metodologií. Je sekvenován celý genom viru Working Seed Virus (WSV) a celý genom jedné výrobní šarže PROSTVAC-V a PROSTVAC-F. Dále je pro každou výrobní šarži prokázána identita na základě PCR, Western blot a analýzy restrikčních míst. Uvedené přístupy determinace genetické stability vakcíny jsou akreditovaně prováděny výrobcem vakcíny a nejsou předmětem předkládané žádosti.

**2.19. Zapojení do environmentálních procesů**

Prostvac-V/F se do environmentálních procesů nezapojují.

**2.20. Vlastní vektory organismu: nejsou známy**

**2.21. Předchozí genetické modifikace rodičovského organismu povolené v České republice (včetně data a čísla povolení) - nerelevantní**



### 3. Údaje o genetické modifikaci

#### 3.1 Typ genetické modifikace:

PROSTVAC – V: vnesení cizorodého genetického materiálu

PROSTVAC – F: vynětí části dědičného materiálu

PROSTVAC-V. V případě PROSTVAC-V se geny PSA a TRICOM vkládají na jediné místo v oblasti Hind F (*Goebel, 1990*) rodičovského viru TBC-Wy. Tyto čtyři geny se vkládají do intergenové oblasti mezi otevřenými čtecími rámci F12L a F13L.

PROSTVAC-F. V případě PROSTVAC-F se geny PSA a TRICOM ~~všechny~~ vkládají na jediné místo v genomu rodičovského viru. Vložením lidských genů do PROSTVAC-F byl u TBC-FPV narušen jeden gen ptačích neštovic. Nepředpokládá se, že deaktivace genu FPV246, který má homologii s repetitivním ankyrinem (*Afonso, 2000*), bude mít na vlastnosti viru ptačích neštovic prokazatelný negativní účinek.

#### 3.2. Zamýšlený výsledek genetické modifikace

Zamýšleným výsledkem genetické modifikace bylo získat rekombinantní viry kravských a ptačích neštovic, které by byly užitečné při léčbě rakoviny prostaty. PROSTVAC-V a PROSTVAC-F jsou terapeutické vakcíny, které byly navrženy tak, aby dodávaly antigen PSA související s nádorem do buněk prezentujících antigen (APC), kde poté dochází k jeho zpracování a expimaci na povrchu APC v rámci hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), což vede k aktivaci T-buněk (*Essajee, 2004; Schlom, 2008*). Za účelem posílení imunogenicity exprimovaného PSA exprimují PROSTVAC-V a PROSTVAC-F také tři lidské kostimulační molekuly označované jako TRICOM. Vakcinace pomocí PROSTVAC-V vede v infikovaných buňkách k současné expresi epitopů PSA v kombinaci s kostimulačními molekulami. Předpokládá se, že koexprese PSA v kontextu molekul TRICOM posiluje imunitní odpověď T-buněk na PSA. Tyto imunitní odpovědi na PSA jsou poté posíleny vícečetnými imunizacemi pomocí příslušného rekombinantního viru ptačích neštovic, PROSTVAC-F.

#### 3.3. Byl při genetické modifikaci použit vektor? – ANO (Plazmid)

##### 3.3.1 Je vektor zcela nebo částečně přítomen ve výsledném geneticky modifikovaném organismu? – ANO

##### 3.3.2 Typ vektoru + mapa vektoru

Typ vektoru:

PROSTVAC – V: Plazmid vector pT2240

PROSRVAC – F: Plazmid vector pT2246

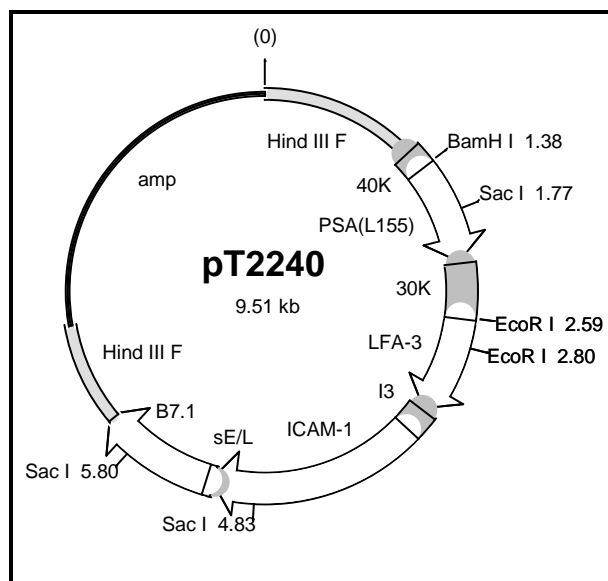
Rekombinantní viry neštovic se získávají homologní rekombinací v rámci infikované buňky, mezi DNA viru neštovic a plazmidovým vektorem, jenž je nositelem heterologních sekvencí určených k vložení. Plazmidový vektor obsahuje jeden nebo více chimérických genů, z nichž



každý zahrnuje promotor viru neštovic navázaný na sekvenci kódující protein; genové sekvence určené k vložení jsou obklopené virovými sekvencemi z neesenciální oblasti genomu viru neštovic. Plazmid se přenáší do primárních buněk fibroblastů kuřecích embryí (CEF), infikovaných rodičovským virem kravských nebo ptačích neštovic; výsledkem rekombinace mezi sekvencemi viru neštovic na plazmidu a příslušné DNA ve virovém genomu je vložení chimérických genů na plazmidu do virového genomu.

**PROSTVAC-V.** Plazmidový vektor (pT2240) použitý k vložení genů PSA a TRICOM do genomu rodičovského viru kravských neštovic s využitím rekombinace je znázorněn na **obrázku 2**. Tento vektor obsahuje následující prvky:

- prokaryotický počátek replikace, který umožňuje amplifikaci vektoru v bakteriálním hostiteli,
- rezistence kódování genu vůči antibiotiku ampicilinu, jež umožňuje selekci prokaryotických hostitelských buněk, které obsahují plazmid,
- DNA sekvence homologní vůči oblasti Hind III F genomu kravských neštovic, které řídí vložení cizích sekvencí do této oblasti prostřednictvím homologní rekombinace; tato obklopující sekvence rovněž zahrnuje gen F13L kravských neštovic, jenž kóduje protein obalu 37K,
- chimérický gen, který zahrnuje promotor transkripce 40K kravských neštovic, navázaný na gen PSA,
- druhý chimérický gen, který zahrnuje promotor transkripce 30K kravských neštovic, navázaný na gen LFA-3,
- třetí chimérický gen, který zahrnuje promotor transkripce I3 kravských neštovic, navázaný na gen ICAM-1,
- čtvrtý chimérický gen, který zahrnuje promotor transkripce sE/L, navázaný na gen B7.1



**Obrázek 2: Mapa plazmidového vektoru pT2240**

**PROSTVAC-F.** Vektor plazmidu (pT2246) použitý k vložení genů PSA a TRICOM do genomu rodičovského viru ptačích neštovic prostřednictvím homologní rekombinace je znázorněn na **obrázku 2**. Tento vektor obsahuje následující prvky:

- prokaryotický počátek replikace, který umožňuje amplifikaci vektoru v bakteriálním hostiteli,
- gen pro rezistenci vůči antibiotiku ampicilinu, jež umožňuje selekci prokaryotických hostitelských buněk, které obsahují plazmid,
- DNA sekvence homologní s oblastí BamH I J genomu ptačích neštovic, které řídí vložení cizích sekvencí do této oblasti prostřednictvím homologní rekombinace,
- gen *E. coli lacZ*, obklopený repetitivními sekvencemi,
- chimérický gen, který zahrnuje promotor transkripce 40K kravských neštovic, navázaný na gen PSA (L155),
- chimérický gen, který zahrnuje promotor transkripce 30K kravských neštovic, navázaný na gen LFA-3,
- chimérický gen, který zahrnuje promotor transkripce I3 kravských neštovic, navázaný na gen ICAM-1,
- chimérický gen, který zahrnuje promotor transkripce sE/L, navázaný na gen B7.1.

### 3.3.3 Identita vektoru

Plazmidová páteřní část, včetně bakteriálního počátku replikace a genu rezistence na ampicilin, byla získána z plazmidového vektoru pUC8 (Viera, 1982), a sice delecí fragmentu Hae II o 442 párech bází (bp), jenž obsahuje polylinkery pUC8 a gen *lacZ*. Za účelem usnadnění dalšího klonování byl do specifického místa Nde I vložen linker obsahující unikátní místo Hind III.

### 3.3.4 Spektrum hostitelů vektoru

Propagace plazmidového vektoru pUC8 probíhá v *E. coli*.

### 3.3.5 Přítomnost sekvence v dotyčném vektoru, která předává výběrový (selektovaný) nebo identifikovatelný fenotyp

Odolnost vůči antibiotikům: Páteřní část plazmidu sice obsahuje gen rezistence na ampicilin, jenž umožňuje selekci v bakteriálních buňkách, ovšem ve finálním GMO není gen rezistence na ampicilin přítomen.

Odolnost vůči těžkým kovům – nerelevantní

Odolnost vůči pesticidům – nerelevantní

Odolnost vůči pesticidům – nerelevantní

Jiné - nerelevantní

### 3.3.6 Dílčí fragmenty vektoru a jejich přítomnost ve výsledném geneticky modifikovaném organismu

Ve finálních geneticky modifikovaných organismech jsou přítomny pouze geny PSA a TRICOM, spolu s regulačními sekvencemi viru neštovic. Nejsou přítomny žádné zbytkové fragmenty vektoru pUC8.

Plazmidové vektory, které jsou použity k získání PROSTVAC-V a PROSTVAC-F, obsahují DNA sekvence kódující geny PSA a TRICOM, spolu s regulačními sekvencemi (promotory) viru neštovic, které řídí jejich expresi u buněk infikovaných virem neštovic. Tyto genové sekvence jsou obklopeny oblastmi genomu, které umožňují homologní rekombinaci mezi přenosovým plazmidem a genomem viru kravských, resp. ptačích neštovic. Páteřní část každého přenosového plazmidu obsahuje bakteriální počátek replikace a gen rezistence na ampicilin, což umožňuje selekci a propagaci plazmidů v bakteriálních buňkách; ve finálních rekombinantních virech jsou nicméně přítomné pouze geny PSA a TRICOM, spolu s regulujícími sekvencemi viru neštovic.

### 3.3.7 Metody vnesení vektoru do organismu příjemce

Metodou vložení je **transfekce**

Plazmidový vektor se přenáší transfekcí metodou precipitace fosforečnanem vápenatým (Graham, 1973) do primárních buněk fibroblastů kuřecích embryí (CEF), infikovaných rodičovským virem kravských nebo ptačích neštovic; výsledkem rekombinace mezi sekvencemi viru neštovic na plazmidu a příslušné DNA ve virovém genomu je vložení chimérních genů kódovaných plazmidem do virového genomu.

**3.3.8 Údaje o tom jak dalece je daný vektor omezen na sekvenci nukleové kyseliny, potřebné k zajištění zamýšlené funkce a zda obsahuje sekvence, jejich produkt nebo funkce nejsou známy**

PROSTVAC-V. V případě PROSTVAC-V se geny PSA a TRICOM všechny vkládají na unikátní místo v oblasti Hind F ([Goebel, 1990](#)) rodičovského viru TBC-Wy. Tyto čtyři geny se vkládají do intergenové oblasti mezi otevřenými čtecími rámci F12L a F13L.

PROSTVAC-F. V případě PROSTVAC-F se geny PSA a TRICOM všechny vkládají na unikátní místo v genomu rodičovského viru. Vložením lidských genů do PROSTVAC-F byl u TBC-FPV narušen jeden gen ptačích neštovic. Nepředpokládá se, že deaktivace genu FPV246, který má homologii s repetitivním ankyrinem ([Afonso, 2000](#)), bude mít na vlastnosti viru ptačích neštovic detekovatelný negativní účinek.

**3.4. Pokud nebyl při genetické modifikaci použit vektor, metoda vnesení insertu do organismu příjemce – nerelevantní**

**3.5. Metody a kritéria použitá pro selekci – nerelevantní, zajišťováno výrobcem vakcíny**

**4. Údaje o insertu**

**4.1.Údaje o každé části insertu, případně o každé vyňaté části dědičného materiálu, se zvláštním zřetelem k jakýmkoli škodlivým sekvencím**

V případě PROSTVAC-V i PROSTVAC-F obsahuje vložený úsek kódující sekvence čtyř lidských transgenů (PSA, B7.1, ICAM-1 a LFA-3), spolu s jejich přidruženými oblastmi řízení transkripce.

**4.1.1 Velikost** – celková velikost transgenů společně s regulačními sekvencemi není výrobcem vakcíny uváděna, vzhledem k velikosti jednotlivých subgenů se však jedná o tisíce bazí

**4.1.2. Sekvence**

**Promotory transkripce.** Prvek promotoru 40K byl izolován jako fragment 161 bp Dra I – FnuD II z viru kravských neštovic, oblast Hind III H ([Rosel, 1986](#)). Prvek promotoru 30K (M2L) byl izolován jako fragment 415 bp Sal I – Rsa I z genomu viru kravských neštovic, oblast Hind III M ([Goebel, 1990](#)). Prvek promotoru I3 byl izolován pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) 201 bp sekvence, 5' vůči kodonu zahájení translace genu I3 ([Schmitt, 1988](#)).

**4.1.3. Původ**

**Promotory transkripce.** Prvek promotoru 40K byl izolován jako fragment 161 bp Dra I – FnuD II z viru kravských neštovic, oblast Hind III H ([Rosel, 1986](#)). Prvek promotoru 30K (M2L) byl izolován jako fragment 415 bp Sal I – Rsa I z genomu viru kravských neštovic, oblast Hind III M ([Goebel, 1990](#)). Prvek promotoru I3 byl izolován pomocí polymerázové

řetězové reakce (PCR) 201 bp sekvence, 5' vůči kodonu zahájení translace genu I3 ([Schmitt, 1988](#)).

**Gen PSA.** Gen kódující PSA byl izolován v Národním ústavu pro rakovinu, USA (National Cancer Institute) amplifikací polymerázovou řetězovou reakcí cDNA získané z RNA z lidské LNCaP buněčné linie (CRL 1740, americká sbírka typových kultur (ATCC), Rockville, MD), pocházející z metastatické léze adenokarcinomu prostaty ([Horoszewicz, 1983](#)). Analýza sekvence nukleotidů ukázala, že sekvence této cDNA je identická s publikovanou sekvencí s výjimkou jediné nukleotidové záměny, která má za následek změnu rezidua aminokyseliny 658 z asparaginu na tyrosin ([Lundwall, 1987](#)). Gen PSA byl poté modifikován mutagenezí *in vitro* tak, aby expimoval protein v plné délce, jenž obsahuje jeden změněný epitop, o němž bylo zjištěno, že podporuje imunogenicitu ([Terasawa, 2002](#)). Tato mutace vedla ke změně kódované aminokyseliny na pozici 155 z izoleucinu na leucin. Modifikovaný gen PSA byl omezen na fragment 786 bp, který tvoří celou kódující sekvenci PSA ([Lundwall, 1987](#)).

**Gen LFA-3.** Gen kódující LFA-3 byl izolován v Národním ústavu pro rakovinu, USA, PCR amplifikací cDNA získané z lidské sleziny (Clontech Inc.) s využitím publikované sekvence ([Wallner, 1987](#)). Tento gen byl omezen na fragment 753 bp, který tvoří celou kódující sekvenci LFA-3.

**Gen ICAM-1.** Gen kódující ICAM-1 byl izolován v Národním ústavu pro rakovinu, USA, pomocí PCR amplifikace cDNA reverzně transkribované z RNA z B buněčné linie transformované virem Epsteina a Barrové, odebrané zdravému muži, s využitím publikované sekvence ([Staunton, 1988](#)). Tento gen byl omezen na fragment 1599 bp, který tvoří celou kódující sekvenci ICAM-1.

**Gen B7.1.** Gen kódující B7.1 byl izolován v Národním ústavu pro rakovinu, USA, pomocí PCR amplifikace cDNA získané z RNA z lidské buněčné linie Raji (ATCC # CCL 86), s využitím publikované sekvence ([Chen, 1992](#)). Tento gen byl omezen na fragment 867 bp, který tvoří celou kódující sekvenci B7.1.

#### 4.1.4. Funkční charakteristika

Funkce každé z částí vloženého úseku ve finálních geneticky modifikovaných organismech jsou následující:

- (1) Chimérický gen, který obsahuje promotor transkripce 40K viru kravských neštovic, navázaný na PSA gen, řídí expresi prostatického specifického antigenu souvisejícího s nádorem v lidských buňkách. Exprimovaný antigen PSA se poté zpracovává a exprimuje na povrchu buněk prezentujících antigen (APC) v rámci hlavního histokompatibilního komplexu (MHC).
- (2) Tři hlavní chimérické geny, které tvoří TRICOM (tj. chimérický gen, který zahrnuje promotor transkripce 30K viru kravských neštovic, navázaný na gen LFA-3; chimérický gen, který zahrnuje promotor transkripce I3 viru kravských neštovic, navázaný na gen ICAM-1; a dále chimérický gen, který zahrnuje promotor transkripce sE/L, navázaný na gen B7.1), řídí expresi těchto tří lidských kostimulačních molekul.

Vakcinace pomocí PROSTVAC-V vede v infikovaných buňkách k současné expresi epitopů PSA v kombinaci s kostimulačními molekulami. Předpokládá se, že koexprese PSA v kontextu molekul TRICOM posiluje imunitní odpověď T-buněk na PSA. Tyto imunitní odpovědi na PSA jsou poté posíleny vícečetnými imunizacemi pomocí příslušného rekombinantního viru ptačích neštovic, PROSTVAC-F.

#### **4.2 Umístění insertu v organismu příjemce**

Insert je v organismu příjemce přítomen jako extrachromozomální, cytoplasmatický, exprimující se genový segment.

#### **4.3 Obsahuje insert část, jejichž produkty nebo sekvence nejsou známy?**

Produkty a funkce všech prvků vloženého úseku jsou známy.

#### **4.4 Údaje o tom jak dalece je insert omezen na sekvence nukleové kyseliny, potřebné k zajištění zamýšlené funkce.**

Insert obsahuje geny výše popsané biologické funkce a jejich nezbytné regulační sekvence.

#### **4.5 Údaje o tom, zda se sekvence obsažené v insertu podílejí jakýmkoli způsobem na patogenních nebo škodlivých vlastnostech dárcovského organismu nebo vektoru.**

Vložené sekvence se žádným způsobem nepodílejí na patogenních nebo škodlivých vlastnostech dárcovského organismu nebo vektoru.

#### **4.6 Struktura a velikost každého úseku nukleové kyseliny původem z vektoru anebo dárcovského organismu, která zůstala v konečném geneticky modifikovaném organismu, včetně metod a údajů potřebných i identifikaci vložených sekvencí.**

Potvrzení identity a genomické struktury PROSTVAC-V a PROSTVAC-F bylo provedeno digescí restrikčním enzymem s využitím tří různých enzymů a Southern blot hybridizací s využitím sond specifických pro virus kravských, resp. ptačích neštovic, a také sond specifických pro PSA, LFA-3, ICAM-1 a B7.1. Byla provedena analýza každého rekombinantního viru souběžně s rodičovským virem a plazmidem, jenž byl použit pro homologní rekombinaci. Veškeré kontrolní analýzy byly provedeny výrobcem vakcíny.

K prozkoumání molekulární hmotnosti a k identifikaci proteinů, které exprimují rekombinantní viry, byla použita analýza Western blot s využitím protilátek specifických pro PSA a tři proteiny TRICOM.

#### **4.7 V případě vynětí části dědičného materiálu (delece) velikost a funkce vyňatého úseku nukleové kyseliny – nerelevantní**

#### **4.8 Počet kopií vloženého dědičného materiálu – každý virus transgenní vakcíny obsahuje pouze jeden element kazety nesoucí transgen.**

#### **4.9 Stabilita dědičného materiálu a stabilita jeho umístění - viz body 2.9.1 a 4.6.**

### **5. Informace o dárcovském organismu (organismus ze kterého je inzerent odvozen)**

#### **5.1. Dárcovský organismus**

Dárcovským organismem je člověk

**5.2. České a latinské rodové a druhové jméno dárcovského organismu s přesným určením kultivaru (odrůdy, rasy, plemene, linie, formy, hybridu, kmene, patovaru)**  
Homo sapiens

**5.3. Uved'te, zda je dárcovský organismus patogenní nebo jiným způsobem škodlivý (živý nebo neživý, včetně mimobuněčných produktů). Pokud ano, uved'te, zda vzhledem k lidem, zvířatům, rostlinám nebo jinak. Škodlivost vždy jednoznačně identifikujte.**

Dárcovský organismus není škodlivý

**5.4. Je dárcovský organismus klasifikován podle platných právních předpisů nebo ES týkajících se ochrany zdraví zaměstnanců při práci?**

Nerelevantní

**5.5. Vyměňují si příjemce a dárcovský organismus genetický materiál přirozeným způsobem?**

Mezi dárcovským organismem a organismem příjemce nedochází k přirozené výměně genetického materiálu.

## **6. Údaje o výsledném geneticky modifikovaném organismu**

### **6.1 Popis dědičných vlastností a fenotypových znaků, které byly změněny v důsledku genové modifikace**

PROSTVAC-V a PROSTVAC-F jsou viry kravských, resp. ptačích neštovic, do nichž byly vloženy geny kódující modifikovaný lidský PSA a tři lidské imunoregulační molekuly B7.1, ICAM-1 a LFA-3 (označují se jako TRIad of COstimulatory Molecules, tj. třída kostimulačních molekul neboli **TRICOM<sup>TM</sup>**). PROSTVAC-V i PROSTVAC-F tyto čtyři vložené lidské geny exprimují.

Vložením lidských genů do PROSTVAC-V nedochází k přerušení žádných genů kravských neštovic; v případě PROSTVAC-F dochází vložením genů k deaktivaci jediného genu, a sice FPV246. Nepředpokládá se, že deaktivace genu FPV246, který má homologii vůči rodině genů s repetitivním ankyrinem, bude mít na vlastnosti viru ptačích neštovic detekovatelný negativní účinek.

Jedinými exogenními geny, které jsou přítomny v PROSTVAC-V a PROSTVAC-F, jsou geny kódující lidský PSA, B7.1, LFA-3 a ICAM-1, spolu s regulujícími sekvencemi (promotory) viru neštovic, které řídí jejich expresi v buňkách infikovaných virem neštovic.

S výjimkou schopnosti exprimovat lidský PSA a geny TRICOM jsou tudíž genetické znaky a fenotypické charakteristiky PROSTVAC-V a PROSTVAC-F v zásadě stejné jako rodičovské vakcinační kmeny viru kravských neštovic a viru ptačích neštovic.

#### **6.1.1 Liší se geneticky modifikovaný organismus od příjemce ve schopnosti přežít? Pokud ano jednoznačně identifikujte**



PROSTVAC-V ani PROSTVAC-F nevykazují žádné známé fenotypické změny (např. změny virulence nebo růstové zvýhodnění) v porovnání s nerekombinantními rodičovskými geny neštovic, které byly získány z licencovaných vakcín.

### PROSTVAC-V

Virus kravských neštovic je relativně stabilní, je-li uchováván při nízkých teplotách. To přispívá k úspěšnosti programu vakcinace proti neštovicím v rozvinutých zemích, kde možnost jeho zmrazení byla snadno dostupná. Po skladování vakcíny při teplotách prostředí ovšem její síla rychle klesala, což mělo začátkem 20. století za následek vysoký podíl neúspěšných vakcinací v rozvojových zemích. Bylo nutno vynaložit značné úsilí k tomu, aby se podařilo vyvinout suchou vakcínu, která je stabilní při teplotách prostředí ([Fenner, 1988](#)). Prosté sušení vedlo k variabilní stabilitě. Dokonce i komplexní podmínky sušení často dávaly neuspokojivé výsledky. Postupně se dařilo dosahovat zlepšení, přičemž vhodné podmínky lyofilizace byly nakonec optimalizovány v 50. letech 20. století, což přispělo ke konečnému úspěchu globálního programu vakcinace proti neštovicím.

Viry neštovic mají schopnost přežít po značně dlouhou dobu v sušeném materiálu, například v odloupených strupech po vakcinaci. Jsou také relativně stabilní, jsou-li uchovávány ve zmrazeném nebo lyofilizovaném stavu, za pozorně regulovaných podmínek. Jejich stabilita ovšem při rostoucí teplotě významně klesá. Za normálních podmínek prostředí se předpokládá, že PROSTVAC-V i PROSTVAC-F ztrácejí životaschopnost během dnů nebo týdnů.

Na téma regenerace nerekombinantního viru kravských neštovic za různých laboratorních podmínek nastavených tak, aby imitovaly expozici v prostředí, bylo publikováno několik studií. Přežití viru se hodnotilo například na textiliích a potravinách ([Sidwell, 1966](#); [Pastoret, 1996](#); [Essbauer, 2007](#)), v suchém stavu nebo v kapalině (včetně solného roztoku, pitné vody, sterilně filtrované vody jezerní nebo říční, srážkové vody, srážkové vody obohacené fetálním telecím sérem nebo smíšené se zeminou pro pokojové rostliny) ([Mahnel, 1977](#); [Mahnel, 1987](#); [Essbauer, 2007](#)), za různých podmínek relativní vlhkosti, teploty či pH ([Mahl, 1975](#); [Newman, 2003](#)), při expozici vzduchu nebo ve vzduchotěsných nádobách ([Mahnel, 1987](#)). Mezi těmito publikovanými experimenty je řada rozdílů, mezi něž lze řadit různé kmeny viru kravských neštovic, různé techniky přípravy, různé počáteční titry viru a metody titrace viru. Všechny tyto studie nicméně skýtají jednoznačná data jednak o tom, že virus kravských neštovic je relativně stabilní za různých laboratorních podmínek, a jednak že s rostoucí teplotou jeho stabilita významně klesá.

Nerekombinantním rodičovským virem kravských neštovic (TBC-Wy) a rekombinantním virem kravských neštovic, který je podobný PROSTVAC-V, a který se označuje jako PANVAC-V, byly provedeny specifické stabilitní studie ([nepublikovaná data](#)). PANVAC-V je rekombinantní virus kravských neštovic, který podobně jako PROSTVAC-V exprimuje tři kostimulační molekuly TRICOM; dále exprimuje dva další antigeny související s nádorem ([Petrulio, 2006](#); [Madan, 2007](#)). Stabilita PANVAC-V v suchém stavu nebo ve vodě za různých teplot se porovnávala se stabilitou nerekombinantního rodičovského viru TBC-Wy. Na základě těchto studií bylo prokázáno, že rekombinantní virus je srovnatelný s příslušným nerekombinantním rodičovským virem. Oba viry při uchovávání ve vodě o teplotě 25 °C

ztrácely životaschopnost během týdnů. Stejně viry ztrácí životaschopnost během dnů, jsou-li uchovávány suché při teplotě 25 °C. Tyto výsledky jsou v souladu s výše diskutovanými publikovanými zprávami, jež prokazují, že viry neštovic jsou stabilní při nízkých teplotách, při vyšších teplotách ale vykazují nižší stabilitu, nejsou-li speciálně upraveny, například lyofilizací za regulovaných podmínek.

### PROSTVAC-F

O perzistenci virů ptačích neštovic v prostředí je k dispozici málo publikovaných studií. Nicméně jako výsledek používání licencovaných produktů na bázi rekombinantních virů ptačích neštovic a virů canarypox, včetně veterinárních vakcín proti viru Newcastleké nemoci, viru ptačí chřipky, vzteklině, viru kočičí leukemie, psince a západonilskému viru, nebyla hlášena perzistence v prostředí, nežádoucí následky ani jiné environmentální problémy. V rámci postupu udělování licence oznámila USDA Findings of No Significant Impact (Zjištění nepřítomnosti významného dopadu), které se týkají pravděpodobnosti nežádoucích environmentálních příhod při použití těchto vakcín ([Payne, 1994](#); [Payne, 1995](#); [Payne, 1996](#); [Federal Register, 1994, 1997a, 1997b, 2003, 2004](#)).

Nerekombinantním rodičovským virem ptačích neštovic (TBC-FPV) a rekombinantním virem ptačích neštovic, který je podobný PROSTVAC-F, a který se označuje jako PANVAC-F, byly provedeny specifické stabilitní studie ([nepublikovaná data](#)). PANVAC-F je rekombinantní virus kravských neštovic, který podobně jako PROSTVAC-F exprimuje tři kostimulační molekuly TRICOM; dále exprimuje dva další antigeny související s nádorem ([Petrulio, 2006](#); [Madan, 2007](#)). Stabilita PANVAC-F v suchém stavu nebo ve vodě za různých teplot se porovnávala se stabilitou nerekombinantního rodičovského viru TBC-FPV. Na základě těchto studií bylo prokázáno, že rekombinantní virus je srovnatelný s příslušným nerekombinantním rodičovským virem. Oba viry při uchovávání ve vodě o teplotě 25 °C ztrácely životaschopnost během týdnů. Stejně viry ztrácí životaschopnost během dnů, jsou-li uchovávány suché při teplotě 25 °C. Tyto výsledky prokazují, že PROSTVAC-F je stabilní při nízkých teplotách, při vyšších teplotách ale vyazuje nižší stabilitu, není-li speciálně upraven, například lyofilizací za regulovaných podmínek.

#### **6.1.2 Liší se geneticky modifikovaný organismus od příjemce ve způsobu nebo rychlosti reprodukce?**

PROSTVAC-V ani PROSTVAC-F nevykazují žádné známé změny schopnosti reprodukce v porovnání s nerekombinantními rodičovskými viry neštovic, které byly získány z licencovaných vakcín. Zejména v primárních buňkách fibroblastů kuřecích embryí rostou PROSTVAC-V i PROSTVAC-F přibližně stejně *in vitro* jako příslušné nerekombinantní rodičovské viry kravských a ptačích neštovic.

#### **6.1.3 Liší se geneticky modifikovaný organismus od příjemce ve schopnosti šíření?**

### PROSTVAC-V

PROSTVAC-V nevykazuje žádné známé fenotypické vlastnosti, které by zvyšovaly jeho riziko pro prostředí v porovnání s jeho nerekombinantním rodičovským virem neštovic. PROSTVAC-V je vskutku více oslaben než jeho rodičovský nerekombinantní virus

kravských neštovic, který je zase významně více oslaben než licencovaná vakcína Dryvax proti neštovicím. Pravděpodobnost, že PROSTVAC-V povede k ustavení přítomnosti a perzistence viru kravských neštovic v prostředí, je tudíž mizivá.

Ve prospěch environmentální bezpečnosti PROSTVAC-V dále hovoří zkušenosti s jinými rekombinantními viry kravských neštovic. Raboral V-RG je vakcína proti vzteklině, která je založena na rekombinantním viru kravských neštovic. Pro tuto rekombinantní vakcínu vydala USDA v roce 1995 podmíněnou licenci, plná licence byla vydána v roce 1997. Raboral V-RG se umísťuje do návnad, které se poté distribuují vzduchem nebo ručně do oblastí, kde žije divoká zvěř. Od roku 1995 bylo distribuováno více než 40 miliónů dávek ( $10^8$  pfu [jednotek tvořících plaky] na dávku). To představuje mimořádně velkou virovou zátěž prostředí ( $>10^{15}$  pfu), mnohem větší, než jaká by vznikla za použití jakéhokoliv potenciálního množství PROSTVAC-V za podmínek navrhovaného uvolnění.

### PROSTVAC-F

PROSTVAC-F se získává z oslabené veterinární vakcíny proti ptačím neštovicím POXVAC-TC, která se používá v drůbežářském průmyslu k ochraně kuřat před infekcí patogenním virem ptačích neštovic. Na základě používání POXVAC-TC nebyly hlášeny žádné nepříznivé účinky na životní prostředí, jiné ptačí druhy ani osoby zacházející se zvířaty.

Ve prospěch environmentální bezpečnosti PROSTVAC-F dále hovoří zkušenosti s jinými rekombinantními viry ptačích neštovic. V současné době je v platnosti licence USDA pro rekombinantní viry ptačích neštovic k vakcinaci drůbeže proti ptačí chřipce a Newcastlešské nemoci. V Mexiku a ve Střední Americe bylo dosud použito více než dvě miliardy vakcín proti chřipce na bázi rekombinantního viru ptačích neštovic, aniž by byly hlášeny nějaké nežádoucí reakce (*Bublot, 2006*).

#### **6.1.4 Liší se geneticky modifikovaný organismus v patogenicitě?**

Nejčastější vedlejší účinky (AE), které byly dosud pozorovány v souvislosti s PROSTVAC-V, jsou reakce v místě podání injekce, z nichž všechny vykazovaly závažnost  $\leq$  stupeň 2. Typické AE, které byly historicky pozorovány při intradermálním podávání (skarifikace) vakcín na bázi viru kravských neštovic (puchýřky, vřídky a zjizvení), u PROSTVAC-V pozorovány nebyly. Imunizace pomocí PROSTVAC-V se podává subkutánně, což značně snižuje reakce v místě podání injekce i vznik povrchových kožních ran / šíření viru. Mezi nejčastější systémové AE, které se připisují podávání PROSTVAC-V, patřila únava, nevolnost / zvracení, horečka, zimnice, artralgie a závratě.

Závažné nežádoucí reakce, o nichž je známo, že bývají spojené s tradičními způsoby vakcinace virem kravských neštovic, nebyly pozorovány v předchozích klinických hodnoceních PROSTVAC-V ani jiných vakcín na bázi viru kravských neštovic. Předpokládá se, že riziko těchto vzácných příhod je u PROSTVAC-V ještě nižší vzhledem k použití oslabeného kmenu viru kravských neštovic. Jelikož je ale PROSTVAC-V replikačně kompetentní virus kravských neštovic, existuje potenciál závažných nežádoucích reakcí po podání. V této části je popsán profil bezpečnosti viru kravských neštovic a rozsah nežádoucích reakcí, od mírných po vážné, které byly pozorovány během programu na eliminaci neštovic.

Virus kravských neštovic vyvolává přechodnou infekci, přičemž k eliminaci virových komponent dochází v průběhu několika týdnů. Hostitelské buňky infikované virem kravských neštovic přežívají krátce (dny) a odumírají smíšenou formou apoptózy / nekrózy. Virus kravských neštovic se replikuje v cytoplazmě infikovaných buněk a virová DNA se neintegruje do DNA hostitelské buňky. O viru kravských neštovic je známo, že u vakcinace na bázi tradiční dermální skarifikace dochází k jeho šíření z místa rány.

Použití viru kravských neštovic za účelem eliminace neštovic v celosvětovém měřítku skýtá bezpečnostní databázi, kde počet jednotlivých pozorování dosahuje řádově milionů. Příčinou některých rozporů, pokud jde o incidenci hlášených nežádoucích příhod, jsou geografické rozdíly, co se týče použitých kmenů viru kravských neštovic i používaných postupů při hlášení, diagnostice a kritériích sledování, ovšem celkový obrázek bezpečnosti viru kravských neštovic je velmi dobře znám. Další soubor dat skýtá nedávná kampaň za očkování ve prospěch vakcinace příslušníků armády a civilních občanů v USA.

Řada příhod po vakcinaci se předpokládá a považuje za normální: horečka, myalgie, bolest hlavy, únava, zimnice, nevolnost, bolestivost a erytém v místě vakcinace, místní lymfadenopatie. Byly hlášeny satelitní léze kolem místa vakcinace i místní edém. Tyto příznaky jsou omezené, trvají zhruba tři týdny po vakcinaci a vzácně se stávají příčinou výraznějších obav ([Frey, 2002](#); [Fulginiti, 2003](#)). Mezi mírné nežádoucí reakce, které se mohou po vakcinaci objevit, patří bakteriální superinfekce v místě vakcinace, erythema multiforme a generalizované kravské neštovice. Podle různých zpráv představuje superinfekce vzácnou příhodu s incidencí od 0,14 do 55 případů na 1 milion ([Vellozzi, 2004](#)).

Erythema multiforme (EM) se nejčastěji prezentuje jako zarudlá vyrážka, plaky nebo kopřivka, jež mohou být symetrické a mohou postihovat dlaně a chodidla. EM se upraví spontánně a nevyžaduje žádnou speciální péči. Mimořádně vzácný je rozvoj Stevens-Johnsonova syndromu s postižením sliznic, přičemž v rámci kampaně za očkování v letech 2003 – 2004 v USA byl zjištěn pouze jeden případ (<1 na 1 000 000) ([Fulginiti, 2003](#); [Neff, 2008](#)).

Generalizované kravské neštovice jsou následkem viremického šíření viru kravských neštovic z místa vakcinace. Projevují se jako generalizovaná vyrážka, která se chová podobně jako léze v místě vakcinace a progreduje přes papulární, vezikulární, pustulární a strup tvořící stádia. Posouzení incidence je obtížné, jelikož z historického hlediska neexistovala žádná striktní definice k odlišení generalizovaných kravských neštovic od jiných postižení, kdy převažujícím příznakem byla vyrážka (závažné plané neštovice, neštovice, eczema vaccinatum, EM). Na základě retrospektivní analýzy vakcinací z let 2002 – 2004 lze usuzovat na incidenci ~50 případů na 1 000 000 ([Bryant-Genevier, 2006](#)). Vyrážka se objevuje do týdne po vakcinaci a upravuje se do dalšího týdne. Ve většině případů není nutná specifická léčba ([Fulginiti, 2003](#)).

Některé z nežádoucích příhod po vakcinaci, i když jsou velmi vzácné, jsou vážné a potenciálně život ohrožující. Patří mezi ně progresivní kravské neštovice (PV), eczema vaccinatum (EV) a postvakcinační encefalitida (PVE).

Nejvýznamnější známou komplikací je PV. Před představením imunoglobulinu kravských neštovic (VIG) bylo toto onemocnění téměř vždy fatální. PV nastupuje především u osob s nedostatkem T-buněk nebo u osob, které mají léčbu vedoucí k nedostatku T-buněk. Primární místo vakcinace se nehojí, virové šíření kravských neštovic vede ke generalizovanému vzniku nových lézí bez reaktivní imunožánlivé odpovědi ([Bray, 2003](#); [Fulginiti, 2003](#)). Onemocnění PV je mimořádně vzácné; minulá incidence dosahuje řádově 1 případ na 1 000 000. V rámci kampaní za vakcinaci v letech 2002 – 2004 u příslušníků armády a civilního obyvatelstva nebylo onemocnění PV hlášeno ([Neff, 2008](#)).

EV se projevuje jako vyrážka (papulární, vezikulární, pustulární, erozivní), která může být lokalizovaná nebo generalizovaná, a která se projevuje převážně v oblastech, jež byly postiženy lézemi atopické dermatitidy nebo jinými ekzematózními kožními problémy. V minulosti dosahoval výskyt EV ~1 případ na 25 000 vakcinací. EV se může projevit u příjemce vakcíny i u náchylných osob, které jsou s ním v úzkém kontaktu. V nedávné době byly hlášeny dva případy EV následkem přenosu, oba u dětí příslušníků armády USA, kteří nedávno absolvovali vakcinaci ([Lederman, 2009](#); [Vora, 2008](#)). V rámci programu vakcinace v armádě USA nebyl hlášen žádný výskyt EV u 450 239 vakcín, pravděpodobně díky pečlivému screeningu na kontraindikace ([Grabenstein, 2003](#)). Při zpětném posouzení vakcinací u civilního obyvatelstva nebyly zjištěny žádné případy EV ([Velozzi, 2005](#)). EV lze zamezit důkladným screeningem rizikových osob a poučením o tom, že je důležité vyvarovat se kontaktu s takovými osobami, a o správné hygieně.

Míra fatality v případech PVE v minulosti je 25 %. Historicky (1963 – 1968) hlášená četnost PVE ve Spojených státech se uvádí ve výši 2,9 případů na 1 000 000 vakcinací. PVE vykazuje vyšší prevalenci a míru mortality u dětí v porovnání s dospělými. Vyšší historický výskyt byl hlášen v Evropě než v USA. Variabilita je přičítána rozdílům v tom, jak byly případy definovány, v klinickém vyhodnocování a v použitých vakcinačních kmenech v různých státech ([Sejvar, 2005](#)). Patogeneze se dosud zkoumá, i když několik přesvědčivých teorií se zaměřuje na autoimunitní mechanismus. Kromě kravských neštovic je známo, že s PVE souvisejí vakcíny proti spalničkám a vzteklině, a také dalším virovým a bakteriálním infekcím ([Bennetto, 2004](#); [Menge, 2007](#)). Na základě posouzení vakcinací v USA v letech 2002 – 2004 byly zjištěny tři případy PVE při výskytu 5 případů na 1 000 000.

V rámci nedávných kampaní za vakcinaci v USA byla zjištěna vyšší než historicky pozorovaná incidence myoperikarditidy u příjemců vakcín. Převažujícími příznaky byla bolest na hrudi, dechová nedostatečnost a únava, typicky mírného a přechodného rázu. Pokud jde o zástupce z armádních řad, 88 % případů s incidencí 16,11 na 100 000 se objevilo u mužů po primární vakcíně a 2,07 na 100 000 po opakované vakcinaci ([Arness, 2004](#)). Pokud jde o civilní populaci, 67 % případů se projevilo u žen a většina příhod (86 %) byla hlášena po opakované vakcinaci ([Casey, 2005](#); [Sniadack, 2008](#)). Variabilitu mezi těmito dvěma sadami dat mohou vysvětlovat demografické rozdíly mezi příjemci vakcín, rozdíly v detekci případů, v postupech jejich zjišťování a hlášení ([Morgan, 2008](#)). Myoperikarditida je již dlouho spojována s řadou virových infekcí, nicméně zpráv o potvrzené virové infekci je velmi málo. Po vakcinacích proti DTP a chřipce bylo hlášeno několik případů myoperikarditidy ([de Meester, 2000](#); [Boccara, 2001](#)). V současné době se předpokládá, že poškození srdce po virové infekci



má charakter spíše imunitní zánětlivé reakce než charakter přímý ([Cassimatis, 2004](#); [Feldman, 2000](#)).

Na základě posouzení dat z vakcinací v letech 2002 – 2004 v USA byl hlášen ~1 případ autoinokulace na 6 500 vakcinací, z toho v 17 % případů se jednalo o oblast oka, z toho žádný nevykazoval postižení rohovky ([Neff, 2008](#)). Nejzávažnějším následkem autoinokulace je keratitida při kravských neštovicích, jelikož léze na rohovce ohrožují zrak. Riziko této komplikace může zvyšovat nemocná nebo poškozená spojivka a rohovka. Keratitida při kravských neštovicích bude reagovat na léčbu topickými antiviroty a interferonem a je možné ji zabránit použitím okluzivních bandáží zakrývajících místo skarifikace a poučením pacienta ([Fulginiti, 2003](#)).

Další známou komplikací je přenos viru kravských neštovic na osoby v blízkém kontaktu. Virus kravských neštovic se šíří z léze příjemců vakcíny, která po vakcinaci zůstává; přenos viru je vzácný, nicméně k němu dochází. Kravské neštovice získané kontaktem se mohou projevit jako PV, EV nebo nahodilá infekce oka, úst nebo v oblasti genitálií. Z posouzení několika národních a státních přehledových prací z let 1962 až 1968 vyplývá četnost EV ve výši 8 – 27 na 1 000 000 a četnost nahodilých infekcí ve výši 3 – 44 na 1 000 000 ([Neff, 2002](#)). Výskyt kravských neštovic na základě kontaktu v letech 2002 – 2004 byl <10 případů na 100 000. Jako přiměřená a účinná profylaxe proti nahodilému kontaktu s virem kravských neštovic se jeví poučení příjemců vakcín o řádné péči o místo po vakcinaci, o řádné hygieně rukou a o tom, že se mají vyvarovat kontaktu s rizikovými osobami.

Rekombinantní vakcíny založené na stejném rodičovském viru, jaký byl použit i pro PROSTVAC-V, jsou zkoušeny v klinických hodnoceních již déle než deset let. Vakcinaci podstoupily stovky dobrovolníků, přičemž byly uplatněny různé cesty vakcinace včetně skarifikace, intradermálního, subkutánního a intramuskulárního podání. Dávky dosahovaly až  $2 \times 10^9$  pfu. V žádném klinickém hodnocení nebyl dosud zmíněn průkaz přenosu těchto vakcín na bázi viru kravských neštovic kontaktem.

#### Bezpečnost viru kravských neštovic (PROSTVAC-V) u jiných živočišných druhů

Virus kravských neštovic může infikovat teplokrevné obratlovce, jako jsou savci, hlodavci a ptáci. O tomto viru není známo, že by infikoval studenokrevné obratlovce, jako jsou ryby, obojživelníci a plazi ([Essbauer, 2001](#)), i když bylo prokázáno, že virus kravských neštovic infikuje určité buňky v tkáňové kultuře, včetně ledvinových buněk želvy *Testudo graeca* a jaterních buněk ještěrky *Lacerta viridis* ([Shindarov, 1965](#)). U několika studenokrevných druhů byly pozorovány jiné viry neštovic, které s virem kravských neštovic nejsou příbuzné. Přítomnost částic podobných viru neštovic byl hlášen u malého počtu těchto druhů, například u žáby *Rana temporaria*, chameleona *Chamaeleo dilepsis* a u několika druhů krokodýlů. Dva druhy virů neštovic, z nichž žádný nebyl virus kravských neštovic, byly identifikovány jako viry infikující plazy ([Essbauer, 2001](#)). Proto potenciální uvolnění virů kravských neštovic, jako je PROSTVAC-V, do prostředí může znamenat menší riziko pro vodné organismy. PROSTVAC-C dále neinfikuje mikroby ani rostliny.

Virus kravských neštovic nemá žádné přirozené stanoviště a původ tohoto viru v přírodě a jako vakcíny je neznámý. Přestože ale virus kravských neštovic nemá žádné známé přírodní živočišné rezervoáry, některé jeho kmeny byly izolovány z domácích zvířat, a to včetně

několika kmenů izolovaných z dojníc po celé Brazílii ([Trindade 2007](#)), a také virus buvolích neštovic, který byl poprvé izolován v Indii a dosud je kladen do souvislosti se sporadickými propuknutími nemoci v Pákistánu, v Indii, Bangladéši, Rusku, Indonézii, Egyptě a Itálii ([Singh, 2007](#)). Propuknutí nemoci je spojeno s morbiditou zvířat, a také s infekcí dojičů a osob zacházejících se zvířaty.

Původ těchto cirkulujících kmenů kravských neštovic zůstává nejasný. Jednou z možností je to, že se kmeny kravských neštovic dostaly do prostředí náhodně během programu pro eliminaci neštovic; nicméně přinejmenším u brazilských kmenů kravských neštovic ukazují genetické odchylky mezi izoláty na to, že zde existovaly dřívější kmeny ještě před zahájením kampaní na vakcinaci s cílem eliminace neštovic ze strany WHO ([Trindade, 2007](#)). Je tudíž také možné, že viry podobné viru kravských neštovic již dříve existovaly v přírodě, aniž by jejich přítomnost byla zjištěna.

Vakcinační kmeny, které se používaly v Indii a Brazílii, se lišily od licencované vakcíny proti neštovicím Dryvax, z níž byl PROSTVAC-V získán. PROSTVAC-V nevykazuje žádné známé fenotypické změny (např. změny virulence nebo růstové zvýhodnění), které by zvyšovaly jako riziko pro životní prostředí, v porovnání s nerekombinantními rodičovskými geny neštovic. PROSTVAC-V je vskutku více oslaben než jeho rodičovský nerekombinantní virus kravských neštovic, který je zase významně více oslaben než licencovaná vakcína Dryvax proti neštovicím. Pravděpodobnost, že PROSTVAC-V povede k ustavení přítomnosti a perzistence viru kravských neštovic v prostředí, je tudíž mizivá.

Předpokládá se, že rozsah expozice necílových druhů je omezen vzhledem k tomu, že podání vakcíny probíhá v klinickém centru, za kontrolovaných podmínek. Podání PROSTVAC-V subkutánně, použití bandáže, která omezí výskyt viru na místo podání vakcíny, a komplexní poučení zdravotnických pracovníků a pacientů – to vše jsou opatření, která slouží k minimalizaci expozice necílových živočišných druhů. I když existuje potenciál sekundárního přenosu viru na necílové organismy, na základě několika studií lze usuzovat, že přenos na necílové organismy, buď z člověka na zvíře nebo ze zvířete na zvíře, je nepravděpodobný, snad s výjimkou přenosu z očkovaných nebo infikovaných osob zacházejících se zvířaty na dobytek.

#### Bezpečnost viru ptačích neštovic (PROSTVAC-F) u člověka

Virus ptačích neštovic patří do rodu Avipox, který se od viru kravských neštovic evolučně odchýlil, a který nevykazuje serologickou křížovou reaktivitu ([Taylor, 1988](#); [Beukema, 2006](#)). Produktivní infekce virem ptačích neštovic je omezena *in vivo* na určité druhy ptactva, k nimž se řadí kuřata, krůty a holubi, a dále *in vitro* na buňky získané od ptačích druhů. Vzhledem k tomu, že vektory viru ptačích neštovic nejsou schopny replikace v lidských buňkách (pouze v buňkách ptačích), představují tudíž mnohem menší bezpečnostní riziko než vektory na bázi viru kravských neštovic. V infikovaných lidských buňkách genová exprese mediovaná virem ptačích neštovic sice probíhá, spolu s ranou virovou a transgenovou expresí, ovšem pozdní genová exprese je blokována a nedochází k produkci žádných infekčních částic. V důsledku této skutečnosti nevyvolává infekce savčích druhů onemocnění.

Virus ptačích neštovic je předmětem výzkumu a používá se v návrhu vakcín již nejméně dvě desetiletí. Stejně jako virus kravských neštovic, nabízí výhody velkého genomu, navíc ale



skýtá dodatečnou jistotu bezpečnosti vzhledem k tomu, že není schopen replikace v savčích buňkách. Vakcíny na bázi viru ptačích neštovic (HIV, malárie, rakovina) byly testovány u zvířat i u člověka. Nevznikly žádné obavy ohledně bezpečnosti a nežádoucí příhody spojené s použitím vektorů viru ptačích neštovic se omezovaly na mírné reakce v místě podání injekce ([Beukema, 2006](#); [Essajee, 2004](#); [Webster, 2006](#)). V žádném klinickém hodnocení nebyl dosud zmíněn průkaz přenosu viru ptačích neštovic. Vzhledem k tomu, že virus ptačích neštovic je u člověka replikačně defektivní, přenos PROSTVAC-F je u člověka nepravděpodobný.

TBC-FPV i PROSTVAC-F jsou významně více oslabené než vakcína Dryvax proti neštovicím, což bylo měřeno pomocí testu intrakraniální LD<sub>50</sub> u myší. Tento test neurovirulence je tradičně nejcitlivější metodou měření virulence viru kravských neštovic *in vivo*. Pokud jde o toxigenicitu a alergenicitu, ve studiích bezpečnosti na hlodavcích či u non-humánních primátů nebyly zaznamenány žádné biologicky významné změny ani známky nepříznivých toxikologických účinků. A dále, PROSTVAC-F byl v minulosti podán více než 300 subjektům v osmi klinických hodnoceních fáze 1 a 2, přičemž nebyly hlášeny žádné toxické ani alergenní účinky. Nejčastější AE v souvislosti s PROSTVAC-F, které byly dosud pozorovány, zahrnují reakce v místě podání injekce, z nichž všechny vykazovaly stupeň závažnosti  $\leq 2$ . Mezi nejčastější systémové AE, které jsou připisovány podání PROSTVAC-F, patří únava, nevolnost / zvracení, horečka, zimnice, artralgie a závratě.

#### Bezpečnost viru ptačích neštovic (PROSTVAC-F) u jiných živočišných druhů

PROSTVAC-F se získává z oslabené veterinární vakcíny proti ptačím neštovicím POXVAC-TC, která se používá v drůbežářském průmyslu k ochraně kuřat před infekcí patogenním virem ptačích neštovic. Na základě používání POXVAC-TC nebyly hlášeny žádné nepříznivé účinky na životní prostředí, jiné ptačí druhy ani osoby zacházející se zvířaty.

V současné době je v platnosti licence USDA pro rekombinantní viry ptačích neštovic k vakcinaci drůbeže proti ptačí chřipce a Newcastleké nemoci. V Mexiku a ve Střední Americe bylo dosud použito více než dvě miliardy vakcín proti chřipce na bázi rekombinantního viru ptačích neštovic, aniž by byly hlášeny nějaké nežádoucí reakce ([Bublot, 2006](#)).

V případě viru ptačích neštovic nebyla hlášena replikace v jiných než ptačích druzích. Pravděpodobnost šíření PROSTVAC-F na necílové organismy je tudíž velmi nízká. V nepravděpodobném případě virového přenosu se u necílového organismu nepředpokládá žádné klinické onemocnění.

Produktivní infekce virem ptačích neštovic je omezena *in vivo* na určité druhy ptactva, k nimž se řadí kuřata, krůty a holubi, kanáři ([Tripathy, 1984](#)). Je pravděpodobné, že přenos viru ptačích neštovic bude maximální u drůbeže; bylo nicméně zjištěno, že přenos vakcinačního kmene viru ptačích neštovic u kuřat, která jsou pro tento virus permissivním hostitelem, je omezen ([McMillen, 1994](#)).

Rovněž byla hodnocena schopnost vakcinačního kmene a rekombinantního viru ptačích neštovic infikovat jiné ptačí druhy. Po inokulaci virem ptačích neštovic byl pozorován vznik lézí u krůt, nikoliv ale u křepelek. Rodičovský i rekombinantní virus ptačích neštovic se podařilo izolovat z míst podání injekce u krůt, nikoliv ale u křepelek ([McMillen, 1994](#)). Virus

ptačích neštovic se tudíž produktivně replikuje u některých, nikoliv ale u všech ptačích druhů, což ještě více omezuje jeho potenciální přenos.

## 6.2 Genetická stabilita geneticky modifikovaného organismu

Genetická stabilita PROSTVAC-V a PROSTVAC-F byla stanovena s využitím řady různých metodologií. Je sekvenován celý genom viru Working Seed Virus (WSV) a celý genom jedné výrobní šarže PROSTVAC-V a PROSTVAC-F. Dále je pro každou výrobní šarži prokázána identita na základě PCR, Western blot a analýzy restričních míst. Společně představuje toto testování verifikaci genetické stability.

Dále bylo provedeno hodnocení komparability úplných genomů výzkumných přípravků fáze II a fáze III. Tato data představují další doložení genetické stability PROSTVAC-V a PROSTVAC-F.

PROSTVAC-V ani PROSTVAC-F nevykazují žádné známé fenotypické změny (např. změny virulence nebo růstové zvýhodnění) v porovnání s nerekombinantními rodičovskými geny neštovic, které byly získány z licencovaných vakcín.

### PROSTVAC-V

Virus kravských neštovic je relativně stabilní, je-li uchováván při nízkých teplotách. To přispívá k úspěšnosti programu vakcinace proti neštovicím v rozvinutých zemích, kde možnost jeho zmrazení byla snadno dostupná. Po skladování vakcíny při teplotách prostředí ovšem její síla rychle klesala, což mělo začátkem 20. století za následek vysoký podíl neúspěšných vakcinací v rozvojových zemích. Bylo nutno vynaložit značné úsilí k tomu, aby se podařilo vyvinout suchou vakcínu, která je stabilní při teplotách prostředí ([Fenner, 1988](#)). Prosté sušení vedlo k variabilní stabilitě. Dokonce i komplexní podmínky sušení často dávaly neuspokojivé výsledky. Postupně se dařilo dosahovat zlepšení, přičemž vhodné podmínky lyofilizace byly nakonec optimalizovány v 50. letech 20. století, což přispělo ke konečnému úspěchu globálního programu vakcinace proti neštovicím.

Viry neštovic mají schopnost přežít po značně dlouhou dobu v sušeném materiálu, například v odloupených strupech po vakcinaci. Jsou také relativně stabilní, jsou-li uchovávány ve zmrazeném nebo lyofilizovaném stavu, za pozorně regulovaných podmínek. Jejich stabilita ovšem při rostoucí teplotě významně klesá. Za normálních podmínek prostředí se předpokládá, že PROSTVAC-V i PROSTVAC-F ztrácejí životaschopnost během dnů nebo týdnů.

Na téma regenerace nerekombinantního viru kravských neštovic za různých laboratorních podmínek nastavených tak, aby imitovaly expozici v prostředí, bylo publikováno několik studií. Přežití viru se hodnotilo například na textilích a potravinách ([Sidwell, 1966](#); [Pastoret, 1996](#); [Essbauer, 2007](#)), v suchém stavu nebo v kapalině (včetně solného roztoku, pitné vody, sterilně filtrované vody jezerní nebo říční, srážkové vody, srážkové vody obohacené fetálním telecím sérem nebo smíšené se zeminou pro pokojové rostliny) ([Mahnel, 1977](#); [Mahnel, 1987](#); [Essbauer, 2007](#)), za různých podmínek relativní vlhkosti, teploty či pH ([Mahl, 1975](#); [Newman, 2003](#)), při expozici vzduchu nebo ve vzduchotěsných nádobách ([Mahnel, 1987](#)). Mezi těmito publikovanými experimenty je řada rozdílů, mezi něž lze řadit různé kmeny viru

kravských neštovic, různé techniky přípravy, různé počáteční titry viru a metody titrace viru. Všechny tyto studie nicméně skýtají jednoznačná data jednak o tom, že virus kravských neštovic je relativně stabilní za různých laboratorních podmínek, a jednak že s rostoucí teplotou jeho stabilita významně klesá.

Nerekombinantním rodičovským virem kravských neštovic (TBC-Wy) a rekombinantním virem kravských neštovic, který je podobný PROSTVAC-V, a který se označuje jako PANVAC-V, byly provedeny specifické stabilitní studie (*nepublikovaná data*). PANVAC-V je rekombinantní virus kravských neštovic, který podobně jako PROSTVAC-V exprimuje tři kostimulační molekuly TRICOM; dále exprimuje dva další antigeny související s nádorem (*Petrulio, 2006; Madan, 2007*). Stabilita PANVAC-V v suchém stavu nebo ve vodě za různých teplot se porovnávala se stabilitou nerekombinantního rodičovského viru TBC-Wy. Na základě těchto studií bylo prokázáno, že rekombinantní virus je srovnatelný s příslušným nerekombinantním rodičovským virem. Oba viry při uchovávání ve vodě o teplotě 25 °C ztrácely životaschopnost během týdnů. Stejně viry ztrácí životaschopnost během dnů, jsou-li uchovávány suché při teplotě 25 °C. Tyto výsledky jsou v souladu s výše diskutovanými publikovanými zprávami, jež prokazují, že viry neštovic jsou stabilní při nízkých teplotách, při vyšších teplotách ale vykazují nižší stabilitu, nejsou-li speciálně upraveny, například lyofilizací za regulovaných podmínek.

### PROSTVAC-F

O perzistenci virů ptačích neštovic v prostředí je k dispozici málo publikovaných studií. Nicméně jako výsledek používání licencovaných produktů na bázi rekombinantních virů ptačích neštovic a virů canarypox, včetně veterinárních vakcín proti viru Newcastleké nemoci, viru ptačí chřipky, vzteklině, viru kočičí leukemie, psince a západonilskému viru, nebyla hlášena perzistence v prostředí, nežádoucí následky ani jiné environmentální problémy. V rámci postupu udělování licence oznámila USDA Findings of No Significant Impact (Zjištění nepřítomnosti významného dopadu), které se týkají pravděpodobnosti nežádoucích environmentálních příhod při použití těchto vakcín (*Payne, 1994; Payne, 1995; Payne, 1996; Federal Register, 1994, 1997a, 1997b, 2003, 2004*).

Nerekombinantním rodičovským virem ptačích neštovic (TBC-FPV) a rekombinantním virem ptačích neštovic, který je podobný PROSTVAC-F, a který se označuje jako PANVAC-F, byly provedeny specifické stabilitní studie (*nepublikovaná data*). PANVAC-F je rekombinantní virus kravských neštovic, který podobně jako PROSTVAC-F exprimuje tři kostimulační molekuly TRICOM; dále exprimuje dva další antigeny související s nádorem (*Petrulio, 2006; Madan, 2007*). Stabilita PANVAC-F v suchém stavu nebo ve vodě za různých teplot se porovnávala se stabilitou nerekombinantního rodičovského viru TBC-FPV. Na základě těchto studií bylo prokázáno, že rekombinantní virus je srovnatelný s příslušným nerekombinantním rodičovským virem. Oba viry při uchovávání ve vodě o teplotě 25 °C ztrácely životaschopnost během týdnů. Stejně viry ztrácí životaschopnost během dnů, jsou-li uchovávány suché při teplotě 25 °C. Tyto výsledky prokazují, že PROSTVAC-F je stabilní při nízkých teplotách, při vyšších teplotách ale vyazuje nižší stabilitu, není-li speciálně upraven, například lyofilizací za regulovaných podmínek.

### **6.3 Vlastnosti geneticky modifikovaného organismu, které mají vliv na přežívání, rozmnožování a šíření v životním prostředí**

Viz bod 6.2

### **6.4 Známé nebo předvídatelné enviromentální podmínky, které mohou mít vliv na přežívání, rozmnožování a šíření (vítr, voda, teplota, pH)**

Viz bod 6.2

### **6.5 Citlivost na specifické látky (prostředky)**

PROSTVAC-F/V jsou citlivé na běžné užívané dezinfekční prostředky. K dezinfekci budou používány přípravky SAVO nebo SEKUSEPT forte.

### **6.6 Uveďte, zda je geneticky modifikovaný organismus patogenní nebo jiným způsobem škodlivý (živý neživý, včetně mimobuněčných produktů). Pokud ano, uveďte zda vzhledem k lidem, zvířatům, rostlinám, nebo jinak.**

Geneticky modifikovaný organismus není patogenní nebo jakýmkoli způsobem škodlivý - Viz bod 6.2

### **6.7 Popis metod identifikace a detekce geneticky modifikovaného organismu**

Detekce a identifikace PROSTVAC-V a PROSTVAC-F se provádí pomocí těchto zkoušek a je akreditovaně zajišťována výrobcem vakcíny:

- Kvantitativní zkouška FACS pro měření titrů infekčního viru
- Polymerázová řetězová reakce (PCR) vložených genů a spojek rekombinace pro identitu viru
- Transgenní exprese podle Western Blot

#### **6.7.1 Metody používané k detekci geneticky modifikovaného organismu, včetně ověřené metody detekce**

Kvantitativní zkouška FACS. Zkouška FACS je kvantitativní zkouška *in vitro*, která potvrzuje expresi virových produktů, TRICOM<sup>®</sup> (B7.1, ICAM-1 a LFA-3) a PSA. V této zkoušce se provádí inkubace buněk *in vitro* při postupném ředění viru, následuje současné vyhodnocení exprese virových proteinů i transgenních produktů. Transgenní produkty a virové antigeny se v jednotlivých buňkách detekují pomocí specifických protilátek konjugovaných s fluorofory, které se detekují pomocí FACS. Vazba protilátek na jejich specifické cíle probíhá po fixaci a permeabilizaci infikovaných buněk. Analýza FACS ukazuje procentuální zastoupení buněk, které jsou infikovány virem, z čehož se počítá titr infekčních jednotek (Inf. U.). Ukazuje také podíl buněk, které exprimují transgeny, z nichž se počítá titr transdukčních jednotek (Txg.

U.). Tato zkouška představuje plně validovanou zkoušku síly, která se používá při uvolňování klinických materiálů.

Polymerázová řetězová reakce (PCR) vložených genů a spojek rekombinace. Identita PROSTVAC-V a PROSTVAC-F se prokazuje pomocí kvalitativního testu PCR. Postup lze stručně popsat tak, že pro každý test se provádí extrakce DNA z testovaného vzorku, která se podrobí amplifikaci PCR s využitím specifických primerů, jež jsou homologní vůči sekvencím obklopujícím vložené geny PSA-TRICOM. Výsledné amplikony PCR se vizualizují pomocí elektroforézy na agarózovém gelu a barvení ethidium bromidem a porovnávají se s DNA markery známých velikostí fragmentů. Analýza rekombinantních virů se provádí souběžně s analýzou referenčních standardů PROSTVAC-V/F.

PCR zkoušky identity PROSTVAC-V a PROSTVAC-F byly validovány vzhledem k dolnímu detekčnímu limitu, specifičnosti a opakovatelnosti (vnitřní přesnost zkoušky).

Analýza Western Blot. Tato analýza, která využívá protilátek specifických pro PSA, B7.7, ICAM-1 a LFA-3, slouží ke zkoumání molekulové hmotnosti a identity těchto polypeptidů, které jsou exprimovány savčí buněčnou linií po absorpci rekombinantního viru. Analýza rekombinantních virů se provádí souběžně s analýzou referenčních standardů PROSTVAC-V a PROSTVAC-F. Tato zkouška představuje plně validovanou zkoušku identity, která se používá při uvolňování klinických materiálů.

## **6.7.2 Metody používané k identifikaci geneticky modifikovaného organismu v prostředí, včetně ověřené metody identifikace a údajů o spolehlivosti a citlivosti metod**

Viz bod 6.7.1

## **6.7.3 Údaje umožňující jednoznačnou identifikaci změněného úseku dědičného materiálu**

Viz bod 6.7.1

## **6.8 Expres vložení dědičného materiálu**

Předpokládaný způsob působení PROSTVAC-V/F obnáší indukci imunitních odpovědí proti PSA, které povedou k vyhlazení nádorových buněk exprimujících PSA. PROSTVAC-V a PROSTVAC-F jsou terapeutické vakcíny, které byly navrženy tak, aby dodávaly antigen PSA související s nádorem do buněk prezentujících antigen (APC), kde poté dochází k jeho zpracování a expresi na povrchu APC v rámci hlavního histokompatibilního komplexu (MHC), což vede k aktivaci T-buněk (*Essajee, 2004; Schlom, 2008*). Za účelem posílení imunogenicity exprimovaného PSA exprimují PROSTVAC-V a PROSTVAC-F také tři lidské

kostimulační molekuly označované jako TRICOM. Vakcinace pomocí PROSTVAC-V vede v infikovaných buňkách k současné expresi epitopů PSA v kombinaci s kostimulačními molekulami. Předpokládá se, že koexprese PSA v kontextu molekul TRICOM posiluje imunitní odpověď T-buněk na PSA. Tyto imunitní odpovědi na PSA jsou poté posíleny vícečetnými imunizacemi pomocí příslušného rekombinantního viru ptačích neštovic,

V infikovaných lidských buňkách genová exprese mediovaná virem ptačích neštovic sice probíhá, spolu s ranou virovou a transgenovou expresí, ovšem pozdní genová exprese je blokována a nedochází k produkci žádných infekčních částic. V důsledku této skutečnosti nevyvolává infekce savčích druhů onemocnění.

#### **6.8.1 Rychlost a míra exprese vloženého dědičného materiálu, závislost na životním cyklu, orgány, kde k expresi dochází**

Jelikož se jedná o cytoplasmaticky přenášený transgen, je míra exprese transgenu ovlivněna dobou jeho persistence v infikované buňce. Virus má afinitu převážně k epiteliálním buňkám a buňkám imunitního systému, čehož je s výhodou využíváno v obou transgenních vakcínách.

#### **6.8.2 Popis metod měření s udáním jejich citlivosti – viz bod 6.7.1**

#### **6.8.3 Stabilita exprese**

Stabilita exprese je daná identitou expresní kazety, ve které je transgen propagován. Jednotlivé elementy expresního systému vakcíny byly popsány výše.

### **6.9 Exprimované bílkoviny**

Transgenní kazeta exprimuje proteiny TRICOM a PSA, jak bylo popsáno výše. Všechny čtyři proteiny jsou lidského původu a jsou zcela nepatogenní, samostatně i v dané kombinaci.

#### **6.9.1 Aktivita exprimovaných bílkovin**

Exprimované proteiny jsou běžnou součástí lidských buněk; jejich biologické funkce byly popsány na předchozích místech žádosti.

#### **6.9.2 Popis metod identifikace a detekce exprimovaných bílkovin s udáním jejich citlivosti, spolehlivosti a specifčnosti**

Identifikace a detekce exprimovaných proteinů probíhá pomocí průtokové cytometrie, PCR analýzy a Western blot. Uvedené techniky jsou běžně používány v laboratořích a pro dané molekulární cíle mají jasně danou míru senzitivity a specifity. Tyto analýzy jsou prováděny výrobcem vakcíny před každým uvedením nového lotu vakcíny do oběhu.

### **6.10 Předchozí nakládání s geneticky modifikovaným organismem**

PROSTVAC-V/F byl v minulosti podán více než 300 subjektům v osmi klinických hodnoceních fáze 1 a 2

## **7 Informace o uvádění do životního prostředí a o pozemcích, na nichž bude probíhat**



**7.1 Liší se místo uvádění do životního prostředí od ekosystému, ve kterém se příjemce nebo rodičovský organismus obvykle vyskytují, nebo jsou pěstovány anebo kultivovány?**

Klinické hodnocení s GMO PROSTVAV-V/F bude probíhat ve zdravotnickém zařízení Fakultní nemocnice Olomouc po obdržení povolení k nakládání s GMO a jeho uvádění do životního prostředí

**7.2 Pracoviště a pozemky, na kterých bude uvádění do životního prostředí probíhat**

- metodika pokusů – viz synopse protokolu
- havarijný plán – viz příloha pro pracoviště
- provozní řád pro pracoviště – příloha 4

Fakultní nemocnice Olomouc  
Urologická klinika  
I.P.Pavlova 6  
775 20 Olomouc

**7.3 Vlastník pozemků, pokud není totožný s osobou, která podává žádost o uvádění GMO do životního prostředí a smluvní vztah mezi vlastníkem a touto osobou**

Viz bod 7.2

**7.4 Specifikace pozemku**

Pracoviště je koncipováno svým prostorovým a technickým vybavením jako zdravotnické zařízení pro léčbu pacientů a pracoviště se a podílí se na řadě výzkumných klinických hodnocení.

**7.5 Celková rozloha plochy, na které se uvádění do životního prostředí má uskutečnit**

Nerelevantní

**7.6 Vzdálenost pokusného pozemku od specifických území v metrech nebo kilometrech**

Nerelevantní

**7.7 Využití okolních pozemků, včetně plodin pěstovaných na sousedních pozemcích**

Nerelevantní

**7.8 Fauna a flora, včetně zemědělských plodin, hospodářských zvířat a migrujících druhů, která by mohla přijít do styku s geneticky modifikovaným organismem**

Nerelevantní

**7.9 Metody uvádění do životního prostředí a množství použitých geneticky modifikovaných organismů**



GMO vakcína bude aplikována pacientům zařazeným do klinického hodnocení. Ve Fakultní nemocnici Olomouc se předpokládá zařazení nejvýše 10 pacientů. Jednomu pacientovi bude v rámci klinického hodnocení aplikováno celkem 7 dávek. PROSTVAC-V:  $2 \times 10^8$  (Inf.U) v týdnu 1.-; PROSTVAC-F  $1 \times 10^9$  (Inf.U) v týdnech 3; 5; 9; 13; 17; 21.

Předpokládá se, že pro centrum, při uvážení malé rezervy na konfiguraci balení a rezervy na ampulky, které bude nutno vyhodit nebo je bude nutno dodat znovu, by mohlo být dovezeno až 10 ampulek PROSTVAC-V, 36 ampulek PROSTVAC-F a 46 ampulek s prázdným prázdným vektorem ptačích neštovic.

**7.10 Relevantní údaje o předchozích případech uvádění stejného GMO do životního prostředí, pokud existují, zejména ve vztahu k možným účinkům této činnosti na zdraví lidí a zvířet, životní prostředí a biologickou rozmanitost**

Nerelevantní

**7.11 Popis ekosystémů, které by mohly být ovlivněny**

Nerelevantní

**7.12 Srovnání přirozeného habitatu příjemce, případně rodičovského organismu s navrhovaným místem uvádění do životního prostředí**

Nerelevantní

**7.13 Jakékoli plánované změny ve využití pozemků v okolí místa uvádění do životního prostředí, které by mohly mít význam pro působení GMO na životní prostředí**

Nerelevantní

## **8. Popis nakládání s GMO**

**8.1 Nakládání s GMO před jejich uváděním do životního prostředí (uzavřené nakládání, přeprava)**

Nakládání s GMO je omezeno pouze na skladování lahviček s vakcínou, přípravu vakcíny k použití (přetažení do injekční stříkačky) a její aplikaci pacientovi. Vakcína je uskladněna v mrazicím boxu při teplotě -70, příprava a aplikace vakcíny probíhá na určeném pracovišti ambulantní části urologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc. Manipulace s GMO je prováděna pouze řádně proškolenými pracovníky.

Všechna dotčená pracoviště jsou řádně označena nápisem „PRÁCE S GMO“ a „BIOLOGICKÉ RIZIKO“, jsou uzamykatelná a vstup je povolen pouze řádně proškoleným osobám v souladu s Provozním řádem pracoviště a Havarijním plánem.

Nakládání s GMO bude probíhat na určeném pracovišti urologické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc, které je v samostatně stojící budově a je rozděleno na část pro zdravotnický personál (šatna, denní místnost, pracovny lékařů, přípravná léků) a část pro pacienty (vyšetřovny, infúzní a odběrové místnosti, čekárna).

Do prostor určených pro zdravotnický personál (urologické oddělení, lékárna) mají přístup pouze zaměstnanci, jiné osoby jsou hlášeny jako návštěvy pracoviště a vstup je povolen pouze v doprovodu zaměstnanců. Pracoviště jsou uzamykatelná bezpečnostními zámky a prostory nemocnic jsou monitorovány 24h službou.

Práce s GMO probíhá výhradně v místnostech určených k tomuto účelu, které jsou řádně označené a uzamykatelné.

Okna v místnostech pracovišť určených k nakládání s GMO jsou opatřena sítěmi proti vniknutí hmyzu.

Rozmístění jednotlivých místností pracovišť je znázorněno na plánu pracoviště: viz příloha 4

Vakcína je v určené místnosti urologické kliniky aplikována proškoleným členem studijního týmu do deltovitého svalu horní končetiny. Místo aplikace je okamžitě přelepeno sterilním krytím, vzniklý odpad (stříkačka, jehla) je okamžitě po aplikaci likvidován do kontejneru řádně označeného „GMO ODPAD“. Člen studijního týmu je v době aplikace GMO chráněn jednorázovými ochrannými pomůckami (Jednorázové rukavice, čepice, plášť, rouška) tyto jsou okamžitě po aplikaci umístěny rovněž do zvláštního kontejneru označeného „GMO ODPAD“. Pacient je po proškolení vybaven dostatečným množstvím materiálu pro převaz místa aplikace. Použité krytí bude po ošetření místa aplikace doma odkládat do bezpečnostního uzavíratelného kontejneru označeného „GMO ODPAD“. Tento kontejner vrátí při další návštěvě centra klinického hodnocení.

S veškerým GMO odpadem je nakládáno jako se zvlášť nebezpečným biologickým odpadem. Je likvidován ve spalovně Fakultní nemocnice Olomouc dle interních předpisů.

## **8.2 Postup, kterým budou GMO uváděny do životního prostředí**

Vakcína bude aplikována pacientům v centru klinického hodnocení, které bude řádně označeno „Práce s GMO“. Místo aplikace bude přelepeno sterilním krytím a pacient bude po řádném proškolení vybaven dostatečným množstvím sterilního krytí pro přelepení místa vpichu. Všechny použité materiály bude pacient ukládat do bezpečnostního uzavíratelného kontejneru řádně označeného „GMO odpad“. Kontejner odevzdá při další návštěvě centra klinického hodnocení studijního týmu.

## **8.3 Přibližný počet GMO (na m2, případně m3)**

nerelevantní

## **8.4 Příprava a způsob úpravy pozemku před uvedením GMO**

Nerelevantní

## **8.5 Způsob dopravy GMO**

Přeprava bude na území České republiky zajišťována společností TNT, která splňuje požadavky pro přepravu GMO dané vyhláškou.

## **8.6 Způsob ochrany zdraví pracovníků v průběhu nakládání s GMO v souladu se zvláštními předpisy**

Pracovníci budou v době nakládání používat jednorázové ochranné pomůcky (rukavice, plášť, čepice, rouška). Nakládání s GMO bude probíhat pouze na místech k tomu určených, řádně označených „PRÁCE S GMO“, která v době manipulace s GMO nebude využívána k jinému účelu.

Plochy, kde bude připravována vakcína, budou překryty jednorázovým krytím a po přípravě okamžitě sanovány dezinfekčními prostředky (SAVO, SEKUSEPT Forte)

Viz. Provozní řád pracoviště

## **8.7 Způsob kultivace GMO**

Nerelevantní

## **8.8 Popis dalšího nakládání s GMO, včetně jejich likvidace**

Viz bod 8.1

## **8.9 Termín a způsob vyhodnocení uvádění GMO do životního prostředí**

Vzhledem k povaze vakcíny PROSTVAC se neplánuje vyhodnocení vlivu na životní prostředí. Po ukončení klinického hodnocení bude zpracována závěrečná zpráva o průběhu klinického hodnocení.

## **9 Údaje o interakcích mezi geneticky modifikovanými organismy a životním prostředím a jejich možném vlivu na životním prostředí**

### **9.1 České a latinské rodové a druhové jméno cílového organismu, pokud existuje, s přesným určením kultivaru (odrůdy, rasy, plemene, linie, hybridu, kmene, patovaru)**

Homo sapiens

### **9.2 Předpokládaný mechanismus a výsledek interakce mezi geneticky modifikovaným organismem uváděným do životního prostředí a cílovým organismem**

PROSTVAC – V/R jsou vektorové vakcíny, které budou aplikovány v 7 podkožních dávkách v průběhu pěti měsíců. Výsledkem je navození imunitní odpovědi na specifický prostatický antigen a buňky karcinomu prostaty. Vakcína vyvolává chronickou aktivní imunomodulační odpověď a zpomaluje celkovou progresi nádorového onemocnění.

### **9.3 Předpokládaný mechanismus a výsledek interakcí s dalšími organismy v životním prostředí, které mohou být významné**

Nerelevantní

### **9.4 Je pravděpodobné, že dojde k selekci po uvedení do životního prostředí, jako např. zvýšená konkurenceschopnost nebo invazivnost GMO?**

Není pravděpodobné.

PROSTVAC-V/F nevykazují žádnou kompetitivní výhodu proti nemodifikovaným rodičovským virům s ohledem na replikaci *in-vitro*. Rovněž neexistují žádné důkazy o možnosti šíření a usídlení transgenních vakcín do ekosystémů.

#### **9.5 Možnost prudkého nárůstu populace GMO v životním prostředí a podmínky, za kterých by mohlo k tomuto nárůstu dojít**

Nerelevantní

#### **9.6 Cesty biologického šíření GMO, známé nebo možné způsoby interakce s rozšiřujícími agens**

Nerelevantní

#### **9.7 Typy ekosystémů, do kterých se GMO může rozšířit z místa uvádění do životního prostředí a ve kterých se může usídlit.**

Šíření a dopad na ekosystémy se nepředpokládá. Šíření vyžaduje úzký kontakt s místem vakcinace nebo nepřímý kontakt s kontaminovanými povrchy. Klinické hodnocení bude prováděno ve zdravotnických zařízeních při dodržování standardních hygienických opatření. Nepředpokládá se, že použití vakcíny bude mít jakýkoli negativní dopad na ekosystémy.

#### **9.8 Název (české a latinské rodové a druhové jméno s přesným určením kultivaru, odrůdy, rasy, plemene, linie, formy, hybridu, kmene, patovaru) necílového organismu, který se zřetelem na povahu přijímacího prostředí může být poškozen uváděním GMO do životního prostředí**

Homo Sapiens

Nejpravděpodobnější necílové organismy, které mohou být náhodně vystaveny použitému GMO (PROSTVAC – V/F) jsou členové studijních týmů klinického hodnocení a příbuzní pacienta, žijící s ním v domácnosti.

#### **9.9 Předpokládaný mechanismus zjištěných nežádoucích interakcí mezi GMO a necílovými organismy včetně konkurentů, kořisti, hostitelů, symbiontů, predátorů, parazitů, patogenů.**

Nerelevantní

#### **9.10 Schopnost přenosu dědičného materiálu in vivo**

Potenciál přenosu genů PROSTVAC – V/F na další druhy včetně člověka je extrémně nízký. Životní cyklus Poxvirů probíhá v cytoplazmě a poxviry se neintegrují do hostitelské buňky. Rekombinace mezi PROSTVAC –V/F a divokými typy viru vaccinie nebo avipox viru v infikovaných buňkách hostitelského organismu je teoreticky možná i když pravděpodobnost ko-infekce rekombinantní vakcínou a divokým typem v hostitelských buňkách organismu je velmi malá. Rekombinace virů nemění virulenci, růstové vlastnosti nebo přetrvávání viru v životním prostředí. Rekombinace s jinými virovými genomy je nepravděpodobná vzhledem k nedostatku homologie mezi jednotlivými skupinami virů.

### **9.11 Výsledky studií chování a vlastností GMO a jejich ekologických vlivů prováděných v simulovaném přirozeném prostředí**

S vakcínami PROSTVAC nebyly provedeny žádné studie dopadu v simulovaném životním prostředí

### **9.12 Známé nebo předpokládané zapojení do biochemických procesů**

Nerelevantní. PROSTVAC – V/F se nezapojují do žádného biochemického procesu

### **9.13 Další možné účinky na životní prostředí a biologickou rozmanitost**

Nerelevantní

## **10. Monitorování výskytu a účinků GMO**

### **10.1 Metody zjišťování přítomnosti GMO**

Vzhledem k charakteru GMO (rekombinantní vakcína k použití u pacientů) a zcela zanedbatelnému efektu „virus shedding“ je požadavek na laboratorní průkaz GMO u příjemců vakcíny nerelevantní.

Hodnocení bezpečnosti a monitorování. Pacienti budou během léčebné fáze klinického hodnocení sledováni, zda se u nich neobjevují známky nebo příznaky toxicity vzniklé při léčbě, pomocí patřičně zaměřeného fyzikálního vyšetření, panelů hematologie, chemického rozboru séra, EKG a záznamu AE a současně užívaných léků. Veškeré SAE bude ihned posuzovat zadavatel a lékařští monitoři CRO. Kromě toho se bude v tomto klinickém hodnocení využívat komise pro monitorování dat.

### **10.2 Specifická metoda identifikace GMO a odlišení GMO od dárcovského organismu, příjemce**

Viz 6.7.1

### **10.3 Metody monitorování účinku na ekosystém**

Nerelevantní

### **10.4 Techniky (metody) detekce přenosu vloženého dědičného materiálu na další organismy**

Nerelevantní

### **10.5 Plocha na které bude monitoring prováděn**

Nerelevantní

### **10.6 Četnost monitoringu**

Nerelevantní

## **11. Informace a opatření po skončení pokusu a o nakládání s odpady**

### **11.1 Popis opatření po skončení pokusu**

Po ukončení klinického hodnocení se nepředpokládají žádná mimořádná opatření, neboť veškerý odpad, který vznikne v souvislosti s nakládáním s GMO bude průběžně likvidován. Místo nakládání s GMO bude rovněž průběžně sanováno a dezinfikováno.

### **11.2 Způsob likvidace GMO a kontroly jejich účinnosti**

Veškerý odpad vzniklý v průběhu nakládání s GMO (jednorázové podložky, jednorázové rukavice, jednorázové pláště, roušky, čepice) bude odkládán do připravených jednorázových kontejnerů a vaků viditelně označených „GMO ODPAD“ a bude s ním nakládáno jako se zvlášť nebezpečným biologickým odpadem. Pacienti budou vybaveni jednorázovým bezpečnostně uzavíratelným boxem, kam budou shromažďovat veškerý materiál sloužící k přelepení vpichu. Odpadní box s odpadním převazovým materiálem pacient vrátí zpět do centra klinického hodnocení Fakultní nemocnice Olomouc a zde bude odpad bezpečně uložen do kontejneru pro zvlášť nebezpečný odpad označený „GMO ODPAD“. Destrukce odpadu bude zajištěna dle interních směrnic Fakultní nemocnice Olomouc – odpad bude likvidován jako zvlášť nebezpečný ve spalovně biologického odpadu Fakultní nemocnice Olomouc.

Prázdné ampule, jehly a stříkačky budou odloženy samostatně do speciálních pevně uzamykatelných jednorázových kontejnerů viditelně označených „GMO ODPAD“ a bude s ním nakládáno jako se zvlášť nebezpečným biologickým odpadem. Destrukce bude zajištěna dle interních směrnic Fakultní nemocnice Olomouc – odpad bude likvidován jako zvlášť nebezpečný ve spalovně biologického odpadu Fakultní nemocnice Olomouc.

Pracovní plochy budou okamžitě po přípravě vakcíny sanovány (SAVO, SEKUSEPT forte).

### **11.3 Plán kontrol dohledu**

Bude postupováno podle interních směrnic Fakultní nemocnice Olomouc.

### **11.4 Druhy vytvoření odpadů a jejich předpokládané množství**

Přiměřené množství zdravotnického materiálu (jednorázové podložky, jednorázové rukavice, jednorázové pláště, roušky, čepice, krytí vpichu), použité ampule, stříkačky jehly; použité pro aplikaci až u 10 zařazených pacientů (celkově až 10 ampulek PROSTVAC-V, 36 ampulek PROSTVAC-F a 46 ampulek s prázdným vektorem ptačích neštovic).

### **11.5 Možná rizika vyplývající z nakládání s odpady**

Nepředpokládá se žádné riziko spjaté s odpadem z PROSTVAC – V/F . Centrum klinického hodnocení je instruováno tak, aby při likvidaci infekčního biomedicínského odpadu postupovalo v souladu s „Provozním řádem“ centra. Pacienti dostanou pro likvidaci použitého materiálu k převazu vpichu a rukavic kontejner pro biologicky rizikový odpad, řádně označen „GMO odpad“.



## **11.6 Popis zneškodnění odpadů a metody kontroly účinnosti**

S odpadem bude nakládáno jako se zvlášť nebezpečným biologickým odpadem a bude likvidován ve spalovně Fakultní nemocnice Olomouc.

## **12. Poskytování vzorků GMO**

### **12.1 Množství a předání vzorků poskytovaných podle § 18 odst. 2. zákona**

V rámci klinického hodnocení budou poskytnuty vzorky přípravku PROSTVAC V/ F v celkovém množství 6 ampulek PROSTVAC – V a 6 ampulek PROSTVAC – F. Vzorky budou zaslány zadavatelem klinického hodnocení na adresu SZÚ Praha, Centrum hygieny potravinových řetězců ; Palackého 3a, 612 42 Brno; Doc. Dr. Vladimír Ostrý

## **13. V případě dovozu a vývozu GMO určeného výhradně pro uvádění do životního prostředí**

### **13.1 Stát původu, případně určení**

Německo

### **13.2 Dovozce, případně vývozce**

Almac Clinical Services, Craigavon, Severní Irsko

### **13.3 Maximální množství GMO, které má být dovezeno nebo vyvezeno**

Na základě aktuálního protokolu se v centru Fakultní nemocnice Olomouc předpokládá zařazení až 10 pacientů. během odhadované doby náboru o délce 1,5 roku.

Předpokládá se, že pro všech center, při uvážení malé rezervy na konfiguraci balení a rezervy na ampulky, které bude nutno vyhodit nebo je bude nutno dodat znovu, by mohlo být dovezeno až 7 ampulek PROSTVAC-V, 36 ampulek PROSTVAC-F a 46 ampulek s prázdným vektorem ptačích neštovic.

Do centra se bude zpočátku dodávat jedna krabice obsahující 6 ampulek PROSTVAC-V, jedna krabice placebo PROSTVAC-V, dvě krabice (každá s 6 ampulkami) PROSTVAC-F a dvě krabice placebo (každá s 6 ampulkami) PROSTVAC-F. Jakmile bude aktivováno doplnění zásob při šesti zbývajících ampulkách PROSTVAC-F / placebo nebo třech zbývajících ampulkách PROSTVAC-V / placebo, budou zásoby centra doplněny.

### **13.4 Způsob přepravy**

Veškerá přeprava PROSTVAC bude realizována v souladu se směrnicemi EU pro přepravu GMO a přepravními předpisy IATA. Vakcína nebo placebo PROSTVAC se budou do centra klinického hodnocení přepravovat ve formě krabic po šesti jednotlivých, zamrazených ampulkách. Studijní vakcína se bude uchovávat při teplotě -70 °C nebo nižší, v původním vnějším obalu, a bude uložena na zabezpečeném místě s přístupem pouze pro pracovníky proškolené se zacházením s GMO pro uvádění GMO do životního prostředí. Po podání se použité materiály ze studijní vakcíny ihned vloží do neprodyšně uzavřených bezpečnostních obalů a uchovají se za účelem kontroly jejich počtu. Po odsouhlasení a kontrole počtu klinické

centrum použité studijní materiály zničí v souladu s postupy daného zařízení pro likvidaci biologicky nebezpečného materiálu. Veškeré nepoužité studijní vakcíny budou vráceny do centrálního skladovacího místa ALMAC Clinical Services ve Velké Británii.

Přeprava bude na území České republiky zajišťována společností TNT, která splňuje požadavky pro přepravu GMO dané vyhláškou.

### **13.5 Způsob balení a označování**

Studijní vakcína bude balena do ampulek k individuálnímu použití. Každá dávka PROSTVAC se dodává v ampulkách z borosilikátového skla (2R), uzavřených gumovými zátkami a plastovými-hliníkovými uzávěry, vždy šest ampulek v krabici.

Součástí všech balení bude příbalový leták až v 17 jazycích včetně češtiny. V těchto letácích bude uveden název IMP, léková forma, pokyny k dávkování, objem a koncentrace IMP, požadovaná teplota skladování, výstražné prohlášení, identifikace jako výzkumného preparátu a jako GMO, číslo ampulky, název a adresa výrobce a zadavatele, a konečně datum expirace (pouze na krabici). Samostatné štítky na krabici skýtají prostor pro uvedení čísla centra a jména zkoušejícího.

### **14. Místo uložení dokumentace o nakládání s GMO vedené podle § 19 písm.b) zákona**

V centru klinického hodnocení Fakultní nemocnice Olomouc bude dokumentace o nakládání s GMO součástí dokumentace vedené ke klinickému hodnocení (ISF) uložena u hlavního zkoušejícího.

### **15. Plán školení zaměstnanců před zahájením nakládání s GMO a jejich následné proškolení**

Úvodní zaškolení pracovníků, kteří budou nakládat s GMO (všech členů studijních týmů) na počátku klinického hodnocení a opakovaná proškolení každého půl roku budou prováděna poradcem pro GMO. Pacienti účastníci se klinického hodnocení budou proškoleni proškolenými členy studijního týmu na počátku klinického hodnocení.

Školící materiály spolu se prezenční listinou podepsanou jednotlivými účastníky, stejně tak jako záznam o proškolení jednotlivých pacientů budou součástí dokumentace klinického hodnocení (ICF) v centru klinického hodnocení. V případě, že se někteří členové studijního týmu nebudou moci školení z jakéhokoli důvodu účastnit bude pro ně provedeno školení v náhradním termínu. (Příloha Vzor prezenční listiny proškolení zaměstnanců, Vzor individuálního školení pacienta)

### **Vyjádření odborného poradce pro práci s GMO:**

Souhlasím se zněním Žádosti a jejím zařazením do kategorie Uvádění geneticky modifikovaného organismu do životního prostředí.

.....

.....

MUDr. Soňa Peková, Ph.D.  
(odborný poradce pro práci s GMO)

Datum

**Plán pro případ havárie („havarijní plán“) pro práci s geneticky modifikovanými organismy při uvádění geneticky modifikovaného organismu do životního prostředí.**

**– pracoviště Fakultní nemocnice Olomouc – Urologická klinika**

**a) Identifikační údaje pracoviště a kontaktní adresy**

**Pracoviště:** Urologická klinika  
Fakultní nemocnice Olomouc  
I.P.Pavlova 6  
775 20 Olomouc

**IČO:** 00098892

**Statutární orgán:** ředitel MUDr. Radomír Maráček

**Ředitel společnosti:** MUDr. Radomír Maráček  
**Adresa:** Fakultní nemocnice Olomouc  
I.P.Pavlova 6  
775 20 Olomouc

**Zřizovatel:** Ministerstvo zdravotnictví  
Palackého náměstí 4, 128 01 Praha 2

***Odborný poradce***

**Jméno:** MUDr. Soňa Peková, PhD.  
**Trvalé bydliště:** 5. Května 23  
27308 Pchery, okr. Kladno

**Kontaktní adresa:** Laboratoř Molekulární Diagnostiky  
Laboratoře CHAMBON, s.r.o  
Evropská 176/16  
160 00 Praha 6

**E-mail:** pekovas@post.cz  
**Fax:** -  
**Tel.:** 221985475

***Osoby odpovědné za eliminaci havárie***

V případě havárie kontaktujte osobně nebo telefonicky vedoucího pracoviště:  
MUDr. Jaroslav Perníčka PhD. Tel: 585 853 461

**b) Popis oblasti/prostoru, kde se bude manipulovat s GMO**

Práce s GMO na pracovišti zahrnují převzetí dodané vakcíny ve zmrazeném stavu, její umístění v mrazicím boxu -70°C v samostatné místnosti sloužící tomuto účelu ve zdravotnickém zařízení, dále přípravu vakcíny k aplikaci a vlastní podkožní podání pacientovi v odběrové a aplikační místnosti zdravotnického zařízení. Všechny místnosti, v nichž bude manipulace s GMO probíhat, jsou řádně označeny „PRÁCE S GMO“

Pracoviště je koncipováno svým prostorovým a technickým vybavením jako zdravotnické zařízení pro léčbu pacientů. Je rozděleno na lůžkovou a ambulantní část a je v samostatné stojící budově v areálu Fakultní nemocnice Olomouc. Ambulance je v samostatném podlaží budovy se zvláštním vchodem na pracoviště. Ambulance je rozdělena na část pro zdravotnický personál (šatna, denní místnost, pracovny lékařů, příprava léků, odběrová/infuzní místnost) a část pro pacienty (vyšetřovny, čekárna).

Vakcína GMO (PROSTVAC-V/F) je uskladněna v mrazicím boxu, který je použit pouze pro tento účel a řádně, viditelně označen „GMO materiál“. Místnost je uzamykatelná a přístup je omezen pouze na proškolené členy týmů, kteří se podílí na klinických hodnoceních.

Vakcínu přebírá od kurýrní služby pouze proškolený pracovník, který ji uloží do mrazicího boxu. K manipulaci používá jednorázové rukavice.

Označená pracovní plocha pro přípravu vakcíny GMO se v době přípravy nepoužívá pro jiný účel je překryta jednorázovým krytím a po přípravě je vydesinfikována (SAVO, SEKUSEPT active). Pracovníci používají při přípravě jednorázové rukavice, jednorázový plášť z netkané textilie, jednorázovou roušku, jednorázovou čepici. Vakcína, která je připravena k použití je ihned vložena do přenosného, uzavíratelného, nerozbitného kontejneru, určenému pouze k tomuto účelu a viditelně označeném „GMO Materiál“. Kontejner s vakcínou je určeným členem studijního týmu předán dalšímu členu studijního týmu (zaslepená sestra), který ji dopraví do určené urologické ambulance k aplikaci pacientovi.

Místnost určená pro manipulaci s vakcínou je řádně označena (PRÁCE S GMO) a v době manipulace s GMO se nepoužívá k jinému účelu. Pracovní plocha určená pro manipulaci s GMO je překryta jednorázovým krytím a po aplikaci GMO je okamžitě vydesinfikována (SAVO, SEKUSEPT active). Pověřený, proškolený člen studijního týmu odloží kontejner na připravenou pracovní plochu. Určená a proškolená sestra, otevře kontejner, vyjme připravenou vakcínu a ihned aplikuje pacientovi. Při manipulaci s GMO používá jednorázové rukavice, roušku, čepici a jednorázový plášť.

Místo aplikace vakcíny bude překryto sterilním krytím a přelepeno. Pacient bude vybaven dostatečným množstvím sterilního krytí a náplastmi pro opětovné překrytí místa vpichu doma a kontejnerem řádně označeným „GMO ODPAD“ pro shromažďování krycího materiálu použitého pro překrytí místa vpichu.

Okna v místnosti určené k nakládání s GMO jsou opatřena sítěmi proti vniknutí hmyzu. Místnost je uzamykatelná bezpečnostními zámky. Přístup je omezen pouze na řádně proškolené členy studijního týmu.

**c) Plán pracoviště s označením míst významných pro omezení následků havárie; při dopravě popis zajištění geneticky modifikovaných organismů proti úniku**

- Níže je uveden plán pracoviště s vyznačením místností, ve kterých dochází k nakládání s GMO, rovněž je vyznačen hlavní uzávěr vody a lokace hlavního spínače elektrického proudu (Příloha 1)

**d) Popis havárie, která může vzniknout v prostorách nebo na místě, kde probíhá nakládání s geneticky modifikovanými organismy.**

Předplněné injekční stříkačky jsou plastové, jehla je kryta ochranným krytem a proto při práci s GMO (PROSTVAC V/F) hrozí minimální riziko dané potřísněním při neopatrné manipulaci s předplněnou injekční stříkačkou. Tento typ havárie může vést ke kontaminaci pracovníka, který manipulaci prováděl. Při likvidaci odpadů nehrozí únik GMO do životního prostředí.

Hmyz a hlodavci jako vektor přenosu GMO jsou z rizika vyloučeni díky preventivním opatřením: síť na oknech proti vniknutí hmyzu.

**e) Přehled možných následků havárie na zdraví lidí, zvířata, životní prostředí a biologickou rozmanitost, včetně způsobů zjišťování těchto následků a účinné ochrany před nimi**

Teoreticky hrozí riziko kontaminace pracovníka (nebo i dalších osob) geneticky modifikovaným organismem. Riziko závažného zdravotního je zcela minimální a to z následujících důvodů:

PROSTVAC-F se v lidských buňkách nereplikuje, proto je riziko horizontálního přenosu mimořádně nízké. Toto riziko lze ještě více zmírnit uplatňováním standardních opatření biologické bezpečnosti, například opatření, která se uplatňují při zacházení s lidskou krví nebo tkáňovými vzorky. Na základě rozsáhlých klinických zkušeností s příbuznými virovými vakcínami nebyl horizontální přenos hlášen.

Mezi dárcovským organismem (*Homo sapiens*) a organismem příjemců (virus kravských a ptačích neštovic) k žádné přirozené výměně genetického materiálu nedochází. Životní cyklus viru neštovic probíhá v cytoplazmě; viry neštovic se neintegrují do genomu infikované buňky. Vzhledem k fyzikálnímu oddělení lidského genomu a genomu viru je přirozená výměna genetického materiálu mezi dárcem a příjemcem nepravděpodobná. Pokud jde o virus ptačích neštovic, je výskyt jakékoliv takové genetické výměny rovněž vyloučen vzhledem k chybějící schopnosti replikace viru ptačích neštovic u savčích druhů.

Podávání PROSTVAC-V/F bude probíhat pouze ve vybraných klinických centrech, v chráněném režimu podávání v souladu s Oznámením; riziko úniku vakcíny do životního prostředí se tudíž nepředpokládá. PROSTVAC-V ani PROSTVAC-F nejsou schopny infikovat mikroby či rostliny.



Riziko přenosu rekombinantních virů na exponované zdravotnické pracovníky je velmi nízké. V žádném z provedených klinických hodnocení s virem PROSTVAC-V ani souvisejícími vakcínami na bázi kravských neštovic se nevyskytly žádné případy přenosu na zdravotnické pracovníky.

Nicméně vzhledem k potenciálu přenosu kravských neštovic nebo rekombinantních virů kravských neštovic je potřeba, aby se zdravotnické pracovníce, které jsou těhotné, či pracovníci s kožním postižením doprovázeným exfoliací nebo s narušenou imunitou vyvarovali expozice kontaminovaným obvazům nebo místům očkování. Všichni zdravotničtí pracovníci, kteří jsou v přímém kontaktu s kontaminovanými obvazy nebo s jinými infekčními materiály pacientů účastnících se studie, dostanou podrobné pokyny s řádnými profylaktickými opatřeními. Nejkritičtější preventivním opatřením je řádné zacházení s vakcínou a důkladná hygiena rukou po každém kontaktu s místem vakcinace nebo s materiály použitými k bandáži. Nevyskytly se žádné případy přenosu kontaktem z civilních příjemců vakcíny na osoby, s nimiž byli v kontaktu.

**Rekombinantní viry kravských a ptačích neštovic jsou v současné době komerčně dostupné a v životním prostředí jsou široce distribuovány jako veterinární vakcíny.**

**Při práci s těmito vakcínami není riziko vyšší než při práci s jakoukoli jinou geneticky neupravenou vakcínou, za zachování zásad správné manipulace s vakcinační látkou, jak je blíže specifikováno v Provozním řádu klinického pracoviště (příloha Oznámení). Při zacházení s vakcínou představuje určité riziko pouze možnost potřísnění v případě rozbití ampule nebo poranění při aplikaci vakcíny, což však nesouvisí s genetickou modifikací GMO.**

#### **f) Validované postupy detekce přítomnosti geneticky modifikovaných organismů**

Vzhledem k charakteristice GMO (rekombinantní vakcína pro injekční použití u lidských subjektů) je detekce geneticky modifikovaných organismů ve studované kohortě pacientů a na pracovišti přípravy injekčních přípravků na urologické klinice nerelevantní; nebude tudíž prováděna.

#### **g) Validované metody a postupy použitelné k likvidaci geneticky modifikovaných organismů a k dekontaminaci zasaženého prostoru**

Při likvidaci havárie je potřeba provést (s využitím ochranných pomůcek) vysušení zasaženého prostoru (odpad bude inaktivován autoklávováním) a ošetření zasaženého prostoru desinfekčním činidlem (SAVO SEKUSEPT active) – desinfekční chemikálie jsou uloženy v příslušné ambulanci na viditelném místě u výlevky a označeny „Prostředky k sanaci GMO“. Pokud budou zasaženy jednotlivé drobné předměty v ambulanci, provede se jejich dekontaminace desinfekčními prostředky, případně autoklávováním.

V případě zasažení pracovníka GMO je potřeba provést nezbytná opatření – výplach úst, nosu, očí příp. poraněného místa a zabezpečit lékařské ošetření. Z každé havárie bude vyhotoven písemný záznam na předepsaném formuláři (tiskopis uložen u vedoucího pracovníka), který bude obsahovat:

- datum, čas, místo
- popis mimořádné události  
kontaminace osob, únik mimo zdravotnické pracoviště
- způsob dekontaminace
- vyhodnocení dekontaminace
- přijatá opatření pro zabránění opakování

#### **h) Metody izolace prostor a zařízení zasažených havárií, včetně metod kontroly účinnosti izolace**

Každé místo havárie musí být viditelně označeno a pokud možno fyzicky izolováno. Opětné zprovoznění zajistí některá z osob zodpovědných za likvidaci havárie (viz výše).

#### **i) Popis a nákres uložení asanačních prostředků použitelných k likvidaci geneticky modifikovaných organismů a dekontaminaci zasaženého prostoru**

SAVO, SEKUSEPT active.

Asanační prostředky jsou uloženy v příslušné ambulanci v hygienickém koutě u umyvadla nebo výlevky a jsou zřetelně označeny „Prostředky k sanaci GMO“.

#### **j) Postupy na ochranu zdraví lidí, zvířat, životního prostředí a biologické rozmanitosti v případě nežádoucího ovlivnění vzniklou havárií;**

- první pomoc pracovníkům kontaminovaným GMO
- dekontaminace zasaženého místa
- vyhodnocení příčin havárie
- zabránění opakování havárie.

#### **k) Popis postupu zajištění následného monitoringu prostor a pozemků po ukončení asanace**

Prostory ambulance, ve kterých je zacházeno s GMO jako s druhou kategorií rizika jsou pravidelně sanovány chemickou dezinfekcí, odpady jsou pravidelně likvidovány předepsaným způsobem (chemicky, autoklávováním, likvidace biologického odpadu v jednorázových kontejnerech specializovanou firmou). Oděvy pracovníků jsou pravidelně (minimálně 1x týdně) sanovány specializovanou firmou pro praní nemocničního a infekčního prádla a oděvů.

Nepředpokládá se žádný způsob šíření GMO mimo pracovní prostory ambulance. Sanace pozemků a zdravotnického zařízení není nutná.

#### **l) Úřady nebo osoby, kterým se havarijní plán předkládá**

Ministerstvo životního prostředí

Ministerstvo zdravotnictví

Hasičský záchranný sbor Olomouckého kraje

Magistrát města Olomouc

**m) Způsob vyrozumění správních orgánů v případě havárie**

V případě havárie budou vyrozuměny následující orgány:

Ministerstvo životního prostředí

Ministerstvo zdravotnictví

Česká inspekce životního prostředí

Vyrozumění bude provedeno elektronickou poštou s následným písemným potvrzením.

**n) Vyjádření odborného poradce, datum podpis.**

**Autor vypracovaného dokumentu:** MUDr. Jaroslav Perníčka PhD.

**Datum vypracování dokumentu:** 11.11.2011

**Vyjádření odborného poradce:**

Souhlasím se zněním havarijního plánu pro uvádění geneticky modifikovaného organismu do životního prostředí pro pracoviště Fakultní nemocnice Olomouc – urologická klinika.

.....  
MUDr. Soňa Peková, Ph.D.  
(odborný poradce pro práci s GMO)

.....  
Datum

**Provozní řád pracoviště pro práci s GMO  
Pracoviště Fakultní nemocnice Olomouc  
Urologická klinika**

a) jméno, popřípadě jména, příjmení, obchodní firmu, místo podnikání a identifikační číslo, bylo-li přiděleno, oprávněné osoby, je-li fyzickou osobou oprávněnou k podnikání

b) název nebo obchodní firmu, sídlo a identifikační číslo, bylo-li přiděleno, oprávněné osoby, je-li právnickou osobou, jakož i jméno, popřípadě jména, příjmení a adresu bydliště statutárního orgánu oprávněné osoby

**Pracoviště:**

Urologická klinika  
Fakultní nemocnice Olomouc  
I.P.Pavlova 6  
775 20 Olomouc

**IČO:** 00098892

**Statutární orgán:** ředitel MUDr. Radomír Maráček

**Ředitel společnosti:** MUDr. Radomír Maráček.

**Adresa:** Fakultní nemocnice Olomouc  
I.P.Pavlova 6  
775 20 Olomouc

**Zřizovatel:** Ministerstvo zdravotnictví  
Palackého náměstí 4, 128 01 Praha 2

c) jméno, popřípadě jména, příjmení a adresu bydliště vlastníka budovy nebo pozemku, pokud není vlastník totožný s oprávněnou osobou

nerelevantní

d) jméno, popřípadě jména, příjmení, adresu bydliště, číslo telefonu, popřípadě též číslo faxu a adresu elektronické pošty odborného poradce

**Jméno:** MUDr. Soňa Peková, PhD.

**Bydliště:** 5. Května 23  
Pchery, okr. Kladno  
273 08  
tel: 732 517 266

**Kontaktní adresa:** Laboratoř molekulární diagnostiky,  
Laboratoře CHAMBON, s.r.o.  
Evropská 176/16  
160 00 Praha 6

**2.3.E-mail:** pekovas@post.cz

**Fax:** -

**Tel.:** 221 985 475

**e) kategorii rizika nakládání s geneticky modifikovaným organismem které smí být na pracovišti prováděno, jedná-li se o uzavřené nakládání**

V předkládané klinické studii se jedná o kategorizaci rizika zacházení s GMO v režimu „Uvádění GMO do životního prostředí“.

**f) jméno, popřípadě jména, příjmení, adresu bydliště, číslo telefonu, popřípadě též číslo faxu a adresu elektronické pošty osoby odpovědné za provoz pracoviště**

MUDr. Jaroslav Perníčka PhD., primář urologické kliniky

Tel: 585 853 461

Fax: -

E-mail: pernickaj@fnol.cz

**g) charakter, účel, popis technických prvků zajišťujících uzavření prostoru, pokud se jedná a uzavřené nakládání**

Práce s GMO na pracovišti zahrnují převzetí dodané vakcíny ve zmrazeném stavu, její umístění v mrazicím boxu -70°C v samostatné místnosti sloužící tomuto účelu ve zdravotnickém zařízení, dále přípravu vakcíny k aplikaci a vlastní podkožní podání pacientovi v odběrové a aplikační místnosti zdravotnického zařízení. Všechny místnosti, v nichž bude manipulace s GMO probíhat, jsou řádně označeny „PRÁCE S GMO“

Pracoviště je koncipováno svým prostorovým a technickým vybavením jako zdravotnické zařízení pro léčbu pacientů. Je rozděleno na lůžkovou a ambulantní část a je v samostatně stojící budově v areálu Fakultní nemocnice Olomouc. Ambulance je v samostatném podlaží budovy se zvláštním vchodem na pracoviště. Ambulance je rozdělena na část pro zdravotnický personál (šatna, denní místnost, pracovny lékařů, přípravná léků, odběrová/infuzní místnost) a část pro pacienty (vyšetřovny, čekárna).

Vakcína GMO (PROSTVAC-V/F) je uskladněna v mrazicím boxu, který je použit pouze pro tento účel a řádně, viditelně označen „GMO materiál“ Místnost je uzamykatelná a přístup je omezen pouze na proškolené členy týmů, kteří se podílí na klinických hodnoceních.

Vakcínu přebírá od kurýrní služby pouze proškolený pracovník, který ji uloží do mrazicího boxu. K manipulaci používá jednorázové rukavice.

Označená pracovní plocha pro přípravu vakcíny GMO se v době přípravy nepoužívá pro jiný účel je překryta jednorázovým krytím a po přípravě je vydesinfikována (SAVO, SEKUSEPT active). Pracovníci používají při přípravě jednorázové rukavice, jednorázový plášť z netkané textilie, jednorázovou roušku, jednorázovou čepici. Vakcína, která je připravena k použití je ihned vložena do přenosného, uzavíratelného, nerozbitného kontejneru, určenému pouze k tomuto účelu a viditelně označeném „GMO Materiál“. Kontejner s vakcínou je určeným členem studijního týmu předán dalšímu členu studijního týmu (zaslepená sestra), který ji dopraví do určené urologické ambulance k aplikaci pacientovi.

Místnost určená pro manipulaci s vakcínou je řádně označena (PRÁCE S GMO) a v době manipulace s GMO se nepoužívá k jinému účelu. Pracovní plocha určená pro manipulaci s GMO je překryta jednorázovým krytím a po aplikaci GMO je okamžitě vydesinfikována (SAVO, SEKUSEPT active). Pověřený, proškolený člen studijního týmu odloží kontejner na připravenou pracovní plochu. Určená a proškolená sestra, otevře kontejner, vyjme připravenou vakcínu a ihned aplikuje pacientovi. Při manipulaci s GMO používá jednorázové rukavice, roušku, čepici a jednorázový plášť.

Místo aplikace vakcíny bude překryto sterilním krytím a přelepeno. Pacient bude vybaven dostatečným množstvím sterilního krytí a náplastmi pro opětovné překrytí místa vpichu doma a kontejnerem řádně označeným „GMO ODPAD“ pro shromáždění krycího materiálu použitého pro překrytí místa vpihu.

Okna v místnosti určené k nakládání s GMO jsou opatřena sítěmi proti vniknutí hmyzu. Místnost je uzamykatelná bezpečnostními zámky. Přístup je omezen pouze na řádně proškolené členy studijního týmu.

Místnosti pro skladování, přípravu a aplikaci vakcíny jsou znázorněny na plánu pracoviště: viz příloha 4

**h) seznam závazných pracovních postupů** (jednotlivé dokumenty jsou uloženy u vedoucího pracoviště)

- Pracovní postupy zdravotnických úkonů (aplikační postupy apod.)
- Záznam o likvidaci biologického odpadu
- Záznam o školení BOZP – uložen na personálním oddělení nemocnice
- Provozní řád zdravotnického zařízení
- Havarijní plán zdravotnického zařízení

**i) seznam pracovníků proškolených pro práci na pracovišti**

MUDr. Jaroslav Perníčka PhD.  
MUDr. Šárka Kudláčková  
Karla Krejčířiková



**j) výčet a přibližné množství geneticky modifikovaných organismů, se kterými bude na pracovišti nakládáno**

Na pracovišti jsou používány dva typy geneticky modifikovaných organismů:

- PROSTVAC-V (rekombinantní virus lidských neštovic), jedna předplněná injekce 0,5 ml /pacient/ návštěva
- PROSTVAC-F (rekombinantní virus ptačích neštovic), jedna předplněná injekce 0,5 ml /pacient/ návštěva

V centru klinického hodnocení Fakultní nemocnice Olomouc se předpokládá zařazení asi 10 pacientů v průběhu 1,5 ročního zařazovacího období.

**k) organizační a technologické zabezpečení pracoviště**

Pracoviště je pro práci s GMO vybaveno následovně:

- osobními ochrannými pracovními prostředky (plášť, rukavice, roušky, čepice)
- základními prostředky pro poskytnutí první pomoci (desinfekce, obvaz, náplast)
- prostředky pro likvidaci havárie (SAVO, SEKUSEPT active).
- omyvatelnými pracovními stoly
- přívodem teplé a studené vody
- vstupy jsou opatřeny nápisy „Práce s GMO
- havarijním plánem pro práci s GMO
- provozním řádem pracoviště pro práci s GMO

**l) opatření pro případ havárie a požáru, včetně havarijního plánu podle §20**

Havarijní plán je vypracován pro geneticky modifikovaný organismus PROSTVAC V/F. Je vyvěšen v místnosti určené k práci s GMP. Požární řád pracoviště je vyvěšen na viditelném místě a platí i pro oblast, kde se pracuje s GMO.

**m) povinnosti pracovníků při práci (dodržování pracovních postupů, postup sanitace prostoru a zařízení po ukončení pracovní činnosti, postup dekontaminace nástrojů, osobních ochranných prostředků a oděvů**

Pracovníci jsou povinni postupovat v souladu se směrnicemi pro práci s GMO – tzn. řídit se „Provozním řádem pro práci s GMO“, příp. „Havarijním plánem pro práci s GMO“. Je požadováno minimalizovat možnost kontaminace pracovníků GMO při všech pracovních postupech.

Povinnosti pracovníků při práci:

1. veškerý materiál obsahující GMO musí být řádně označený.
2. osoby pracující s GMO musí vést záznam o práci a předložit jej na vyžádání odbornému poradci.
3. veškerý odpadní materiál musí být inaktivován předepsaným způsobem – chemickou desinfekcí a poté likvidován jako zvlášť nebezpečný biologický odpad zdravotnického pracoviště specializovanou firmou.

4. pracovníci jsou povinni hlásit všechny závady. V případě havárie jsou povinni postupovat podle „Havarijního plánu“, včetně vyplnění formuláře „Oznámení o vzniku mimořádné události“.
5. pracovníci jsou povinni dodržovat předepsané pracovní postupy. Jsou povinni postupovat v souladu s vyvěšeným provozním řádem.
6. při práci s geneticky modifikovaným PROSTVAC V/F musí pracovníci používat osobní ochranné pomůcky.
7. dekontaminace a sanitace prostoru a zařízení probíhá v pravidelných intervalech v souladu s Provozním řádem zdravotnického pracoviště (dezinfekční plán, specializovaná úklidová služba, spotřební materiál na jednorázové použití, dekontaminace chemická, dekontaminace autoklávováním).

#### **n) systém a četnost kontrol prostoru, zařízení a ochranných opatření**

Kontroly přítomnosti (resp. nepřítomnosti) GMO na pracovišti nejsou proveditelné vzhledem k povaze GMO.

#### **o) povinnosti pracovníků při údržbě zařízení**

irelevantní

#### **p) zásady hygieny a bezpečnosti práce v souladu s ustanovením zvláštních právních předpisů**

- kontakt s GMO je nutné omezit na nejmenší možnou míru (dopravovat vakcínu GMO k aplikaci a aplikovat opatrně v ochranných pomůckách).
- používat předepsané ochranné pomůcky.
- ve zdravotnickém zařízení jíst a pít na určených místech.
- jednorázové ochranné pomůcky (plášť, rukavice, roušku, čepici) svléknout okamžitě po aplikaci vakcíny pacientovi a uložit do připraveného, GMO kontejneru.
- v případě potřeby použít prostředky pro první pomoc uložené na zdravotnickém zařízení na příslušném místě.

#### **q) způsob nakládání s odpady a kontaminovanými materiály a předměty, zejména postupy zneškodnění geneticky modifikovaného organismu a způsob kontroly jejich účinnosti**

Použitá stříkačka s jehlou, v níž byla vakcína, je okamžitě aplikaci odložena do speciálního jednorázového pevně uzavíratelného kontejneru pro zvlášť nebezpečný biologický odpad, který je viditelně označen „GMO ODPAD“.

Jednorázové krytí pracovní plochy, prostředky použité k sanaci prostředí, jednorázové rukavice, jednorázový plášť, čepice a rouška jsou okamžitě po sanaci pracovní plochy odloženy do připraveného vaku pro zvlášť nebezpečný biologický odpad, který je viditelně označen „GMO odpad“

Odpadní kontejner a vak jsou skladovány v určené místnosti až do doby svozu odpadu (jednou týdně) k likvidaci specializovanou firmou.

Všechn materiál bude pacient shromažďovat v boxu k tomu určeném a řádně označeném (GMO ODPAD). Tento box vrátí při nejbližší návštěvě (nejdéle za 14 dní-1 měsíc) do centra klinického hodnocení, kde bude box uložen do GMO odpadu, poté bude zlikvidován předepsaným způsobem.

**r) seznam osobních ochranných pracovních prostředků a dalších pomůcek, které stanoví zaměstnavatel v souladu se zvláštním právním předpisem, s uvedením činností, ke kterým musí být používány**

Při práci s GMO je nutné používat následující ochranné pomůcky

- jednorázové rukavice
- jednorázový plášť, rouška, čepice

**s) zakázané činnosti na pracovišti**

- je zakázáno v místě aplikace GMO jíst, pít

**t) zásady vedení evidence o provozu zařízení, prováděné sanitaci a kontrolách zabezpečovacích prvků**

Každý pracovník je povinen vést protokol o práci s GMO v příslušném sešitě.

**u) opatření k zabránění vstupu nepovolaných osob**

V prostoru aplikace vakcíny GMO se mohou pohybovat pouze osoby k tomu určené. Tento je zabezpečen bezpečnostním zámekem. Prostor nemocnice je monitorován 24h bezpečnostní službou.

**v) irelevantní**

**w) údaj o případném časovém omezení platnosti provozního řádu.**

Platnost provozního řádu je omezena na dobu trvání klinického hodnocení BNIT-PRV-301.

Provozní řád vypracoval:

MUDr. Jaroslav Pernička PhD.

**Vyjádření odborného poradce:**

Souhlasím se zněním provozního řádu pro pracoviště Fakultní nemocnice Olomouc – urologická klinika

---

Provozní řád Fakultní nemocnice Olomouc – urologická klinika

.....  
MUDr. Soňa Peková, Ph.D.  
(odborný poradce pro práci s GMO)

.....  
Datum

# HAVARIJNÍ PLÁN

## Příloha 1

Fakultní nemocnice Olomouc – Urologická klinika

### Legenda k plánu pracoviště:



Hlavní uzávěr vody



Hlavní uzávěr plynu



Hlavní uzávěr el. proudu



### Vyznačení hlavních uzávěrů - Budova „A“, 2. podzemní podlaží

I. chirurgická klinika, II. chirurgická klinika, Urologická klinika, Traumatologické oddělení, Kardiochirurgická klinika, Oddělení urgentního příjmu, Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, Oddělení plastické a estetické chirurgie, Oddělení intenzivní péče chirurgických oborů, Radiologická klinika, Centrální operační sál a Centrální sterilizace

