

# Predpisi za pripravke tkivnega inženirstva in za somatsko celično zdravljenje

## Regulative for tissue engineered medical products and somatic cell therapy

Saša Puhar, Matjaž Jeras

**Povzetek:** Tkivno inženirstvo je novo, hitro se razvijajoče interdisciplinarno področje biotehnologije, ki se ukvarja z izdelavo klinično uporabnih celičnih, tkivnih in organotipskih kultur *in vitro*. Sem sodi tudi celično inženirstvo, ki predstavlja osnovo za somatsko celično zdravljenje s klinično uporabnimi pripravki iz celic, pridobljenimi iz tkiv človeškega izvora in gojenih *ex vivo*. Nenadzorovana uporaba človeških celic in tkiv lahko pri prejemniku povzroči bolezni in druge neželene učinke. Zato mora biti osnovni kriterij vrednotenja in nadzora pripravkov tkivnega inženirstva ocena tveganja njihove uporabe za bolnika – prejemnika. Prenos nalezljivih bolezni predstavlja nedvomno največjo nevarnost pri tovrstnem zdravljenju, poleg tega pa obstaja tudi tveganje zaradi okužb celičnih kultur ter izgube tkivno specifičnih lastnosti celic, do katerih lahko pride med njihovim gojenjem. Zaradi kompleksnosti pripravkov tkivnega inženirstva in razmeroma omejenih izkušenj pri njihovi klinični uporabi je nujna pravna ureditev področja, in sicer tako, da bo zagotovljena kar največja stopnja kakovosti, varnosti in učinkovitosti tovrstnega zdravljenja.

**Ključne besede:** tkivno inženirstvo, somatske celice, celične kulture, celično in tkivno zdravljenje.

**Abstract:** Tissue engineering is a new and rapidly developing interdisciplinary field of biotechnology, dealing with tissues and organs by applying viable cell-, tissue- and organotypic cultures prepared *in vitro*. Somatic cell therapy is a part of tissue engineering and it encompasses preparation of viable human cells, cultured *ex vivo* in a way to achieve sufficient number of cells suitable for the re-implantation into recipient. Beside wanted effect, the application of human cells and tissues may cause transferable diseases and other unwanted effects in the patient. Risk estimation for the recipient is therefore the main criteria for their application. Transmission of infectious diseases thus represents the major threat, along with possible contamination of cell cultures and the loss of specific cell characteristics occurring during their *in vitro* manipulation. Due to the complexity of tissue engineered medical products and the lack of clinical experience following their application it is necessary to thoroughly regulate this field in order to assure quality, safety and effectiveness.

**Key words:** tissue engineering, somatic cells, cell cultures, cell and tissue therapy.

### 1 Uvod

Vse bolj poglabljeno poznavanje patofizioloških mehanizmov bolezni na molekularni in biokemijski ravni ter intenziven razvoj biotehnologije sta privedla do novih pristopov k zdravljenju bolezni. Tkivno inženirstvo je hitro razvijajoče se interdisciplinarno področje, katerega cilji so obnovitev tkiv s pomočjo živih celic, ki jim lahko po potrebi dodamo tudi pomožne snovi in posamezne izbrane biomolekule (1, 2, 3). Žive tkivne nadomestke lahko uporabimo za obnovo, vzdrževanje ali izboljšanje funkcij posameznih tkiv in organov. Ti pripravki se razlikujejo od klasičnih zdravil ter drugih ustaljenih oblik zdravljenja v tem, da se za stalno vgradijo v telo in nato s svojimi specifičnimi lastnostmi vplivajo na zdravljenje oziroma lajšanje bolezni ter poškodb (3).

S tkivnoinženirskimi postopki pripravljamo avtologne<sup>1</sup> ter alogenske<sup>2</sup> tkivne in celične pripravke, ki lahko vsebujejo tako žive kot mrtve

celice, katerim po potrebi dodamo pomožne snovi (3). V najožjem pomenu tkivno inženirstvo ne obsega genskega zdravljenja, ksenogenskih<sup>3</sup> pripravkov ter pripravkov iz celic, katerih biološke lastnosti so znatno spremenjene (le-te ureja zakonodaja o zdravilih za napredno zdravljenje) (4, 5).

Večina današnjih pripravkov tkivnega inženirstva sestoji iz dveh ključnih sestavin (6):

**1. Celic**, ki so lahko avtolognega ali alogenskega izvora. Teoretično bi lahko uporabljali različne vrste celic, a znanstvena in tehnološka dognanja tega za sedaj še ne omogočajo. Celice predstavljajo »glavno učinkovino«, njihove lastnosti pa so ključne za kakovost, učinkovitost in varnost končnih pripravkov.

**2. Pomožnih snovi**, pri čemer lahko uporabljamo tako naravne kot umetne biološko sprejemljive ter največkrat razgradljive, včasih pa

Saša Puhar, mag. farm., Educell d.o.o., Letališka c. 33, 1000 Ljubljana

dr. Matjaž Jeras, mag. farm., Center za tipizacijo tkiv, Zavod RS za transfuzijsko medicino, Štajmerjeva 6, 1000 Ljubljana

<sup>1</sup> avtologno: uporaba bolnikovih lastnih celic

<sup>2</sup> alogensko: uporaba človeških celic drugega dajalca

<sup>3</sup> ksenogensko: uporaba živalskih celic

tudi nerazgradljive materiale. Najpogosteje uporabljamo polimere mlečne in poliglikolne kisline, estre hialuronske kisline, različne kolagene, alginat, hidroksiapatit ipd. Tovrstne pomožne snovi predstavljajo tridimenzionalno okolje, ki omogoča razrast celic ter pripravo tkiva *ex vivo*, poleg tega pa zagotavlja ustrezno trdnost končnih pripravkov, ki je potrebna za uspešno implantacijo. Interakcije med celicami in pomožnimi snovmi imajo lahko zelo velik vpliv na učinkovitost končne pripravke.

Glede na raznolikost pripravkov tkivnega inženirstva (različna tkiva, medceličnina, sporočilne molekule...) je tveganje pri njihovi uporabi različno. Najpomembnejše je povezano s prenosom nalezljivih bolezni, pa tudi s stopnjo biološke prenosljivosti ter s samo učinkovitostjo pripravkov (6).

Dodatno tveganje predstavlja tudi sam način priprave celic *ex vivo*, saj lahko pride do spremembe njihovih genotipskih in fenotipskih ter s tem bioloških lastnosti, kar je lahko posledica različnih načinov njihove osamitve, gojenja ali celo farmakološke obdelave (1, 7).

Glede na stopnjo tveganja pri klinični uporabi lahko pripravke tkivnega inženirstva delimo na dve skupini (6, 5):

**1. Pripravki z nizko stopnjo tveganja:** Sem uvrščamo pripravke iz avtolognih ali alogenskih celic oziroma tkiv človeškega izvora, katerih biološke lastnosti se z uporabljenimi postopki za njihovo pripravo *in vitro* niso znatno spremenile. Med takšne varne postopke uvrščamo rezanje tkiv, mehansko in encimsko osamitev celic, centrifugiranje, liofilizacijo, zamrzovanje ipd. Nasprotno pa lahko uporaba posameznih rastnih in diferenciacijskih dejavnikov ali ekstrakcija znotrajceličnih sestavin (mineralov, beljakovin) znatno vplivata na lastnosti celic in tkiv.

**2. Pripravki z visoko stopnjo tveganja** (t.i. zdravila za napredno zdravljenje): Sem uvrščamo pripravke iz človeških avtolognih ali alogenskih celic in tkiv, katerih biološke lastnosti so se med pripravo *ex vivo* znatno spremenile. Tipična primera sta namnožitev (proliferacija) in antigensko specifična aktivacija avtolognih imunsko zmožnih celic *ex vivo* (npr. za privzeto oziroma adoptivno imunsko zdravljenje) ter uporaba alogenskih celic, združenih z neceličnimi sestavinami (npr. mikrokapsule, intrinzični ogradni nosilci, medicinski pripomočki). V to skupino sodijo tudi pripravki živalskega izvora oziroma ksenogene celice in tkiva.

## 2 Somatsko celično zdravljenje

Pri somatskem celičnem zdravljenju uporabljamo žive človeške avtologne ali alogenske ter živalske somatske celice, pripravljene *ex vivo*, in sicer za zdravljenje, preventivno ter diagnostično uporabo. Učinek je lahko lokalni ali sistemski (7, 8, 9).

Pripravke za somatsko celično zdravljenje pripravljamo iz živih somatskih celic, ki jih osamimo iz določenih tkiv in jih gojimo tako dolgo, da jih pripravimo v zadostnem številu, potrebnem za uspešno implantacijo. Celice lahko kombiniramo tudi z neceličnimi sestavinami in tako omogočimo zdravljenje v zelo kratkem času. (1, 7).

Prednosti somatskega celičnega zdravljenja so (6):

1. imunosupresija bolnika pri presaditvah avtolognih pripravkov ni potrebna;

2. dostopnost izhodnega tkiva je običajno lahka, poleg tega pa največkrat potrebujemo le majhen delček zdravega tkiva;

3. omogoča učinkovito nadomestitev funkcij poškodovanega organa ali tkiva;

4. zagotovljen dolgotrajen učinek v primerjavi s kronično uporabo klasičnih zdravil.

## 3 Kontrola kakovosti

Biološki pripravki so največkrat zelo kompleksni, zato njihove sestave pogosto ne moremo popolnoma opredeliti. Zaradi tega ne moremo vedno ugotoviti prisotnosti določenih načistot, pa tudi končna kontrola ni vedno učinkovita, zato jih pogosto opredelimo z nadzorom procesa priprave (postopki izdelave, oprema, prostori in osebje) (8, 10).

Sprva je predelava oziroma priprava celic *ex vivo* obsegala le njihovo shranjevanje v tekočem dušiku, postopek, ki so ga izvajali v transfuzijskih bolnišničnih centrih ali v ustreznih raziskovalnih laboratorijih. V tem obdobju sta bila standardizacija in nadzor postopkov predelave celic zelo omejena in popolnoma prepuščena izbiri izvajalcev. Danes lahko postopki predelave obsegajo več stopenj, npr. različne načine osamitve in selekcije celic, gojenje celic *ex vivo*, celično aktivacijo in diferenciacijo, gensko modificiranje ipd. Vse to pa znatno povečuje tveganje pri uporabi tovrstnih pripravkov in zato terja poostren nadzor priprave, validacijo uporabljenih postopkov ter ustrezno dokumentiranje (11).

### 3.1 Pomembni dejavniki, potrebni za razvoj in vrednotenje celičnih pripravkov

Ključni dejavniki pri razvoju in vrednotenju celičnih pripravkov so: izbira začetnega tkiva oziroma dajalcev, predelava celic *ex vivo* ter shranjevanje (1, 8, 12, 13, 14).

1. Izbor celic

Pri izboru celic so pomembni podatki o vrsti celic oziroma odvzetega tkiva, ki predstavlja njihov vir. Pri dajalcih (živih ali mrtvih) moramo opraviti vse potrebne medicinske preiskave, s pomočjo katerih lahko z veliko verjetnostjo predvidimo varnost tako zanje kot za prejemnike ter s tem tudi za uspeh posega.

2. Predelava in shranjevanje celic

Tkiva in celice moramo skladno s sprejetimi in odobrenimi postopki aseptično odvzeti in jih ustrezno označiti. Minimalne zahteve terjajo, da morajo oznake na vsebnikih nedvoumno označevati izvor biološkega vzorca (npr. »človeško tkivo«) ter vsebovati identifikacijsko kodo. Iz priložene dokumentacije in oznak vsebnika morajo biti razvidni tudi morebitni posebni pogoji ravnanja z vzorci.

Nadzor kakovosti uporabljenih materialov in postopkov predelave celic, validacija opreme oziroma celovit nadzor so ključnega pomena. Zagotoviti moramo, da bo ravnanje s celicami *in vitro* potekalo v takšnem okolju, ki bo onemogočalo možnost nastanka okužb.

Kadar želimo celične pripravke iz enega samega vira (dajalca) pripraviti večkrat, moramo vzpostaviti sistem tkivne banke za

somatske celice. Pri tem moramo upoštevati zahteve za običajne celične banke in voditi dokumentacijo o izvoru biološkega vzorca ter o opravljenih postopkih predelave celic.

### 3.2 Kontrola kakovosti celičnih pripravkov

Nadzor kakovosti celičnih pripravkov lahko smiselno razdelimo na štiri glavna področja (8):

1. preverjanje varnosti celičnih pripravkov (sterilnost, prisotnost mikoplazem, bakterijskih endotoksinov, virusov), ki nam zagotavlja, da le-ti ne vsebujejo zdravju škodljivih kontaminantov;
2. ugotavljanje čistosti oziroma identifikacije (število in živost celic, istovetenje celic – morfologija, zaostale nečistote...) nam zagotavlja, da celični pripravki ustrezajo specifikaciji na ovojnicini in da ne vsebujejo znanih nečistot;
3. ugotavljanje učinkovitosti (citotoksičnost, metabolna aktivnost...) nam zagotavlja vpogled v funkcionalno učinkovitost celičnih pripravkov;
4. ugotavljanje stabilnosti (funkcionalna aktivnost po določenem času) nam zagotavlja, da celični pripravki ohranijo svojo učinkovitost po določenem času shranjevanja pri določenih pogojih.

Zakonsko je trenutno obvezen le vhodni nadzor odvzetega tkiva na označevalce okužb zaradi preprečevanja širjenja nalezljivih boleznih (serološki postopki analize dajalca). Preostala kontrola kakovosti pa je prepuščena presoji posameznega proizvajalca, obstajajo pa določena priporočila zlasti glede končne kontrole kakovosti, vendar ni predpisov o vrstah analiznih metod, ki naj bi jih pri tem uporabljali (2).

#### Priporočila skupin za somatsko celično zdravljenje glede kontrole kakovosti (15, 16):

1. Vhodna kontrola kakovosti:
  - serološka analiza odvzetega tkiva (ugotavljanje okužbe z virusom hepatitisa B, hepatitisa C, HIV in s povzročiteljem sifilisa);
  - analiza mikrobne obremenitve vhodnega materiala.
2. Procesna kontrola kakovosti:
  - celični genotip (genotipizacija);
  - celična morfologija;
  - živost celic;
  - aseptičnost celotnega procesa ravnanja s celicami.
3. Končna kontrola kakovosti:
  - celična morfologija;
  - živost celic;
  - celični fenotip;
  - celični genotip;
  - mikrobna kontaminacija;
  - apirogenost (bakterijski endotoksini);
  - ostanki snovi, ki se uporabljajo v postopku proizvodnje (antibiotiki, DMSO, tripsin).

Celični pripravki imajo omejen rok uporabnosti, zato jih moramo uporabiti v zelo kratkem času po izdelavi, tako da pogosto končne kontrole ni mogoče izvesti v celoti. Pred uporabo tako izvedemo identifikacijo celic, ostala testiranja pa izvedemo naknadno in nam služijo kot potrditev ustreznosti procesa izdelave (8).

## 4 Pravni vidiki

Področje tkivnega inženirstva je v Evropi pravno še vedno razmeroma slabo urejeno in vse kaže, da bo za izdelavo in sprejem ustrezne zakonodaje potrebnih še kar nekaj let. Zaradi vse pogostejše klinične uporabe pripravkov tkivnega inženirstva in zelo intenzivnega razvoja tega področja je potrebno čim hitreje in kar najbolje opredeliti predvsem zahteve za kakovost (6).

Izkušnje zadnjih desetih let so pokazale, da največje tveganje predstavljajo prenos nalezljivih boleznih, biološka prenosljivost in učinkovitost, kar je številne države spodbudilo k hitrejšemu pravnem urejanju tega področja (6, 17).

V Evropski skupnosti posamezne države članice zelo različno urejajo področje tkivne tehnologije. Zakoni in pravilniki s področja darovanja organov in tkivnih bank so bili do sedaj sprejeti oziroma posodobljeni le v nekaterih članicah (6, 17). Junija 2002 je Svet Evrope sprejel odločitev, da pripravki iz tkiv človeškega izvora potrebujejo posebno direktivo, katera je bila sprejeta marca 2004 – Direktiva 2004/23/EC (2, 18).

V Sloveniji trenutno ni specifičnih zakonov in pravilnikov, ki bi obravnavali celične in tkivne pripravke, pripravljene *ex vivo*. Imamo pa sodoben Zakon o odvzemu in presaditvi delov človeškega telesa zaradi zdravljenja (Ur. l. 12/2000) ter pripadajoče pravilnike, ki urejajo način odvzema delov človeškega telesa, izbor in pridobivanje dajalcev ter varovanje osebnih podatkov, vodenje evidenc opravljenih odvzemov in presaditev, načine shranjevanja in prevoz delov človeškega telesa ter izmenjavo delov človeškega telesa z drugimi državami (Ur. l. 53/2002, 70/2003, 75/2003, 131/2003).

### 4.1 Kriteriji tveganja pri uporabi pripravkov tkivnega inženirstva

Glavni kriterij razvrščanja pripravkov tkivnega inženirstva je ocena tveganja za prejemnika (bolnika). Pripravke z nizko oceno tveganja, pri katerih biološke lastnosti celic niso bile znatno spremenjene med njihovo pripravo *ex vivo*, v celoti urejajo zakoni s področja presajanja organov, tkiv in celic (4, 19, 21).

Kadar pripravki vsebujejo celice z znatno spremenjenimi biološkimi lastnostmi, predstavljajo le-ti večje tveganje za prejemnika in zato sodijo pod okrilje zakonov s področja zdravil (zdravila za napredno zdravljenje) in medicinskih pripomočkov (5, 19, 21).

Na tveganje uporabe celičnih pripravkov pomembno vpliva tudi odnos med dajalcem in prejemnikom tkiva. Pri avtoloških pripravkih je dajalec in prejemnik ista oseba, to pa pomeni večjo stopnjo varnosti in zato so v tem primeru možne tudi določene izjeme. Tako lahko takšne pripravke uvrstimo med pripravke z nizko oceno tveganja tudi v primeru, ko imajo določene lastnosti, zaradi katerih bi jih sicer uvrstili v skupino pripravkov z večjim tveganjem (11).

## 5 Sklep

Vse pogostejša terapevtska uporaba človeških celic in tkiv terja čim prejšnjo vzpostavitev standardov kakovosti in varnosti z namenom, da bi učinkovito preprečili predvsem prenos nalezljivih bolezni, kar predstavlja največje tveganje pri tovrstnem načinu zdravljenja. Tveganju se lahko izognemo s skrbno oceno ustreznosti dajalcev ter z njihovim doslednim testiranjem v skladu z veljavnimi sodobnimi zahtevami in postopki. Hkrati moramo zagotoviti zanesljiv sistem sledljivosti človeških celic in tkiv vse od dajalca do končnega prejemnika. (2). Med samo predelavo celic predstavlja največjo nevarnost zagotovo kontaminacija celičnih kultur. Zato moramo obvezno preverjati morebitno navzkrižno kontaminacijo posameznih celičnih kultur ter seveda vrsto in identiteto povzročiteljev (20).

Vse intenzivnejša izmenjava tkiv med posameznimi državami in regijami terja tudi hitro vzpostavitev skupnih smernic za zagotavljanje kakovosti, varnosti in učinkovitosti. Zakonodaja in ukrepi regulatornih organov morajo zagotoviti, da bodo imele človeške celice in tkiva, pripravljena v različnih področjih sveta primerljivo kakovost in varnost (2).

## 6 Literatura

1. Points to consider on manufacture and quality control of human somatic cell therapy medical products. EMEA 2001, London; CPMP/BWP/41450/98: 1-10.
2. Directive 2004/23/EC. Official Journal of the European Union, 2004; L102: 46-94.
3. Need for a legislative framework of Human tissue engineering and tissue-engineered products. European Commission 2002; Consultation document: 1-5.
4. Proposed Approach to regulation of cellular and tissue-based products. FDA, CBER 1997; 97N-0068: 1-37.
5. Directive 2003/63/EC. Official Journal of the European Union, 2003; L159: 46-94.
6. Tissue engineered medical products (TEMPs): A prelude to risk management. RIVM Report 605148 009, 2001: 1-57.
7. Guidance for Human Somatic Cell Therapy and Gene Therapy, Guidance for Industry. FDA, CBER 1998:1-27.
8. Guidance on application for products comprised of living autologous cells manipulated *ex vivo* and intended for structural repair or reconstruction. FDA, CBER 1996; 95N-0200: 1-10.
9. Directive 2001/83/EC, Annex 1, part IV. European Commission 2001; Working document 2002: 53-57.
10. Guidance concerning demonstration of comparability of human biological products, including therapeutic biotechnology-derived products. FDA, CBER, CDER 1996: 1-9.
11. Burger SR. Current regulatory issues in cell and tissue therapy. *Cytotherapy* 2003, Vol.5, No.4: 289-298.
12. Zakon o odvzemu in presaditvi delov človeškega telesa zaradi zdravljenja. Uradni list RS, Ljubljana; 12/00:1569-1572.
13. Pravilnik o načinu shranjevanja in prevoza delov človeškega telesa, namenjenih za presaditev. Uradni list RS, Ljubljana; 70/03:10825-10827.
14. Pravilnik o načinu varstva osebnih podatkov dajalcev in prejemnikov delov človeškega telesa zaradi zdravljenja. Uradni list RS, Ljubljana 2003; 75/03:11369-11370.
15. Guidance for the submission of chemistry, manufacturing, and controls information and establishment description for autologous somatic cell therapy products. FDA, CBER 1997; 95N-0200: 1-19.
16. Opinion on the state of the art concerning tissue engineering. European Commission 2001; SANCO/SCMPMD/2001/0006 Final: 1-15.
17. Warwick RM, Kearney JN. Safety of human tissues and cells for transplantation. *Future Strategies for tissue and organ replacement*. Imperial College Press 2002: 381-419.
18. Human Tissue and cell engineering products. European Commission; Commission's Consultation paper 2004: 1-12.
19. Smith DS. Understanding external controls over the commercial introduction of engineered human tissue. *Tissue engineering* 1999: Vol.26, No 4: 537-548.
20. Validation of procedures for processing of human tissue intended for transplantation. Guidance for industry. FDA, CBER 2002: 1-3.
21. Human tissue engineering and beyond: Proposal for a Community regulatory framework on advanced therapies. European Commission 2005; Consultation document: 1-15.