



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Medicamentos de Terapia Avançada - desenvolvimento pré-clínico e clínico

Catarina Filipa Gonçalves Frederico

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob a orientação da Doutora Liliana Simões Mendonça e coorientação do
Professor Doutor Clévio Nóbrega

2023



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Medicamentos de Terapia Avançada - desenvolvimento pré-clínico e clínico

Catarina Filipa Gonçalves Frederico

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob a orientação da Doutora Liliana Simões Mendonça e coorientação do
Professor Doutor Clévio Nóbrega

2023

Medicamentos de Terapia Avançada - desenvolvimento pré-clínico e clínico

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Catarina Filipa Gonçalves Frederico

Copyright© 2023 Catarina Filipa Gonçalves Frederico

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Um especial agradecimento à minha orientadora, Doutora Liliana Mendonça, por ter aceite o desafio de orientar esta dissertação. Pelo elevado rigor científico, disponibilidade, apoio, conselhos e sugestões valiosas que contribuíram para a realização deste trabalho. Por todas as palavras de incentivo e motivação nos últimos meses e que me fizeram acreditar nas minhas capacidades.

Ao meu co-orientador Professor Clévio Nóbrega, pela sua disponibilidade e igualmente pelo seu apoio na elaboração deste trabalho.

Aos meus pais e irmão por acreditarem sempre em mim e serem pilares na minha vida.

Ao André que me incentivou a embarcar nesta aventura e por acreditar em mim até ao fim. Pelo carinho, apoio incondicional, dedicação, compreensão e por estar sempre presente nos momentos mais difíceis. És das pessoas mais importantes da minha vida.

À Joana, Tânia e Ana Rita, pela amizade e por toda a ajuda ao longo destes últimos anos que permitiram que este caminho fosse mais fácil. Não seria o mesmo sem vocês.

O meu profundo agradecimento a todas as pessoas que se cruzaram comigo durante o meu percurso académico e contribuíram para a concretização desta etapa.

A todos os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Avanços recentes na biomedicina têm permitido desenvolver novas abordagens terapêuticas, culminando na criação de uma nova classe de medicamentos baseados em células, tecidos ou genes – os medicamentos de terapia avançada (ATMPs, do inglês *Advanced Therapy Medicinal Products*). Esta classe de medicamentos apresenta elevado potencial para transformar a vida dos doentes e dos sistemas de saúde, proporcionando novas opções terapêuticas para doenças para as quais o tratamento disponível é limitado ou inexistente.

Devido às suas características únicas, os ATMPs, apresentam vários desafios durante o processo de desenvolvimento e produção, distinguindo-os dos restantes produtos farmacêuticos. Deste modo, as agências que regulam e supervisionam os produtos farmacêuticos têm feitos esforços para disponibilizar as orientações necessárias para o desenvolvimento e comercialização destes novos medicamentos inovadores. Na Europa, a Agência Europeia do Medicamento (EMA, do inglês *European Medicines Agency*) publicou várias *guidelines* acerca da qualidade, desenvolvimento pré-clínico e clínico dos ATMPs, potenciando e regulando a entrada destes produtos no mercado.

Com base nas considerações anteriores, na presente Dissertação pretende-se descrever: i) as diferentes categorias dos ATMPs, ii) as *guidelines* aplicáveis a estes medicamentos, nomeadamente a avaliação do risco, processo de produção, avaliação pré-clínica e clínica, iii) importância e aplicações destas terapias e iv) quais os ATMPs autorizados atualmente pela EMA.

Na última década, mais de 15 ATMPs receberam autorização de introdução no mercado (AIM) na Europa, no entanto algumas AIM não foram renovadas ou o medicamento foi retirado do mercado por questões de segurança e/ou falta de eficácia ou viabilidade económica. Assim, é necessário continuar o desenvolvimento de novos ATMPs assim como do seu enquadramento legal, acelerando a aprovação destas terapias inovadoras e mantendo os elevados padrões de qualidade, segurança e eficácia.

Palavras-chave: Medicamentos de terapia avançada; Legislação UE; Padrões de qualidade e segurança; desenvolvimento pré-clínico; desenvolvimento clínico.

ABSTRACT

Recent advances in biomedicine have empowered the development of new therapeutic approaches, culminating in the creation of a new class of medicines based on cells, tissues, or genes – the advanced therapy medicines products (ATMPs). This class of medicines has high potential to transform the lives of patients and healthcare systems, providing new therapeutic options for diseases for which available treatment is limited or non-existent.

Due to their unique characteristics, ATMPs present several challenges during the development and manufacturing process, differentiating them from other pharmaceutical products. Therefore, agencies that regulate and supervise pharmaceutical products have made efforts to provide the necessary guidance for the development and commercialization of these new innovative medicines. In Europe, the European Medicines Agency published several guidelines about quality, non-clinical and clinical development of ATMPs, promoting and regulating the entrance of these products into the market.

Based on the previous considerations, this Dissertation aims to describe: i) the different categories of ATMPs, ii) the guidelines applicable to these medicines, namely risk assessment, manufacturing process, pre-clinical and clinical evaluation, iii) the importance and applications of these therapies, and iv) which ATMPs are currently authorized by EMA.

In the last decade, more than 15 ATMPs have received marketing authorization (MA) in Europe, however some MAs weren't renewed, or the medicine was withdrawn from the market due to safety concerns and/or lack of efficacy or economic viability. Therefore, it's necessary to continue the development of new ATMPs as well as their legal framework, accelerating the approval of these innovative therapies and maintaining high standard of quality, safety and efficacy.

Keywords: Advanced therapy medicines products; Quality and safety standards; EU legislation; pre-clinical development; clinical development.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
ÍNDICE	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. ENQUADRAMENTO LEGAL DOS ATMPs	5
3. AGÊNCIA EUROPEIA DE MEDICAMENTOS	7
3.1. Comité de Medicamentos de Uso Humano	9
3.2. Comité de Terapias Avançadas	9
4. CLASSIFICAÇÃO DOS MEDICAMENTOS DE TERAPIA AVANÇADA	11
4.1. Medicamentos de Terapia Génica	11
4.2. Medicamentos de Terapia com Células Somáticas	12
4.3. Produtos de Engenharia de Tecidos.....	12
4.4. Medicamentos de Terapia Avançada Combinados.....	13
5. ATMPs – REGULAMENTAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PRÉ-CLÍNICO E CLÍNICO	15
5.1. Medicamentos de terapia celular e engenharia de tecidos.....	16
5.1.1. Produtos à base de células.....	16
5.1.1.1. Desenvolvimento pré-clínico de medicamentos à base de células.....	16
5.1.1.2. Desenvolvimento clínico dos produtos à base de células.....	17
5.1.2. Produtos à base de células xenogénicas.....	20

5.1.2.1.Desenvolvimento pré-clínico de produtos à base de células xenogénicas.....	21
5.1.2.2.Desenvolvimento clínico de produtos à base de células xenogénicas.....	23
5.1.3. Produtos à base de células estaminais.....	23
5.1.3.1.Desenvolvimento pré-clínico de produtos à base de células estaminais.....	26
5.1.3.2.Desenvolvimento clínico de produtos à base de células estaminais.....	27
5.1.4.Imunoterapia à base de células.....	28
5.2. Medicamentos de terapia génica.....	33
5.2.1. Considerações gerais sobre medicamentos de terapia génica	33
5.2.1.1 Desenvolvimento pré-clínico de produtos de terapia génica.....	38
5.2.1.2. Desenvolvimento clínico de produtos de terapia génica.....	51
5.2.2 Considerações sobre medicamentos com vírus oncolíticos	56
5.2.2.1. Desenvolvimento pré-clínico de medicamentos com vírus oncolíticos.....	58
5.2.2.2. Desenvolvimento clínico de medicamentos com vírus oncolíticos.....	58
5.2.2.3.Medicamentos de terapia génica com vírus oncolíticos aprovados e em ensaios clínicos.....	59
5.2.3 Medicamentos que contêm células geneticamente modificadas.....	61
5.2.3.1. Desenvolvimento pré-clínico de produtos que contêm células geneticamente modificadas.....	63
5.2.3.2.Desenvolvimento clínico de produtos que contêm células geneticamente modificadas.....	71
5. CONCLUSÃO	77
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.1 – Ilustração esquemática do implante NT-501, adaptado de (34).....	14
Figura 5.1 – Desenvolvimento de medicamentos da fase pré-clínica até à fase clínica, adaptado de (22).....	18
Figura 5.2 – Fontes de células estaminais disponíveis para as terapias à base de células estaminais, adaptado de (57).....	25
Figura 5.3 – Vetores utilizados nos MTG, até 2017, retirado de (84).....	33
Figura 5.4 – Mecanismo do miRNA, adaptado de (85).....	34
Figura 5.5 – Ferramentas de edição genética, adaptado de (87).....	35
Figura 5.6 – Resumo dos tipos de vacinas da Doença do Coronavírus 2019 (COVID-19), adaptado de (93).....	42
Figura 5.7 – Mecanismo de ação dos vírus oncolíticos, adaptado de (115).....	57
Figura 5.8 – Mecanismo de ação do Imlygic, adaptado de (118).....	60
Figura 5.9 – Ilustração esquemática da terapia com CAR-T cells, adaptado de (133).....	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 5.1 – Medicamentos à base de células e produtos de engenharia de tecidos atualmente aprovados pela EMA (2009 – abril 2023).....	32
Tabela 5.2 – Medicamentos de terapia génica atualmente aprovados pela EMA (2009 – abril 2023).....	54
Tabela 5.3 – Ensaio clínico com vírus oncolíticos, adaptado de (119).....	61
Tabela 5.4 – Terapias CAR-T <i>cells</i> aprovadas na EU.....	68
Tabela 5.5 – Exemplos de ensaios clínicos com iPSCs.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

- AADC** - L-aminoácido aromático descarboxilase
- AAV** - Vírus Adenoassociados
- AAV1** - Serotipo 1 do vírus adenoassociado
- AAV2** - Serotipo 2 do vírus adenoassociado
- AAV5** - Serotipo 5 do vírus adenoassociado
- AAV9** - Serotipo 9 do vírus adenoassociado
- ADA** - Adenosina desaminase
- ADME** - Absorção, distribuição, metabolismo e eliminação
- AEC** - Autorização de ensaio clínico
- AIM** - Autorização de introdução no mercado
- AM** - Autorização no mercado
- AME** - Atrofia muscular espinal
- ARSA** - Arilsulfatase A
- ATMPs** – Medicamentos de Terapia Avançada
- ATMPs combinados** - Medicamentos de Terapia Avançada Combinados
- CAR-T Cells** – Recetores de antígenos quiméricos de células T
- CAT** - Comité das Terapias Avançadas
- CHMP** - Comité de Medicamentos para Uso Humano
- C_{max}** - Concentração plasmática máxima
- CNTF** – Factor neurotrófico ciliar
- COMP** - Comité de Medicamentos Órfãos
- COVID-19** - Doença do Coronavírus 2019
- DSBs** - Quebra da cadeia dupla
- EEE** - Espaço económico Europeu
- EMA** – Agência Europeia do Medicamento
- EUA** - Estados Unidos da América
- GCP** – Boas práticas clínicas
- GM-CSF** - Fator estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos
- HDR** - Reparação direta por homologia

HLA – Antígeno leucocitário humano

hRPE65 - Proteína do epitélio pigmentado da retina humana de 65 kilodanton

iPSCs – Células estaminais pluripotentes induzidas

IVIM – Ensaio de imortalização *in vitro*

LDGCB - Linfoma difuso de grandes células B

LF3B - Linfoma folicular de grau 3B

LPL - Lipoproteína lípase

LPMGCB - Linfoma primário do mediastino de grandes células B

miRNA - microRNA

mRNA - RNA mensageiro

MTCS - Medicamentos de Terapia com Células Somáticas

MTG - Medicamentos de Terapia Génica

NAAT - Testes de amplificação de ácidos nucleicos

NHEJ - Reparação através de junção da extremidade não-homóloga

PAM - Motivo adjacente protoespaçador

PAP-GM-CSF - Fator estimulador de colónias de macrófagos e granulócitos ligado à fosfatase ácida prostática

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PEI - Polietilenoimina

PET - Produtos de Engenharia de Tecidos

PoC – Prova de conceito

PRAC - Comité de Avaliação do Risco em Farmacovigilância

PRIME - PRiority MEdicines

RBA - Abordagem baseada no risco

RBD – Domínio de ligação ao recetor

RCV – Vírus com replicação competente

SAWP - Grupo de Trabalho de Aconselhamento

scFv - Fragmento variável de cadeia única

sgRNA - RNA guia

ssRNA – RNA de cadeia simples

T $\frac{1}{2}$ - Tempo de semivida

TCR – Recetor de células T

Tmax - Tempo médio para atingir a concentração plasmática máxima

UE - União Europeia

VLP - Partículas semelhantes aos vírus

ZFNs - Nucleases dedos de zinco

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de abordagens terapêuticas inovadoras para a prevenção e tratamento de doenças resulta do crescente conhecimento científico em diversas áreas, nomeadamente na biotecnologia e biologia celular e molecular. Assim, os avanços que resultam da investigação científica trazem, cada vez mais, novas oportunidades para desenvolver tratamentos inovadores a um ritmo cada vez mais elevado (1,2).

Os Medicamentos de Terapia Avançada (ATMPs, do inglês *Advanced Therapy Medicinal Products*) constituem uma classe complexa, emergente, inovadora e em expansão de medicamentos utilizados no tratamento de múltiplas patologias, tais como a doença de Alzheimer, cancro, doenças genéticas e doenças raras. Nesta classe de medicamentos, os medicamentos podem ser classificados em Medicamentos de Terapia Génica (MTG), Medicamentos de Terapia com Células Somáticas (MTCS) e Produtos de Engenharia de Tecidos (PET). Alguns ATMPs podem conter um ou mais dispositivos médicos como parte integrante do medicamento, sendo por isso denominados Medicamentos de Terapia Avançada Combinados (ATMPs combinados)(3–5).

Os ATMPs oferecem uma alternativa face aos medicamentos tradicionais, nomeadamente os fármacos obtidos através de síntese química, ou até mesmo face a alguns medicamentos biológicos, como é o caso dos anticorpos monoclonais, pois apresentam um elevado potencial para eliminar ou reparar células que apresentem alterações patológicas que são responsáveis pelo desenvolvimento de doenças. Deste modo, é expectável que a investigação em torno desta classe de medicamentos inovadores continue a crescer, uma vez que estes permitem um tratamento mais específico e direccionado para várias doenças, nomeadamente doenças raras para as quais a causa subjacente é conhecida, frequentemente uma alteração genética. Estas terapias apresentam particular relevância nestas patologias onde as opções terapêuticas são limitadas ou para as quais o tratamento é sintomático e que apresentam elevadas necessidades médicas pois permitem tratar e impedir a progressão natural da doença. Para além disso, podem reduzir os custos de gestão em saúde, através da redução dos cuidados de saúde prestados a longo prazo, uma vez que muitos tratamentos com ATMPs requerem uma única administração e frequentemente conduzem a melhoria radical na condição de saúde do doente. Assim os ATMPs, embora sejam medicamentos mais caros, ao reduzirem o absentismo, a morte prematura e o

elevado custo dos cuidados especializados com grande peso nos sistemas de saúde, a longo prazo resultam num impacto económico favorável (6–9).

A estrutura legal e regulamentar dos ATMPs na União Europeia (UE) foi estabelecida pela Comissão da UE em 2007 e aplicada em dezembro de 2008 (8). O Comité das Terapias Avançadas (CAT, do inglês *Committe for Advanced Therapies*), criado em 2007, desempenha um papel importante na supervisão regulamentar dos ATMPs. O CAT é o principal comité científico responsável por fornecer recomendações científicas para classificação dos ATMPs e pela avaliação da qualidade, segurança e eficácia destes medicamentos. Este comité tem como principal responsabilidade preparar um parecer sobre cada pedido de um ATMP submetido à Agência Europeia do Medicamento (EMA, do inglês *European Medicines Agency*), antes do Comité de Medicamentos para Uso Humano (CHMP, do inglês *Committe for Medicinal Products for Human Use*) emitir um parecer final sobre a concessão, alteração, suspensão ou revogação de autorização de introdução no mercado (AIM) para o medicamento em questão. Deste modo, o CAT é constituído por uma equipa multidisciplinar com qualificações científicas específicas e experiência relevante nas áreas das terapias avançadas (6–9).

A legislação da UE acerca dos ATMPs foi elaborada com o intuito de facilitar o acesso a todo o mercado da UE, garantir uma ampla disponibilidade de produtos aprovados e promover a competitividade das empresas europeias deste sector, garantindo assim, o nível mais elevado de proteção da saúde dos doentes. Em 2019, a Comissão Europeia publicou as diretrizes sobre as Boas Práticas Clínicas (GCP, do inglês *Good Clinical Practice*) específicas para ATMPs. Deste modo, as entidades reguladoras têm feito esforços para reduzir os encargos administrativos e adaptar os requisitos de produção às características dos ATMPs (1,10).

Apesar das possibilidades únicas destas terapias, existem alguns desafios a nível regulamentar, científico, de produção e de acesso ao mercado, dificultando assim o desenvolvimento e disponibilidade destas terapias. Um dos principais desafios prende-se com a heterogeneidade dos mecanismos de ação destes medicamentos, dado que podem atuar em mais do que um alvo, podem ter mais do que um agente terapêutico e frequentemente é necessário estabelecer ensaios de avaliação de potência terapêutica específicos para o ATMPs em desenvolvimento. Também a avaliação do perfil de segurança é mais exigente, sendo necessário avaliar caso a caso para estabelecer quais os estudos a implementar para cada ATMPs em específico. Finalmente, é também um grande desafio o estabelecimento de processos de produção robustos e economicamente rentáveis que permitam produzir ATMPs seguindo as

exigentes *guidelines* de produção deste tipo de medicamentos. No entanto, é espectável que os ATMPs se afirmem no futuro da medicina, culminando numa abordagem terapêutica mais precisa e personalizada para cada doente (1,11).

Recentemente, vários indicadores demonstraram uma redução da atratividade geral na Europa pelas companhias farmacêuticas, havendo uma diminuição de investimento por parte destas, impedindo que a Europa acompanhe o ritmo de progressão de outras regiões. Apesar da Europa produzir um elevado número de publicações científicas na área dos ATMPs, isto não se reflete no número de ensaios clínicos desenvolvidos nesta área. Verificam-se duas vezes mais ensaios clínicos nos Estados Unidos da América (EUA) e quase três vezes mais na China. Entre 2014 e 2021, o número de ensaios clínicos de ATMPs nos EUA e região da Ásia-Pacífico cresceu 70% e 67%, respetivamente. No entanto, a Europa continua a ser um local atrativo para diversas companhias farmacêuticas realizarem ensaios clínicos para tecnologias mais tradicionais. No caso das novas abordagens terapêuticas, como os ATMPs, esta atratividade não se verifica. Existem várias opções que permitem justificar esta falta de atratividade na Europa, tais como a liderança da China nos ensaios clínicos de ATMPs tem sido em grande parte impulsionados pelo governo, pois mais de metade dos ensaios de terapia génica não são patrocinados pela indústria. Os EUA podem ser favorecidos nos investimentos em ensaios clínicos de ATMPs, dadas as vantagens associadas à familiarização dos principais líderes de opinião clínica com o pré-lançamento de um novo produto para apoiar sua rápida aceitação pós-comercialização. Os novos fármacos normalmente chegam mais rapidamente ao público nos EUA do que na Europa (12,13).

Em 2002, o valor do investimento feito pela indústria farmacêutica nos EUA e na Europa divergia em 2 mil milhões de euros. Em 2020, esta diferença aumentou em quase 25 mil milhões de euros. Do investimento total feito nos EUA, China e Japão, apenas 31% corresponde ao investimento feito na Europa. No mesmo período, a China apresentou um crescimento de 1% a 8%, não havendo evidência que isto esteja relacionado com a redução de investimento na Europa. Deste modo, a Europa continua a crescer a um ritmo mais lento, apresentando uma participação cada vez menor no investimento farmacêutico global total (13).

As companhias farmacêuticas afirmam que um dos principais fatores que impulsionam a maioria dos novos investimentos é a localização e o desempenho na pesquisa e desenvolvimento ou da área de produção existente. Normalmente é mais económico e eficiente, continuar a investir num local onde o capital humano, a cultura da empresa, o conhecimento especializado e a infraestrutura já se encontram estabelecidos (13).

Assim, para que a Europa comece a competir de forma mais eficaz no que diz respeito ao investimento nos ATMPs, é necessário reconhecer a crescente complexidade destas novas tecnologias, a precisão científica e logística necessária para garantir um desenvolvimento eficaz, produção de qualidade e entrega a tempo das terapias aos doentes (13).

Neste contexto, a presente dissertação tem como principal objetivo realizar uma revisão da literatura no que diz respeito aos ATMPs, as suas diretrizes legais quer no seu desenvolvimento quer na sua produção, a sua importância e as suas aplicações. Para tal, foi efetuada uma pesquisa bibliográfica da literatura disponível proveniente de *websites* oficiais (por exemplo, EMA), bases de dados como o *PubMed* e livros de referência, através das quais foram retiradas as informações científicas mais relevantes para o tema em questão.

2. ENQUADRAMENTO LEGAL DOS ATMPs

Na UE, os medicamentos para uso humano, são legislados pela Diretiva 2001/83/CE e pelo Regulamento (CE) N.º 726/2004 que fornece o enquadramento geral dos ATMPs que se destinam a ser colocados no mercado dos Estados-Membros da UE. Em 2009, a Diretiva 2009/120/CE veio atualizar as definições e requisitos técnico-científicos para as terapias avançadas. Alguns ATMPs, para além de serem regulados pelas *guidelines* de medicamentos são também regulados pelas *guidelines* dos dispositivos médicos, uma vez que existem ATMPs combinados com dispositivos médicos (7,14,15).

Tanto na UE como nos EUA, os ATMPs enquadram-se na legislação dos produtos biológicos, sendo a sua classificação diferente em ambas as regiões. Nos EUA os ATMPs são divididos em dois grupos, os produtos de terapia génica e os produtos de terapia celular. Na UE, os ATMPs são divididos em quatro grupos – medicamentos de terapia génica, medicamentos de terapia com células somáticas, produtos de engenharia de tecidos e ATMPs combinados (15).

Na UE os pedidos de ensaios clínicos de ATMPs são apresentados individualmente às autoridades nacionais responsáveis onde o ensaio será realizado. Os pedidos de AIM de todos os ATMPs são avaliados via procedimento centralizado pela EMA, o que permite que estes medicamentos beneficiem apenas de uma única avaliação e autorização para toda a UE e espaço económico Europeu (EEE) que inclui a Islândia, Liechtenstein e Noruega (15).

3. AGÊNCIA EUROPEIA DE MEDICAMENTOS

A EMA, criada pelo Regulamento (CEE) N.º 2309/93 de 22 de julho de 1993, é uma agência descentralizada, com o objetivo de harmonizar a avaliação científica associada à aprovação, produção e inspeção de medicamentos na UE (16–18). Tem como principais responsabilidades a proteção da saúde humana e animal nos países do EEE e em toda a UE, através da garantia da qualidade, eficácia e segurança dos medicamentos de uso humano e de uso veterinário disponíveis no mercado. É responsável pela avaliação científica dos pedidos de AIM e por facilitar o desenvolvimento e o acesso aos medicamentos com o intuito de evoluir as ciências médicas e consequentemente beneficiar a saúde dos doentes. Através de uma rede de farmacovigilância, consegue monitorizar a segurança dos medicamentos ao longo de todo o seu ciclo de vida (19).

Todos medicamentos carecem de uma autorização antes de serem introduzidos no mercado, de modo a garantir que estes medicamentos apresentam a qualidade, segurança e eficácia necessárias. O pedido de AIM pode ser realizado via procedimento centralizado, procedimento descentralizado, procedimento de reconhecimento mútuo ou procedimento nacional (EMA/716925/2016) (20).

O **procedimento centralizado**, tal como referido anteriormente, permite que o medicamento seja comercializado em toda a UE apenas com uma única avaliação e AIM, sendo feito apenas um pedido de autorização à EMA. O Comité de Medicamentos de Uso Humano realiza uma avaliação científica do pedido e emite uma recomendação à Comissão Europeia para a concessão ou não da AIM. Se for concedida a AIM via procedimento centralizado, a AIM é válida em toda a UE e EEE. A maioria dos medicamentos inovadores são obrigados a utilizar esta via de procedimento para pedido da AIM (EMA/716925/2016) (20). No **procedimento descentralizado** as companhias farmacêuticas podem fazer mais do que um pedido de AIM do medicamento em mais do que um Estado-Membro da UE em simultâneo, exceto se o medicamento se inserir no âmbito do procedimento centralizado e/ou já tiver sido autorizado num país da UE (EMA/716925/2016) (20). Por outro lado, no caso do **procedimento de reconhecimento mútuo**, a companhia farmacêutica já possui um medicamento autorizado num dos Estados-Membros da UE e deste modo, pode pedir que esta autorização seja reconhecida nos restantes países da UE, enquanto que o **procedimento nacional** é realizado quando se pretende que o medicamento seja aprovado apenas em um Estado-Membro, sendo feito um pedido de AIM apenas às autoridades nacionais desse país (EMA/716925/2016) (20,21).

Um dos principais focos das entidades reguladoras, como a EMA, é desenvolver e implementar estratégias que permitam acelerar o desenvolvimento clínico, assegurando que estes produtos são disponibilizados o mais cedo possível no mercado e aos doentes sem comprometer a qualidade, segurança, eficácia destes produtos. Deste modo, em março de 2016, a EMA introduziu o PRiority MEdicines (PRIME), um esquema que visa aumentar o desenvolvimento de medicamentos que tem como alvo patologias que apresentem elevadas necessidades médicas para as quais não existe resposta, ou seja, para as quais não existe opção terapêutica, ou medicamentos que podem oferecer uma grande vantagem terapêutica sobre os tratamentos existentes (22,23).

O PRIME utiliza ferramentas já existentes na estrutura regulamentar da UE, como é o caso do aconselhamento científico, aprovação condicional e avaliação acelerada. Estas ferramentas permitem otimizar o desenvolvimento dos medicamentos prioritários que têm como alvo patologias para as quais as opções terapêuticas são limitadas e/ou demonstrem inovação terapêutica (23).

A aprovação condicional e a avaliação acelerada são procedimentos regulamentares que permitem que o pedido de AIM seja submetido, revisto e aprovado, o mais rapidamente possível para que estes medicamentos mais complexos cheguem aos doentes (23).

A EMA apresenta sete comités científicos responsáveis pela avaliação técnico-científica dos medicamentos ao longo do seu ciclo de vida. Estes comités, desempenham um papel importante desde as fases de desenvolvimento iniciais dos medicamentos, concessão da AIM e monitorização da sua segurança desde o momento em que são introduzidos no mercado. Os comités, grupos de trabalho e grupos relacionados da EMA são compostos por especialistas europeus em diferentes áreas. Cada um dos comités tem as suas próprias regras de procedimento (24,25).

Os comités científicos da EMA são os seguintes (20,24):

- Comité de Medicamentos de Uso Humano;
- Comité de Medicamentos de Uso Veterinário;
- Comité de Medicamentos Órfãos (COMP, do inglês *Committe for Orphan Medicinal Products*);
- Comité de Medicamentos à base de Plantas;
- Comité Pediátrico;
- Comité de Terapias Avançadas;

- Comité de Avaliação do Risco em Farmacovigilância (PRAC, do inglês *Pharmacovigilance Risk Assessment Committee*)

Existem principalmente dois comités responsáveis pela validação e avaliação científica das terapias avançadas, o CAT e o CHMP (15).

3.1. Comité de Medicamentos de Uso Humano

O CHMP desempenha um papel indispensável na autorização de medicamentos de uso humano na UE, de acordo com o Regulamento (CE) N.º 726/2004. Sendo parte da EMA, o CHMP, elabora pareceres e decisões através de avaliações científicas, o que lhes permite determinar se os medicamentos cumprem os requisitos de qualidade, segurança e eficácia necessários para a concessão da AIM (26).

Este comité é responsável por realizar a avaliação inicial dos pedidos de AIM e considerar as recomendações do PRAC sobre a segurança dos medicamentos. É também responsável pela avaliação de possíveis alterações relativas aos processos de AIM e, caso seja necessário, pode recomendar à Comissão Europeia a suspensão do medicamento do mercado, sempre que se verifique que a utilização do medicamento não é segura, ou seja, sempre que se verifique uma relação risco/benefício negativa. Para além disso, o CHMP, elabora *guidelines* científicas que auxiliam os pedidos de AIM pelas companhias farmacêuticas, fornece aconselhamento científico no âmbito do desenvolvimento de novos medicamentos e tem um papel na harmonização dos requisitos regulamentares em conjunto com parceiros internacionais (26).

3.2. Comité de Terapias Avançadas

O Regulamento (CE) N.º 1394/2007, sobre Medicamentos de Terapia Avançada e que altera a Diretiva 2001/83/CE e o Regulamento (CE) N.º 726/2004, estabelece regras específicas em relação à autorização, fiscalização e farmacovigilância de ATMPs e também veio instituir a criação do CAT (EMA/CAT/454446/2008 rev. 5)(6).

O CAT consiste num grupo multidisciplinar constituído por 37 membros. Cada um dos membros é escolhido tendo em conta as suas habilitações técnico-científicas e experiência nas áreas que são relevantes para as terapias avançadas. Se o comité considerar necessário pode ainda recorrer a especialistas adicionais, que não pertencem ao comité. Os membros deste comité são nomeados a cada 3 anos, onde também é eleito um presidente pelo mesmo período de tempo (27).

O CAT é responsável por preparar um parecer sobre a qualidade, segurança e eficácia de cada ATMP submetido à EMA para posteriormente ser sujeito a uma aprovação final pelo CHMP. O CHMP emite um parecer final sobre a farmacovigilância e concessão, alteração, suspensão ou revogação da AIM emitindo este parecer à Comissão Europeia, que concede a AIM (6,27).

Para além de colaborar especialmente com o CHMP, o CAT também colabora com outros comités da EMA, como é o caso do COMP, o PRAC, o Grupo de Trabalho de Aconselhamento Científico (SAWP, do inglês *Scientific Advice Working Party*), assim como outros grupos de trabalho (27).

4. CLASSIFICAÇÃO DOS MEDICAMENTOS DE TERAPIA AVANÇADA

Os medicamentos de terapia avançada pertencem à categoria de produtos biológicos inovadores e complexos (15). Permitem tratar ou prevenir doenças, e têm como objetivo modificar, corrigir ou reconstituir funções fisiológicas através de mecanismos de ação de natureza farmacológica, imunológica ou metabólica (7).

A primeira etapa do desenvolvimento de um ATMP consiste na sua definição e consequente classificação. Deste modo, é importante classificar corretamente o produto num estado inicial de desenvolvimento, pois determinará qual a legislação e recomendações a seguir ao longo de todo o plano de desenvolvimento do produto. O CAT é responsável por confirmar que um dado medicamento cumpre os critérios científicos para ser classificado como ATMP e esclarece a classificação de um determinado produto, sobretudo quando o produto se pode enquadrar em duas categorias diferentes (15).

De acordo com o Regulamento (CE) N.º 1394/2007 do Parlamento Europeu e do Conselho de 13 de Novembro de 2007 (7), podem ser classificados em:

4.1. Medicamentos de Terapia Génica

Os Medicamentos de Terapia Génica (MTG) são medicamentos biológicos que contêm uma substância ativa que inclui ou consiste num ácido nucleico recombinante a inserir no corpo, utilizado com o objetivo de regular, reparar, substituir, adicionar ou suprimir uma sequência genética. Podem apresentar efeito profilático, de diagnóstico ou terapêutico, sendo que este efeito está intimamente relacionado com a sequência recombinante do ácido nucleico que contêm ou com o produto resultante da expressão genética da sequência (14).

Os MTG incluem vetores virais e não virais, que incluem plasmídeos de DNA, vírus e células geneticamente modificados. Esta classe de medicamentos não inclui vacinas contra doenças infecciosas. Geralmente são utilizados para tratar uma variedade de doenças, incluindo distúrbios genéticos, cancro ou doenças prolongadas (27).

Em 2012, a EMA concedeu a primeira AIM para um MTG, o Glybera®. O Glybera® destinava-se a doentes com deficiência na lipoproteína lípase (LPL, do inglês *Lipoprotein lipase*) com pancreatites múltiplas ou graves. A deficiência na LPL é uma doença rara autossómica recessiva e estima-se que afete 1-2 pessoas por milhão. A alteração genética subjacente desta doença reflete-se na produção insuficiente de LPL, enzima responsável pela hidrólise dos triglicéridos.

Por se tratar de uma doença rara o número de doentes disponíveis para os ensaios clínicos é muito limitado e deste modo não foi possível obter informação completa sobre este medicamento e por isso a AIM foi concedida em circunstâncias excepcionais (28,29).

O Glybera® utiliza um vetor viral, o vírus adenoassociado (AAV), como veículo de entrega das cópias funcionais do gene da LPL nas células musculares, permitindo com uma única administração a produção da enzima LPL nas células, reduzindo assim o número de crises de pancreatite e a gravidade da doença. Antes da introdução deste MTG, o tratamento dos doentes portadores desta alteração genética consistia apenas numa redução do aporte lipídico (inferior a 20% da ingestão calórica diária), sendo muito difícil de cumprir, resultando em episódios de pancreatites recorrentes. Em 2017, este MTG foi retirado do mercado por apresentar pouca evidência relativamente aos seus benefícios clínicos (28,30).

Em maio de 2023, existiam 14 MTG aprovados pela EMA, sendo por isso a classe de ATMPs com mais medicamentos aprovados (31).

4.2. Medicamentos de Terapia com Células Somáticas

Os Medicamentos de Terapia com Células Somáticas (MTCS) são medicamentos biológicos que consistem ou contêm células ou tecidos que foram sujeitos a manipulação substancial de modo a alterar as características biológicas, fisiológicas ou propriedades estruturais relevantes para a situação clínica em causa, ou células ou tecidos que não se destinam a ser utilizados para as mesmas funções no recetor e no dador (7,14,27). De acordo com o Anexo I do Regulamento (CE) N.º 1394/2007, excluem-se os seguintes procedimentos como sendo manipulação substancial - corte, trituração, moldagem, centrifugação, imersão em soluções antibióticas ou antimicrobianas, esterilização, irradiação, separação, concentração ou purificação, filtração, liofilização, congelação, criopreservação e vitrificação (7,27).

Os MTCS permitem prevenir, tratar, diagnosticar uma doença através de uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica das células ou tecidos (14,27).

4.3. Produtos de Engenharia de Tecidos

Os Produtos de Engenharia de Tecidos (PET) contêm ou são constituídos por células ou tecidos modificados e têm como finalidade regenerar, reparar ou substituir um tecido humano. Podem conter células ou tecidos de origem humana ou animal, ou ambos. As células ou tecidos podem ser viáveis ou não viáveis e para além disso, podem conter substâncias adicionais como

produtos celulares, biomoléculas, biomateriais, substâncias químicas, suportes ou matrizes. Os produtos que contém exclusivamente tecidos ou células não viáveis, ou seja, que não contém nenhum tecido ou células viáveis, e que não atuam principalmente por ação farmacológica, imunológica ou metabólica não devem ser considerados PET (27).

Os MTCS e os PET podem apresentar componentes semelhantes - células, suportes e matrizes - no entanto o que diferencia estes medicamentos entre si é a finalidade para os quais são utilizados. Como referido anteriormente, os MTCS são utilizados com intenção de prevenir, tratar ou diagnosticar uma doença através de uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica das células ou tecidos. Os PET, por outro lado, têm como objetivo regenerar, reparar ou substituir o tecido humano (7).

Podem surgir situações em que um produto se enquadre tanto na definição de MTCS como na de PET, e de acordo com o artigo 2º do Regulamento (CE) N.º 1394/2007, considera-se como sendo um PET. Contudo, um produto que possa ser abrangido pela definição de MTCS, PET ou MTG, considera-se como sendo um MTG (7).

4.4. Medicamentos de Terapia Avançada Combinados

Os Medicamentos de Terapia Avançada Combinados (ATMPs combinados) incorporam um ou mais dispositivos médicos, ou um ou mais dispositivos médicos implantáveis ativos, e a sua estrutura celular ou tecidual contém células ou tecidos - viáveis ou não viáveis – que seja suscetível de atuar no corpo humano através de um modo de ação que possa considerar-se principal em relação aos referidos dispositivos. Um produto que contenha células ou tecidos viáveis, a ação farmacológica, imunológica ou metabólica dessas células ou tecidos deve ser considerada como o principal modo de ação do produto (7,27).

Um dispositivo médico, de acordo com a Diretiva 90/385/CEE de 20 de junho de 1990, é qualquer instrumento, aparelho, equipamento, material ou outro artigo utilizado isoladamente ou combinado, incluindo os acessórios e suportes lógicos necessários para o seu correto funcionamento. Estes dispositivos são destinados pelo fabricante para serem utilizados em seres humanos com finalidade de diagnóstico, prevenção, controlo, tratamento ou atenuação de uma doença ou lesão. Também podem ser utilizados com a finalidade de estudo, de substituição ou alteração da anatomia ou de um processo fisiológico e de controlo da concepção. O efeito principal pretendido não é atingido por meios farmacológicos, químicos, ou imunológicos ou por metabolismo, no entanto a sua atuação pode ser apoiada através destes (32).

Por outro lado, um dispositivo médico implantável ativo refere-se a qualquer dispositivo médico ativo, ou seja, qualquer dispositivo cujo funcionamento depende de uma fonte de energia elétrica ou de outra fonte de energia diferente da gerada diretamente pelo corpo humano ou pela ação da gravidade, que seja concebido para ser total ou parcialmente introduzido no corpo humano através de uma intervenção médica ou cirúrgica (32).

Os ATMPs combinados representam apenas 1% de todos os ATMPs em desenvolvimento na UE. Por exemplo, o NT-501 é um AMTP combinado que consiste em células epiteliais pigmentadas da retina humana encapsuladas que foram geneticamente modificadas para libertar doses terapêuticas de fator neurotrófico ciliar (CNTF, do inglês *Ciliary Neurotrophic Factor*) na parte posterior do olho. As células são encapsuladas num implante intravítreo (dispositivo médico), que consiste numa cápsula externa semipermeável, onde o crescimento celular ocorre de forma controlada, assim como a libertação de CNTF em doses efetivas (Figura 4.1) (33).

Em 2012, a EMA classificou este implante como um medicamento órfão para o tratamento da telangiectasia macular tipo 2 e em 2013 para o tratamento da retinite pigmentosa (33)

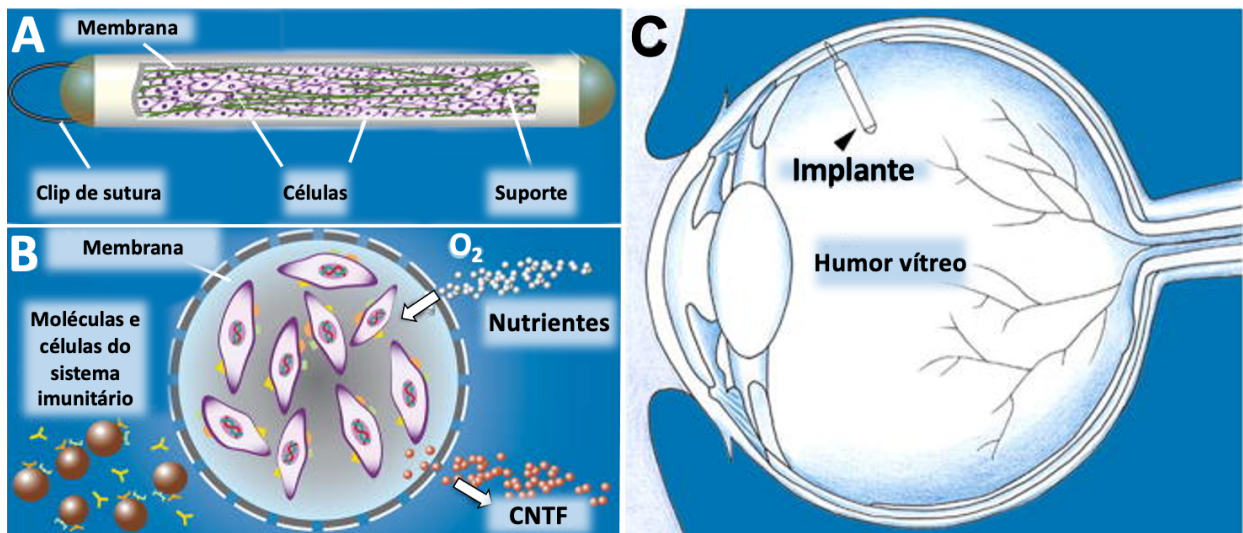


Figura 4.1 - Ilustração esquemática do implante NT-501, adaptado de (34). O implante é composto por uma membrana semipermeável que contém células que libertam o fator neurotrófico ciliar (CNTF). A cápsula da membrana é fechada nas extremidades, sendo que uma das extremidades apresenta um clip de sutura para se poder fixar na esclera (A). A membrana permite a difusão de oxigénio e nutrientes, assim como a difusão do CNTF para fora das células (B). O implante encontra-se fora do eixo visual do olho quando ancorado à esclera (C).

5. ATMPs – REGULAMENTAÇÃO E DESENVOLVIMENTO PRÉ-CLÍNICO E CLÍNICO

A complexidade inerente dos ATMPs dificulta a criação de uma estratégia regulamentar universal para a avaliação do risco, uma vez que os riscos podem diferir de acordo com o tipo de produto, das características/natureza das matérias-primas e do nível de complexidade do processo de produção. Assim, cada novo ATMP desenvolvido é muito distinto e específico, comparativamente com outros produtos já existentes (35).

Em reconhecimento das dificuldades únicas associadas ao desenvolvimento dos ATMPs, as autoridades regulamentares publicaram várias *guidelines* relacionadas com a qualidade, desenvolvimento pré-clínico e clínico dos ATMPs, de modo a auxiliar o desenvolvimento destes produtos. A Diretiva 2009/120/CE veio introduzir uma abordagem baseada no risco (RBA, do inglês *risk-based approach*) para estes produtos, permitindo justificar aspetos específicos relacionados com os produtos e população de doentes, assim como com o tipo e extensão dos dados incluídos na AIM relacionados com a qualidade, segurança e eficácia dos produtos (22).

A RBA foi desenvolvida de modo a melhorar a qualidade dos medicamentos de uma forma eficiente, reduzindo custos com o desenvolvimento e eliminando riscos inesperados. Esta metodologia centra-se na monitorização contínua dos riscos e fatores de risco, identificando precocemente os riscos, o que permite controlá-los e minimizá-los no contexto da gestão do risco (36).

A EMA define os riscos como efeitos adversos que causam preocupação nos doentes e a terceiros, sendo que estes efeitos estão relacionados com a utilização clínica do medicamento. As características quantitativas e/ou qualitativas do produto que contribuem para um risco específico, são definidas como um fator de risco. Durante o desenvolvimento dos ATMPs, a deteção dos riscos deve iniciar-se numa fase inicial e continuar durante todo o desenvolvimento dos ATMPs, de modo a prevenir e/ou minimizar os riscos associados (EMA/149995/2008 rev.1)(36,37).

Frequentemente os ATMPs são desenvolvidos em meio hospitalar, académico ou pequenas empresas de biotecnologia e por isso estão sujeitos a sistemas de qualidade diferentes daqueles que são normalmente exigidos na produção dos medicamentos convencionais (35). A EMA recomenda que os planos de desenvolvimento e os requisitos de avaliação de risco sejam ajustados caso a caso para cada produto pois existem inúmeras fontes de variabilidade, e por isso a RBA deve incluir todo o processo de produção, avaliação pré-clínica e clínica do produto (38).

5.1. Medicamentos de terapia celular e engenharia de tecidos

5.1.1. Produtos à base de células

5.1.1.1. Desenvolvimento pré-clínico de medicamentos à base de células

Durante o desenvolvimento de medicamentos a avaliação pré-clínica é fundamental, não sendo exceção no caso dos produtos à base de células. Estes estudos têm como objetivo demonstrar a prova de conceito (PoC, do inglês *Proof-of-Concept*) e antecipar tanto os efeitos farmacológicos como os toxicológicos, para posteriormente estes dados serem utilizados para a autorização do ensaio clínico. Devem permitir estabelecer as doses terapêuticas, via de administração, a biodistribuição das células, toxicidade e potenciais efeitos secundários e demonstrar a variabilidade dos produtos à base de células (EMEA/CHMP/410869/2006) (22,38,39).

Como qualquer estudo pré-clínico, estes podem incluir dados obtidos *in vitro*, como a avaliação da estabilidade genética de células a transplantar através da análise do cariótipo, e devem também ser desenvolvidos em modelos animais relevantes, ou seja, que caracterizem/mimetizem devidamente a doença em seres humanos. Quando possível, estes estudos devem ser realizados em dois modelos animais diferentes, idealmente de espécies diferentes (um roedor e um não roedor) (EMA/CHMP/ICH/731268/1998). É recomendável que se consulte as autoridades relevantes, como por exemplo a EMA, durante a seleção das espécies para estes estudos, particularmente quando se trata de estudos de segurança. No entanto, quando os estudos *in vivo* não são passíveis de serem realizados, devido à ausência de um modelo animal da doença ou quando existem diferenças fisiológicas que limitam o valor preditivo do modelo animal, podem ser substituídos por estudos *in vitro*. Independentemente do modelo animal escolhido, deve-se ter sempre em consideração as limitações do modelo e a informação relevante que o modelo pode fornecer (EMEA/CHMP/410869/2006) (38,40).

Os problemas de segurança dos produtos à base de células estão sobretudo relacionados com a origem e manipulação das células. Por exemplo, deve-se monitorizar a potencial transformação maligna no caso das células estaminais, o que se justifica pela capacidade destas células se diferenciarem em células de diferentes linhagens e por frequentemente serem obtidas de fontes de células estaminais com pluripotência celular. É também preciso monitorizar a rejeição imunológica às células transplantadas no caso de células xenogenéticas e alogénicas, monitorizando a rejeição a longo prazo e avaliando eventuais reações inflamatórias que possam afetar a saúde do indivíduo transplantado (EMEA/149995/2008 rev.1) (37,39).

5.1.1.2. Desenvolvimento clínico dos produtos à base de células

Após a conclusão dos estudos pré-clínicos da PoC em modelos *in vitro* e *in vivo*, inicia-se o desenvolvimento clínico (EMEA/CHMP/410869/2006) (38).

A segurança geral do medicamento experimental é testada na Fase I do ensaio clínico (primeira vez testado em humanos), de seguida na Fase II é avaliada a segurança relacionada com a dose e PoC do mecanismo terapêutico (eficácia inicial) e posteriormente na Fase III confirma-se a eficácia (Figura 5.1). Os dados obtidos durante o ensaio clínico são fundamentais para o pedido de AIM, e caso a autorização seja concedida pode ser necessário realizar estudos adicionais pós-autorização para consolidar a evidência da relação positiva risco/benefício e manter a AIM (22,41).

No caso dos ATMPs, a maioria dos ensaios de Fase I, são realizados numa pequena população alvo de doentes por motivos éticos. Frequentemente, são realizados estudos de Fase I/II em simultâneo, nos quais se avalia simultaneamente a segurança e a eficácia inicial do produto (Figura 5.1). Posteriormente na Fase III, são recolhidos dados adicionais de segurança e eficácia que permitem demonstrar que o ATMP em estudo apresenta um efeito terapêutico benéfico (5,22,42).

Os medicamentos à base de células devem incluir estudos farmacodinâmicos e farmacocinéticos, estudos de mecanismo de ação, determinação da dose e ensaios clínicos aleatorizados. Caso se justifique, podem ser consideradas abordagens alternativas entre a Fase I/III dos ensaios clínicos tendo em conta as características biológicas inerentes destes produtos. Os estudos pré-clínicos relevantes, assim como, a experiência clínica prévia pode ser utilizados para a demonstrar a PoC e os limites significativos para a avaliação da segurança e eficácia (EMEA/CHMP/410869/2006) (38,42).

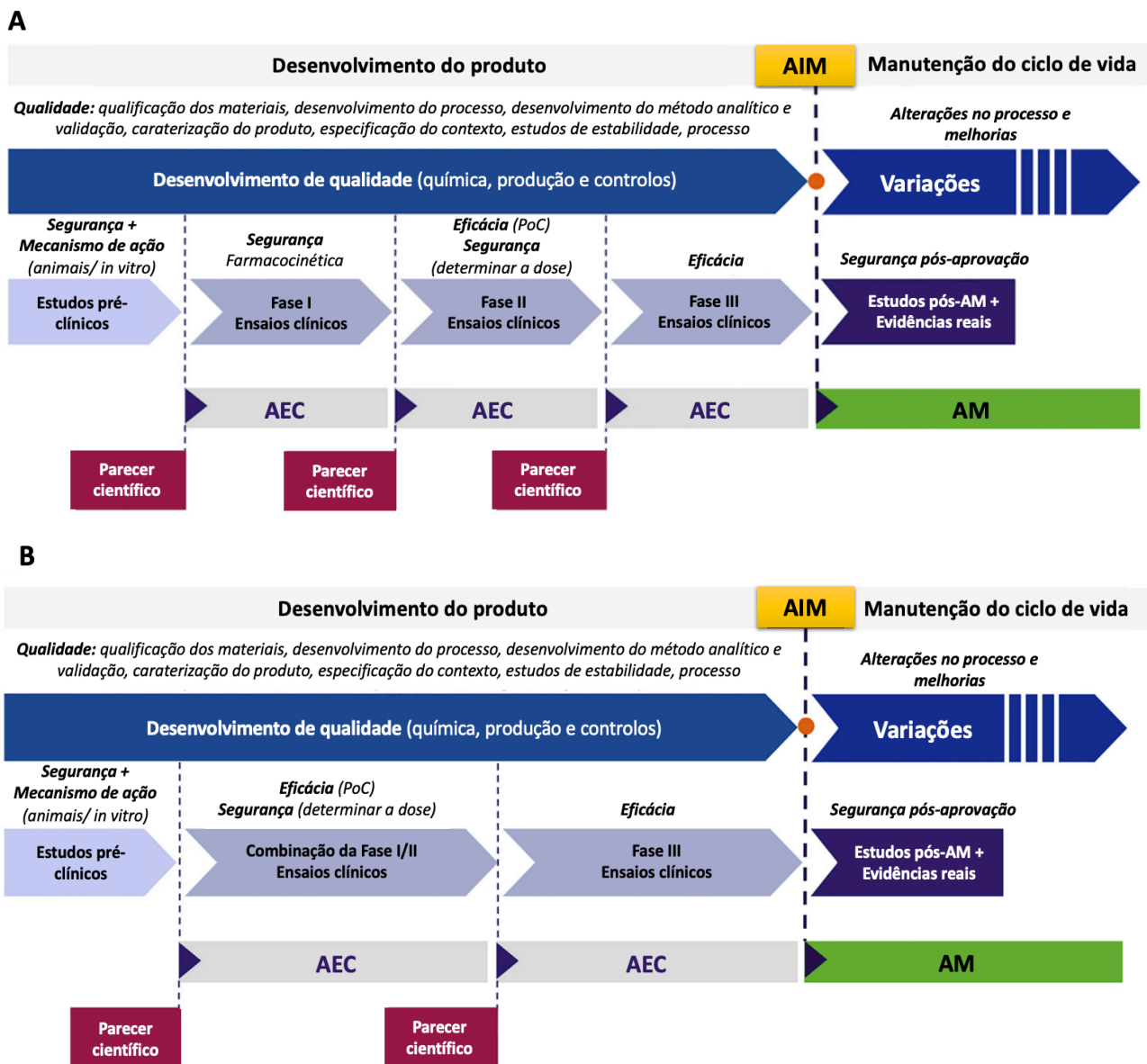


Figura 5.1 - Desenvolvimento de medicamentos da fase pré-clínica até à fase clínica, adaptado de (22). O desenvolvimento de um medicamento engloba várias etapas distintas que têm como objetivo demonstrar a qualidade, segurança e eficácia do medicamento. Para se poder iniciar um estudo é necessário um pedido de autorização de ensaio clínico (AEC). (A) Normalmente, os estudos iniciais de um medicamento iniciam-se em voluntários saudáveis e podem envolver a avaliação inicial da segurança geral do medicamento na Fase I dos ensaios clínicos (primeira vez em humanos), de seguida é realizada uma avaliação de segurança relacionada com a dose e prova de conceito (PoC, do inglês *Proof-of-Concept*) do mecanismo de ação (eficácia inicial) durante a Fase II do ensaio clínico e por fim, na Fase III do ensaio clínico é feita a confirmação da eficácia. (B) A maioria dos ensaios clínicos de ATMPs, por motivos éticos, não são realizados em voluntários saudáveis. Há combinação da Fase I/II dos ensaios clínicos para avaliar a segurança e a eficácia inicial, sendo a eficácia confirmada na Fase III. Os dados obtidos durante os ensaios clínicos são utilizados para apoiar o pedido de AIM à EMA. Se o pedido de AIM for concedido, os dados de segurança pós-autorização e/ou evidências reais podem ser necessários para manter a autorização no mercado (AM).

Os métodos de administração destes produtos podem ser muito particulares e pode ser necessário recorrer a tratamentos concomitantes para obter o efeito terapêutico desejado. Os efeitos biológicos podem ser influenciados pelo sistema imunitário do doente, visto que o efeito destes produtos é altamente dependente do ambiente *in vivo*. Deste modo, é importante que o desenvolvimento clínico inclua a padronização e otimização destes produtos (EMEA/CHMP/410869/2006) (38).

Apesar de muitas vezes o mecanismo de ação não ser completamente conhecido ou ser multifatorial, devem ser conhecidos os principais efeitos indesejáveis do produto em estudo. Para avaliar a atividade farmacodinâmica destes produtos, os ensaios efetuados vão depender do propósito da terapia em causa e podem ser utilizadas várias técnicas de microscopia, histologia e de atividade enzimática. Para além disso, quando algum produto à base de células inclui um componente não celular deve ainda ser avaliado quanto à sua compatibilidade, taxa de degradação e funcionalidade (EMEA/CHMP/410869/2006) (38,43).

Por norma, para a avaliação da atividade farmacocinética os estudos convencionais de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação (ADME) não são relevantes, nem aplicáveis, aos produtos à base de células. São particularmente importantes estudos que monitorizem a viabilidade, proliferação, diferenciação, distribuição corporal e funcionalidade durante a viabilidade pretendida do ATMP em estudo (EMEA/CHMP/410869/2006) (38,44).

A determinação da dose deve ser baseada na potência e nas evidências obtidas durante o desenvolvimento do ATMP. Frequentemente, nestes medicamentos a dose está relacionada com as características individuais de cada doente e do estágio da doença em que o doente se encontra, no entanto, a dose deve ser sempre baseada nas evidências científicas obtidas durante a Fase I/II dos ensaios clínicos. Estes estudos são desenhados com o objetivo de identificar qual a dose mais baixa para se obter o efeito terapêutico (dose mínima efetiva) ou um intervalo de dose efetiva ótima definida como o intervalo de dose necessária para obter o efeito pretendido com base nos resultados clínicos para a eficácia e tolerabilidade (EMEA/CHMP/410869/2006) (38,45).

Durante o desenvolvimento e fase pós-comercialização, deve-se ter especial atenção a infeções, respostas do sistema imunitário, transformações malignas e tratamentos concomitantes. No geral, nos produtos à base de células pode ser necessário a realização de estudos farmacoepidemiológicos a longo prazo para a avaliar a segurança e eficácia dos mesmos, sobretudo nos produtos em que é expectável uma viabilidade a longo prazo (EMEA/CHMP/410869/2006) (38).

5.1.2. Produtos à base de células xenogénicas

A terapia à base de células xenogénicas consiste na utilização de preparações de células ou tecidos animais viáveis como substância ativa que foram obtidas de um indivíduo de uma espécie diferente. Estas terapias podem ter várias finalidades, tais como a implantação/ perfusão num recetor/hospedeiro humano ou tratamento extracorporal através do contato de células animais (não humanas) com fluídos, tecidos ou órgãos humanos. Têm como objetivo a reconstituição das funções das células/ tecidos/ órgãos, sendo que o genótipo e/ou fenótipo das células pode ter sido modificado previamente através de tratamento farmacológico, combinação com matrizes, isolamento, cultura ou expansão (EMEA/CHMP/CPWP/83508/2009) (46).

A *Guideline on xenogeneic cell-based medicinal products* (EMEA/CHMP/CPWP/83508/2009) foi desenvolvida de modo a complementar a *Guideline on human cell-based medicinal products* (EMEA/CHMP/410869/2006), fornecendo considerações gerais para o desenvolvimento e avaliação de produtos à base de células xenogénicas. Os critérios e princípios gerais para a avaliação do risco definidos na *Guideline on human cell-based medicinal products* (EMEA/CHMP/410869/2006) também se aplicam aos medicamentos à base de células xenogénicas, no entanto existem algumas considerações específicas destes medicamentos que devem ser examinadas, nomeadamente a gestão do risco da transmissão de novas doenças infecciosas na população em geral através da adaptação de agentes infecciosos, conhecidos ou não, num hospedeiro imunocomprometido. Para além disso, existe o desafio de manter funções e sobrevivência das células xenogénicas a longo prazo, assim como o risco de rejeição destas células e/ou tecidos animais (EMEA/CHMP/CPWP/83508/2009)(38,46,47).

Apesar dos riscos associados a estes produtos à base de células, estes podem ser minimizados através da escolha cuidadosa de animais doadores, processo de produção reprodutível, testes pré-clínicos e clínicos, e programas de gestão do risco. A avaliação do risco deve ter em consideração as características específicas do produto, sendo que este deve ser também avaliado do ponto de vista da saúde pública e do meio ambiente (EMEA/CHMP/CPWP/83508/2009) (46).

Os tecidos e/ou células utilizados nos produtos à base de células xenogénicas podem ser obtidos a partir de animais modificados geneticamente (transgénicos ou *knock-out*) ou através de alterações genéticas *ex vivo*. Os animais modificados geneticamente devem ser totalmente caracterizados. Relativamente a este último ponto um dos fatores a ter em consideração é análise do risco potencial que o medicamento representa para o meio ambiente, nomeadamente

o uso de organismos/células geneticamente modificadas e a necessidade da implementação da *Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells* (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) sobre qualidade, aspetos não clínicos e clínicos de medicamentos contendo células geneticamente modificadas (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1) (46).

A avaliação do risco ambiental é sobretudo relevante para células humanas geneticamente modificadas através de vetores virais e MTG contêm/ consistem em vetores AAV. Os AAV não estão associados a nenhuma doença em humanos ou animais, e são incapazes de se replicar, exceto quando célula está co-infetada com um vírus *helper*. Na presença de um vírus *helper* ocorre infeção produtiva dos AAV, caracterizada por replicação do genoma, expressão de genes virais e produção de viriões (48,49).

Apesar das células humanas sobreviverem apenas no corpo humano ou em condições de cultura *in vitro* que lhes são favoráveis, quando um medicamento experimental é constituído por células humanas modificadas geneticamente através de vetores virais (por exemplo, retro/lentivirais ou AAV), podem apresentar riscos para o meio ambiente e para a saúde pública, pois podem conduzir à presença ou geração de um agente viral infeccioso para o meio ambiente. Deste modo, os medicamentos que contêm células modificadas geneticamente com recurso a vetores AAV, devem demonstrar a ausência/ risco insignificante da formação de vírus competentes e quando são utilizados vírus *helper* na produção, o produto acabado não pode conter estes vírus. Por outro lado, quando são utilizados vetores retro/lentivirais os requerentes devem também demonstrar a ausência/ risco insignificante da formação de vírus competentes e ainda, demonstrar que as partículas virais do vetor retro/lentiviral foram reduzidas a concentrações insignificantes no produto acabado. Quando estas situações são asseguradas, não são identificados riscos para o meio ambiente e saúde animal (48).

5.1.2.1. Desenvolvimento pré-clínico de produtos à base de células xenogénicas

O desenvolvimento pré-clínico de produtos à base de células xenogénicas, tal como noutros produtos à base de células, devem ser realizados sempre que possível, em modelos animais relevantes. Podem ser realizados estudos entre espécies diferentes, dependendo do objetivo do estudo (EMA/CHMP/CPWP/83508/2009) (46).

Um dos principais problemas relacionados com este tipo de produtos é a migração e proliferação das células xenogénicas no hospedeiro, por isso devem ser realizadas técnicas

histopatológicas em animais e testes complementares adequados, que permitam identificar especificamente as células xenogénicas e estabelecer o seu perfil de migração. Contudo é frequente existirem diferenças significativas no comportamento de uma mesma fonte de células em espécies diferentes (EMEA/CHMP/CPWP/83508/2009) (46,50).

A realização de estudos toxicológicos vai depender do produto em causa, uma vez que os estudos convencionais frequentemente não são apropriados (EMEA/CHMP/CPWP/83508/2009). Por exemplo, no desenvolvimento de terapias celulares para utilização no sistema nervoso é frequente avaliar a resposta inflamatória e a toxicidade neuronal do medicamento (46,51).

É também expectável que este tipo de terapia induza uma forte resposta imunitária no hospedeiro quando as células do hospedeiro interagem com as células xenogénicas, por isso se for relevante para o produto em questão, devem ser realizados estudos que avaliem a resposta imunitária do hospedeiro na ausência e também presença de imunossupressão (46,50).

Na ausência de terapêuticas de imunossupressão, o transplante de tecidos ou células não autólogas, induz uma resposta imunitária no hospedeiro, conduzindo rapidamente à falha e rejeição do transplante. De modo a ultrapassar a rejeição imunológica, têm sido realizados estudos com recurso ao encapsulamento das células. O encapsulamento permite modular a atividade do sistema imunitário, ou seja, permite manter as células isoladas da resposta imunitária do hospedeiro, através de uma membrana semipermeável. Esta membrana permite a difusão de gases e nutrientes, mas não das células do sistema imunitário do hospedeiro (52,53).

Devido à complexidade da tecnologia envolvida no desenvolvimento das cápsulas e nas dificuldades encontradas para evitar respostas imunitárias desencadeadas pelos seus constituintes (por exemplo, polímeros, células e vetores de DNA), ainda não existe nenhum produto baseado na tecnologia de encapsulamento disponível no mercado (53).

Os estudos imunológicos podem ser relevantes quando se recorre ao encapsulamento das células, para melhorar a compatibilidade das células animais com as do hospedeiro, uma vez que permitem avaliar a integridade do encapsulamento (EMEA/CHMP/CPWP/83508/2009) (46).

Se possível, devem ser estudados os mecanismos subjacentes responsáveis pela rejeição ou perda de função (46). Isto é particularmente importante porque a resposta imunológica e inflamatória representa um risco para a qualidade de vida do indivíduo transplantado (54,55).

5.1.2.2. Desenvolvimento clínico de produtos à base de células xenogénicas

O desenvolvimento clínico de produtos baseados em células xenogénicas, inicialmente deve ser realizado em doentes portadores de doenças graves ou que apresentem risco de vida e para os quais não estão disponíveis terapias alternativas, ou quando existe um potencial benefício clinicamente relevante (EMEA/CHMP/CPWP/83508/2009) (46).

Nos estudos farmacocinéticos deve ser caracterizada a distribuição, proliferação e sobrevivência das células xenogénicas, assim como as suas interações com os tecidos do hospedeiro. Os métodos e a duração da avaliação devem ser justificados (EMEA/CHMP/CPWP/83508/2009). Os estudos da dose e os estudos de eficácia são realizados de acordo com os mesmos princípios da *Guideline on human cell-based medicinal products* (EMEA/CHMP/410869/2006) (38,46).

No que diz respeito à farmacovigilância, deve-se considerar as características especiais deste tipo de medicamentos, assim como os riscos individuais de cada produto e a utilização terapêutica proposta. Assim, deve-se considerar potenciais infeções por agentes patogénicos, o desenvolvimento de doenças malignas e efeitos adversos a longo prazo (46). O plano de farmacovigilância deve contemplar um plano que garanta a deteção, avaliação e prevenção de reações adversas permitindo uma rápida identificação de ligações epidemiológicas e dados para avaliação da segurança a longo prazo da terapia (EMEA/CHMP/CPWP/83508/2009) (46).

5.1.3. Produtos à base de células estaminais

Os produtos à base de células incluem os produtos à base de células estaminais, sendo estes produtos muito promissores na área das terapias celulares no tratamento de várias patologias, incluindo doenças metabólicas, degenerativas e inflamatórias. Adicionalmente constituem uma inovação na reparação e regeneração de tecidos (EMA/CAT/571134/2009) (56).

Estes produtos representam um espectro diverso de diferentes produtos à base de células, para os quais existe um grau variável de conhecimento científico e experiência clínica disponível, uma vez que esta classe de produtos não é homogénea. Apesar das células estaminais partilharem algumas características, cada tipo de célula estaminal tem uma capacidade de autorrenovação (ou seja, capacidade de originar células-filhas mantendo o seu estado de diferenciação), migração e diferenciação que pode ser muito diferente (EMA/CAT/571134/2009) (56,57).

As células estaminais podem ser classificadas de acordo com a sua origem e potência, ou seja, diversidade de diferentes tipos de células que podem originar após diferenciação (Figura 5.2). Podem ser classificadas em totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes, de acordo com a sua potência. As células estaminais totipotentes podem originar qualquer tipo de célula das três camadas germinativas e estruturas de suporte necessárias ao desenvolvimento embrionário, como a placenta e cordão umbilical. As células estaminais pluripotentes após diferenciação conseguem originar todas as células das três camadas germinativas, no entanto não permitem originar estruturas extraembrionárias, sendo as células estaminais embrionárias um exemplo deste tipo de células. As células estaminais multipotentes já estão comprometidas a uma das camadas germinativas e por isso só conseguem originar células dessa camada. As células estaminais unipotentes apenas conseguem originar um tipo de células. A identificação e caracterização das células estaminais pode ser feita através da sua capacidade de autorrenovação (proliferação) e expressão de marcadores específicos, que por exemplo, podem indicar o tipo de célula, pluripotência e linhagem celular (EMA/CAT/571134/2009) (56–58).

É crucial que os estudos pré-clínicos e clínicos sejam bem definidos e caracterizados, dada a plasticidade e diferenciação destes produtos. Assim, os produtos à base de células estaminais devem ser produzidos através de um processo de fabrico robusto que garanta que o produto final é reproduzível e consistente (EMA/CAT/571134/2009) (51,56).

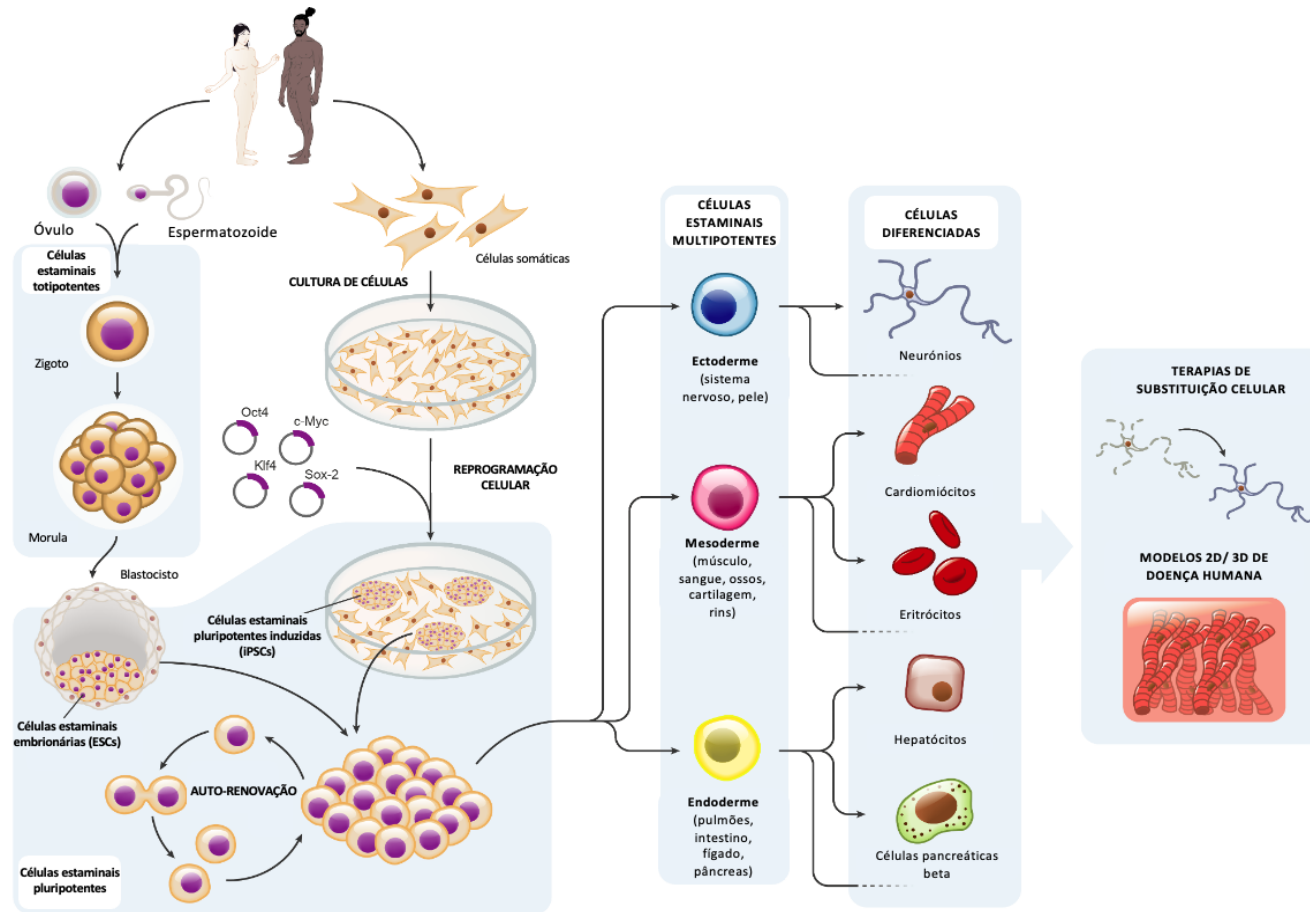


Figura 5.2 – Fontes de células estaminais disponíveis para as terapias à base de células estaminais, adaptado de (57). As células estaminais podem ser classificadas de acordo com a sua origem e potência. As células estaminais totipotentes podem originar todos os tipos de células presentes no organismo e as estruturas de suporte necessárias para o desenvolvimento do embrião. As células estaminais pluripotentes também têm a capacidade de originar todos os tipos de células presentes no organismo, ou seja, conseguem originar células da ectoderme, mesoderme ou endoderme, no entanto não conseguem originar as estruturas de suporte para o desenvolvimento embrionário. As células estaminais multipotentes são células um pouco mais diferenciadas e por isso apenas conseguem originar células de uma das camadas germinativas (endoderme, mesoderme ou ectoderme). As células totipotentes estão presentes na morula após a fertilização enquanto as células estaminais pluripotentes podem ser obtidas por reprogramação das células somáticas em células estaminais pluripotentes induzidas (iPSCs, do inglês *induced pluripotent stem cells*) ou podem ser obtidas da camada mais interna do blastocisto (células estaminais embrionárias). As células estaminais pluripotentes podem ser induzidas em células estaminais multipotentes e células mais especializadas, servindo como modelos de doenças humanas 2D e 3D e terapias de substituição celular.

5.1.3.1. Desenvolvimento pré-clínico de produtos à base de células estaminais

Idealmente, os testes pré-clínicos devem ser realizados em modelos animais de doença relevantes, no entanto, a disponibilidade destes modelos pode ser limitada. Pode ser necessário utilizar modelos animais de maiores dimensões, em situações em que o tamanho, fisiologia ou sistema imunitário é relevante para o efeito clínico em estudo (EMA/CAT/571134/2009) (56). Por exemplo, os medicamentos que são destinados a aplicar no sistema nervoso, é necessário utilizar primatas não humanos, como os macacos rhesus (*Macaca mulatta*). Isto deve-se ao facto de o cérebro humano apresentar uma maior complexidade comparativamente ao cérebro dos roedores, e por isso é necessário utilizar modelos animais mais complexos (59).

Este tipo de produtos apresenta um risco inerente de formação de tumores, nomeadamente aquando da utilização de fontes de células provenientes de células pluripotentes, sendo que as condições de cultura podem influenciar significativamente a estabilidade genómica destas células. Assim as células devem ser avaliadas em relação à estabilidade cromossómica e formação de tumores antes de serem testadas clinicamente. Para testar a formação de potenciais tumores e/ou teratomas, um tipo de tumor benigno, deve-se utilizar um modelo animal imunocomprometido ou um modelo animal humanizado (por exemplo, com um sistema imunitário humanizado), uma vez que os imunossuppressores podem influenciar a formação de tumores. É também importante a utilização de modelos animais não roedores para avaliação da estabilidade genómica das células, porque dada a sua esperança média de vida (< 3 anos) torna difícil a avaliação deste parâmetro. Por outro lado, um modelo animal que apresente um sistema imunitário imunocompetente vai rejeitar/matar as células estaminais humanas administradas, conduzindo a falta de efeito terapêutico e a um falso resultado negativo (EMA/CAT/571134/2009) (51,56,57).

A utilização clínica de células estaminais que são sujeitas a uma elevada manipulação *in vitro* não é aconselhada (EMEA/CHMP/410869/2006) (38).

A biodistribuição é altamente dependente da via de administração ou local de implantação, e por isso os estudos pré-clínicos de biodistribuição são muito importantes e devem ter em consideração os processos de migração, diferenciação e persistência das células (EMA/CAT/571134/2009) (56,60).

5.1.3.2. Desenvolvimento clínico de produtos à base de células estaminais

Antes da administração em humanos, devem existir evidências pré-clínicas que comprovem a PoC e a segurança do produto em dois modelos animais, sendo isto particularmente importante quando as células foram extensamente manipuladas *ex vivo* ou quando é proposta uma administração sistêmica (EMA/CAT/571134/2009) (56).

Nos ensaios clínicos deve ser possível demonstrar a segurança e eficácia do produto, assim como fundamentar o mecanismo de ação (EMA/CAT/571134/2009) (51,56).

No momento de administração das células estaminais, estas podem encontrar-se em vários estadios de diferenciação, sendo por isso importante selecionar biomarcadores que permitam determinar o estadio de diferenciação das células no momento de administração do doente, de modo a definir corretamente a população de células necessária para obter o efeito pretendido *in vivo*, assim como facilitarem a monitorização *in vivo* após a administração (56).

A presença de células estaminais em locais diferentes daqueles que são pretendidos deve ser investigada. Durante a fase pré-clínica deve-se abordar o efeito de diferentes procedimentos de administração, doses/ número de células e que posteriormente devem ser confirmados durante os estudos clínicos (EMA/CAT/571134/2009) (56).

Neste tipo de ATMPs é necessário avaliar a dose a administrar, a frequência de administração, a via de administração, e no que respeita ao tratamento do cérebro é também necessário estabelecer as coordenadas estereotáticas do local da administração e, o tempo necessário para atingir o resultado clínico. No entanto, devido ao potencial de proliferação que estas células apresentam, o número de células pode aumentar após a administração, sendo necessário avaliar e monitorizar este fator (EMA/CAT/571134/2009) (56,61).

Relativamente à dose a administrar, sempre que possível deve-se determinar a dose mínima efetiva. Quando não é possível determinar a dose, por exemplo porque a administração deve ser realizada numa região anatómica delicada (por exemplo, sistema nervoso central), pode ser realizado um ensaio clínico com uma dose que apresente efeito terapêutico. Este efeito terapêutico deve ser justificado tendo em conta evidências pré-clínicas (EMA/CAT/571134/2009) (56,62).

Alguns tipos de células estaminais, como as células estaminais embrionárias e as células estaminais pluripotentes induzidas, têm a capacidade de formar teratomas. Quando ocorre formação de tumores, deve ser investigada a causa, ou seja, se foi devido ao produto administrado ou devido a formação endógena (EMA/CAT/571134/2009) (56,63).

Nos primeiros estudos realizados em humanos, pode ser necessário estabelecer limites de segurança específicos com base em princípios teóricos, de modo detetar precocemente potenciais efeitos tóxicos no produto final (EMA/CAT/571134/2009) (56).

5.1.4. Imunoterapia à base de células

No caso da imunoterapia, na qual são utilizadas células com o objetivo de tratar os doentes através da estimulação do próprio sistema imunitário do doente, existem outras considerações a ter em conta para além das *guidelines* dos produtos à base de células (EMA/CHMP/BWP/271475/2006 rev.1) (64).

A imunoterapia é muitas vezes utilizada no tratamento de doenças oncológicas, onde a resposta imunitária é direcionada a antigénio(s) específico(s) do tumor/associados ao tumor e que vão conduzir à destruição das células tumorais. Estas interações entre o sistema imunitário e as células tumorais constituem uma abordagem complexa, cujos mecanismos de ação muitas vezes não são totalmente compreendidos. Frequentemente, dada a complexidade dos produtos de imunoterapia, estes não podem ser totalmente caracterizados. No entanto, tal como outros medicamentos biológicos, é importante e necessário determinar a potência (ou seja, medida quantitativa da atividade biológica) destes produtos, utilizando testes *in vivo* ou *in vitro* (EMA/CHMP/BWP/271475/2006 rev.1) (64,65).

De modo acordo com a *Guideline on potency testing of cell based immunotherapy medicinal products for the treatment of cancer* (EMA/CHMP/BWP/271475/2006 rev.1), nos resultados de um ensaio de potência deve-se conseguir obter resultados que garantam que a quantidade de substância ativa é suficiente para induzir uma resposta significativa, e que esta quantidade é reprodutível de lote para lote. Assim, o ensaio deve ser capaz de detetar alterações clinicamente significativas na quantidade de substância ativa numa dose de produto. Contudo, não é fácil determinar a atividade biológica nos produtos de imunoterapia, uma vez que a substância ativa é constituída por células completas e a

atividade destes produtos não pode ser atribuída única e exclusivamente a uma característica celular. Por isso, os ensaios de potência para estes produtos são baseados em mecanismos imunológicos complexos (EMA/CHMP/BWP/271475/2006 rev.1) (64).

Pode ser necessário desenvolver vários ensaios de potência em paralelo, sendo que estes devem ser adequados e iniciados o mais rápido possível. Estes ensaios devem ser validados antes dos ensaios clínicos de Fase III, salvo algumas exceções (EMA/CHMP/BWP/271475/2006 rev.1) (64).

O ensaio de viabilidade celular pode ser relevante para avaliar a potência dos produtos à base de células, pois é um parâmetro que reflete a integridade do produto e para além disso, pode ser utilizado como controlo após manipulação de certas características celulares (64,66).

Em alguns casos, pode ser necessário adicionar adjuvantes aos produtos de imunoterapia para aumentar a imunogenicidade, no entanto deve-se ter especial atenção nestas situações, uma vez que os adjuvantes podem interferir nos ensaios de potência (EMA/CHMP/BWP/271475/2006 rev.1) (64,67).

5.1.5. Aspetos clínicos relacionados com os PET

Os PET apresentam um carácter heterogéneo, relativamente à origem/ natureza do material e à sua indicação terapêutica. Estes produtos devem permitir uma regeneração total ou parcial, reparação e/ou substituição do tecido/órgão alvo (EMA/CAT/573420/2009) (68)

No caso dos PET, a farmacodinâmica está relacionada com a integridade estrutural e/ou funcional do produto enquanto que, a farmacocinética está relacionada com a biodistribuição, longevidade e possível degradação do PET e dos seus constituintes. A descrição da persistência e sobrevivência das células e/ou tecidos é possível através dos estudos de longevidade (EMA/CAT/573420/2009) (68).

Relativamente aos estudos de farmacodinâmica, estes devem permitir estabelecer qual o tempo necessário para atingir e manter os parâmetros fisiológicos predefinidos. Deste modo, devem ser definidos previamente um conjunto de parâmetros fisiológicos estruturais e funcionais do tecido/órgão alvo do indivíduo ou de uma população compatível

com o recetor. Para ser possível retirar as conclusões necessárias sobre o estudo, deve haver um número de participantes considerado suficiente (EMA/CAT/573420/2009) (68,69).

No caso dos produtos combinados, os estudos devem referir a combinação de componentes celulares e não celulares (por exemplo, polímeros sintéticos, colagénio, matrizes de tecido acelulares) (EMA/CAT/573420/2009) (68).

Dependendo do efeito terapêutico pretendido do PET, os estudos farmacocinéticos devem refletir a persistência e biodistribuição das células funcionais e/ou outros constituintes do produto, sendo expectável que as questões relacionadas com a biodistribuição sejam avaliadas nos estudos pré-clínicos (EMA/CAT/573420/2009) (68,69).

A informação obtida durante os estudos pré-clínicos destes produtos pode ser limitada, pois o ambiente influencia de forma distinta o modelo animal e o humano. As células do PET podem reagir ao novo ambiente e alterar o seu fenótipo ou padrão de migração, ou até mesmo outras características. Deste modo é possível observarem-se diferenças significativas na eficácia e toxicidade de um determinado PET quando testado em duas espécies diferentes, por exemplo entre roedores e humanos. Sendo por vezes necessário recorrer a imagens estruturais/ histológicas para avaliar a organização do tecido/órgão artificial implantado, sobretudo quando parte do produto é integrado e/ou degradável (EMA/CAT/573420/2009) (68,70).

Para a avaliação da biodistribuição podem ser utilizados marcadores celulares, radioisótopos ou corantes luminescentes nas amostras *ex vivo* ou *in vitro*, apesar da sensibilidade destas abordagens poder ser limitada. Imagens estruturais/histológicas podem ser necessárias para avaliar a organização geral do tecido/órgão artificial implantado dentro do hospedeiro e as suas modificações, especialmente quando parte do produto é degradável (EMA/CAT/573420/2009) (68).

A dose a ser administrada é definida tendo em conta as características da lesão do tecido a ser regenerado, reparado e/ou substituído, no entanto a limitação da quantidade de células/tecidos disponíveis no PET pode levar ao uso de doses variáveis (EMA/CAT/573420/2009) (68).

Na substituição, regeneração e/ou reparação de um tecido danificado pode ser necessária uma resposta rápida e/ou prolongada, podendo persistir durante a vida toda do doente tratado com o PET. No momento da AIM, o tempo proposto e a duração da eficácia necessitam de ser suportadas pelo plano de desenvolvimento clínico. Para além disso,

podem ser necessárias investigações adicionais após a comercialização para acompanhar a duração da eficácia. Em 2019, esta classe de ATMPs representava menos de 5% de todos os ATMPs em ensaios clínicos (EMA/CAT/573420/2009) (68,71).

Dos vinte e cinco ATMPs que receberam AIM na UE, quatro são MTC e quatro são PET (Tabela 5.1). Atualmente continuam no mercado, 2 PET, 2 MTC e 14 MTG.

Em 2009, o primeiro PET a ser aprovado foi o ChondroCelect[®], um produto à base de condrócitos autólogos, para implantação no tratamento de defeitos condrais focais (71,72). Tal como o ChondroCelect[®], o MACI[®] (Vericel), é PET à base de condrócitos autólogos, de terceira geração, indicado na reparação de defeitos condrais focais do joelho (71,73). Estes dois medicamentos já não se encontram disponíveis no mercado. Atualmente, os PET disponíveis no mercado da UE são o Holoclar[®] e o Spherox[®].

Tabela 5.1- Medicamentos à base de células e produtos de engenharia de tecidos atualmente aprovados pela EMA (2009 – abril 2023).

Nome	Tipo de ATMP	Composição	Indicação terapêutica	Data de autorização	Observações
ChondroCelect ^{® (a)}	PET	Células autólogas de cartilagem, viáveis e caracterizadas, expandidas <i>ex vivo</i> (74).	Deficiência na cartilagem do côndilo femoral (extremidade inferior do osso da coxa) que origina os sintomas (74).	10/2009 (31)	^(a) AIM removida em julho de 2016 (31)
MACI ^{® (b)}	PET	Células autólogas de cartilagem (75).	Reparar defeitos na cartilagem nas extremidades dos ossos da articulação do joelho (75).	06/2013 (31)	^(b) AIM não renovada (AIM terminou em junho de 2018) (31)
Provenge ^{® (c)}	MTC	Células mononucleares autólogas de sangue periférico ativadas com fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos ligado à fosfatase ácida prostática (PAP-GM-CSF) (76).	Câncer da próstata metastizado resistente à castração, assintomático ou minimamente sintomático (76).	09/2013 (31)	^(c) AIM removida em maio de 2015 (31)
Holoclar [®]	PET	Células autólogas epiteliais contendo células estaminais do limbo (na extremidade da córnea), expandidas <i>ex vivo</i> /em laboratório (77).	Deficiência moderada a grave das células estaminais límbicas devido a queimaduras (incluindo queimaduras químicas) (77).	02/2015 (31)	
Zalmoxis ^{® (d)}	MTC	Células T alogénicas geneticamente modificadas com um vetor retroviral que codifica uma forma truncada do recetor de baixa afinidade para fator de crescimento de nervo humano (ΔLNGFR) e a timidina cinase do vírus herpes simplex I (HSV-TK Mut2)(78).	Tratamento adjuvante do transplante de células estaminais hematopoiéticas de doentes adultos com doença oncológica hematológica de alto risco (78).	08/2016 (31)	^(d) AIM removida em outubro de 2019 (31)
Spherox [®]	PET	Contém esferoides (agregados esféricos) de condrócitos, células presentes na cartilagem saudável, que foram criados a partir dos tecidos do próprio doente (79).	Reparar defeitos da cartilagem do joelho em adultos que apresentam sintomas (dor, problemas de mobilidade) (79).	07/2017 (31)	
Alofisel [®]	MTC	Constituído por células estaminais adultas mesenquimatosas alogénicas humanas expandidas extraídas de tecido adiposo (80).	Tratamento de fistulas perianais complexas em doentes adultos com doença de Crohn luminal não ativa/ ligeiramente, ativa (80).	03/2018 (31)	
Ebvallo [®]	MTC	As células T são obtidas de um dador, e posteriormente misturadas com as células B (infetadas com o vírus Epstein-Barr) do mesmo dador, de modo que as células T aprendam a reconhecer as células B infetadas como estranhas (81).	Tratamento de adultos e crianças (> 2 anos) que, após um transplante de órgão ou de medula óssea, desenvolvem doença linfoproliferativa pós-transplante positiva para o vírus Epstein-Barr (81).	12/2022 (31)	

5.2. Medicamentos de terapia génica

5.2.1. Considerações gerais sobre medicamentos de terapia génica

Os MTG são constituídos por um vetor ou formulação/sistema de entrega que contém uma sequência terapêutica (por exemplo um gene) que permite regular, reparar, substituir, adicionar ou eliminar uma sequência genética. A substância ativa pode ser composta por sequência(s) de ácidos nucleicos, microrganismos geneticamente modificados, vírus ou células, ou por múltiplos elementos. Os vetores utilizados nestes medicamentos podem ser utilizados para atingir células/ tecidos específicos ou para assegurar a segurança do MTG através da eliminação de genes associados à virulência, patogenicidade, imunotoxicidade ou replicação (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Os MTG que são baseados em células enquadram-se em 3 grupos: vetores virais, vetores de DNA (por exemplo, plasmídeos de DNA e vetores baseados em cromossomas) e vetores bacterianos (por exemplo *Lactococcus* sp, *Listeria* sp e *Streptococcus* sp modificados). Os sistemas de vetores mais utilizados nos MTG são os vetores virais e os plasmídeos de DNA (Figura 5.3). Os plasmídeos de DNA podem ser administrados na forma de *naked* DNA (numa solução salina simples) ou complexados numa formulação de entrega. Também estão disponíveis vetores não virais e métodos físicos para a entrega das sequências terapêuticas (EMA/CAT/80183/2014) (82,83).

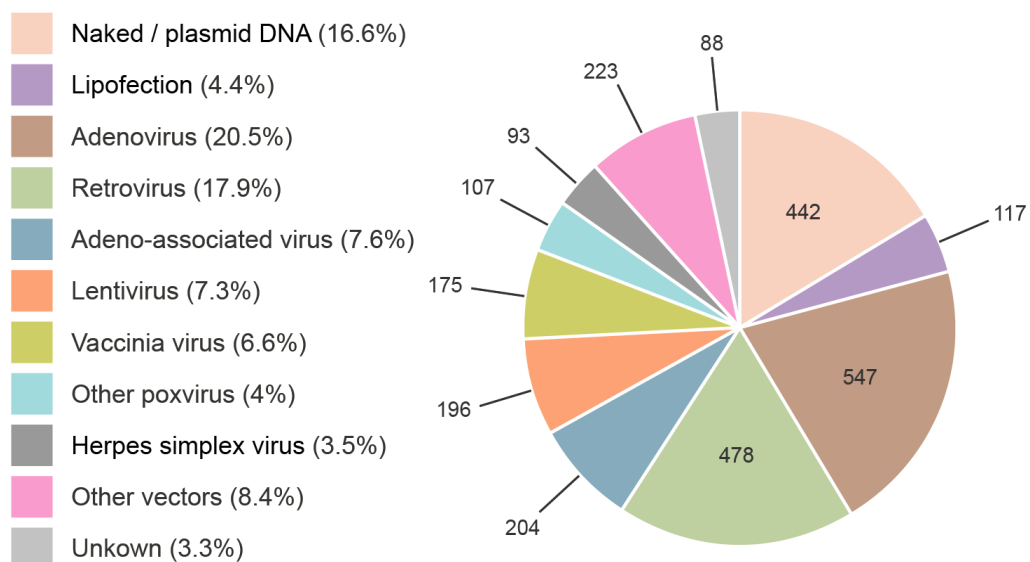


Figura 5.3 – Vetores utilizados nos MTG, até 2017, retirado de (84). Os vetores de DNA e os plasmídeos de DNA representam os vetores mais utilizados nos ensaios clínicos.

Existem várias ferramentas de terapia génica que permitem a edição do genoma, permitindo gerar células geneticamente modificadas com inúmeras vantagens terapêuticas. Ao longo dos últimos anos verificou-se uma expansão na diversidade destas ferramentas, convergindo em técnicas que permitem uma edição mais direcionada. Estas ferramentas incluem por exemplo, o sistema CRISPR/Cas e nucleases *Zinc finger* (ZFNs, do inglês *Zinc finger nucleases*). Cada nuclease de edição do genoma tem propriedades únicas que devem ser tidas em consideração no momento da seleção, tais como interrupção de genes, regulação transcricional/ epigenética da expressão génica (EMA/CAT/80183/2014) (82).

A descoberta do mecanismo do microRNA (miRNA) levou a um enorme desenvolvimento dos ensaios pré-clínicos de terapia génica. Este mecanismo compreende a transcrição do miRNA em pri-miRNA ou diretamente em pre-miRNA no núcleo. De seguida, o pre-miRNA é exportado para o citoplasma onde é clivado, originando miRNA maduro. No citoplasma o miRNA maduro combina-se com o complexo RISC, e posteriormente o complexo RISC/ miRNA combina-se com o mRNA alvo. Se a complementaridade entre o miRNA e o mRNA alvo for incompleta, há repressão da tradução, no entanto se a complementaridade for completa, o mRNA é degradado (Figura 5.4) (85,86). O facto de se poder direccionar mRNAs específicos e consequentemente controlar tradução da proteína e a expressão do gene, é uma grande vantagem face aos medicamentos convencionais que visam proteínas (por exemplo, enzimas e receptores). Na área da terapia génica, os miRNAs podem futuramente ter um grande impacto na cura de doenças genéticas de carácter dominante, através da redução da expressão do gene e da proteína mutante (85).

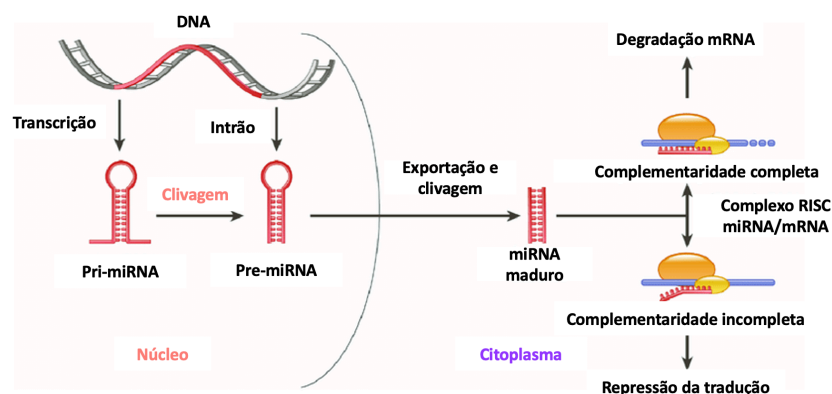


Figura 5.4 - Mecanismo do miRNA, adaptado de (85). O miRNA é transcrito em pri-miRNA ou diretamente em pre-miRNA no núcleo. O pre-miRNA é exportado para o citoplasma onde é clivado, originando miRNA maduro. No citoplasma o miRNA maduro combina-se com o complexo RISC, formando o complexo RISC/miRNA. Se a complementaridade entre o miRNA e o mRNA alvo for incompleta, há repressão da tradução. No caso de a complementaridade ser completa, o mRNA é degradado.

O sistema CRISPR/Cas9 compreende dois componentes, a cadeia simples de RNA guia (sgRNA) e a endonuclease Cas9 (Figura 5.5). O sgRNA é desenhado de modo a ser complementar ao DNA alvo de maneira específica e a montante deve conter uma sequência de DNA curta, essencial para a compatibilidade com a proteína Cas9 utilizada, denominada de motivo adjacente protoespaçador (PAM, do inglês *protospacer adjacent motif*). O sgRNA liga-se à sequência alvo e cliva o DNA de modo a gerar quebra da cadeia dupla (DSBs, do inglês *double-stranded breaks*). Após a quebra, os mecanismos de reparação do DNA, iniciam a reparação do genoma. Por outro lado, as nucleases ZFNs (Figura 5.5) são proteínas quiméricas, constituídas por dois domínios: o motivo de reconhecimento do DNA, constituído por uma sequência tandem, e o domínio de clivagem do DNA formado por uma enzima de restrição, geralmente FokI (87,88).

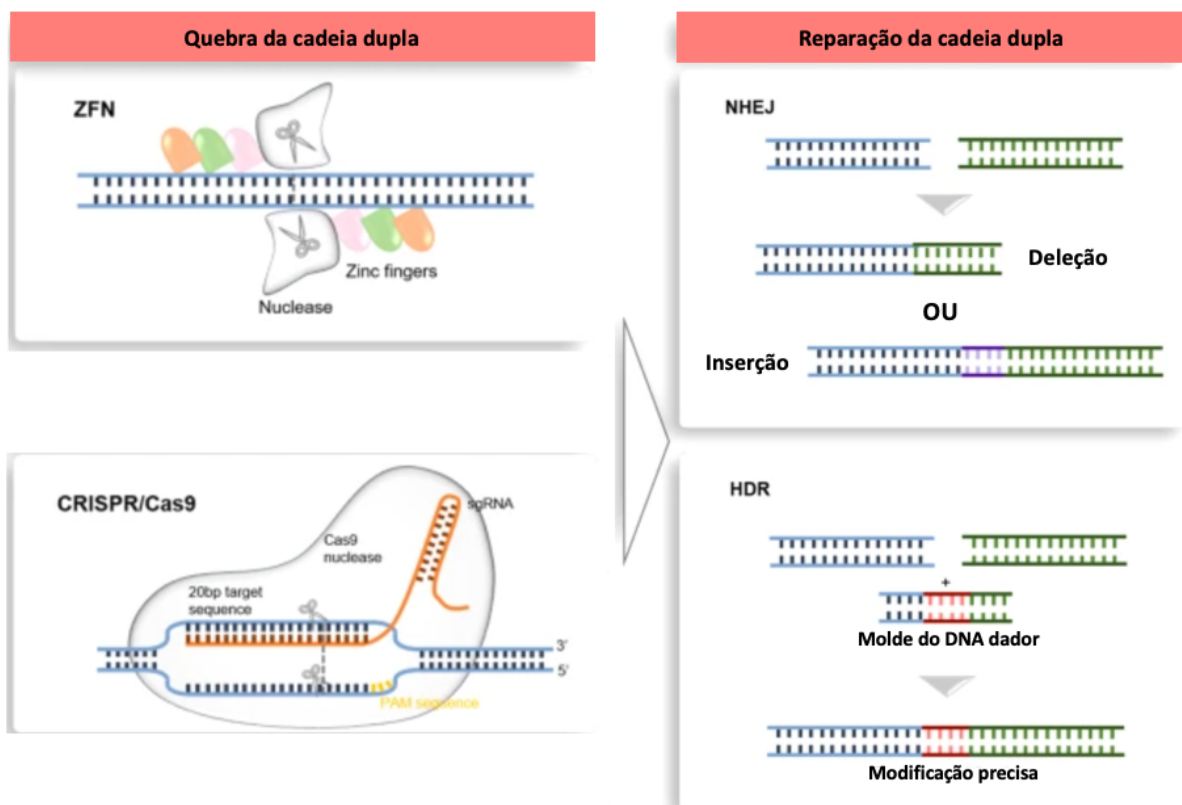


Figura 5.5 – Ferramentas de edição genética, adaptado de (87). As nucleases de edição genética como as nucleases *Zinc-finger* (ZFNs) e **CRISPR/Cas9**, induzem quebra da cadeia dupla (DSBs, do inglês *double-stranded breaks*) de DNA em locais alvo. As DSBs podem ser reparadas através de mecanismos de reparação do DNA, como o mecanismo de reparação através de junção da extremidade não-homóloga (NHEJ, do inglês *Non-Homologous End Joining*) que identifica as duas extremidades quebradas do DNA e “cola” as sequências, levando à formação de inserções ou deleções (indels). Por outro lado, o mecanismo de reparação direta por homologia (HDR, do inglês *Homology-directed repair*) utiliza a homologia de uma sequência de DNA doadora para reparar os danos da DSB no local correto.

Nos MTG, a escolha do vetor vai depender de vários fatores, nomeadamente da indicação clínica, mecanismo de ação, via e frequência de administração do tratamento. Para além disso, deve considerar-se a seletividade e eficiência da transdução/ transfeção do vetor nas células-alvo, e a expressão e atividade funcional da(s) sequência(s) terapêuticas (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Quando são utilizados vetores virais ou bacterianos existem considerações adicionais a ponderar. Deve ser avaliada a patogenicidade e virulência do vetor, tanto em humanos como em outras espécies animais, podendo ser necessário eliminar características relacionadas com a virulência do vetor minimizando os componentes não essenciais do vetor. Por exemplo, podem ser utilizadas linhas celulares de produção e empacotamento de modo a minimizar a homologia de sequências com o vetor, reduzindo a geração de novos agentes infecciosos ou vírus com replicação competente. Deve-se ainda considerar o tropismo do vetor tendo em contas as células/tecidos alvo, assim como a replicação tecidual específica, transmissão na linha germinativa, presença e persistência das sequências virais importantes para o tratamento de vírus *wild-type* e a eficiência de transdução nas células-alvo. Deve ainda ser considerada a possibilidade de integração do vetor no genoma das células do hospedeiro, uma vez que existe o risco de mutagénese por inserção e consequentemente de oncogénese (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Os vetores de integração são os vetores de eleição quando se pretende tratar uma doença que requer uma expressão génica a longo prazo. Estes vetores integram permanentemente o genoma nas células do hospedeiro, e cada vez que as células se replicam, as sequências integradas são transmitidas às células-filhas. Apesar dos vetores de integração apresentarem uma maior probabilidade de mutagénese por inserção, a grande maioria é clinicamente silenciosa (EMA/CAT/190186/2012) (89).

Quando são utilizados vetores retrovirais, a integração que ocorre no genoma das células é semi-aleatória, no entanto na população de células transduzidas (onde ocorre inserção), por motivos de segurança, a integração perto de proto-oncogenes deve ser rara. Contudo, aparentemente, a desregulação de genes celulares devido às inserções por vetores, em regra, não induz alterações no programa celular de modo a favorecerem processos cancerígenos. Para além disso, as células apresentam mecanismos intrínsecos (por exemplo, apoptose) que reduzem o risco de oncogénese por inserção (EMA/CAT/190186/2012) (89).

As estratégias de substituição/correção de genes direcionadas para locais específicos do genoma demonstram alguma atividade *off-target*, no entanto o risco de oncogênese por inserção é muito mais reduzido comparativamente com os vetores de integração (EMA/CAT/190186/2012) (89).

De acordo com o *Reflection paper on management of clinical risks deriving from insertional mutagenesis* (EMA/CAT/190186/2012), a necessidade e extensão dos estudos de integração nos doentes depende do tipo de vetor utilizado e dos resultados obtidos durante os estudos pré-clínicos/clínicos. No desenvolvimento de novos vetores, nos estudos iniciais de viabilidade o perfil de inserção pode fornecer informações para compreender melhor a biologia do vetor e melhorar o seu perfil de segurança. Nos testes pré-clínicos os estudos de inserção podem ser realizados *ex vivo* e *in vivo* nos tecidos/órgãos alvo. Caso sejam identificados alguns problemas de segurança no estudos pré-clínicos pode ser necessário realizar estudos de integração na fase clínica, de modo a monitorizar a segurança dos doentes e avaliar potenciais efeitos adversos (EMA/CAT/190186/2012) (89).

Deve ser realizada uma avaliação global de fatores que possam favorecer a transição de um evento mutagénico para oncogénico, como o perfil de inserção do vetor, a presença de elementos que favorecem a ativação ou inativação da inserção, a biologia do transgene e a célula/tecido alvo específico (EMA/CAT/190186/2012) (89).

Nos MTG, todos os elementos genéticos devem ser descritos e justificados para a sua inclusão no medicamento, inclusive aqueles destinados à terapia, entrega, segurança, controlo e produção (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Durante o desenvolvimento e produção dos MTG, devem ser fornecidas informações sobre o controlo e estabilidade do vetor e sequência(s) terapêutica(s). Os sistemas de replicação devem garantir a integridade e homogeneidade dos ácidos nucleicos a expressar nas células, também é necessário demonstrar que a sequência correta de ácidos nucleicos é entregue e que esta é mantida de forma estável, garantido que a sequência terapêutica se mantém inalterada durante o período de tempo em que o vetor é desenhado para atuar. As células utilizadas para produção do vetor e/ou do material genético devem também ser completamente caracterizadas (por exemplo, identificação, proveniência, número de passagens e o potenciais contaminantes virais e micoplasma). Devem ser realizados estudos apropriados de validação do processo que permitam demonstrar a estabilidade genética durante a produção (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Os vetores devem ser produzidos a partir de bactérias ou vírus *seeds* e/ou bancos de células bem caracterizados. É crucial realizar um controlo do risco de contaminação adequado de modo a garantir a segurança microbiológica do produto (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Deve ser realizado um processo de purificação que permita reduzir ou eliminar impurezas para níveis aceitáveis. De modo a minimizar ou eliminar possíveis contaminações no MTG final devem ser tomadas medidas na produção. A utilização de etapas de purificação é incentivada para todos os vetores de terapia génica, no entanto quando estas etapas não são realizadas para reduzir as impurezas relacionadas com o produto e com o processo devem ser justificadas tendo em conta considerações técnicas, qualidade do produto, segurança clínica e eficácia (EMA/CAT/80183/2014) (82).

A adição de excipientes durante a preparação do vetor final ou produto final, deve demonstrar não afetar a eficácia e segurança do vetor nas concentrações utilizadas (EMA/CAT/80183/2014) (82).

De modo a assegurar níveis aceitáveis de consistência das condições de produção e do produto esperado, devem ser implementados parâmetros de processo e procedimentos de controlo. Todo o processo de produção deve ser desenhado com o intuito de minimizar o risco de contaminação microbiológica (EMA/CAT/80183/2014) (82).

No caso dos vetores virais, deve ser determinada a relação partícula/ infecciosidade e os títulos mínimos aceitáveis. Quando são utilizados vetores virais que apresentam replicação deficiente é necessário realizar testes que permitam identificar vírus competentes (EMA/CAT/80183/2014) (82).

5.2.1.1 Desenvolvimento pré-clínico de produtos de terapia génica

Em 2008, a *Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products* (EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006) foi publicada de modo a orientar os requerentes durante o desenvolvimento de um MTG nos estudos pré-clínicos, facilitando assim a harmonização do desenvolvimento destes produtos na UE (90).

O objetivo dos estudos pré-clínicos durante o desenvolvimento de um MTG é fornecer as informações necessárias para uma avaliação adequada do benefício/risco destes produtos em humanos (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Os estudos pré-clínicos realizados dependem do tipo de MTG ou vetor utilizado, ou seja, vão depender se são utilizados plasmídeos, vetores virais, vetores não virais ou células somáticas geneticamente modificadas (EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006) (90).

As considerações que são aplicadas aos **plasmídeos** e ao **naked DNA** (ou seja, DNA que não está associado a proteínas, lipídios ou outras moléculas) são as mesmas. Os estudos de integração podem ser solicitados dependendo do uso clínico a que se destinam e do método de administração utilizado. Para além disto, estes estudos são recomendados caso estas moléculas sejam utilizadas *in vivo* para crianças e no caso de doenças que não sejam fatais. Devem ser também realizados estudos de transmissão e integração na linha germinativa, quando os plasmídeos são desenhados para terem capacidade de integração. É desencorajado o uso de genes de resistência a antibióticos como marcadores de seleção, no entanto caso sejam utilizados devem ser realizados estudos da expressão do gene em células somáticas humanas, antes dos primeiros estudos clínicos. Para além disso, quando são utilizadas sequências adjuvantes ou substâncias adjuvantes adicionais na formulação final, devem ser realizados estudos que permitam avaliar a segurança imunotoxicológica do produto (EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006) (90).

Os **vetores virais** consistem em vírus geneticamente modificados ou vetores virais que foram desenhados de modo a serem incapazes de se replicarem, ou replicarem-se completamente ou replicarem-se apenas em condições específicas (replicação condicional). No caso dos vetores virais que são incapazes de se replicarem (vírus com replicação incompetente) deve ser investigada a possibilidade de replicação após combinação com um vírus *wild-type*. No caso dos vetores com capacidade replicativa completa (RCV, do inglês *replication competente vírus*) ou replicação condicional, deve ser avaliado qual o comportamento destes vetores em diferentes tipos de tecidos e células, a influência de possível medicação concomitante, sendo que estes estudos podem ser dificultados pela especificidade do vetor-hospedeiro. Devem ser realizados estudos de integração, transmissão na

linha germinativa e carcinogénese, no caso do vetor apresentar capacidade de integração. Para além disso, se o vetor partir de um vírus que apresenta capacidade de latência ou se o vetor desenhado apresentar essa capacidade, deve-se investigar se a latência é restrita a tecidos específicos e se o vetor tem capacidade de reativação. Se o vetor viral provocar uma resposta imunitária significativa pode ser difícil de re-administrar, e por isso, deve ser avaliado o impacto da resposta imune. Deve ser tida em consideração a virulência da estirpe original do vírus assim como a capacidade de ocorrerem eventos de recombinação que possam restaurar inadvertidamente a virulência (EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006) (84,90).

Quando se pretende utilizar vetores RCV devem ser tidas algumas considerações quanto à sua aceitabilidade num MTG, tais como a) se para a eficácia do medicamento a competência de replicação é necessária; b) se o vetor não contém nenhum elemento que possa induzir oncogenicidade/ tumorigenicidade em humanos; c) Se o RCV partir de um patógeno conhecido, a infecciosidade, virulência e patogenicidade deve ser determinada após as manipulações genéticas pretendidas e deve ser justificada a segurança da sua utilização, e por fim d) qual a especificidade tecidual da replicação do RCV. Deve também ser gerada informação acerca da transdução/ expressão seletiva do gene inserido ou de um gene repórter apropriado no local desejado quando os vetores virais são escolhidos com base no tropismo do órgão/tecido (EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006) (90).

Existem vários tipos de **vetores não-virais**, nomeadamente polímeros, lípidos, partículas inorgânicas e até mesmo combinações destes materiais. Este tipo de vetores atrai cada vez mais os investigadores devido à sua baixa citotoxicidade, imunogenicidade e mutagénese. Contudo, apresentam alguns desafios a nível de eficácia de transferência génica, especificidade e duração da expressão génica (91,92).

A polietilenoimina (PEI, do inglês *Polyethylenimine*) é um dos polímeros mais utilizados como veículo na terapia génica. A organização dos seus grupos amina conferem-lhe elevada densidade de carga catiónica, o que lhe permite ter elevada afinidade com as cargas negativas dos ácidos nucleicos, formando um poliplexo. Apresenta também boa eficiência de transfeção devido às cargas catiónicas que permitem condensar o material genético. Para além disso, as cargas catiónicas da PEI geram um efeito osmótico (“efeito protão esponja”), provocando rotura dos

endossomas e conseqüentemente aumento da eficiência de transfeção. Apesar dos vetores não-virais representarem uma percentagem reduzida nos ensaios clínicos de terapia génica, a PEI é cada vez mais utilizada nos tratamentos oncológicos e imunoterapia (91,92).

Algumas das vacinas desenvolvidas recentemente para a Doença do Coronavírus 2019 (COVID-19) utilizam vetores não-virais (Figura 5.6), como é o caso das vacinas de DNA e vacinas de RNA. As vacinas de DNA são constituídas por um plasmídeo de DNA muito estável e que pode ser facilmente propagado em larga escala em bactérias. Normalmente o DNA do plasmídeo inclui promotores de expressão de mamíferos e o gene que codifica a proteína de interesse (antígeno). Como é uma vacina de DNA, necessita de alcançar o núcleo das células, onde o DNA é transcrito em RNA mensageiro (mRNA, do inglês *messenger* RNA). O mRNA sai do núcleo e posteriormente ocorre tradução da proteína de interesse no citoplasma. A primeira vacina com DNA plasmídeo para a COVID-19 foi a ZyCoV-D™ (93,94).

Por outro lado, as vacinas de RNA (mRNA) aparentam ser alternativas muito promissoras às vacinas convencionais (vacinas inativas ou vivas atenuadas) pois apresentam elevada potência, custo-efetividade, desenvolvimento rápido e entrega segura. Estas vacinas normalmente utilizam como vetor as nanopartículas lipídicas para a entrega do mRNA, protegendo-o da degradação enzimática e facilitando a endocitose. Apesar de funcionarem de forma semelhante, as vacinas de RNA são mais potentes e para além disso, aparentam ser mais efetivas e mais seguras do que as vacinas de DNA, uma vez que as vacinas de RNA não necessitam de entrar no núcleo das células. Atualmente, existem duas vacinas de mRNA aprovadas em vários países para prevenir a COVID-19, a Comirnaty™ (Pfizer/BioNTech) e Spikevax™ (Moderna) (93–95).

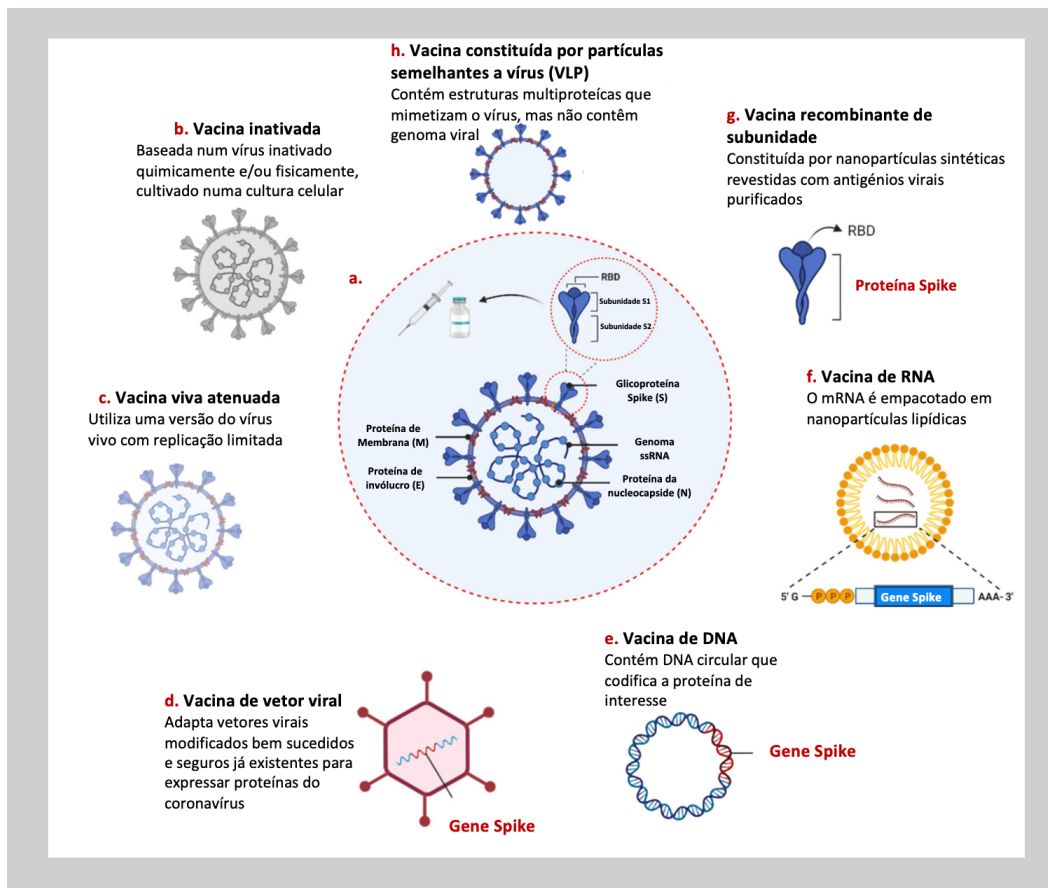


Figura 5.6 - Resumo dos tipos de vacinas da Doença do Coronavírus 2019 (COVID-19), adaptado de (93). (a) Esquema da estrutura do vírus SARS-CoV-2, incluindo o genoma de RNA de cadeia simples (ssRNA, do inglês *single-stranded RNA*) e as quatro proteínas estruturais: proteína Spike (S), proteína de envoltório (E), proteína de membrana (M) e proteína da nucleocapside (N). Os diferentes tipos de vacina incluem a (b) vacina inativada, (c) vacina viva atenuada (d) vacina de vetor viral (e) Vacina de DNA (f) Vacina de RNA (g) Vacina recombinante de subunidade (h) Vacina constituída por partículas semelhantes a vírus (VLP, do inglês *Virus-like particles*). mRNA: messenger RNA, RBD: receptor-binding domain.

As **células somáticas modificadas geneticamente** devem ser sujeitas a testes *in vitro* e/ou *in vivo* de modo a avaliar alterações na sua morfologia, fenótipo, função e comportamento (por exemplo, diferenciação indesejada, imortalização ou indução de um fenótipo inadequado), sendo que qualquer alteração não planeada deve ser cuidadosamente avaliada. A possibilidade de as células libertarem o vetor ou o plasmídeo *in vivo*, intencionalmente ou não, deve ser investigada, incluindo o potencial de interação com outros agentes infecciosos ou medicamentos. Quando as células com potencial replicativo são transduzidas com vetores de integração, as regiões de integração devem ser caracterizadas quanto à identidade dos genes adjacentes e das suas funções, principalmente quando pode ocorrer ativação de oncogenes e/ou inativação de genes supressores de tumor. Os estudos devem

permitir demonstrar a distribuição, tráfego, localização e persistência das células *in vivo* e dos produtos génicos. Deve ser demonstrado o efeito terapêutico das células e/ou genes transduzidos assim como, a limitação ao órgão/tecido pretendido. Se não for intenção da modificação genética, devem ser fornecidas evidências de que as células transduzidas não provocam uma resposta imunitária indesejada. Quando as células são encapsuladas com materiais biocompatíveis, os dados devem comprovar a compatibilidade das células com o tecido no local do transplante. Para além disso, deve ser avaliada a estabilidade do material de encapsulamento quanto à sua degradação e libertação das células (EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006) (90).

A natureza e extensão do desenvolvimento pré-clínico depende da natureza do MTG e disponibilidade de modelos relevantes, uso clínico, via de administração e do regime de tratamento. Os estudos pré-clínicos devem ser realizados em modelos animais relevantes, sendo a escolha justificada pelo requerente. Os modelos animais escolhidos devem permitir a avaliação dos efeitos farmacológicos esperados nos seres humanos. No entanto, quando não existem modelos animais de doença relevantes *in vivo*, devem ser realizados estudos *in vitro* utilizando sistemas que refletem a doença ou tentar desenvolver um modelo adequado (EMA/CAT/80183/2014), (EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006) (82,90).

Durante a escolha do modelo animal existem várias considerações a ter em conta, tais como (EMA/CAT/80183/2014) (82):

- Capacidade do vetor para transfetar/ transduzir/ infetar e replicar no modelo animal escolhido. Quando é utilizado um vetor viral com replicação deficiente o animal deve ser sensível à infeção viral. Quando um MTG é baseado num vírus com replicação competente deve-se considerar a capacidade de replicação na escolha do modelo animal. Quando são utilizados vírus oncolíticos pode ser importante avaliar os efeitos da replicação viral em células tumorais nos estudos pré-clínicos;
- Expressão e distribuição tecidual de recetores para um vírus/bactéria no modelo animal que pode afetar a eficiência, uma vez que pode haver sequestração celular e tecidual do vetor. Quando ocorre

tropismo tecidual, intencional ou não, deve-se comparar este tropismo no modelo animal e no humano;

- Atividade dos elementos reguladores e do seu controlo para conduzir a expressão específica do tecido e o nível de expressão do transgene/gene terapêutico;
- Resposta biológica ao gene expresso e/ou ácido nucleico entregue, incluindo a sua expressão alvo, distribuição, ligação e ocupação, consequências funcionais, sinalização celular e regulação do(s) gene(s) associado(s);
- Tanto no modelo animal como no humano deve-se considerar a sua resposta imune e imunidade pré-existente. O estado imunitário do animal deve mimetizar o mais próximo possível a situação do doente;
- Presença de genes animais/ produtos génicos homólogos ao gene terapêutico/ produto transgénico;
- Os modelos animais transgénicos são utilizados para várias patologias humanas;
- Se necessário, metabolismo e outros aspetos farmacocinéticos. Pode ser necessário utilizar animais de grandes dimensões ou modelos de doença, para mimetizar as condições clínicas específicas ou biodistribuição do MTG, dependendo dos produtos, via de administração e sistema de entrega;
- Características biológicas dos componentes do produto na espécie utilizada, em relação à dose administrada e volume que pode ser administrado com segurança aos animais do teste;
- Distribuição do vetor no organismo do modelo animal e a possibilidade de recombinação do MTG (ou partes do MTG) com vírus endógenos do hospedeiro.

Dependendo do tipo de MTG, pode ser necessário um ou vários modelos animais. Estes modelos podem incluir animais *wild-type*, imunocomprometidos, *knock-out*, *knock-in*, humanizados ou transgénicos (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Pequenos animais roedores podem ser modelos relevantes, no entanto o seu tamanho e tempo de vida reduzido podem conferir limitações aos estudos. Para além disso, o número de animais por dose testada influencia diretamente a capacidade de deteção de toxicidade, uma vez que uma amostra reduzida pode conduzir à ausência de observação de determinados efeitos tóxicos devido à baixa frequência, independentemente da gravidade. Estas limitações relacionadas com o tamanho da amostra, podem ser parcialmente compensadas através do aumento da frequência e duração da monitorização (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Nos estudos pré-clínicos deve ser possível compreender o mecanismo de ação, ou seja, devem ser realizados estudos farmacodinâmicos de PoC em modelos animais adequados que permitam demonstrar que o gene/ácido nucleico atinge o alvo pretendido e exerce a função pretendida (nível de expressão e atividade funcional) (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Quando se pretende que o MTG apresente seletividade ou seja restrito ao alvo, devem ser realizados estudos que confirmem esta especificidade nas células e tecidos alvo. De modo a demonstrar o efeito terapêutico e avaliar o nível de expressão génica e atividade funcional, devem ser selecionados e testados marcadores relevantes para a doença e segurança (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Quando é expectável que ocorra integração no genoma do hospedeiro, os requerentes são incentivados a desenvolver análises *ex vivo* da distribuição genómica dos vetores de integração acerca da influência do hospedeiro no vetor, tendo em conta a genética da célula-alvo e estado epigenético durante o desenvolvimento inicial, uma vez que a epigenética pode interferir na eficácia e segurança do MTG final (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Podem ser necessários estudos de integração mesmo quando não seja expectável que o MTG tenha capacidade de integração, de modo a confirmar a ausência de integração. Assim, os estudos realizados *in vivo* e/ou *in vitro* devem permitir detetar a integração do vetor, e caso ocorra integração deve ser realizada uma avaliação e delineadas medidas que permitam controlar os possíveis riscos associados à integração (EMA/CHMP/GTWP/125459/2006) (90).

Quando são utilizados testes de amplificação de ácidos nucleicos (NAAT, do inglês *nucleic acid amplification testing*) para quantificar o número de cópias de

vetores de integração, os limites de detecção e quantificação devem preferencialmente ser expressos em número de cópias do vetor/genoma, enquanto para os vetores episomais deve ser expresso em número de cópias/ μ g de DNA da célula hospedeira analisado. A especificidade destes métodos depende da escolha e *design* dos *primers* e sondas, assim como das condições das reações e método de detecção. Os ensaios NAAT apresentam elevada sensibilidade e por isso, são muito sujeitos a contaminações cruzadas e falsos positivos. De modo a minimizar estas situações, devem ser utilizados controlos positivos e negativos (EMA/CAT/80183/2014) (82).

A detecção do DNA do vetor ou do transgene no interior das células/tecidos também pode ser realizada através da amplificação de ácidos nucleico *in-situ* e técnicas de hibridização (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Os estudos de segurança devem ser considerados caso a caso, dependendo da via de administração, do conhecimento pré-existente da classe e distribuição do vetor e do mecanismo de ação do produto. Normalmente, estes estudos são combinados com os estudos de toxicidade e biodistribuição (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Os estudos farmacocinéticos neste tipo de medicamentos, centram-se essencialmente na distribuição, persistência e *clearance* e devem contemplar o risco de transmissão germinativa. Devem ser utilizados apenas métodos validados, como os ensaios NAAT, que permitem a detecção do vetor e/ou gene administrado, distribuição e persistência do MTG, e devem incluir todos os órgãos e tecidos relevantes (EMA/CAT/80183/2014), (EMA/CHMP/ICH/318372/2021) (82,96) .

Os estudos de biodistribuição devem permitir obter dados não apenas sobre os órgãos alvo, mas também de órgãos onde seja provável ocorrer acumulação, por exemplo o fígado e pulmão na administração intravenosa. Estes dados devem incluir a duração da expressão e atividade do gene, e períodos temporais para os quais não há detecção de sinal (se aplicável). A via de administração e regime de tratamento (frequência e duração) devem ser representativos da utilização clínica. A dosagem deve mimetizar o uso clínico com margens de segurança apropriadas (EMA/CAT/80183/2014),(EMA/CHMP/GTWP/125459/2006),(EMA/CHMP/ICH/318372/2021) (82,90,96).

Os pontos temporais e a frequência de amostragem devem ser escolhidos de modo a permitir a determinação do nível máximo de MTG administrado presente nos locais alvo e não alvo, assim como a clearance ao longo do tempo. O estudo deve continuar até não haver detecção de sinal ou até que se atinja uma fase plateau a longo prazo (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Se um ácido nucleico for detetado num tecido/órgão que não é suposto utilizando um teste NAAT, deve ser determinada a expressão do produto génico, a sua duração e nível de expressão, utilizando ensaios imunológicos, ensaios que permitam detetar a proteína funcional e/ou reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) com transcriptase reversa (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Se o vetor viral apresentar replicação competente e forem detetadas sequências virais em locais não-alvo através de técnicas NAAT, devem realizar-se ensaios quantitativos de infecciosidade para avaliar o potencial infeccioso do ácido nucleico detetado (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Os estudos de biodistribuição devem ser realizados de modo a avaliar uma segunda virémia resultante da replicação do vetor/ vírus *in vivo*. Caso o modelo animal utilizado não suporte a replicação *in vivo*, a replicação pode ser mimetizada pela administração repetida do MTG (EMA/CAT/80183/2014) (82).

A utilização *in vivo* de *naked* DNA, vírus geneticamente modificados, vetores virais ou não virais pode estar associado a um risco de transmissão germinativa. Deste modo, os estudos pré-clínicos para avaliar a transmissão germinativa são obrigatórios para produtos de terapia génica não celulares no estadió de autorização de comercialização (EMEA/273974/2005) (97).

Antes do pedido de AIM, devem ser realizados estudos com o vetor de interesse, utilizando no mínimo duas doses, em pelos menos duas espécies, sendo que uma delas deve ser uma espécie de não-roedor. O estudo deve ser realizado em ambos os sexos dos animais (EMEA/273974/2005) (97).

O risco de transmissão germinativa de cada vetor vai depender do perfil de biodistribuição, replicação do vetor e capacidade de integração. A via de administração é um fator muito importante, uma vez que qualquer administração parenteral pode potencialmente levar à presença de DNA do vetor nas gónadas,

contudo a persistência nas gónadas depende de múltiplos fatores como por exemplo, níveis de dose e tropismo do vetor/vírus administrado (EMEA/273974/2005), (EMA/CHMP/ICH/318372/2021) (96,97).

A terapia genética in útero apresenta maior risco de transmissão germinativa, uma vez que nos humanos, até à 7ª semana de gestação as células germinativas estão desprotegidas e mitoticamente ativas, permitindo a infeção do vetor viral. Deste modo, se for necessário realizar terapia génica in útero, deve-se considerar realizar após este período de modo a minimizar o risco de transmissão germinativa (EMEA/273974/2005) (97).

Um MTG pode apresentar toxicidade devido ao número de partículas do vetor e expressão e/ou integração dos genes entregues, por isso, quando a dose é determinada deve ser considerada a proporção de partículas virais infecciosas (com capacidade de fazer expressar o gene) em relação ao número de partículas virais totais (EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006) (90).

Os estudos de toxicidade devem ser realizados utilizando a mesma via e método de administração descritos no protocolo clínico. Se for utilizada apenas uma espécie, a escolha deve ser justificada cientificamente, sendo o mais relevante possível tendo em conta os efeitos toxicológicos esperados. Normalmente, nos estudos toxicológicos e farmacocinéticos, recomenda-se a utilização do mesmo modelo animal, sobretudo quando são observados sinais de toxicidade relacionados com o vetor (EMA/CAT/80183/2014), (EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006) (82,90).

A avaliação da toxicidade deve permitir avaliar toda a construção do MTG (vírus ou partícula vetorial e/ou sistema de entrega + vetor de expressão incluindo a cassette + gene/transgene), considerando o seu posicionamento intracelular e o número de vetores de expressão/ cópias do gene. Para além disso, estes estudos devem também avaliar o gene de modo a determinar quais as consequências da sua sobreexpressão e/ou imunogenicidade ou efeitos adversos. A frequência da dosagem nos animais deve ser a mesma a ser utilizada no ensaio clínico, salvo algumas exceções (EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006) (90).

Foram desenvolvidos vários testes pré-clínicos de modo a assegurar a segurança dos MTG que contêm vetores de integração. Por exemplo, o ensaio de imortalização *in vitro* (IVIM, do inglês *in vitro immortalization assay*) tem como

objetivo determinar o risco de mutagênese por inserção nos MTG. Baseiam-se na cultura *in vitro* de células da medula óssea de murganho e avaliam a sobreexpressão dos genes *Evi1* e *Prdm16*, que codificam reguladores cruciais na hematopoiese e estão envolvidos na patogênese da leucemia humana e transformação por inserção na terapia génica em humanos. As principais limitações deste ensaio prendem-se com a previsão de eventos genotóxicos em apenas alguns *loci*, as condições de cultura afetam a reprodutibilidade do ensaio e para além disso, baseia-se apenas em células de murganho e linhagem mieloide (EMA/CAT/190186/2012) (89,98).

Podem também ser utilizados modelos animais de doença nos estudos de genotoxicidade, uma vez que permitem avaliar a integração do vetor e o efeito do gene, assim como o histórico geral da doença (EMA/CAT/190186/2012) (89).

A informação clínica e experimental disponível é limitada, não permitindo fazer uma previsão significativa acerca do risco de mutagênese por inserção e oncogénese. Deste modo, todos os doentes que recebem um MTG que utilize vetores, devem ser monitorizados a longo prazo. Dependendo do nível de risco identificado, duração do *follow-up*, frequência e a intensidade da avaliação clínica, as investigações laboratoriais associadas devem ser planeadas durante a fase dos ensaios clínicos assim como para a fase de pós-comercialização (EMA/CAT/190186/2012) (89).

Normalmente, durante os estudos pré-clínicos não é necessário desenvolver estudos de carcinogénese em roedores. Contudo, dependendo do tipo de MTG, o potencial oncogénico e tumorigénico devem ser investigados em modelos *in vivo/ in vitro* relevantes, que permitam avaliar sinais de neoplasia, ativação de oncogenes ou índice de proliferação celular (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Os estudos de imunogenicidade devem ser realizados quando os dados obtidos sobre o MTG indicam a produção de produtos anómalos ou de uma proteína com estrutura diferente daquilo que seria normal. Para além disso, deve-se caracterizar a imunidade pré-existente ao produto transgénico (produto transcrito a partir da sequência terapêutica) assim como, a imunidade anti-vetor após múltiplas administrações do vetor viral (EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006) (90).

Em alguns casos, os modelos animais podem não ser representativos da situação clínica e por isso não fornecer dados relevantes para os estudos de imunotoxicidade. Nestes casos, devem ser planeados cuidadosamente, os critérios de

elegibilidade e os estudos imunogenicidade, a nível clínico (EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006) (90).

Os ensaios de excreção permitem avaliar a disseminação do vírus/vetor através de secreções do doente. Estes ensaios devem ser específicos, sensíveis e reprodutíveis. Por norma, são ensaios quantitativos uma vez que permitem quantificar a probabilidade de transmissão. Normalmente, são realizados ensaios de infecciosidade e PCR, sendo o PCR uma técnica muito sensível apresenta como principal desvantagem a impossibilidade de diferenciar vírus infecciosos de não infecciosos ou degradados, podendo induzir erros na interpretação dos resultados. Por outro lado, os ensaios de infecciosidade detetam apenas vírus/ vetores intatos e com potencial de transmissão, no entanto são muito menos sensíveis do que os testes PCR (EMEA/CHMP/ICH/449035/2009) (99).

A expressão e distribuição tecidual de recetores virais num dado animal pode afetar o perfil de excreção do vírus/vetor e por isso, o perfil de excreção pode não se correlacionar com o dos humanos, uma vez que o sequestro celular e tecidual pode não ser igual. De modo a permitir uma melhor avaliação, podem ser utilizados modelos animais de doença (EMEA/CHMP/ICH/449035/2009) (99).

Para determinar quais as amostras a utilizar, deve ser tido em consideração as características do vírus/vetor, via de administração e espécie animal. Frequentemente são colhidas mais amostras nos primeiros dias após a administração, de modo a detetar o perfil de excreção transitório (EMEA/CHMP/ICH/449035/2009) (99).

Se um estudo de excreção pré-clínico indicar a possibilidade de transmissão, devem ser realizados estudos adicionais que permitam prever a possibilidade de transmissão de humano para humano nos ensaios clínicos (EMEA/CHMP/ICH/449035/2009) (99).

Caso o dispositivo de administração e/ou excipientes não tenham sido aprovados para o uso clínico de um MTG, são necessários estudos que permitam avaliar a contribuição destes para a atividade e biodistribuição do MTG. Se tiverem sido aprovados, mas para um MTG diferente, devem ser desenhados estudos que permitam completar os dados existentes (EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006) (90).

A administração concomitante de outros fármacos deve ser investigada caso a caso, quando podem afetar a transfeção/ transdução/ infeção, tropismo e eficácia do vetor, expressão do gene terapêutico, atividade biológica das proteínas expressas e distribuição tecidual do vetor. Para além disso a inflamação ou libertação de citocinas no fígado pode afetar o metabolismo hepático dos produtos farmacêuticos administrados em simultâneo (EMA/CAT/80183/2014) (82).

5.2.1.2. Desenvolvimento clínico de produtos de terapia génica

Geralmente, as regras de desenvolvimento clínico que se aplicam a qualquer outro medicamento também se aplicam aos MTG. Para novas indicações/ condições terapêuticas, onde existe orientação limitada, é recomendável recorrer às autoridades reguladoras nacionais e/ou EMA para o aconselhamento científico sobre o desenvolvimento clínico (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Os estudos farmacocinéticos desenvolvidos na fase clínica vão depender de caso para caso, dependendo das características específicas do MTG. Contudo é expectável que sejam desenvolvidos (EMA/CAT/80183/2014) (82):

- Estudos de excreção e o risco de transmissão a terceiros devendo ser acompanhados por uma avaliação do risco ambiental, salvo algumas exceções, tendo em conta o tipo de MTG;
- Quando possível, devem ser realizados estudos que permitam avaliar a persistência, *clearance* e mobilização do vetor de terapia génica. Os estudos de biodistribuição devem abordar o risco de transmissão germinativa;
- Estudos farmacocinéticos do medicamento e do gene terapêutico.

O momento exato da realização dos estudos de excreção vai depender do tipo de produto viral/vetor e da população de doentes, por isso deve ser discutido com as autoridades reguladoras. Caso sejam obtidos dados suficientes sobre a excreção durante as fases iniciais do ensaio clínico, pode justificar a ausência da análise de excreção nos ensaios clínicos confirmatórios (EMA/CHMP/ICH/449035/2009) (99).

Quando se observa excreção devem ser realizados estudos que permitem avaliar o risco de potencial transmissão a terceiros e o risco para o meio ambiente. Caso estes

estudos não sejam realizados deve ser justificado o motivo. Na presença de risco de excreção através do líquido seminal, devem ser utilizados dois métodos contraceptivos, incluindo um método contraceptivo de barreira (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Como referido anteriormente, durante o desenvolvimento pré-clínico a amostragem é mais frequente nos primeiros dias após a administração, tornando-se menos frequente ao longo do tempo. A colheita de amostras deve ser realizadas até se obter várias amostras negativas consecutivas. Caso o vírus/vetor derive de um vírus *wild-type* que apresente latência, pode ser difícil detetar excreção nos períodos de reativação, e por isso é recomendável discutir a situação com a autoridade reguladora regional (EMA/CHMP/ICH/449035/2009) (99).

Se o ensaio realizado para avaliar a excreção não permitir distinguir o vírus/vetor intacto de degradado ou não infeccioso, então não é possível perceber qual o risco associado à transmissão. Deste modo, pode ser necessário realizar ambos os ensaios PCR quantitativos e ensaios de infecciosidade. Quando são realizados testes que não permitem distinguir o estado do vírus/vetor (intacto, degradado ou não infeccioso), presume-se que o material excretado é infeccioso (EMA/CHMP/ICH/449035/2009) (99).

Nos estudos de biodistribuição deve ser tido em consideração a via de administração, células/ órgãos alvo, tipo de vetor, cinética da virémia, viabilidade clínica e aceitabilidade ética. As técnicas invasivas podem nem sempre ser viáveis e eticamente aceitáveis, deste modo a utilização de técnicas menos invasivas podem ser úteis no estudo na disseminação do MTG (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Quando são utilizados MTG com vetores virais que apresentam replicação competente, os doentes devem ser monitorizados para avaliar possíveis sinais clínicos de infeção produtiva devido à replicação do vetor ou de sinais de disseminação indesejada (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Nos estudos farmacocinéticos, se apropriado, pode ser determinado a concentração mínima eficaz e o tempo de semi-vida do produto terapêutico. Para além disso, deve ser investigada a correlação entre os níveis e duração da expressão e eficácia/ segurança clínica (82).

Diferenças na cinética e a influência de polimorfismos genéticos na eliminação dos produtos de expressão génica (por exemplo, enzimas ou pró-fármacos) devem ser tidos em consideração (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Os estudos farmacodinâmicos são realizados para avaliar a função e/ou expressão da sequência terapêutica. Por isso, os marcadores farmacodinâmicos selecionados devem refletir a eficácia terapêutica do produto. Estes marcadores devem estar relacionados com o benefício clínico (EMA/CAT/80183/2014) (82).

A seleção da dose deve ser baseada no desenvolvimento pré-clínico do produto e deve estar relacionada com a potência do produto. Quando não é possível determinar a dose, a dose mínima efetiva e a dose máxima tolerável pode fornecer informação sobre a relação entre a exposição e o efeito, sendo que a dose proposta tem que ser justificada através de dados científicos (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Antes de ser iniciada uma terapêutica, deve ser avaliada a resposta imunitária ao gene terapêutico e a imunidade pré-existente ao vetor, uma vez que infecções prévias/vacinação podem afetar a segurança e eficácia do MTG e, determinar se é necessário utilizar imunossupressão (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Os estudos de eficácia devem demonstrar a eficácia na população alvo, suportar a posologia proposta e avaliar a duração do efeito terapêutico do medicamento. Para avaliar a eficácia do MTG, idealmente devem ser realizados estudos controlados aleatorizados e cegos. Quando isto não é possível, o requerente deve justificar a abordagem cientificamente (EMA/CAT/80183/2014) (82).

A duração do *follow-up* deve refletir a duração do tratamento, ou seja, a persistência e funcionalidade do gene terapêutico. O *follow-up* pode apenas ser concluído após a comercialização (por exemplo, quando é expectável uma expressão do gene terapêutico a longo prazo) (EMA/CAT/80183/2014) (82).

A segurança clínica deve ser avaliada tendo em conta os riscos associados ao procedimento de administração (métodos não invasivos *versus* invasivos), utilização de anestesia local ou geral, ou a utilização de terapia imunossupressora e quimioterapia. Quando são utilizados dispositivos médicos deve ser avaliada e explicada a sua utilização (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Durante os estudos de farmacovigilância deve-se avaliar a perda de eficácia, especialmente durante o *follow-up* a longo prazo de doentes tratados com um MTG (EMA/CAT/80183/2014) (82).

Como referido anteriormente, os MTG representam a classe de ATMPs com mais medicamentos aprovados. Atualmente existem 14 MTG autorizados na UE (Tabela 5.2),

sendo Kymriah®, Yescarta®, Tecartus®, Abecma® Breyanzi® e Carvykti™ terapias dos recetores antigénicos quiméricos para células T (*CAR-T Cells*, do inglês *Chimeric Antigen Receptor T-cells*) referidos na Tabela 5.4.

Tabela 5.2- Medicamentos de terapia génica aprovados pela EMA (2009 – abril 2023).

Nome	Descrição	Indicação terapêutica	Data de autorização	Observações
Glybera® ^(a) (alipogene tiparvovec)	Contém uma variante do gene <i>LPL</i> humano num vetor derivado do serotipo 1 do vírus adenoassociado (AAV1) (29).	Doentes adultos diagnosticados com deficiência da LPL e com crises graves ou repetidas de pancreatite apesar das restrições de gordura na dieta. O diagnóstico tem de ser confirmado através de um teste genético, sendo o Glybera® restrito a doentes com níveis detetáveis da proteína LPL (29).	10/2012 (31)	^(a) AIM não renovada (AIM terminou em outubro de 2017) (31)
Imlygic® (talimogene laherparepvec)	Consiste no vírus herpes simplex do tipo 1 atenuado, resultante da deleção funcional de 2 genes (ICP34.5 e ICP47) e da inserção de uma sequência codificada para o fator estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF, do inglês <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>) (100).	Tratamento de adultos com melanoma não ressecável com metástases locais ou à distância (Estadio IIIB, IIIC e IVM1a), que não ósseas, cerebrais, pulmonares ou outras viscerais (100).	12/2015 (31)	
Strimvelis®	Células autólogas CD34 ⁺ transduzidas com vetor retroviral que codifica a sequência de DNA complementar da adenosina desaminase (ADA) humana a partir de células (CD34 ⁺) estaminais/progenitoras hematopoéticas humanas (101).	Tratamento de doentes com imunodeficiência combinada grave por deficiência de adenosina desaminase (ADA-SCID), para os quais não está disponível um dador familiar adequado de células estaminais compatível (101).	05/2016 (31)	
Luxturna® (voretigene neparvovec)	Consiste em um vetor derivado do serotipo 2 do vírus adenoassociado (AAV2) para transportar a proteína do epitélio pigmentado da retina humana de 65 kilodanton (hRPE65) (102).	Tratamento de doentes adultos e pediátricos com perda de visão devida a distrofia retiniana hereditária causada por mutações em ambos os alelos do gene <i>RPE65</i> confirmadas e que tenham células viáveis da retina suficientes (102,103).	11/2018 (31)	
Zynteglo® ^(b) (betibeglogene autotemcel)	Células estaminais autólogas geneticamente modificadas, enriquecidas com células CD34 ⁺ , transduzidas com vetor lentiviral codificando o gene da β^{A-T87Q} – globina (104,105).	Tratamento de doentes com idade ≥ 12 anos com β talassemia dependente de transfusões, que não têm um genótipo β^0/β^0 , para os quais o transplante de células estaminais hematopoéticas é adequado, mas não está disponível um dador compatível (104).	05/2019 (31)	^(b) AIM retirada em março de 2022 (31)

Zolgensma® (onasemnogene abeparvovec)	Vetor recombinante do serotipo 9 do vírus adenoassociado (AAV9) recombinante não replicante contendo o DNA complementar do gene humano <i>SMN</i> , ou seja, contém uma cópia funcional deste gene. (106,107)	Tratamento de: - doentes com atrofia muscular espinal (AME) 5q com uma mutação bialélica no gene <i>SMN1</i> e um diagnóstico clínico de AME de Tipo 1 - doentes com AME 5q com uma mutação bialélica no gene <i>SMN1</i> e até 3 cópias do gene <i>SMN2</i> (107). Tratamento da leucodistrofia metacromática caracterizada por mutações bialélicas no gene <i>ARSA</i> que levam a uma redução da atividade enzimática da <i>ARSA</i> (108):	05/2020 (31)	
Libmeldy® (atidarsagene autotemcel)	População autóloga, geneticamente modificada, enriquecida com células CD34+, que contém células estaminais e progenitoras hematopoiéticas transduzidas <i>ex vivo</i> utilizando um vetor lentiviral expressando o gene da arilsulfatase A (<i>ARSA</i>) humana (108).	- em crianças com a forma infantil tardia ou juvenil precoce, sem manifestações clínicas da doença; - em crianças com a forma juvenil precoce, com manifestações clínicas precoces da doença, que ainda têm a capacidade de andar de forma autónoma e antes do início do declínio cognitivo (108).	12/2020 (31)	
Skysona® (c) (elivaldogene autotemcel)	População autóloga geneticamente modificada, enriquecida com células CD34+, que contém células estaminais hematopoiéticas transduzidas <i>ex vivo</i> com vetor lentiviral codificando o DNA complementar <i>ABCD1</i> para proteína da adrenoleucodistrofia humana (109).	Tratamento da adrenoleucodistrofia cerebral precoce em doentes com idade < 18 anos, com uma mutação no gene <i>ABCD1</i> e para os quais não esteja disponível um dador de células estaminais hematopoiéticas compatível (109).	07/2021 (31)	(c)AIM retirada em novembro de 2021 (31)
Upstaza® (eladocagene exuparvovec)	Vetor recombinante do AAV2 que contém o DNA complementar que codifica a enzima L-aminoácido aromático descarboxilase (<i>AADC</i>) (110,111)	Tratamento de doentes com >18 meses de idade com um diagnóstico clínico, molecular e geneticamente confirmado da deficiência da enzima <i>AADC</i> com um fenótipo grave (110).	07/2022 (31)	
Roctavian® (valactocogene roxaparvovec)	Vetor recombinante do serotipo 5 do vírus adenoassociado (AAV5) que contém o DNA complementar do gene da forma SQ do fator VIII da coagulação humana com o domínio B eliminado sob controlo de um promotor hepático específico (112).	Tratamento de hemofilia A grave (deficiência congénita do fator VIII) em doentes adultos sem antecedentes de inibidores do fator VIII e sem anticorpos detetáveis contra o AAV5 (112).	08/2022 (31)	
Hemgenix® (etranacogene dezaparvovec)	Vetor recombinante do AAV5 que permite entregar uma cópia funcional do gene humano do Fator IX da coagulação (113).	Tratamento de Hemofilia B grave e moderadamente grave (deficiência congénita do Fator IX) em doentes adultos sem histórico de inibidores de Fator IX (113).	02/2023 (31)	

5.2.2 Considerações sobre medicamentos com vírus oncolíticos

Os vírus oncolíticos destinam-se a replicar seletivamente em tecidos tumorais, destruindo os tecidos sem causar danos excessivos nos tecidos normais. Inicialmente, estes vírus foram observados em estudos clínicos, nos quais se observou a regressão de tumores devido a infecções virais ou vacinas com vírus vivos. Após vários estudos, constatou-se que alguns vírus (por exemplo, herpes simplex, poxvirus, adenovírus) podiam ser muito promissores no tratamento oncológico (EMEA/CHMP/ICH/607698/2008) (114).

Após modificações genéticas, os vírus podem replicar-se seletivamente e lisar células tumorais (Figura 5.7). Existem várias modificações que permitem atingir estes objetivos, tais como (EMEA/CHMP/ICH/607698/2008)(114):

- Mutação de genes virais essenciais para a replicação em células normais;
- Controlo da expressão génica através de promotores específicos do tumor;
- Alteração do tropismo celular e/ou processo de entrada na célula;
- Incorporação de transgenes no genoma viral.

É importante conhecer a seletividade dos vírus oncolíticos nas células tumorais antes da utilização em ensaios clínicos. Estes vírus devem ser submetidos a testes *in vitro* para avaliar a citotoxicidade e/ou replicação em linhas celulares tumorais/ permissivas e não permissivas (que por definição, são linhagens em que a infeção viral não replica e/ou não gera prógenia infecciosa). A seletividade não é considerada uma medida direta da potência para estes produtos, uma vez que um teste de potência deve medir ou correlacionar a atividade biológica dos vírus oncolíticos (EMEA/CHMP/ICH/607698/2008)(114).

Devem ser realizados testes que permitam avaliar possíveis variantes moleculares dos vírus, pois estas variantes podem apresentar uma seletividade de replicação ou perfil oncolítico diferente do pretendido. Por isso, é importante demonstrar a estabilidade genética do produto (EMEA/CHMP/ICH/607698/2008)(114).

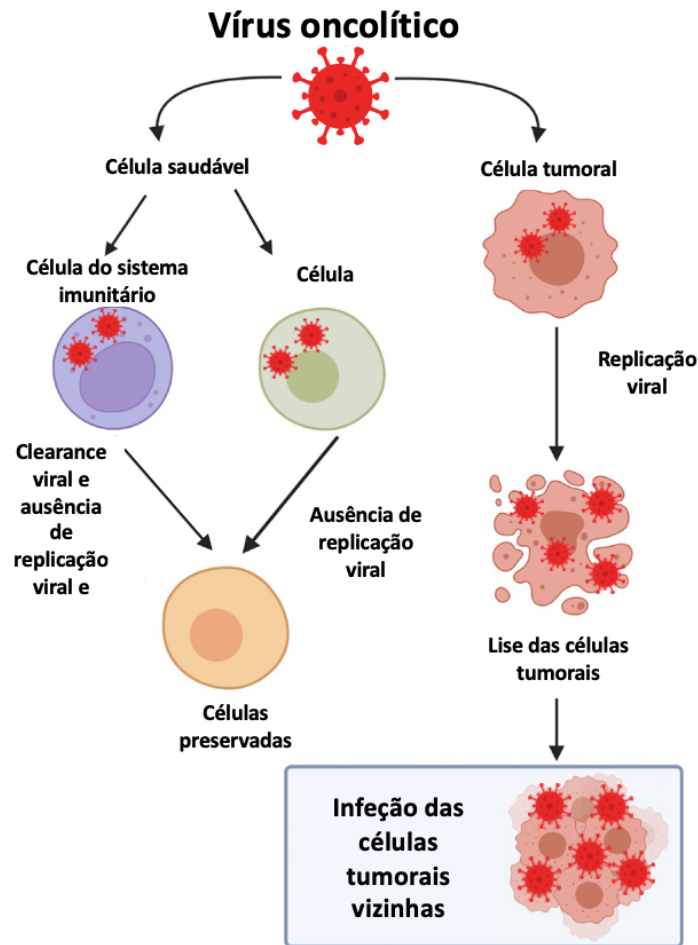


Figura 5.7 – Mecanismo de ação dos vírus oncolíticos, adaptado de (115). Os vírus oncolíticos conseguem infectar, replicar e lisar seletivamente as células tumorais. Após infecção com um vírus oncolítico, o vírus replica nas células tumorais provocando a sua lise e infecção das células tumorais vizinhas. As células normais mantêm-se preservadas pois não ocorre replicação viral nestas.

Os testes para avaliar a contaminação de microrganismos podem ser difíceis de executar nestes produtos, uma vez que os vírus oncolíticos podem replicar e causar falsos positivos. Para ultrapassar este desafio, podem ser utilizados anticorpos específicos para neutralizar os vírus oncolíticos antes da realização dos testes *in vivo* e *in vitro*. Se não existirem anticorpos disponíveis para realizar o teste, podem ser realizados testes em simultâneo com um grupo de células infectadas com o vírus oncolítico e um grupo de células controlo (células tratadas com as mesmas condições e reagentes das células tratadas com vírus oncolítico, com a exceção de que não são expostas ao produto viral) (EMEA/CHMP/ICH/607698/2008) (114).

5.2.2.1. Desenvolvimento pré-clínico de medicamentos com vírus oncolíticos

Nos estudos pré-clínicos deve ser utilizada a construção do vírus oncolíticos destinado à utilização nos ensaios clínicos de modo a mimetizar ao máximo a utilização do medicamento e, podem ainda ser considerados resultados de estudos anteriores com vírus que apresentam características semelhantes ao vírus oncolítico em estudo (EMEA/CHMP/ICH/607698/2008) (114).

Devem ser realizados estudos *in vitro* para avaliar a seletividade em células normais e tumorais, a expressão génica seletiva, citotoxicidade e replicação viral, antes de serem utilizados modelos animais. Para além disso, a PoC e o mecanismo de ação podem ser demonstrados tanto em modelos *in vivo* como em modelos *in vitro* (EMEA/CHMP/ICH/607698/2008) (114).

Os estudos de biodistribuição avaliam a disseminação nos órgãos alvo e não alvo, e devem ser realizados através de ensaios NAAT. É também importante compreender o potencial de infecciosidade do vírus oncolítico administrado e quantificar os títulos virais e/ou níveis de ácidos nucleicos virais, uma vez que os vírus administrados apresentam replicação competente e por isso podem infetar e replicar em tecidos normais. A presença de sequências do genoma viral ou expressão do transgene em tecidos não alvo em níveis significativos deve conduzir a uma análise mais aprofundada do tecido (EMEA/CHMP/ICH/607698/2008) (114).

A avaliação da excreção viral em modelos animais permite monitorizar os efeitos adversos a longo prazo, nos ensaios pré-clínicos e clínicos, uma vez que uma das principais preocupações da utilização de vírus oncolíticos é o potencial de exposição que pode conduzir à transmissão humano para humano (EMEA/CHMP/ICH/607698/2008) (114).

5.2.2.2. Desenvolvimento clínico de medicamentos com vírus oncolíticos

Nas fases iniciais dos ensaios clínicos existem muitas questões para as quais ainda não existe resposta devido à complexidade destes medicamentos e às limitações dos modelos animais. Devido à falta de informação é necessário ter precaução nas dosagens iniciais e vias de administração, sendo frequente começar com uma injeção intratumoral, de seguida para uma administração local e posteriormente administração sistémica. A via de

administração selecionada deve ser justificada com base nos dados pré-clínicos obtidos (EMEA/CHMP/ICH/607698/2008) (114).

Para monitorizar os níveis dos vírus oncolíticos são utilizados ensaios de infecciosidade e técnicas de PCR. A monitorização deve ser feita com uma frequência e duração suficiente que permita a deteção de uma possível replicação viral em tecidos permissivos (EMEA/CHMP/ICH/607698/2008) (114).

A avaliação da presença e/ou distribuição do vírus oncolítico no interior do tumor pode ser conseguida através de uma biopsia ou ressecção do tumor, quando possível (EMEA/CHMP/ICH/607698/2008) (114).

A imunidade prévia ao vírus pode influenciar a via de administração, regime terapêutico e a necessidade de administrações sucessivas. No entanto, apesar da imunidade poder conferir uma potencial segurança contra a virémia excessiva, pode interferir com o objetivo de propagação do vírus (114).

Apesar de não se compreender qual o impacto da transmissão a terceiros, deve-se ter precaução para minimizar a exposição a outras pessoas, sobretudo pessoas imunocomprometidas. Deste modo, os estudos pré-clínicos de excreção viral podem ser úteis na preparação para os estudos clínicos e na avaliação de métodos de deteção viral (EMEA/CHMP/ICH/607698/2008) (114).

5.2.2.3. Medicamentos de terapia génica com vírus oncolíticos aprovados e em ensaios clínicos

Em 2015, foi aprovado o primeiro e único, até ao momento, medicamento com vírus oncolíticos pela EMA, o Imlygic® (talimogene laherparepvec). O uso de Imlygic® é recomendado para o tratamento de doentes adultos com melanoma, que não pode ser removido cirurgicamente e que se espalhou para outras áreas do corpo, sem afetar os ossos, cérebro, pulmão ou outros órgãos internos (116,117).

O Imlygic® é derivado do vírus herpes simplex-1, que foi modificado geneticamente para infetar e replicar nas células tumorais e produzir o GM-CSF (Figura 5.8). Esta proteína estimula o sistema imunitário do doente a reconhecer e destruir as células tumorais. Cada vez que uma célula tumoral morre, são libertadas várias cópias do vírus na corrente sanguínea, o que permite infetar mais células tumorais. Apesar de conseguir entrar nas células saudáveis, o Imlygic® não se consegue replicar nestas células nem provocar a sua

morte. É recomendado que o Imlygic® seja injetado diretamente nas células tumorais (100,116,117).

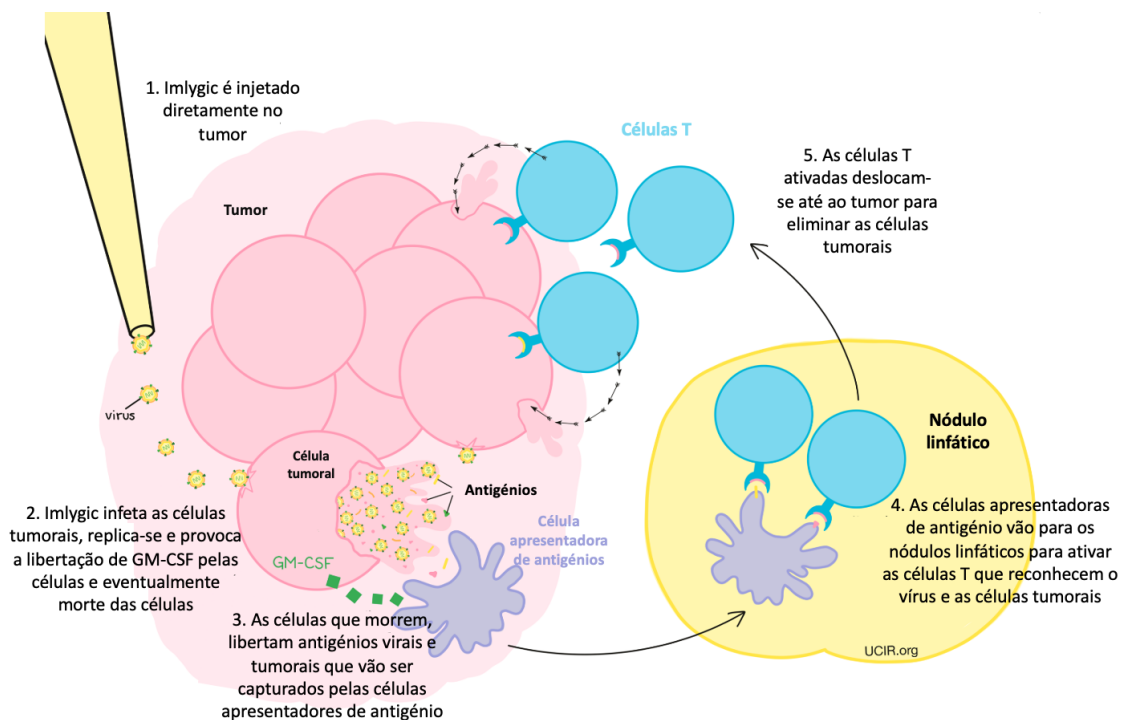


Figura 5.8 - Mecanismo de ação do Imlygic®, adaptado de (118). O Imlygic® infeta e replica seletivamente as células tumorais e provoca a liberação de GM-CSF pelas células. GM-CSF vai estimular o sistema imunitário do doente a destruir as células tumorais.

Apesar de só existir um medicamento aprovado com vírus oncolíticos, o desenvolvimento pré-clínico e clínico destes medicamentos está a crescer a um ritmo exponencial, devido ao potencial que estes podem apresentar para melhorar o resultado terapêutico das diferentes opções de tratamento, como a radioterapia, quimioterapia e imunoterapia. Por vezes estes medicamentos são estudados em combinação com outras terapêuticas anticancerígenas já existentes (Tabela 5.3) (119).

A informação e interpretação dos resultados obtidos durante os ensaios clínicos deve ser feita com cautela devido ao tamanho reduzido da amostra, no entanto os relatórios obtidos sugerem que os vírus oncolíticos podem tornar-se uma opção no tratamento do cancro, num futuro próximo (119).

Tabela 5.3 - Ensaios clínicos com vírus oncolíticos, adaptado de (119).

	Vírus oncolíticos	Via de administração	Combinação	Indicação	Fase	Identificação do Ensaio	Estado
Adenovírus	DNX2440 (Ad5-Δ24-RGD/OX40L)	Injeção estereotáxica	Nenhuma	Glioblastoma recorrente	Fase I	NCT03714334	Terminado (120)
	ORCA-010	Injeção intratumoral	Nenhuma	Adenocarcinoma da próstata	Fase I/II	NCT04097002	A recrutar (121)
	LOAd703 (oAd/CD40L e 4-BBL)	Injeção intratumoral	Atezolizumab	Melanoma maligno	Fase I/II	NCT04123470	Ativo (122)
Herpes simplex	RP3	Injeção intratumoral	Nivolumab	Tumores sólidos	Fase I	NCT04735978	A recrutar (123)
	OH2 (rHSV2hGM-CSF)	Injeção intratumoral	Nenhum	Cancro do pâncreas	Fase I/II	NCT04637698	A recrutar (124)
	NV1020	Injeção intrahepática arterial	Nenhum	Cancro colorretal metastizado ao fígado	Fase I	NCT00012155	Completo (125)
Vaccinia	GL-ONC1	Injeção intraperitoneal	Bevacizumab	Cancro do ovário recorrente ou refratário	Fase I, Fase II	NCT02759588	Completo (126)
	TG6002 (VV TK-RR-FCU1)	Injeção intravenosa	Flucitosina	Tumor gastrointestinal avançado	Fase I/II	NCT03724071	Terminado (127)
	Pexa-Vec (JX-594)	Injeção intratumoral	Sorafenib	Carcinoma hepatocelular	Fase III	NCT02562755	Completo (128)

5.2.3 Medicamentos que contêm células geneticamente modificadas

Todos os medicamentos que utilizem células geneticamente modificadas para uso humano, independentemente se a modificação foi realizada para fins terapêuticos ou não, como é o caso da geração de iPSCs. As modificações genéticas podem ser obtidas por vários métodos, nomeadamente através de ferramentas de edição do genoma ou adição de genes, vetores virais e não virais. Estas modificações devem ser sempre realizadas de acordo com um processo de produção validado (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

A modificação das células constitui um ponto de controlo crítico, uma vez que é uma etapa no processo de fabrico que é afetada por vários fatores, tais como as características das células-alvo (células em divisão ou quiescentes, células que crescem aderentes ou em suspensão, linhas celulares imortalizadas ou culturas primárias, número de passagens da linha celular), características da cultura de células, tipo e quantidade de vetor utilizado para

modificar as células, tempo de incubação com o vetor e constituintes do meio de cultura (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

As células utilizadas podem apresentar várias origens, ou seja, podem ser de origem humana (autólogas ou alogénicas) ou de origem animal (células xenogénicas). A *Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells* (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) não abrange as células de origem microbiana modificadas (129).

As células geneticamente modificadas podem por si só constituir um medicamento ou podem ser combinadas com dispositivos médicos, sendo que as substâncias adicionais (por exemplo, matrizes, biomateriais, biomoléculas e/ou outros componentes) devem ser consideradas como matérias-primas, mesmo que não sejam de origem biológica. De acordo com o uso pretendido do medicamento, devem ser classificados de acordo com a *Guideline on human cell-based medicinal products* (EMA/CHMP/410869/2006) (38,129).

As matérias-primas utilizadas na produção de células geneticamente modificadas, assim como nos produtos de edição genética, devem qualificadas cuidadosamente do modo a garantir um processo de produção consistente. Os dados exigidos para cada uma das matérias-primas utilizadas são os mesmos para os medicamentos à base de células e medicamentos de terapia génica (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

O processo de produção de medicamentos que utilizem células geneticamente modificadas engloba etapas para a produção de medicamentos à base de células e produtos de terapia génica. Tal como outros ATMPs, os riscos de produção diferem de acordo com o tipo de produto, natureza/características das matérias-primas e nível de complexidade do processo de produção. Dependendo das características das matérias-primas pode ser necessário realizar testes adicionais no processo de produção do medicamento (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Uma das principais preocupações das células geneticamente modificadas por vetores virais é a possibilidade das partículas virais infetarem células e se replicarem, produzindo novas partículas virais. Deste modo, deve ser demonstrada a ausência de replicação de vírus competentes durante todo o processo de produção das células geneticamente modificadas, através de ensaios válidos e sensíveis. Para além disso, de acordo com as matérias-primas utilizadas deve ser implementado e descrito um programa de testes adequados, proporcionais aos riscos do medicamento, assim como uma avaliação de risco que

contemple a geração de potencial replicação de vírus competentes durante o processo de fabrico (129).

A preparação das células e as etapas da cultura do processo de produção de fabrico e controlo devem seguir os princípios descritos na *Guideline on human cell-based medicinal products* (EMA/CHMP/410869/2006) (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (38,129).

Durante o desenvolvimento destes produtos geneticamente modificados, pode ser necessário fazer alterações no processo de produção do próprio produto ou a nível da produção de matérias-primas (por exemplo, vetor viral ou fonte celular) que podem afetar a qualidade e a segurança do produto final. Deste modo, é importante que todas as alterações efetuadas durante o desenvolvimento dos produtos sejam identificadas e descritas (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Quando ocorrem mudanças no processo de produção dos produtos ou dos materiais é necessário avaliar o impacto em todos os pontos críticos do processo a jusante da mudança até ao produto final. Devem ser realizados estudos de comparabilidade para comparar os produtos antes e depois da mudança, e avaliar o impacto de qualquer diferença ao nível da segurança e eficácia do produto. A demonstração de comparabilidade indica que os atributos pré- *versus* pós-alteração são comparáveis e que não apresentam impacto negativo na segurança e eficácia do medicamento. Se se verificar que as alterações podem levar a efeitos indesejáveis na segurança e eficácia do produto, devem considerar-se estudos pré-clínicos e/ou clínicos adicionais (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

5.2.3.1. Desenvolvimento pré-clínico de produtos que contêm células geneticamente modificadas

Existem vários motivos para se recorrer às células geneticamente modificadas como terapêutica, como por exemplo, tratamento de uma doença genética devido a um gene mutado ou melhoria de uma função celular. Dependendo do propósito da modificação genética, os estudos farmacodinâmicos devem ser adaptados de modo a avaliar esse propósito. Por isso, a modificação genética e o modo de ação esperado devem ser claramente identificados (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Os estudos pré-clínicos, sempre que possível, devem ser realizados para justificar a seleção da dose para os ensaios clínicos, via de administração e modo de utilização.

Idealmente, devem ser realizados com lotes de células geneticamente modificadas produzidos e com qualidade controlada de acordo com o processo de produção em vigor para os estudos clínicos (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Sempre que possível, os testes em animais devem ser substituídos por estudos *in vitro* ou *ex vivo*. São incentivadas abordagens que não utilizem animais, quando apropriado e aplicável, utilizando modelos à base de células e tecidos, incluindo modelos 2D e 3D, organoides e modelos *in silico* (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Independentemente do tipo de modificação genética, o efeito esperado deve ser confirmado a nível celular. Pode incluir estudos que avaliem as mudanças especificamente no genoma das células, avaliação da expressão genética endógena após a introdução das sequências reguladoras exógenas ou avaliação da expressão de gene/transgene e avaliação da atividade dos genes inseridos (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Devem ser fornecidos estudos de PoC que auxiliem a avaliação do potencial efeito clínico e/ou comprovem o modo de ação antecipado. Pode não ser viável demonstrar a PoC *in vivo* deste tipo de produtos em modelos animais (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Os estudos farmacocinéticos devem permitir avaliar a biodistribuição, persistência e estabilidade das células (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Os parâmetros toxicológicos podem ser avaliados em estudos *in vitro* e/ou *in vivo*, sendo que estes devem ser desenvolvidos para investigar quaisquer efeitos adversos induzidos pelas células geneticamente modificadas. Neste tipo de produtos, deve-se ter em atenção a toxicidade relacionada com a expressão do gene terapêutico/transgene, risco de mutagénese por inserção, mobilização e recombinação de vetores e ainda, aspetos particulares relacionados com o tipo de produto (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

A expressão do gene terapêutico/transgene pode provocar efeitos tóxicos induzindo efeitos adversos. Deste modo é importante avaliar *in vitro* os potenciais efeitos toxicológicos para garantir que as células geneticamente modificadas mantêm as suas funções e não adquirem características que possam influenciar a sua funcionalidade *in vivo* (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

O risco de mutagênese por inserção está sobretudo relacionado com a utilização de vetores virais que sofrem integração no genoma das células. Por isso, existem vários fatores a ter em consideração de modo a reduzir o risco de oncogênese por inserção, nomeadamente o perfil de inserção do vetor escolhido, o desenho do vetor incluindo a escolha das sequências promotoras e ativadores, o número de cópias do vetor entregue por célula, o produto génico/transgénico e a população de células-alvo. Para uma integração direcionada das sequências do vetor num local pré-definido, o local de integração escolhido deve ser seguro (ou seja, evitar a integração do vetor perto de regiões críticas como é o caso dos proto-oncogenes) e a especificidade da integração alvo deve ser avaliada (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Considerações específicas no desenvolvimento pré-clínico para algumas classes de medicamentos

Os produtos que contêm células geneticamente modificadas incluem as *CAR-T Cells*, produtos à base de iPSCs e produtos derivados da edição do genoma (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

- **Células do Sistema imunitário (*CAR-T cells*, T cell receptor (TCR, do inglês *T cell receptor*) modified T-cells, NK T-cells)**

Neste tipo de medicamentos é necessário avaliar a toxicidade no alvo/fora do tumor num modelo animal adequado ou através de uma abordagem alternativa, utilizando métodos *in silico* e *in vitro*. A abordagem alternativa deve incluir análises mais aprofundadas da expressão do antígeno alvo em órgãos, tecidos e células humanos (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

A expressão do antígeno alvo, normalmente é realizada com recurso a análise a células e tecidos de indivíduos saudáveis. Deve ser confirmada a expressão do antígeno específico no tumor das células-alvo e para além disso, devem ser realizados testes *in vitro* de reconhecimento pelas células geneticamente modificadas (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Se o TCR apresentar alguma probabilidade de reatividade cruzada, devem ser realizados testes *in silico* de modo a avaliar a reatividade cruzada. Se durante

estes testes forem identificados peptídeos que podem desencadear uma reação cruzada, as células que expressam a proteína correspondente e/ou que apresentam este peptídeo devem ser analisadas. Quando a reatividade cruzada não pode ser descartada, deve ser realizada uma avaliação de risco com base no padrão de expressão da proteína correspondente ao peptídeo potencialmente reativo e na afinidade do TCR para o peptídeo potencialmente reativo (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129). Deve ser realizado um *screening* que permita avaliar potenciais reações cruzadas do TCR com outros alelos do antígeno leucocitário humano (HLA, do inglês *Human leukocyte antigen*) (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

A maioria das terapias génicas aprovadas são de células autólogas transduzidas *ex vivo*, ou seja, terapias CAR-T *cells*. As terapias aprovadas na UE são Kymriah®, Yescarta®, Tecartus®, Abecma®, Breyanzi® e Carvykti™ (Tabela 5.4) (130). Estes medicamentos constituem uma nova abordagem inovadora e personalizada para os doentes oncológicos, uma vez que as próprias células dos doentes são geneticamente manipuladas e posteriormente re-injetadas no organismo para eliminarem as células tumorais (Figura 5.9). As opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de Linfomas Não Hodgkin agressivos refratários ou em recaída após duas ou mais linhas terapêuticas são limitadas e por isso, estes novos medicamentos trouxeram uma nova esperança para estes doentes (131,132).

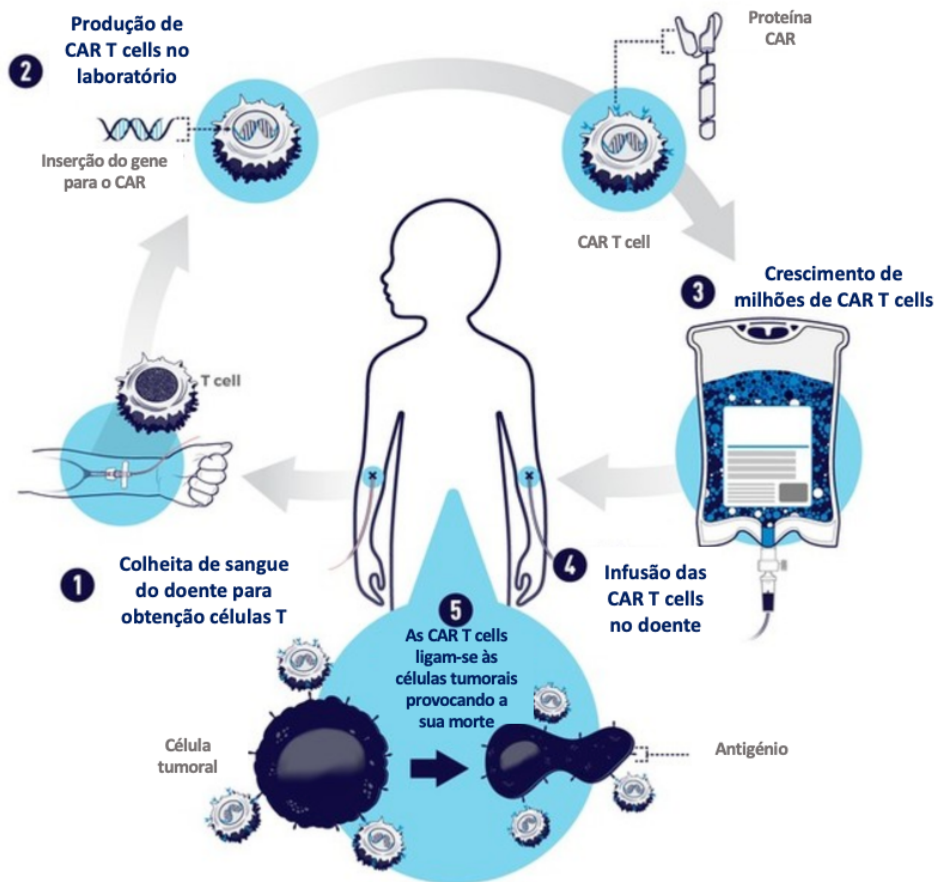


Figura 5.9 - Ilustração esquemática da terapia com CAR-T cells, adaptado de (133). A terapia com CAR-T cells consiste num tratamento no qual as células do doente são geneticamente modificadas, permitindo que estas se liguem a antigénios específicos das células tumorais, e consequentemente provoquem a morte das células tumorais. 1) O primeiro passo consiste na colheita de sangue do doente para obter células T. 2) Seguidamente há inserção do gene para o CAR e consequente produção das CAR-T cells no laboratório. 3) Subsequentemente procede-se à expansão celular, ocorrendo a produção de milhões de CAR-T cells 4) para posteriormente serem re-injetadas no doente por via intravenosa. 5) As CAR-T cells vão se ligar aos antigénios das células tumorais, promovendo a sua morte.

Tabela 5.4 - Terapias CAR-T cells aprovadas na UE.

Nome	Descrição	Indicação terapêutica	Data de autorização
Yescarta® (axicabtagene ciloleucel)	Células autólogas geneticamente modificadas que contêm células T transduzidas <i>ex vivo</i> utilizando um vetor retroviral que expressa um CAR anti-CD19 composto por um fragmento variável de cadeia única (scFv) de murganho anti-CD19 ligado ao domínio co-estimulador CD28 e ao domínio sinalizador CD3-zeta (130,132,134).	Tratamento de doentes adultos com linfoma de células B de alto grau, linfoma difuso de grandes células B, linfoma primário do mediastino de grandes células B ou linfoma folicular recidivante ou refratário após duas ou mais linhas de terapêutica sistémica (130,132,134)	08/2018 (31)
Kymriah® (tisagenlecleucel)	Imunoterapia celular que contém células T autólogas, geneticamente modificadas <i>ex vivo</i> utilizando um vetor lentiviral que codifica um CAR anti-CD19 (130,135).	Tratamento de: -Doentes pediátricos e jovens adultos ≥ 25 anos de idade com leucemia linfoblástica aguda de células B refratária, em recidiva após transplante ou em segunda recidiva ou posterior; -Doentes adultos com linfoma difuso de grandes células B recidivante ou refratário após duas ou mais linhas de terapêutica sistémica (130,135).	08/2018 (31)
Tecartus® (brexucabtagene autoleucel)	Imunoterapia celular que contém células T autólogas, geneticamente modificadas <i>ex vivo</i> utilizando um vetor retroviral que codifica um CAR anti-CD19 composto por um scFv anti-CD19 ligado ao domínio co-estimulador CD28 e ao domínio sinalizador CD3-zeta (130,136).	Tratamento de: - Doentes adultos com linfoma de células do manto recidivante ou refratário após duas ou mais linhas de terapêutica sistémica, incluindo um inibidor da tirosina cinase de Bruton; - Doentes adultos com idade igual ou superior a 26 anos com leucemia linfoblástica aguda de células B precursoras recidivante ou refratária (130,136).	12/2020 (31)
Abecma® (idecabtagene vicleucel)	Células T autólogas modificadas geneticamente com lentivírus que codificam um CAR que reconhece o antigénio de maturação de células B (130,137).	Tratamento de doentes adultos com mieloma múltiplo recidivo ou refratário, que receberam pelo menos 3 terapias, incluindo: um agente imunomodulador, um inibidor do proteosoma e um anticorpo anti-CD38, e demonstraram progressão da doença na última terapia (130,137).	08/2021 (31)
Breyanzi® (lisocabtagene maraleucel)	Células autólogas, geneticamente modificadas, direcionado para CD19 que consiste em células T CD8 ⁺ e CD4 ⁺ purificadas. Foram transduzidas separadamente <i>ex vivo</i> utilizando um vetor lentiviral incompetente na replicação que expressa um CAR anti-CD19, que compreende um domínio de ligação de um scFv derivado de um anticorpo monoclonal de murino específico para CD-19 e uma porção do endodomínio 4-1BB co-estimulador e os domínios de sinalização da cadeia CD3 zeta e um recetor do fator de crescimento epidérmico truncado não funcional (130,138).	Tratamento de: - doentes adultos com linfoma difuso de grandes células B (LDGCB), linfoma de células B de alto grau, linfoma primário do mediastino de grandes células B (LPMGCB) e linfoma folicular de grau 3B (LF3B), que recidivaram nos 12 meses após a conclusão da quimioimunoterapia de primeira linha ou que são refratários à mesma. - doentes adultos com LDGCB, LPMGCB e LF3B refratários ou recidivantes, após duas ou mais linhas de terapêutica sistémica (130,138).	04/2022 (31)
Carvykti™ (ciltacabtagene autoleucel)	Células T autólogas geneticamente modificadas com um CAR direcionado ao antigénio de maturação de células B, que inclui dois anticorpos de domínio único ligados a um domínio coestimulador 4-1BB e a um domínio de sinalização CD3-zeta (130,139).	Tratamento de doentes adultos com mieloma múltiplo recidivante ou refratário que receberam pelo menos 3 terapias, incluindo: um agente imunomodulador, um inibidor do proteosoma e um anticorpo anti-CD38, e demonstraram progressão da doença na última terapia (130,139).	05/2022 (31)

- **Produtos à base de células derivadas de iPSCs**

A utilização de iPSCs pode apresentar risco de mutagênese por inserção (dependendo do protocolo de reprogramação celular) e oncogenicidade elevada devido à utilização de vetores que sofrem integração em algumas estratégias de indução de pluripotência. O risco de formação de tumores pode ser reduzido através da inclusão de um mecanismo de indução de suicídio (inserção de genes suicida) nas iPSCs, sendo este mecanismo confirmado *in vivo* (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

A reprogramação das células pode induzir alterações epigenéticas nas células, sendo que os efeitos destas alterações não são totalmente compreendidos. De modo para avaliar as alterações epigenéticas, devem ser realizados estudos pré-clínicos *in vitro* e/ou *in vivo* que demonstrem o comportamento e a função fisiológica das células a serem administradas nos humanos. Na possibilidade de serem observadas alterações a nível genético e/ou epigenético, o requente deve abordar possíveis problemas de segurança (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Os estudos de toxicidade devem englobar qualquer efeito adverso provocado pela administração das células (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

As primeiras linhas de iPSCs foram estabelecidas em 2006, sendo os primeiros ensaios clínicos desenvolvidos em 2014. Apesar disso, é surpreendente que exista tão pouco progresso no desenvolvimento de terapias com este tipo de células. A falta de progressos e de ensaios clínicos nesta área, pode ser atribuída à instabilidade genómica revelada nas iPSCs. No entanto, existem várias terapêuticas a ser desenvolvidas, assim como ensaios clínicos (Tabela 5.5), esperando-se um desenvolvimento e aceitação clínica mais prevalente no futuro (140).

Tabela 5.5 – Exemplos de ensaios clínicos com iPSCs.

Identificação do ensaio	Título	Fase	Condição	Observações
NCT05647213	iPSCs autólogas da linhagem cardíaca para doenças cardíacas congênitas.	I	Doença cardíaca congênita; coração univentricular; Falência cardíaca III ou IV	A recrutar (141)
NCT05886205	Gotas nasais de exossomas derivados de iPSCs para o tratamento de epilepsia focal refratária.	I	Epilepsia focal refratária	A recrutar (142)
NCT04339764	Estudo de fase I/II para o transplante autólogo de epitélio pigmentar da retina derivado de iPSCs para atrofia geográfica associada à degeneração macular relacionada com a idade.	I/II	Degeneração macular relacionada com a idade	A recrutar (143)
NCT04396899	Segurança e eficácia de miocárdio humano, derivado de células estaminais pluripotentes induzidas, como tecido biológico de assistência ventricular na insuficiência cardíaca terminal.	I/II	Insuficiência cardíaca	A recrutar (144)

- **Produtos à base de células derivados da edição genética**

Os produtos que contêm células modificadas geneticamente por edição genética, ou seja, com recurso a técnicas de edição como por exemplo, CRISPR-Cas e ZFNs seguem as mesmas orientações das células modificadas geneticamente. No entanto, devido às ferramentas de edição utilizadas, apresentam algumas particularidades (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Quando as nucleases de edição do genoma são expressas em células alvo, devem ser utilizadas estratégias de modo a minimizar a expressão em células não alvo. Isto inclui a expressão transitória da nuclease e um design apropriado do domínio de ligação ao DNA (no caso das ZFNs) e do sgRNA (no caso do sistema CRISPR/Cas), de modo a aumentar a seletividade das enzimas. Quando se pretende uma expressão transiente, deve ser demonstrada a ausência de atividade da enzima (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129,145).

A edição do genoma no local alvo deve ser totalmente caracterizada para estabelecer até que ponto o sítio alvo foi editado corretamente, sendo que avaliação de risco também irá depender das células alvo. Por isso, a

especificidade da atividade da enzima modificadora ou do sgRNA para a sequência genômica alvo, necessitam de ser confirmadas *in vitro* através da avaliação no alvo em células (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Existem alguns problemas associados à edição do genoma, nomeadamente mutações fora do local alvo e translocações cromossômicas indesejadas associadas às clivagens de DNA. Para além disso, deve ser avaliado o potencial de imunogenicidade pois, como as enzimas de edição do genoma são derivadas de proteínas não humanas, existe risco de reação por parte do sistema imunitário, devendo por isso ser avaliado (146).

5.2.3.2. Desenvolvimento clínico de produtos que contêm células geneticamente modificadas

Os ensaios clínicos devem ser desenhados de modo a permitir uma avaliação do benefício/risco, com base nas características do medicamento, população-alvo (caso a caso) e tratamentos existentes. Embora se apliquem os mesmos princípios a outros medicamentos em termos de caracterização farmacodinâmica, farmacocinética, segurança e eficácia, devem ser tidas em consideração as características distintivas dos medicamentos (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Normalmente, a entrega de células geneticamente modificadas é realizada por via percutânea, intravascular ou através de procedimentos cirúrgicos (por exemplo, utilização da cirurgia estereotáxica para aplicação no sistema nervoso). No desenho do ensaio clínico deve ser incluído todo o procedimento terapêutico, desde o momento da recolha das células (por exemplo, aspiração de medula óssea) e eventual medicação concomitante necessária (por exemplo, imunossupressores) para avaliar o benefício/risco (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

No caso das células geneticamente modificadas, a dose é definida pelo número de células geneticamente modificada por kg, m² de superfície corporal ou dose fixa. Na seleção da dose inicial, o objetivo é identificar a dose que é expectável ter efeito farmacológico e que apresente segurança na sua utilização. No entanto, a seleção da dose inicial pode ser complexa devido a incertezas nos estudos pré-clínicos *in vivo*, uma vez que existem vários fatores (por exemplo, diferenciação, persistência e imunogenicidade que podem diferir

entre espécies) que podem limitar o valor preditivo da farmacodinâmica pré-clínica, farmacocinética e determinação da dose. Nestes casos, é aceitável que a justificação para a dose inicial e intervalo de doses seja baseada nos dados que são considerados relevantes. A correlação entre a exposição e o efeito deve ser avaliada de modo a estabelecer um intervalo entre a dose efetiva e a dose recomendada, para posteriormente ser avaliada numa fase mais tardia dos ensaios clínicos (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Para além disso, na determinação da dose deve-se ter em consideração as características específicas do doente (por exemplo, etiologia da doença, histórico, idade, sexo, tratamentos anteriores e a quantidade de células tumorais no caso de doenças oncológicas) e as características específicas do produto (por exemplo tipo e origem das células, eficiências de transdução, viabilidade celular, potência, atividade biológica e expressão do gene/transgene) (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Apesar dos ATMPs, conforme definido no Artigo 2(1) do Regulamento 1394/2007 ou usados de acordo com o Artigo 2(d) da Diretiva 2001/20/CE não estarem abrangidos pela *Guideline on strategies to identify and mitigate risks for first-in-human and early clinical trials with investigational medicinal products* (EMA/CHMP/SWP/28367/07 Rev. 1), existem alguns princípios que devem seguir de modo a atenuar o risco. Um dos princípios que lhes são aplicáveis é o cumprimento dos períodos de espera adequados entre a primeira administração a um doente e aos doentes seguintes, de modo a avaliar potenciais situações de toxicidade aguda e permitir implementar regras de interrupção do estudo ou impedir o recrutamento de novos doentes (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Como descrito na *Guideline on human cell-based medicinal products* (EMA/CHMP/410869/2006), os estudos convencionais de ADME normalmente não são relevantes para células. Frequentemente os estudos farmacocinéticos relevantes para estes produtos incluem estudos de biodistribuição e persistência das células geneticamente modificadas, avaliação do nível de produção do gene terapêutico/transgene nos tecidos alvo e não alvo e cinética celular. Para além disso, devem ser realizados testes de imunogenicidade, uma vez, que podem ocorrer respostas imunitárias contra as células e/ou produtos transgénico e conseqüentemente, comprometer a eficácia e segurança do produto. O risco do produto desencadear uma resposta imunitária está intimamente relacionado com a origem das células transduzidas (origem alogénica *versus* autóloga),

natureza da doença (doente imunocompetente versus doente imunocomprometido, ausência total *versus* produto genético anormal), localização do produto transgênico (intracelular *versus* extracelular/secretado) e resposta imunitária pré-existente contra o produto transgênico (EMEA/CHMP/410869/2006) (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (38,129).

O desenvolvimento dos ensaios clínicos tem como objetivo demonstrar a eficácia e avaliar a duração do efeito terapêutico do produto, tendo em conta os resultados clinicamente relevantes para o efeito (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Nos ensaios de produtos de células geneticamente modificadas autólogas que são essenciais para avaliação de risco/benefício, todos os doentes que foram inscritos com a intenção de iniciar o tratamento, devem ser incluídos na análise de eficácia primária. Em alguns casos, a eficácia clínica pode ser avaliada após um período considerável pós-tratamento, dependendo da farmacologia do produto (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Se se pretender que a terapia das células geneticamente modificadas/produto de expressão do transgene/gene terapêutico apresente persistência e funcionalidade a longo prazo, isso deve ser refletido na duração e no *follow-up* do ensaio clínico. O desenho e a duração do *follow-up* devem ser especificados no protocolo e podem ser concluídos após a comercialização (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Relativamente à segurança clínica do produto, deve ser possível detetar eventos adversos relevantes de curto e médio prazo que possam estar associados ao procedimento de uso e/ou aplicação das células geneticamente modificadas e permitir uma avaliação de risco-benefício significativa (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

O risco de reações adversas tardias e a diminuição da eficácia das células geneticamente modificadas está relacionado com o vetor utilizado para a modificação genética da célula, com a natureza do produto genético, tempo de vida (persistência) das células modificadas, biodistribuição e potenciais efeitos nos órgãos em desenvolvimento. Quando é possível que ocorra persistência ao longo da vida de células-estaminais ou progenitoras geneticamente modificadas, deve-se ter especial atenção aos efeitos tardios associados ao vetor integrado e aos seus produtos expressos (por exemplo, oncogénese, imunogenicidade ou reativação do vetor) (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Tal como outros produtos de terapia gênica, o *follow-up* dos doentes deve permitir detetar reações adversas precoces ou tardias, mudanças no perfil de eficácia ou deteção de riscos adicionais desconhecidos. Deve ser tida em consideração a informação clínica e pré-clínica obtida do medicamento em investigação. Para além disso, a informação/ experiência com produtos semelhantes, deve ser considerada com precaução em relação à sua pertinência para o produto sob investigação. De acordo com o conhecimento atual, é recomendado um *follow-up* de 15 anos (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

- **Considerações clínicas para as CAR-T cells na hemato-oncologia**

A experiência clínica para as CAR-T cells é limitada por isso o CAT e o CHMP desenvolveram orientações que devem ser consideradas no desenvolvimento de terapias com as CAR-T cells (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Os estudos farmacocinéticos das terapias com CAR-T cells devem caracterizar a cinética celular, ou seja, os níveis de CAR-T cells, a sua expansão e persistência no sangue e nos tecidos-alvo em períodos temporais relevantes. Nos testes *in vivo* devem ser utilizados métodos bioanalíticos adequados de modo a avaliar a concentração plasmática máxima (C_{max}), tempo de semivida (T_½) e o tempo médio para atingir a concentração plasmática máxima (T_{max}). Para além disso, deve-se avaliar o impacto de tratamentos concomitantes, verificando potenciais interferências com as CAR-T cells, uma vez que a linfodepleção e os tratamentos imunomoduladores podem afetar a expansão, persistência ou função das CAR-T cells. Por exemplo, a linfodepleção antes da administração das CAR-T cells pode prevenir a rejeição pelo sistema imunitário, melhorar a expansão, persistência, atividade anti-tumoral e ainda, facilitar a persistência a longo prazo das CAR-T cells (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129,147).

Como as CAR-T cells proliferam no recetor, não é possível assumir uma relação linear entre a dose de CAR-T cells e a exposição. Para além disso estes produtos normalmente são administrados numa única infusão e por isso, a oportunidade para ajustar a dose após a administração é limitada. Deste modo, devem ser realizados vários estudos que permitam determinar a dose

e explorar a segurança, toxicidade e atividade anti-tumoral com diferentes doses, de modo a estabelecer qual a dose necessária para o efeito anti-tumoral, qual a dose recomendada ou intervalo de dose para os estudos de Fase II (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129,147).

As CAR-T *cells* ligam-se a antígenos específicos e por isso, vão influenciar a toxicidade e eficácia, limitando o potencial de extrapolar a dose efetiva ou o intervalo de dose, a partir de dados clínicos gerados com outras CAR-T *cells* (129).

Os princípios básicos utilizados para demonstrar a eficácia de outros medicamentos anticancerígenos são os mesmos para as CAR-T *cells* na hemato-oncologia. De acordo com as recomendações da EMA, devem ser realizados ensaios confirmatórios aleatorizados que permitam comparar a terapia CAR-T *cell* em estudo com outro(s) medicamento(s) de referência (por exemplo, dose de quimioterapia elevada seguida de transplante de células estaminais autólogas) para avaliar a eficácia destas terapias, pois permitem aumentar a qualidade resultante e minimizar o viés de seleção, que podem afetar o resultado (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (3,129,148,149).

As CAR-T *cells* apresentam um intervalo terapêutico estreito e, geralmente a partir de uma determinada dose provocam toxicidade aguda devido às suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Deve-se avaliar as causas subjacentes dos efeitos adversos, nomeadamente no que diz respeito aos procedimentos relacionados à produção das CAR-T *cells* (por exemplo, procedimento de aférese, mielossupressão/ linfodepleção e infeções) assim como ao próprio medicamento (EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 – corr) (129).

Os dados de segurança devem ser obtidos de forma a a) identificar os efeitos adversos esperados e inesperados com base nos dados pré-clínicos obtidos assim como nas experiências clínicas com outras CAR-T *cells*, b) planear a duração da hospitalização do doente quando são esperados efeitos adversos graves, c) definir qual o algoritmo para detetar e tratar toxicidade que apresente risco de vida e d) planear a duração dos estudos e do *follow-up* do

doente para detetar efeitos tóxicos tardios (EMA/CAT/GTWP/671639/2008
Rev. 1 – corr) (129).

5. CONCLUSÃO

Os Medicamentos de Terapia Avançada (ATMPs) são uma classe de produtos farmacêuticos que abrange os Medicamentos de Terapia Génica (MTG), Medicamentos de Terapia com Células Somáticas (MTCS), Produtos de Engenharia de Tecidos (PET), e ATMPs combinados (células ou tecidos associados a um dispositivo médico). Estes medicamentos apresentam um elevado potencial para curar doenças, através da reposição das funções dos tecidos afetados, quer seja pela regeneração, reparação ou pela substituição das células afetadas. Os ATMPs pretendem, deste modo, oferecer uma resposta terapêutica duradoura e transformadora, muitas vezes com apenas uma única administração. Contudo, devido à natureza destas terapias existem alguns desafios que impedem que estes medicamentos cheguem rapidamente aos doentes (3–5).

Uma das principais limitações no desenvolvimento de ATMPs é a falta e a complexidade da informação produzida durante a fase pré-clínica. Na fase pré-clínica, e após gerar a prova de conceito, o desafio inicia-se ao determinar a relação dose-resposta, tendo em conta os dados farmacocinéticos e farmacodinâmicos muitas vezes limitados. Para além disso, por vezes, o método de administração do ATMP pode ser invasivo ou necessitar de equipamentos especializados, conduzindo a problemas de segurança ou exigindo formação específica para que o medicamento seja administrado corretamente.

No que diz respeito à fase clínica dos ATMPs, ao contrário dos medicamentos convencionais, pode não ser viável, ou representar um obstáculo ético, realizar ensaios clínicos com placebo ou fazer a administração do ATMP em não doentes saudáveis, uma vez que estas terapias normalmente estão indicadas no tratamento de doenças raras e/ou potencialmente fatais. Não obstante, tal como outros produtos médicos, os ATMPs devem realizar os estudos farmacocinéticos, de mecanismo de ação e ensaios clínicos aleatorizados de acordo com a Diretiva 2001/20/CE. Outro obstáculo no desenvolvimento de ATMPs são os dados clínicos limitados devido ao reduzido número de doentes envolvidos nos ensaios clínicos e à falta de informação sobre a eficácia destas terapias a longo prazo. Estas limitações, fazem muitas vezes com que as entidades reguladoras apresentem obstáculos aos requerentes quando estes pretendem obter autorização de comercialização dos ATMPs.

Ao longo do tempo, as agências reguladoras têm demonstrado alguma flexibilidade nos ensaios clínicos com terapias avançadas, focando-se sobretudo na relação

risco/benefício que o medicamento pode trazer para a vida dos doentes. Para além disso, têm feito esforços para que os ATMPs cheguem mais rapidamente ao mercado, quer pela criação de vias de aceleração na produção destes medicamentos (por exemplo a introdução do esquema PRIME), quer pelo estabelecimento de *guidelines* específicas relativamente à autorização, supervisão e farmacovigilância destas terapias promissoras (1,11,23).

Finalmente, devido à sua complexidade de desenvolvimento e produção os ATMPs são consideravelmente mais caros que os medicamentos convencionais. Sendo que o elevado preço destas terapias representa outro desafio, nomeadamente para o financiamento e gestão dos sistemas de saúde.

Atualmente, os ATMPs representam uma área de grande interesse na investigação científica por representarem uma classe de produtos com potencial de curar a doença e capaz de alterar a história natural de doenças que, até agora, não apresentavam qualquer solução terapêutica, a não ser sintomática. Contudo, os ATMPs, continuam a representar um grande desafio para quem desenvolve estes medicamentos e para as entidades reguladoras, devido à sua incerteza clínica e ao risco que representam de um ponto de vista de sustentabilidade económica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Horgan D, Metspalu A, Ouillade M, Athanasiou D, Pasi J, Adjali O, et al. Propelling Healthcare with Advanced Therapy Medicinal Products: A Policy Discussion. *Biomed Hub*. 2020;5(3):1–23.
2. Flory E, Reinhardt J. European Regulatory Tools for Advanced Therapy Medicinal Products. *Transfus Med Hemotherapy*. 2013;40(6):409–12.
3. Iglesias-Lopez C, Agustí A, Vallano A, Obach M. Current landscape of clinical development and approval of advanced therapies. *Mol Ther - Methods Clin Dev*. 2021;23:606–18.
4. Champion A, Lewis S, Davies S, Hughes D. Managing access to advanced therapy medicinal products: Challenges for NHS Wales. *Br J Clin Pharmacol*. 2021;87(6).
5. Pizevska M, Kaeda J, Fritsche E, Elazaly H, Reinke P, Amini L. Advanced Therapy Medicinal Products' Translation in Europe: A Developers' Perspective. *Front Med*. 2022;9.
6. Committee for Advanced Therapies (CAT) - Rules of Procedure. EMA/CAT/454446/2008 rev. 5. European Medicines Agency; 2022.
7. Regulamento (CE) n.º 1394/2007 do Parlamento Europeu e do Conselho de 13 de Novembro de 2007. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*; 2007.
8. Hanna E, Rémuzat C, Auquier P, Toumi M. Advanced therapy medicinal products: current and future perspectives. *J Mark Access Heal Policy*. 2016;4(1).
9. Farkas A, Mariz S, Stoyanova-Beninska V, Celis P, Vamvakas S, Larsson K, et al. Advanced Therapy Medicinal Products for Rare Diseases: State of Play of Incentives Supporting Development in Europe. *Frontiers in Medicine*. 2017;4:1–6.
10. European Commission - Advanced therapies [Internet]. [citado 1 de Abril de 2023]. Disponível em: https://health.ec.europa.eu/medicinal-products/advanced-therapies_en
11. Rousseau C, Mačiulaitis R, Śladowski D, Narayanan G. Cell and Gene Therapies: European View on Challenges in Translation and How to Address Them. *Frontiers in Medicine*. 2018;5:1–6.
12. ASGCT (2021) Gene, Cell, & RNA Therapy Landscape [Internet]. [citado 8 de Abril de 2023]. Disponível em: <https://asgct.org/global/documents/asgct-pharma-intelligence-quarterly-report-july-20.aspx>
13. Wilsdon T, Armstrong H, Sablek A, Cheng P. Factors affecting the location of biopharmaceutical investments and implications for European policy priorities - Final Report. Charles River Associates; 2022. 81 p.

14. Directiva 2009/120/CE da Comissão de 14 de setembro de 2009 que altera a Directiva 2001/83/CE do Parlamento Europeu e do Conselho. Jornal Oficial da União Europeia; 2009.
15. Iglesias-Lopez C, Agustí A, Obach M, Vallano A. Regulatory Framework for Advanced Therapy Medicinal Products in Europe and United States. *Front Pharmacol.* 2019;10:14.
16. Agência descentralizada - Agência Europeia de Medicamentos (EMA) [Internet]. União Europeia; [citado 17 de Abril de 2023]. Disponível em: https://european-union.europa.eu/institutions-law-budget/institutions-and-bodies/institutions-and-bodies-profiles/ema_pt
17. Brody T. Regulatory Approval. 2nd ed. *Clinical Trials*. Elsevier; 2016. 781–828 p.
18. Regulamento(CEE) N.º 2309/93 do Conselho de 22 de Julho de 1993. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*; 1993.
19. What we do [Internet]. European Medicines Agency; [citado 17 de Abril de 2023]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/about-us/what-we-do>
20. O sistema regulador europeu de medicamentos: Uma abordagem coerente à regulação de medicamentos na União Europeia. EMA/716925/2016. *European Medicines Agency*; 2016.
21. Procedimentos de autorização de introdução no mercado (AIM) [Internet]. Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P. (INFARMED); [citado 23 de Abril de 2023]. Disponível em: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/autorizacao-de-introducao-no-mercado/procedimentos_de_aim
22. Detela G, Lodge A. EU Regulatory Pathways for ATMPs: Standard, Accelerated and Adaptive Pathways to Marketing Authorisation. *Mol Ther - Methods Clin Dev.* Junho de 2019;13:205–32.
23. PRIME: priority medicines [Internet]. European Medicines Agency; [citado 27 de Maio de 2023]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/prime-priority-medicines>
24. Committees - How the committees work [Internet]. European Medicines Agency; [citado 17 de Abril de 2023]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/committees/how-committees-work>
25. Who we are [Internet]. European Medicines Agency; [citado 23 de Abril de 2023]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/about-us/who-we-are>
26. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) [Internet]. European Medicines Agency; [citado 17 de Abril de 2023]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/committees/committee-medicinal-products-human->

use-chmp

27. Luria X, Schmidt B. Handbook about Regulatory Guidelines and Procedures for the Preclinical and Clinical Stages of Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs). 15–16 p.
28. European Medicines Agency recommends first gene therapy for approval [Internet]. European Medicines Agency; 2012 [citado 8 de Maio de 2023]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/news/european-medicines-agency-recommends-first-gene-therapy-approval>
29. Resumo das características do medicamento (Glybera). European Medicines Agency; 2017.
30. Glybera: overview [Internet]. European Medicines Agency; 2017 [citado 8 de Maio de 2023]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/glybera#overview-section>
31. CAT quarterly highlights and approved ATMPs - May 2023. EMA/CAT/247792/2023. European Medicines Agency; 2023. 1–4 p.
32. Directiva 90/385/CEE do Conselho de 20 de junho de 1990. Jornal Oficial das Comunidades Europeias; 1990.
33. López-Paniagua M, de la Mata A, Galindo S, Blázquez F, Calonge M, Nieto-Miguel T. Advanced Therapy Medicinal Products for the Eye: Definitions and Regulatory Framework. *Pharmaceutics*. 2021;13(3):347.
34. Wen R, Tao W, Li Y, Sieving P. CNTF and retina. *Prog Retin Eye Res*. 2012;31(2):136–51.
35. EudraLex: The Rules Governing Medicinal Products in the European Union, Volume 4, Good Manufacturing Practice - Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products. European Commission; 2017. 1–90 p.
36. Guideline on the risk-based approach according to annex I, part IV of Directive 2001/83/EC applied to Advanced therapy medicinal products. EMA/CAT/CPWP/686637/2011. European Medicines Agency; 2013. 1–18 p.
37. Guideline on safety and efficacy follow-up and risk management of Advanced Therapy Medicinal Products. EMEA/149995/2008 rev.1. European Medicines Agency; 2018. 1–18 p.
38. Guideline on human cell-based medicinal products. EMEA/CHMP/410869/2006. European Medicines Agency; 2008. 1–25 p.
39. McBlane J, Phul P, Sharpe M. Preclinical Development of Cell-Based Products: a European Regulatory Science Perspective. *Pharm Res*. 15 de Agosto de 2018;35(8):165.

40. ICH guideline S6 (R1) – preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. EMA/CHMP/ICH/731268/1998. European Medicines Agency; 1998. 1–22 p.
41. Umscheid C, Margolis D, Grossman C. Key Concepts of Clinical Trials: A Narrative Review. *Postgrad Med*. 13 de Setembro de 2011;123(5):194–204.
42. Hanna E, Rémuzat C, Auquier P, Toumi M. Advanced therapy medicinal products: current and future perspectives. *J Mark Access Heal Policy*. 25 de Janeiro de 2016;4(1):31036.
43. El-Kadiry A, Rafei M, Shammaa R. Cell Therapy: Types, Regulation, and Clinical Benefits. *Front Med*. 2021;8.
44. Aijaz A, Vaninov N, Allen A, Barcia R, Parekkadan B. Convergence of Cell Pharmacology and Drug Delivery. *Stem Cells Transl Med*. 2019;8(9):874–9.
45. Bravery C, Carmen J, Fong T, Oprea W, Hoogendoorn K, Woda J, et al. Potency assay development for cellular therapy products: an ISCT review of the requirements and experiences in the industry. *Cytotherapy*. Janeiro de 2013;15(1):9-19.e9.
46. Guideline on xenogeneic cell-based medicinal products. EMEA/CHMP/CPWP/83508/2009. European Medicines Agency; 2009. 1–14 p.
47. Lu L, Arbit H, Herrick J, Segovis S, Maran A, Yaszemski M. Tissue Engineered Constructs: Perspectives on Clinical Translation. *Ann Biomed Eng*. 2015;43(3):796–804.
48. Whomsley R, Palmi Reig V, Hidalgo-Simon A. Environmental risk assessment of advanced therapies containing genetically modified organisms in the EU. *Br J Clin Pharmacol*. 2021;87(6):2450–8.
49. Good Practice on the assessment of GMO related aspects in the context of clinical trials with AAV clinical vectors [Internet]. [citado 20 de Julho de 2023]. Disponível em: https://health.ec.europa.eu/system/files/2022-01/aavs_gp_en.pdf
50. Cascalho M, Platt J. Challenges and potentials of xenotransplantation. Em: *Clinical Immunology*. Elsevier; 2008. p. 1215–22.
51. Henriques D, Moreira R, Schwamborn J, Pereira de Almeida L, Mendonça L. Successes and Hurdles in Stem Cells Application and Production for Brain Transplantation. *Front Neurosci*. 2019;13.
52. Lathuilière A, Mach N, Schneider B. Encapsulated Cellular Implants for Recombinant Protein Delivery and Therapeutic Modulation of the Immune System. *Int J Mol Sci*. 8 de Maio de 2015;16(12):10578–600.
53. Ashimova A, Yegorov S, Negmetzhanov B, Hortelano G. Cell Encapsulation Within Alginate Microcapsules: Immunological Challenges and Outlook. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019;7.

54. Krishnan R, Ko D, Foster C, Liu W, Smink A, de Haan B, et al. Immunological Challenges Facing Translation of Alginate Encapsulated Porcine Islet Xenotransplantation to Human Clinical Trials. Em: Cell Microencapsulation: Methods and Protocols. Humana Press; 2017. p. 305–33.
55. Kumbala D, Zhang R. Essential concept of transplant immunology for clinical practice. World J Transplant. 2013;3(4):113.
56. Reflection paper on stem cell-based medicinal products. EMA/CAT/571134/2009. European Medicines Agency; 2011. 1–14 p.
57. Nóbrega C, Mendonça L, Matos C. Stem Cells and Tissue Regeneration. Em: Handbook of Gene and Cell Therapy. Springer Nature Switzerland AG; 2020. p. 104.
58. Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):68.
59. Stonebarger G, Bimonte-Nelson H, Urbanski H. The Rhesus Macaque as a Translational Model for Neurodegeneration and Alzheimer’s Disease. Front Aging Neurosci. 2021;13.
60. Salmikangas P, Schuessler-Lenz M, Ruiz S, Celis P, Reischl I, Menezes-Ferreira M, et al. Marketing Regulatory Oversight of Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs) in Europe: The EMA/CAT Perspective. Em 2015. p. 103–30.
61. McSweeney C, Mao Y. Applying Stereotactic Injection Technique to Study Genetic Effects on Animal Behaviors. J Vis Exp. 2015;(99):52653.
62. Ferreira G, Dijkstra F, Veening-Griffioen D, Boon W, Schellekens H, Moors E, et al. Translatability of preclinical to early clinical tolerable and pharmacologically active dose ranges for central nervous system active drugs. Transl Psychiatry. 2023;13(1):74.
63. Cunningham J, Ulbright T, Pera M, Looijenga L. Lessons from human teratomas to guide development of safe stem cell therapies. Nat Biotechnol. 2012;30(9):849–57.
64. Guideline on potency testing of cell based immunotherapy medicinal products for the treatment of cancer. EMA/CHMP/BWP/271475/2006 rev.1. European Medicines Agency; 2016. 1–8 p.
65. Disis M. Mechanism of Action of Immunotherapy. Semin Oncol. 2014;41:3–13.
66. Cerignoli F, Abassi Y, Lamarche B, Guenther G, Santa Ana D, Guimet D, et al. In vitro immunotherapy potency assays using real-time cell analysis. PLoS One. 2018;13(3):e0193498.
67. Circelli L, Tornesello M, Buonaguro F, Buonaguro L. Use of adjuvants for immunotherapy. Hum Vaccin Immunother. 2017;13(8):1774–7.
68. Reflection paper on clinical aspects related to tissue engineered products. EMA/CAT/573420/2009. European Medicines Agency; 2014. 1–7 p.

69. Khalil A, Jaenisch R, Mooney D. Engineered tissues and strategies to overcome challenges in drug development. *Adv Drug Deliv Rev.* 2020;158:116–39.
70. Lee M, Arcidiacono J, Bilek A, Wille J, Hamill C, Wonnacott K, et al. Considerations for Tissue-Engineered and Regenerative Medicine Product Development Prior to Clinical Trials in the United States. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010;16(1):41–54.
71. Joyce K, Buljovic Z, Rosic G, Kaszkin-Bettag M, Pandit A. Issues with Tissues: Trends in Tissue-Engineered Products in Clinical Trials in the European Union. *Tissue Eng Part B Rev.* 2023;29(1):78–88.
72. European Public Assessment Report for Chondrocelect. Procedure No. EMEA/H/C/000878. European Medicines Agency; 2009.
73. European Public Assessment Report for MACI. Procedure No. EMEA/H/C/002522/0000. (EMA/25287/2013). European Medicines Agency; 2013.
74. ChondroCelect Células autólogas de cartilagem, viáveis e caracterizadas, expandidas ex vivo, que expressam proteínas marcadoras específicas. (EMA/421074/2014). European Medicines Agency; 2014.
75. MACI: matrix applied characterised autologous cultured chondrocy. (EMA/282918/2013). European Medicines Agency; 2013.
76. Resumo das características do medicamento (Provenge). European Medicines Agency; 2015.
77. Holoclar: Células epiteliais autólogas de córnea humana expandidas ex vivo contendo células estaminais. (EMA/6865/2015). European Medicines Agency; 2015.
78. Resumo das características do medicamento (Zalmoxis). European Medicines Agency; 2016.
79. Spherox (esferoides de condrócito humanos autólogos associados por matriz): Um resumo sobre Spherox e porque está autorizado na UE. (EMA/326451/2021). European Medicines Agency; 2017.
80. Resumo das características do medicamento (Alofisel). European Medicines Agency; 2018.
81. Ebvallo (tabelecleucel): Um resumo sobre Ebvallo e porque está autorizado na UE. (EMA/852064/2022). European Medicines Agency; 2022.
82. Guideline on the quality, non-clinical and clinical aspects of gene therapy medicinal products. EMA/CAT/80183/2014. European Medicines Agency; 2018. 1–46 p.
83. Nóbrega C, Mendonça L, Matos C. Non-viral Vectors for Gene Therapy. Em: *Handbook of Gene and Cell Therapy*. Springer Nature Switzerland AG; 2020. p. 23–33.
84. Nóbrega C, Mendonça L, Matos C. Viral Vectors for Gene Therapy. Em: *Handbook of*

- Gene and Cell Therapy. Springer Nature Switzerland AG; 2020. p. 38–86.
85. Andreassen S. Molecular features of adenoid cystic carcinoma with an emphasis on microRNA expression. *APMIS*. Junho de 2018;126:7–57.
 86. Nóbrega C, Mendonça L, Matos C. Gene Therapy Strategies: Gene Silencing. Em: *Handbook of Gene and Cell Therapy*. Springer Nature Switzerland AG; 2020. p. 137–40.
 87. Li H, Yang Y, Hong W, Huang M, Wu M, Zhao X. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1).
 88. Nóbrega C, Mendonça L, Matos C. Gene Editing. Em: *Handbook of Gene and Cell Therapy*. Springer Nature Switzerland AG; 2020. p. 147–60.
 89. Reflection paper on management of clinical risks deriving from insertional mutagenesis. EMA/CAT/190186/2012. European Medicines Agency; 2013. 1–15 p.
 90. Guideline on the non-clinical studies required before first clinical use of gene therapy medicinal products. EMEA/CHMP/GTWP/125459/2006. European Medicines Agency; 2008. 1–10 p.
 91. Zu H, Gao D. Non-viral Vectors in Gene Therapy: Recent Development, Challenges, and Prospects. *AAPS J*. 2021;23(4):78.
 92. Nyamay'Antu A, Dumont M, Kedinger V, Erbacher P. Non-Viral Vector Mediated Gene Delivery: the Outsider to Watch Out For in Gene Therapy. *Cell Gene Ther Insights*. 2019;5(S1):51–7.
 93. Al-Jighefee H, Najjar H, Ahmed M, Qush A, Awwad S, Kamareddine L. COVID-19 Vaccine Platforms: Challenges and Safety Contemplations. *Vaccines*. 2021;9(10):1196.
 94. Sheridan C. First COVID-19 DNA vaccine approved, others in hot pursuit. *Nat Biotechnol*. 2021;39(12):1479–82.
 95. Eroglu B, Nuwarda R, Ramzan I, Kayser V. A Narrative Review of COVID-19 Vaccines. *Vaccines*. 2021;10(1):62.
 96. ICH S12 - Guideline on nonclinical biodistribution considerations for gene therapy products. EMA/CHMP/ICH/318372/2021. European Medicines Agency; 2023.
 97. Guideline on non-clinical testing for inadvertent germline transmission of gene transfer vectors. EMEA/273974/2005. European Medicines Agency; 2006. 1–8 p.
 98. Modlich U, Sürth J, Zychlinski D, Meyer J, Brendel C, Grez M, et al. Use of the in Vitro Immortalization Assay to Quantify the Impact of Integration Spectrum and Vector Design on Insertional Mutagenesis. *Blood*. 2011;118(21):3123–3123.
 99. ICH Considerations - General Principles to Address Virus and Vector Shedding.

- EMA/CHMP/ICH/449035/2009. European Medicines Agency; 2009. 1–7 p.
100. Resumo das características do medicamento (Imlygic). European Medicines Agency; 2016. 1–44 p.
 101. Resumo das características do medicamento (Strimvelis). European Medicines Agency; 2016. 1–27 p.
 102. Resumo das características do medicamento (Luxturna). European Medicines Agency; 2018. 1–39 p.
 103. Luxturna (voretigene neparvovec) - Um resumo sobre Luxturna e porque está autorizado na UE. EMA/831426/2018. European Medicines Agency; 2018.
 104. Resumo das características do medicamento (Zynteglo). European Medicines Agency; 2019. 1–45 p.
 105. Zynteglo (células autólogas enriquecidas com células CD34+ codificando o gene β A-T87Q-globina) - Um resumo sobre Zynteglo e porque está autorizado na UE. EMA/205979/2019. European Medicines Agency; 2019. 1–3 p.
 106. Zolgensma (onasemnogene abeparvovec) - Um resumo sobre Zolgensma e porque está autorizado na UE. EMA/678785/2022. European Medicines Agency; 2022. 1–3 p.
 107. Resumo das características do medicamento (Zolgensma). European Medicines Agency; 2020. 1–48 p.
 108. Resumo das características do medicamento (Libmeldy). European Medicines Agency; 2020. 1–51 p.
 109. Resumo das características do medicamento (Skysona). European Medicines Agency; 2021. 1–43 p.
 110. Resumo das características do medicamento (Upstaza). European Medicines Agency; 2022. 1–33 p.
 111. Assessment report - Upstaza. EMA/CHMP/571076/2022. European Medicines Agency; 2022. 1–132 p.
 112. Resumo das características do medicamento (Roctavian). European Medicines Agency; 2022. 1–47 p.
 113. Resumo das características do medicamento (Hemgenix). European Medicines Agency; 2023. 1–47 p.
 114. ICH Considerations - oncolytic viruses. EMA/CHMP/ICH/607698/2008. European Medicines Agency; 2009. 1–6 p.
 115. Ma R, Li Z, Chiocca E, Caligiuri M, Yu J. The emerging field of oncolytic virus-based cancer immunotherapy. Trends in Cancer. Fevereiro de 2023;9(2):122–39.

116. First oncolytic immunotherapy medicine recommended for approval: Advanced therapy medicine Imlygic indicated to treat certain stages of melanoma. (EMA/CHMP/692401/2015). European Medicines Agency; 2015. 1–3 p.
117. Ferrucci P, Pala L, Conforti F, Cocorocchio E. Talimogene Laherparepvec (T-VEC): An Intralesional Cancer Immunotherapy for Advanced Melanoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(6):1383.
118. Talimogene laherparepvec (Imlygic) [Internet]. Understanding Cancer Immunotherapy Research; 2023 [citado 23 de Julho de 2023]. Disponível em: <https://www.ucir.org/immunotherapy-drugs/laherparepvec>
119. Yun C, Hong J, Yoon A. Current clinical landscape of oncolytic viruses as novel cancer immunotherapeutic and recent preclinical advancements. *Front Immunol*. 2022;13.
120. DNX-2440 Oncolytic Adenovirus for Recurrent Glioblastoma [Internet]. [citado 23 de Julho de 2023]. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT03714334>
121. First in Man Clinical Study to Evaluate Safety and Tolerability of an Oncolytic Adenovirus in Prostate Cancer Patients. [Internet]. [citado 23 de Julho de 2023]. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04097002?term=NCT04097002&draw=1&rank=1>
122. A Phase I/II Trial Investigating LOAd703 in Combination With Atezolizumab in Malignant Melanoma [Internet]. [citado 23 de Julho de 2023]. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04123470>
123. Study of RP3 Monotherapy and RP3 in Combination With Nivolumab in Patients With Solid Tumours [Internet]. [citado 23 de Julho de 2023]. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04735978>
124. OH2 Oncolytic Viral Therapy in Pancreatic Cancer [Internet]. [citado 23 de Julho de 2023]. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04637698>
125. Gene Therapy in Treating Patients With Colon Cancer That Has Spread to the Liver [Internet]. [citado 23 de Julho de 2023]. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00012155>
126. GL-ONC1 Oncolytic Immunotherapy in Patients With Recurrent or Refractory Ovarian Cancer [Internet]. [citado 23 de Julho de 2023]. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02759588>
127. Study of TG6002 (VV TK-RR-FCU1) in Combination With 5-FU in Patients With Advanced Gastro-intestinal Tumors [Internet]. [citado 23 de Julho de 2023]. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03724071>
128. Hepatocellular Carcinoma Study Comparing Vaccinia Virus Based Immunotherapy Plus

- Sorafenib vs Sorafenib Alone (PHOCUS) [Internet]. [citado 23 de Julho de 2023]. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02562755>
129. Guideline on quality, non-clinical and clinical aspects of medicinal products containing genetically modified cells. EMA/CAT/GTWP/671639/2008 Rev. 1 - corr. European Medicines Agency; 2020. 1–34 p.
 130. Heelan B. History of Gene Therapy Products. Em: Handbook of Cell and Gene Therapy: From Proof-of-Concept through Manufacturing to Commercialization. CRC Press; 2023. p. 1–10.
 131. First two CAR-T cell medicines recommended for approval in the European Union [Internet]. European Medicines Agency; 2018 [citado 8 de Maio de 2023]. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/news/first-two-car-t-cell-medicines-recommended-approval-european-union>
 132. Relatório público de avaliação - Yescarta. Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (INFARMED); 2021.
 133. CAR T Cells: Engineering Patients' Immune Cells to Treat Their Cancers [Internet]. National Cancer Institute; 2022 [citado 15 de Maio de 2023]. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells>
 134. Resumo das características do medicamento (Yescarta). European Medicines Agency; 2018.
 135. Resumo das características do medicamento (Kymriah). European Medicines Agency; 2018.
 136. Resumo das características do medicamento (Tecartus). European Medicines Agency; 2022.
 137. Abecma (idecabtagene vicleucel): An overview of Abecma and why it is authorised in the EU. (EMA/614446/2021). European Medicines Agency; 2021.
 138. Resumo das características do medicamento (Breyanzi). European Medicines Agency; 2022.
 139. Carvykti (ciltacabtagene autoleucel): An overview of Carvykti and why it is authorised in the EU. (EMA/233731/2022). European Medicines Agency; 2022.
 140. Kim J, Nam Y, Rim Y, Ju J. Review of the Current Trends in Clinical Trials Involving Induced Pluripotent Stem Cells. Stem Cell Rev Reports. 2022;18(1):142–54.
 141. Autologous Induced Pluripotent Stem Cells of Cardiac Lineage for Congenital Heart Disease [Internet]. [citado 22 de Agosto de 2023]. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05647213>
 142. Induced Pluripotent Stem Cell Derived Exosomes Nasal Drops for the Treatment of Refractory Focal Epilepsy [Internet]. [citado 22 de Agosto de 2023]. Disponível em:

https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT05886205?show_xprt=Y

143. Autologous Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium for Geographic Atrophy Associated With Age-Related Macular Degeneration [Internet]. [citado 22 de Agosto de 2023]. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04339764?cond=%22Retinal+Degeneration%22>
144. Safety and Efficacy of Induced Pluripotent Stem Cell-derived Engineered Human Myocardium as Biological Ventricular Assist Tissue in Terminal Heart Failure (BioVAT-HF) [Internet]. [citado 22 de Agosto de 2023]. Disponível em: <https://classic.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04396899>
145. Haig N, Valeich L, Do C, Marculescu R, Wang J, Fisher B, et al. Analytical Methods for In-Process Testing and Product Release. Em: Handbook of Cell and Gene Therapy: From Proof-of-Concept through Manufacturing to Commercialization. CRC Press; 2023. p. 104–5.
146. Yamaguchi T, Uchida E, Okada T, Ozawa K, Onodera M, Kume A, et al. Aspects of Gene Therapy Products Using Current Genome-Editing Technology in Japan. Hum Gene Ther. 1 de Outubro de 2020;31(19–20):1043–53.
147. Dasyam N, George P, Weinkove R. Chimeric antigen receptor T-cell therapies: Optimising the dose. Br J Clin Pharmacol. 24 de Setembro de 2020;86(9):1678–89.
148. Banerjee R, Prasad V. Characteristics of Registered Studies of Chimeric Antigen Receptor Therapies: A Systematic Review. JAMA Netw Open. 2021;4(7):e2115668.
149. Lim C, In J. Randomization in clinical studies. Korean J Anesthesiol. 2019;72(3):221–32.