

Léčivé přípravky pro fágovou terapii

Legislativa k bakteriofágovým léčivým přípravkům ve veterinární medicině

Jitka Chumchalová

Evropská legislativa

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) 2019/6 o veterinárních léčivých přípravcích

Článek 4

43) „veterinárním léčivým přípravkem určeným pro nové léčebné postupy“:

- a) veterinární léčivý přípravek speciálně určený ke genové terapii, pro regenerativní léčbu, tkáňové inženýrství, léčbu krevními deriváty, bakteriofágovou terapii;
- b) veterinární léčivý přípravek vycházející z nanotechnologií;
- c) jakákoli jiná terapie, která se považuje za zcela novou oblast veterinární medicíny;

Nařízení komise (EU) 2021/805, kterým se mění příloha II nařízení (EU) 2019/6

Veterinární léčivý přípravek konkrétně určený k fágové terapii

- rozmanitosti zamýšlených cílů léčebných postupů a specifičnosti bakteriofágů vede k nutnosti volit vhodný bakteriofágový kmen vůči bakteriálnímu kmenu, který způsobuje nákazu, a to individuálně pro jednotlivá ohniska nákazy.
- Bakteriofágy i hostitelské bakterie/základní buněčné banky pro výrobu musí být přednostně produkovány na základě systému matečného inokula.
- Musí být předloženo potvrzení, že použitý bakteriofág je lytický. Účinnost léčebného postupu je spojena s lytickou aktivitou fágů.
- Prokázat nepřítomnost genu (genů) rezistence a nepřítomnost genů kódujících faktory virulence.
- Indikací mohou být léčebné, profylaktické nebo metafylaktické jedné nebo více infekcí.
- U geneticky modifikovaných fágů musí být popsána genetická modifikace.

Evropský lékopis

V roce 2016 obdržela EDQM od české delegace žádost o přidání Všeobecné monografie pro veterinární léčivé přípravky obsahující aktivní fágové aktivní složky (pAPI). S ohledem na výsledek „Workshopu o terapeutickém využití bakteriofágů“ pořádaného agenturou EMA to bylo považováno za předčasné. Na to navázala žádost belgické delegace v roce 2019, která navrhla přidat do Ph. Eur generální kapitulu o pAPI. Toto téma bylo rozsáhle diskutováno během 165. zasedání Evropské komise pro lékopisy.

5.31 LÉČIVÉ PŘÍPRAVKY PRO FÁGOVOU TERAPII

- 1 DEFINICE
- 2 VÝROBA
- **2-1 OBEČNÁ USTANOVENÍ**
- Výrobní proces zajišťuje PTMP stálou kvalitu a stabilitu. V příslušných fázích a/nebo v klíčových mezistupních procesu se provádí vhodné mezioperační kontroly.

2-2 BAKTERIÁLNÍ BUNĚČNÉ BANKY

Bakteriální hostitelské buňky používané pro výrobu PTMP musí být podrobně popsány. Musí zahrnovat stanovení jeho profilu citlivosti na antibiotika a nukleotidových sekvencí jeho chromozomu (chromozomů) a plazmidů a vyvarovat použití bakteriálních kmenů, jejichž genom obsahuje sekvence kódující škodlivé faktory (např. profágy, determinanty rezistence vůči antibiotikům, toxiny), pokud není zdůvodněno a schváleno jinak.

Totožnost

Mikrobiální čistota

Životaschopnost

Citlivost na fágy

Nepřítomnost škodlivých fágů

2-3 FÁGOVÁ INOKULA

Fágová inokula používaná při výrobě PTMP jsou odvozena z klonu fága a musí být podrobně charakterizována. Musí být uvedena informace o původu fága, nukleotidové sekvenci a bakteriálních druzích a/nebo kmenech, které jsou na něj citlivé.

Fágy, jejichž genom obsahuje sekvence kódující známé nebo potenciálně škodlivé genetické faktory, např. geny pro rezistence vůči antibiotikům, toxiny nebo lyzogenní faktory/geny, se vyloučí, pokud není zdůvodněno a schváleno jinak.

U geneticky nebo chemicky modifikovaných fágů musí být modifikace popsány a jejich účinky charakterizovány.

Totožnost

Mikrobiální čistota

Fágová čistota Protože se však při použití klinických izolátů pro výrobu není vždy možné vyhnout začleněným profágům, může být jejich přítomnost v tomto případě zdůvodněna a schválena, pokud je kontrolována vhodnou metodou.

Účinnost

2-4 VÝROBA A PURIFIKACE

Výroba PTMP je založena na bakteriální buněčné bance a systému jednotné inokulace.

Pokud se pro výrobu použije fágové pracovní inokulum, jedná se o klonální derivát fágového matečného inokula a vyhovuje požadavkům na fágové matečné inokulum. Genetická stabilita fága je stanovena sekvenováním vhodného počtu purifikovaných sklizní a následným porovnáním se sekvencí fágového matečného inokula.

Používají se vstupní suroviny farmaceutické kvality Vstupní suroviny biologického původu také vyhovují požadavkům obecné části 5.2.12 *Vstupní suroviny biologického původu pro výrobu léčivých přípravků pro buněčnou a genovou terapii*.

Několik jednotlivých sklizní stejného fágového klonu může být před purifikací spojeno.

Fágy jsou purifikovány pomocí vhodných technik.

Pro přípravu šarže je možné použít pouze purifikovanou sklizeň obsahující jednu léčivou látku fágové terapie, která vyhovuje následujícím požadavkům:

Totožnost

Účinnost

Mikrobiální kontaminace

Zbytková činidla

Nečistoty a kontaminanty z hostitelských buněk Kontaminanty a další potenciálně toxické látky pocházející z hostitelských buněk (např. endo- a exotoxiny, bílkoviny hostitelských buněk, DNA hostitelských buněk, temperované fágy) nejsou přítomny nebo jsou v rozmezí stanovených specifikací.

2-5 ŠARŽE

Konečná šarže může být podávána různými způsoby a může být dostupná v různých lékových formách. V závislosti na lékové formě a způsobu podání jsou požadovány další zkoušky.

Pokud v případě neregistrovaných léčivých přípravků provedení těchto zkoušek představuje praktické problémy (např. velikost šarže, časová omezení), použijí se jiné vhodné metody, aby bylo zajištěno dosažení odpovídající kvality přípravku v souladu s provedením posouzení rizik a případnými místními pokyny nebo právními požadavky.

Konečná šarže vyhovuje následujícím požadavkům:

Vzhled

Totožnost

Účinnost

Mikrobiologická

Pyrogenita

Obsah vody

Hodnota pH

2-6 ADAPTOVANÝ PŘÍPRAVEK

Proces adaptace (tréninku) fágů spočívá v řízeném vývoji fágů za účelem zlepšení jejich účinnosti proti jednomu nebo více klinickým izolátům.

Ověří se zvýšená účinnost šarže adaptovaného PTMP proti cílovému klinickému izolátu, což slouží také jako vhodná náhrada ověření totožnosti.

3 OZNAČOVÁNÍ

Označení je v souladu s požadavky příslušných nadnárodních a národních předpisů.

2.7.38 stanovení účinnosti bakteriofágů

- Fágový přípravek obsahuje buď jeden druh fága, nebo směs druhů fágů, které se replikují. Účinnost přípravku je vyjádřena infekčním titrem (titry) fágového přípravku, jak je stanoveno jedním nebo několika provedenými plakovými testy. Kromě přímého stanovení infekčního titru lze použít náhradní metodu, např. počet fágových částic nebo kopie fágového genomu. Infekční titr odráží lytickou aktivitu testovaného fágového přípravku působící na buňky citlivého bakteriálního hostitelského kmene, jako je cílový klinický izolát. Vzhledem k úzkému rozmezí hostitelů mnoha fágů je výběr citlivého hostitelského kmene pro plakový test, tj. klinického izolátu nebo jiného vhodného kmene, proměnnou pro nastavení testu, která se může promítnout do změn podmínek testu, tj. složení růstového média a inkubačních podmínek

TESTY NA BÁZI PLAKU

Vizualizace jednotlivých PFU má zásadní význam pro stanovení účinnosti, aby se zabránilo chybné klasifikaci fágové aktivity, která by mohla být spojena s mechanismy lýzy, které se nespojují s virovým cyklem, ale například na abortivní infekci nebo lýzou zvenčí.

1) Metoda s dvojitou vrstvou agaru (referenční)

Výsledky se stanoví počítáním fágových plaků s rozsahem početných plaků na plotnu (např. 20–200 plaků při ručním počítání). Infekční titr pro specifikovaný fág odpovídá počtu fágových plaků vynásobenému indexem ředění.

2) Přímá metoda (derivovaná), nazývaná také „přímý spot test“

Výsledky se stanoví počítáním jednotlivých plaků a vypočítá se titr fágů. Aby přímá metoda nahradila referenční metodu, musí poskytovat výsledky podobné nebo blízké referenční metodě

Validace testu

Postup testu použitý pro stanovení titru infekčního fága je validován s ohledem na specifitu, přesnost, preciznost (opakovatelnost a mezilehlá preciznost), linearitu, rozsah a robustnost. Revalidace se zvažuje v případě podstatných změn v postupu testu, v důsledku biologických vlastností testovaného fága a použitého hostitelského kmene. Pro validaci testu se používají vhodné referenční fágové přípravky a referenční hostitelské kmeny, např. produkční kmeny.

Parametry validace:

Opakovatelnost, reprodukovatelnost a linearita, správnost, specifita.

Doplňkové účinnosti testy

Stanovení počtu částic nebo počtu kopií genomu fágů, bez ohledu na infekčnost fága, může sloužit jako náhradní metoda pro stanovení účinnosti ve fágovém přípravku, pokud je korelace výsledků s plakovým testem řádně validována.

Počet fágových částic

1 Fyzikální titrace se provádí vhodnou technikou, např. kapalinovou chromatografií, měřením absorbance, dynamickým rozptylem světla.

2 Počet kopií genomu fága Techniky amplifikace nukleových kyselin

Pro validaci testu se používají vhodné fágové referenční standardy.

Pokyn pro kvalitu, bezpečnost a účinnost veterinárních léčivých přípravků speciálně určených pro fágovou terapii (EMA)

Cílem pokynu je stanovit regulační/technické a vědecké požadavky platné pro veterinární léčivé přípravky (VMP) speciálně určené pro fágovou terapii a složené z bakteriofágů. Bakteriofágy jsou viry, které infikují bakterie a nemají schopnost infikovat eukaryotické buňky. Jejich účinek je spojen s jejich lytickou aktivitou, obecně omezenou na specifické bakteriální kmeny. Interakce bakteriofág-hostitelská bakterie je navíc dynamický proces a hostitelské bakterie si mohou s určitou frekvencí vyvinout rezistenci vůči bakteriofágům. V důsledku toho se očekává, že VMP založené na bakteriofágech budou vyžadovat časté změny složení kmene (kmenů) bakteriofága, aby se udržela účinnost/obešlo se rozvoji rezistence ve vztahu k zamýšlené indikaci. Fágové terapie jsou nařízením (EU) 2019/6 definovány jako nové terapie (NT). Nařízení (EU) 2021/805, kterým se mění příloha II nařízení (EU) 2019/6, dále obsahuje obecné a specifické požadavky platné pro NT a specifická ustanovení pro fágovou terapii. Tato směrnice se zabývá tím, jak lze tato ustanovení uplatnit v praxi pro bakteriofágové metody.

V příloze II nařízení (EU) 2019/6 se uznává, že vzhledem ke specifické povaze bakteriofágových přípravků může být přizpůsobení obecných pravidel přijatelné a očekává se, že regulační rámec bude flexibilní.

- Fágové léčebné přípravky se mohou sestávat z monofágových nebo multifágových přípravků, jejichž složení může vyžadovat pravidelnou aktualizaci/obnovu z důvodu úzkého spektra bakteriálních hostitelů, rozvoje rezistence vůči bakteriofágům a imunitní odpovědi léčeného zvířete (proti bakteriofágům i bakteriím).

- Technické/vědecké požadavky na nové terapeutické přípravky by měly být úměrné rizikům spojeným s jejich zamýšleným použitím, která závisí na: cílovém druhu zvířete, indikaci, zamýšlené léčbě, cestě podání, lékové formě a současném užívání s jinými léčivými přípravky, např. antibiotiky.

Tato aktuální směrnice se mimo jiné zabývá regulačním, technickým a vědeckým základem platným pro kvalitu, bezpečnost a účinnost veterinárních léčivých přípravků pro fágovou terapii, u nichž se očekává variabilní složení konečného přípravku. Očekává se, že registrace fágových přípravků s flexibilním kvalitativním a kvantitativním složením bude vyžadovat vhodné vědecké znalosti, přístupy založené na riziku, vhodné řízení rizik pro jakost a systémy farmaceutické kvality.

Česká legislativa

Zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech, konkrétně dle § 48a Veterinární speciální léčebné programy.

- Není-li pro veterinární léčebnou indikaci, která slouží k prevenci nebo léčbě onemocnění zvířat, při zohlednění kritérií podle § 30a odst. 1 písm. b) dostupný registrovaný veterinární léčivý přípravek, může s ohledem na čl. 112 až 114 nařízení o veterinárních léčivých přípravcích provozovatel podle § 6 odst. 1 písm. d) předložit žádost o povolení pro uvádění do oběhu a použití veterinárního léčivého přípravku, který není registrovaný v Evropské unii nebo ve třetí zemi (dále jen „žádost o povolení veterinárního speciálního léčebného programu“).
- Žádost o povolení veterinárního speciálního léčebného programu předkládá provozovatel (dále jen "předkladatel veterinárního léčebného programu") Fyzická osoba veterinární lékař nebo právnická osoba, která určí odpovědného veterinárního lékaře.
- Délka trvání veterinárního speciálního léčebného programu nesmí překročit 12 měsíců, v případě trvání podmínek podle odstavce 1 může předkladatel veterinárního léčebného programu požádat o prodloužení programu, a to i opakovaně.