

1. KRATEK OPIS IN NAMEN PROJEKTA

Sindrom CTNNB1 je redka nevrorazvojna motnja, ki jo povzročajo de novo mutacije, ki vodijo v izgubo funkcije enega alela gena *CTNNB1* (Tucci V in sod. 2014-, Miroševič Š in sod. 2022). Sindrom je trenutno diagnosticiran pri približno 500 bolnikov, vendar je verjetno ta številka višja zaradi pogoste napačne diagnoze cerebralne paralize. Incidenca bolezni je približno 1-1,6 na 50.000 ljudi. Sindrom CTNNB1 se kaže z vrsto simptomov, vključno s hipotonijo, spastičnostjo, duševno zaostalostjo, mikrocefalijo, motnjami vida (FEVR; Familial Exudative Vitreoretinopathy), vedenjskimi nepravilnostmi in progresivnim motoričnim upadanjem. Za razliko od statičnih stanj, kot je možganska paraliza, je sindrom CTNNB1 progresivna bolezen (Miroševič Š in sod. 2022). Gen *CTNNB1* (*Catenin Beta 1*) kodira protein β -katenin, protein, ki je ključen za celično adhezijo in Wnt signalno pot, bistveno za razvoj zarodka, celičnega povezovanja ipd (Liu J in sod. 2022; Zhuang W in sod. 2023).

URBAGEN (rAAV9-CTNNB1) je rekombinantni, virusni klinični vektor na osnovi adenovirusom pridruženega virusa serotipa 9 (rAAV9), ki kodira človeški gen *CTNNB1*. Terapija je zasnovana kot enojna, sterilna kirurška cerebrointraventrikularna (ICV) infuzija virusnega pripravka z namenom vzpostavitve ponovne proizvodnje β -katenina v nevronih. Vektor rAAV9-CTNNB1 omogoča ciljno dostavo v centralni živčni sistem (CŽS), s posledičnim prehodom krvno-možganske bariere in zagotavljanjem izražanja gena *CTNNB1*. URBAGEN je bil proizveden v skladu s smernicami dobre proizvodne prakse (ang. GMP; Good Manufacturing Practice) v podjetju Viralgen (Španija) in je prešel čez vsa potrebna testiranja (*in vitro* in *in vivo*), skladno z vsemi smernicami Evropske agencije za zdravila (ang. EMA; European Medicinal Agency) za določitev učinkovitosti, varnosti, biodistribucije in potencialne toksičnosti. Na osnovi podatkov je CTNNB1 fundacija zaprosila Javno agencijo za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP) za dovoljenje za izvajanje klinične študije (GAIN-CTNNB1) za preverjanje varnosti in terapevtske učinkovitosti zdravila URBAGEN na pacientih s sindromom CTNNB1. rAAV9 so enoverižni DNA virusni vektorji, ki jih uporabljajo v genski terapiji in raziskavah za vnos genetskega materiala v celice (Naso MF in sod. 2017). Predvsem so virusi AAV primerni za aplikacije *in vivo*, ker se virusni genom načeloma ne integrira v gostiteljski genom in ker za človeka niso patogeni, saj do sedaj ni nobenih poročil o tem, da AAV povzročajo bolezni. Imajo pa manjšo zmožnost za vstavev tuje DNA (do 4,8 kb) (Maurya S. in sod. 2022; Wang D. in sod. 2019).

Namen namernega sproščanja GSO v okolje je torej izvedba klinične študije na pediatričnih pacientih (starost 2-12 let) s sindromom CTNNB1, ki se bo izvajala na Pediatrični kliniki Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. URBAGEN je torej pripravljen v Viralgnu, dostavljen s transportno službo v UKC v LJUBLJANA, kjer se ga skladišči v Lekarni UKC Ljubljana in na dan operacije ustrezno pripravi (redčitev z ustreznim pufrom, napolnitev kirurškega katetra) v za to namenjenih prostorih, registriranih za delo z GSO.

2. ZNAČILNOSTI GSO IN NAMERAVANEGA NAMERNEGA SPROŠČANJA V OKOLJE

2.1 Lastnosti prejemnega ali starševskega organizma

2.1.1 Rekombinantni virus AAV9

Adenovirusom pridruženi virusi (AAV) so enoverižni DNA virusi, ki spadajo v družino *Parvoviridae*. Njihov življenjski cikel je odvisen od prisotnosti pomožnega virusa, kot je adenovirus (AdV), od koder tudi izhaja njihovo ime in taksonomska klasifikacija (Weitzman in sod. 2019; Li in sod. 2011). Trenutno velja, da AAV ne povzroča nobene človeške bolezni, se pa pri določenih posameznikih pojavljajo protitelesa proti AAV, ki lahko negativno vplivajo na uspešen izid terapije z AAV9 vektorji. Sestavljen je iz ikozaedrične proteinske ovojnice in enoverižnega DNA

genoma velikosti približno 4,7 kb. Genom kodira zapis za gena *rep* in *cap* in je na koncih obdan z dvema obrnjenima terminalnima ponovitvama (ITR), ki služita kot signal za pakiranje genoma. Gen *rep* kodira zapis za štiri beljakovine, ki so potrebne za razmnoževanje virusa (Rep78, Rep68, Rep52 in Rep40). Gen *cap* kodira zapis za tri virusne strukturne proteine, ki tvorijo ovojnico (VP1, VP2 in VP3) in dodaten gen, ki kodira zapis za proteinski faktor aktivacije sestavljanja (angl. assembly-activating protein, AAP) virusnih delcev. Virusi AAV se vežejo na površinske receptorje tarčnih celic, kar sproži njihovo endocitozo in episomalno prepisovanje genov (Weitzman in sod. 2019; Li in sod. 2011). Serotip AAV9 izkazuje močan tropizem za celice živčnega sistema. Virus AAV9 se veže na končno galaktozo površinskih glikoproteinov in na laminin receptor LamR (Patalli in sod. 2019).

V osnovi so rekombinantni adenovirusom pridruženi rekombinantni virusni vektorji (rAAV) sestavljeni iz enake zaporednosti in strukture ovojnice kot divji tip AAV, vendar pa sta regiji *rep* in *cap* izbrisani iz genoma. V vektorju rAAV imamo tako prisotne samo virusne obrnjene terminalne ponovitve ITR, ki so potrebni za nadzor replikacije in pakiranja genoma med proizvodnjo rAAV. Popolna odstranitev virusnih kodirajočih regij povečuje pakirno zmogljivost vektorjev rAAV in prispeva k njihovi nizki imunogenosti in citotoksičnosti ob dostavi *in vivo* (Maurya S. in sod.2022; Wang D. in sod.2019; Weitzman MD in sod.2011; Li C. in sod.2020; Pattali R. in sod. 2019).

). Z uporabo standardnih molekularnih metod kloniranja lahko med virusne regije ITR kodirane na prenosnem plazmidu vstavimo različne promotorske regije (npr. CMV, EF1a, PGK itd.) in želene terapevtske proteine, ki se končajo z repom poly(A). Vektor rAAV so uporabili v številnih kliničnih študijah (<https://clinicaltrials.gov/>). Genske terapije na osnovi vektorjev rAAV, kot sta Luxturna® in Zolgensma®, so odobrili s strani ameriške Organizacije za hrano in zdravila (FDA) za zdravljenje Leberjeve kongenitalne amavroze tipa 2 (LCA2) in spinalne mišične atrofije (SMA) (Maurya S. in sod.2022; Li C. in sod.2020; Pattali R. in sod. 2019).

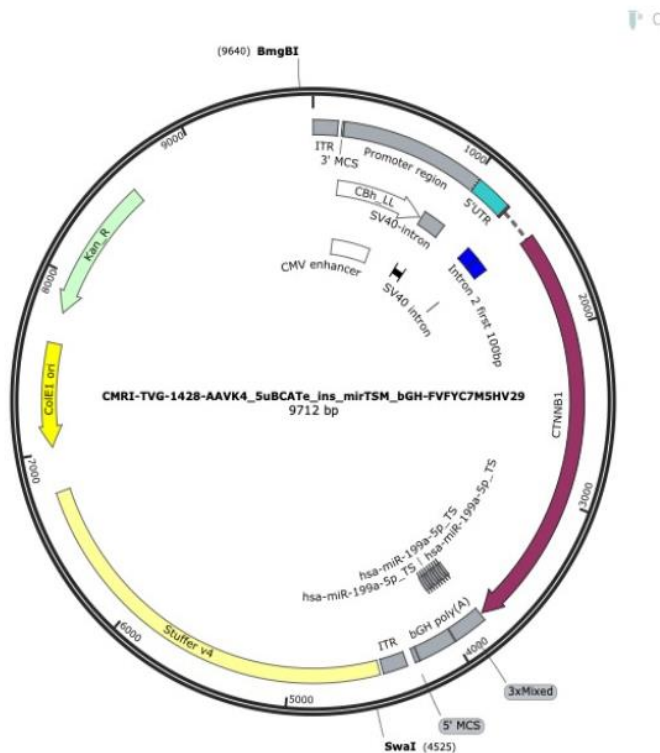
Vektor rAAV9 običajno pripravimo v celicah HEK293 ob kotransfekciji plazmida za izražanje genov *rep* in *cap* ter ekspresijskega vektorja AAV9 po ultracentrifugiranju celičnih lizatov in supernatanta. Virusi rAAV9-CTNNB1 (URBAGEN) so bili proizvedeni v skladu z GMP v podjetju Viralgen.

2.2 Lastnosti vektorja

Vektor rAAV9 je rekombinantni klinični vektor, ki mu je bil odstranjen lastni genom (geni *rep* in *cap*), ostale so le domene ITR. Namesto genov *rep* in *cap* je vstavljena kaseta za izražanje transgena, to je človeški gen *CTNNB1* z dodatnimi regulatornimi regijami z namenom izražanja proteina β -katenina v transduciranih celicah.

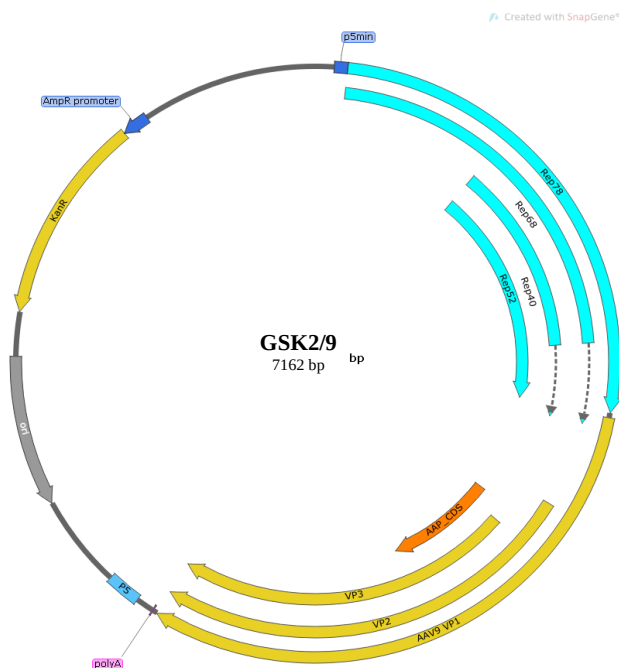
Vektor rAAV9-CTNNB1 (URBAGEN) je proizveden pod pogoji GMP s strani španskega podjetja Viralgen Vector Core, S.L.U (Španija, San Sebastian). Viralgen bo pripravil URBAGEN pod pogoji GMP s PEI osnovano kotransfekcijo celic HEK293 Pro10™ z naslednjimi plazmidi (prav tako proizvedeni pod pogoji GMP):

- **pTR_KAN.CTNNB1** (proizvajalec Aldevron). pTR_KAN.CTNNB1 je plazmid, ki dejansko vsebuje zaporedja ITR in genomsko zaporedje transgena. Znotraj genoma AAV ITR-ji služijo kot izvor replikacije in so potrebni za replikacijo, pakiranje in obstojnost vektorja. Delujejo skupaj z virusnima proteinoma *rep* (replikacija) in *cap* (kapsida), ki se vežeta na ITR-je in sprožita replikacijo. ITR-ji so cis-delujoči elementi, kar pomeni, da so v isti molekuli DNK kot gen, ki ga pakirajo. V prenosnem plazmidu transgen obdajata dva ITR-ja, ki se skupaj z genom ohranita v rekombinantnem vektorju AAV (rAAV), vse ostalo zunaj ITR-jev ne tvori rAAV. pTR_KAN-CTNNB1 je izdelala avstralska raziskovalna skupina CMRI za kar je vložena tudi patentna prijava (International Publication Number WO 2025/094056 A1). Plazmid pTR_KAN.CTNNB1 vsebuje rekombinantni genom AAV9, ki obsega sintetični promotor CBh, zaporedje človeške DNA gena *CTNNB1* s pripadajočimi regulacijskimi regijami in poliadenilacijsko zaporedje, vse omejene s terminalnimi ponavljajočimi se elementi (ITR) (slika 1)



Slika 1: Mapa plazmida pTR_KAN.CTNNB1

- **Rep2/Cap9 plazmidom pGSK2/9** (proizvajalec Viralgen). Plazmid pGSK2/9 (slika 2) je plazmid za izražanje genov *rep* in *cap*, ki omogočajo razmnoževanje virusa ter nastanek strukturnih proteinov. Trans plazmid (pakirni konstrukt) pGSK2/9 vsebuje gen rep AAV2 in gen kapsidnega proteina iz AAV9.



Slika 2: Mapa plazmida pGSK2/9, pomemben za pakiranje virionov

- **Adeno Helper pXX680** (proizvajalec Viralgen). Plazmid pXX680 (slika 3) vsebuje esencialne adenovirusne pomožne gene E2a, E4 in VA pod njihovimi endogenimi promotorji, vendar mu manjkajo esencialni adenovirusni strukturni in replikacijski geni za tvorbo adenovirusa.



Slika 3: Mapa plazmida pXX680; helper plazmid

Sam AAV9-CTNNB1 deluje kot vektor, ki bo v transducirane celice v kliničnem preizkušancu vnesel zapis za izražanje proteina β -katenin. rAAV9-CTNNB1 se izolira iz lizata celic, ki se ga tretira z dofamin bromidom (za odstranitev preostale DNA), sledi filtracija za odstranitev celičnega debrisa. Sledi nadaljnjo čiščenje z imunoafinitetno kromatografijo. Z iodixanol gradientnim ultracentrifugiranjem se loči polne kapside od praznih. Sledi še končno čiščenje z ionsko izmenjevalno kromatografijo. Končno je opravljeno rigorozno QC analiza, pri kateri se določa vsebnost endotoksina, kontaminacija z DNA (celične in plazmidne, določitev kontaminacije s helper plazmidom), mikoplazmami, določitev integritete kapsid (ELISA), določitev titra (ddPCR, qPCR), verodostojnost (NSG) ipd. Podjetje Viralgen je izdalo ustrezen certifikat ustreznosti in kakovosti.

2.2.1 Rekombinantni AAV9-CTNNB1 vektor

Rekombinantni vektor AAV9-CTNNB1 (Urbagen; slika 4) (pridobljen s kotranfekcijo celic HEK293 Pro10™ s plazmidi), osnovan na podlagi sekvence divjega tipa AAV9, sestavljajo naslednji vključki:

- **Virusna obrnjena terminalna ponovitev (ITR)**

Virusne obrnjene terminalne ponovitve omogočajo pakiranje genoma v vektor ter nadzorujejo replikacijo virusa. Ker so odstranjeni geni *Rep* in *Cap* so virioni posledično replikativno nezmožni. ITR so simetrična 145-nukleotidna zaporedja, ki obdajajo konce enoverižnega genoma DNA AAV. V vektorskem plazmidu AAV obdajajo gen, ki nas zanima (transgen). Posamezni ITR je sestavljen iz palindromskih krakov (A-A', B-B' in C-C'), ki dajejo značilno obliko črke T. Razporeditev palindromskih zaporedij B-B' in C-C' določa orientacijo ITR, ki je lahko »flip« ali »flop«. Poleg tega ITR vsebuje 4-nukleotidni vezavni element Rep (RBE), ki služi kot vezavno mesto za Rep78 in Rep68 za začetek replikacije, in terminalno mesto ločljivosti, ki služi kot ciljno mesto za proteine Rep (Savy in sod. 2017). ITR-ji služijo kot izvor replikacije in so potrebni za replikacijo, pakiranje in obstojnost vektorja. Delujejo skupaj z virusnima proteinoma rep (replikacija) in cap (kapsida), ki se vežeta na ITR-je in sprožita replikacijo. ITR-ji so cis-delujoči elementi,

kar pomeni, da so v isti molekuli DNK kot gen, ki ga pakirajo. V prenosnem plazmidu transgen obdajata dva ITR-ja, ki se skupaj z genom ohranita v rekombinantnem vektorju AAV (rAAV), vse ostalo zunaj ITR-jev ne tvori rAAV.

Zaporedje 5' ITR

TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGAC
GCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACT
CCATCACTAGGGGTTCT

Zaporedje 3' ITR

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCC
CGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC
AGAGAGGGAGTGGCCAA

- **CBh promotor**

Promotor CBh (ang. cytomegalovirus/chicken beta-actin) izhaja iz virusa iz redu Cytomegalovirus in je ojačen s piščančjim β -aktinskim promotorjem. Zaporedje uporabljajo za izražanje različnih rekombinantnih genov (ZKBS; Yohari JB. In sod. 2022). CBh promotor kontrolira izražanje transgena v virusnem vektorju. Promotor CBh se pogosto uporablja v rAAV9, ki je namenjen za transdukcijo nevronov, saj je dokazano, da je nivo izražanja transgena v nevronih večje v primerjavi z drugimi promotorji (Gray in sod. 2011; Matsuzaki in sod. 2024).

Zaporedje CBh promotorja:

TCCTGCAGGCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATA
GCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAAC
GACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCAT
TGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATG
CCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACAT
GACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGTGCGAGG
CCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTT
TAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGG
GGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCT
CCGAAAGTTTCCTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGG
CGGGCGGGAGCAAGCTTGAAGTAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAAGTTTGTCTTTTGTCTTTT
ATTTCAAGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGAAATCAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTA
CTTCTAGGCCTGTACGGAAGTGTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTAC

- **Človeški gen CTNNB1**

Človeški transgen CTNNB1 (ang. Catenin Beta 1) (Mirošević Š in sod 2022) izhaja iz človeka in kodira nastanek proteina β -katenin, ki je igra pomembno vlogo v signalizaciji Wnt, tvorbi celičnih stikov ter sodeluje pri organogenezi, medcelični signalizaciji in komunikaciji. Človeški gen *CTNNB1* iz vektorja URBAGEN se uporablja za gensko nadomestno terapijo za zdravljenje sindroma CTNNB1 (Mirošević in sod. 2022). V vektorju je vključen še del drugega introna gena CTNNB1 ter 5'UTR regija gena CTNNB1 za povečano in kontrolirano izražanje transgena iz AAV9. Vključitev teh dodatnih regulatornih domen služi povečanju izražanja tarčnega proteina, preko iniciacije učinkovite translacije proteina z vezavo ribosomalnih proteinov na mesto UTR (Cao in sod. 2021). Vključitev dela introna prav tako služi za povečanje učinkovitosti izražanja transgena, prav tako pa bi naj delovali na stabilizacijo prepisane mRNA.

To izboljšanje je posledica več dejavnikov: povečane stopnje transkripcije, izboljšanega jedrnega izvoza, povečane stabilnosti transkriptov in učinkovitejšega prevajanja mRNA (Lu in sod. 2017)

Zaporedje človeškega gena *CTNNB1*:

ATGGCTACGCAGGCTGACCTGATGGAAGTGGATATGGCGATGGAACCGGATCGCAAGGCCGCCG
TCTCTCATTGGCAACAGCAATCATATCTCGATTGAGGATTCACAGCGGGGCAACAACAACTGCAC
CGTCCCTCAGCGGCAAGGGTAACCCAGAAGAGGAAGACGTCGACACAAGCCAGGTGCTCTACGA
ATGGGAGCAAGGGTTCAGCCAATCTTTTACCCAGGAGCAGGTGGCCGACATAGACGGGCAATACG
CCATGACAAGGGCCCAACGGGTGAGGGCCGCCATGTTTCCAGAAACGCTCGACGAAGGCATGCA
AATTCCCTCAACTCAATTCGACGCCGCACACCCAACCAACGTGCAAAGACTGGCCGAGCCCAGTC
AAATGCTCAAGCACGCGGTAGTGAATCTGATCAATTACCAGGACGACGCTGAGCTGGCTACTAGA
GCCATACCCGAGCTTACTAAGCTTCTGAACGATGAAGATCAAGTAGTCGTGAACAAAGCAGCGGTA
ATGGTTCACCAACTCAGCAAGAAAGAGGCAAGCCGTCATGCCATTATGAGGTACCCGCAAAATGGTT
TCAGCAATCGTGAGAACTATGCAAAACACCAACGACGTGGAACCGCAAGATGCACAGCGGGCAC
TCTGCACAATCTCTCTCACCACCGCGAAGGGCTCCTTGCAATTTTCAAATCCGGTGGAATCCCGGC
TCTTGTCAGATGTTAGGGTCCCCTGTCGACAGCGTTCTTTTCTACGCGATCACTACACTGCATAAT
CTCCTCTTGACCAAGAAGGGGCCAAGATGGCTGTACGGCTGGCCGCGGTTTACAAAAGATGGT
GGCGCTCCTGAATAAGACCAACGTGAAGTTTCTGGCCATCACAACGGATTGTCTGCAGATCCTGGC
CTACGGAAATCAGGAGTCCAAACTGATTATTTTGGCCAGCGGCGGCCCGCAGGCACTTGTCAACA
TCATGCGCACGTACACCTATGAGAAGCTCCTCTGGACAATTCTCGCGTCTCAAAGTCTTGAGCG
TGTGTTCCAGCAACAAACCAGCCATCGTTGAGGCCGGCGGCATGCAGGCCCTGGGCCTTCATCTC
ACTGACCCCTCCAGAGGCTGGTGCAAATTGCCTCTGGACCCTGCGTAACCTGTCCGACGCAGC
CACAAAGCAAGAGGGCATGGAAGGGCTGCTGGGAACACTGGTCCAATTACTCGGGAGTGACGACA
TTAACGTCGTGACTTGCGCCGCAGGCATCCTGTCCAACCTGACcTGcAACAACACTACAAGAAcAAgAT
GATGGTgTGTCAGGTTGGCGGCATCGAAGCATTAGTCCGGACGGTTCTCAGAGCAGGGGATCGAG
AGGATATTACAGAACCAAGCTATTTGCGCGCTCCGACACCTTACAAGTAGACATCAGGAAGCCGAAA
TGGCGCAAACGCTGTCCGACTGCATTACGGGCTGCCCCTGGTCTGTCAAATTACTTCATCCGCCCT
CACATTGGCCCCCTTATCAAAGCCACCGTAGGCCTTATCAGAACTTGGCACTCTGCCCTGCTAACC
ACGCTCCCCTGAGAGAACAAGGAGCAATACCGAGATTAGTACAACCTGCTGGTGCGCGCGCACCAA
GACACACAACGGCGCACTAGTATGGGCGGCACCCAACAACAGTTCTGTCGAAGGAGTTCCGATGGA
AGAGATTGTAGAGGGCTGCACTGGCGCACTCCATATTTTGGCCAGAGACGTCCATAATCGGATAGT
AATACGCGGGTTGAACACGATCCCTCTGTTCTGTCGAATTGCTGTACAGTCCTATAGAGAATATTAG
AGGGTGGCCGCTGGCGTGCTTTGCGAGTTGGCCCAAGATAAAGAGGCCGCTGAGGCCATCGAGG
CAGAAGGCGCTACCGCGCCCCTCACTGAACTGTTGCATAGTCGGAACGAGGGAGTAGCTACCTAC
GCTGCAGCCGTGCTGTTTCGCATGTCAGAAGATAAACCGCAGGACTATAAGAAGCGACTGTCTGT
GGAACCTTACTTCCAGTCTGTTTCGGAAGTGAACCTATGGCGTGGAACGAAACAGCAGACTTGGGCCT
GGACATCGGAGCTCAAGGTGAGCCATTAGGCTACAGGCAAGACGACCCAAGTTACCGGTCTCTCC
ATTCCGGCGGCTACGGTCAAGACGCTCTGGGCATGGACCCAATGATGGAGCACGAAATGGGTGG
ACATCATCCAGGAGCAGATTACCCTGTGGACGGAAGTCCCCGACCTCGGTACGCACAAGATTTGA
TGGACGGAAGTCCCGCCTGGCGATTCAAACCAATTGGCTTGGTTCGACACAGATTTGTAA

Zaporedje introna 2 človeškega gena *CTNNB1*:

GTTTGTGTCATTAAATCTTTAGTTACTGAATTGGGGCTCTGCTTCGTTGCCATTAAGCCAGTCTGGC
TGAGATCCCCCTGCTTTCCTCTCTCCCTGCTTATTTCTAAAAATATTTCAATGGGTCAATACAGAT
TCTTTTTTTTTAAATTAAAGTAACATTTCCAATCTACTAATGCTAATACTGTTTCGTATTTATAG

Zaporedje 5'UTR regije človeškega gena *CTNNB1*:

AAGCCTCTCGGTCTGTGGCAGCAGCGTTGGCCCGGCCCGGGAGCGGAGAGCGAGGGGAGGCG
GAGACGGAGGAAGGTCTGAGGAGCAGCTTCAGTCCCCGCCGAGCCGCCACCGCAGGTCGAGGA
CGGTCGGAATCCCCGCGCGGGAGGAGCCTGTTCCCCTGAGGGTATTTGAAGTATACCATACAAC
GTTTTGAAAATCCAGCGTGGACA

- **Vezavna mesta za miRNA**

V vektorju so tri ponovitve vezavnih mest za mikroRNA (miRNA), ki so namenjene zmanjšanju izražanja transgena izven CŽS (Hordeaux in sod. 2020; Qiao C in sod.2011), torej zmanjšujejo izražanja gena CTNNB1 v periferiji (jetra, gangliji dorzalnih korenov živcev) in s tem zmanjšujejo potencialno toksičnost delovanja AAV9. Ciljna vezavna regija miRNA je zasnovana tako, da zavira ali zavira izražanje transgena v neželenih tipih celic ali tkivih, kot so na primer jetra in dorzalni gangliji (Hordeaux in sod. 2020; Qiao C in sod. 2011). Ciljna regija miRNA, kot se tukaj uporablja, obsega tri kopije ciljnih zaporedij, usmerjenih proti miRNA: miR-122, miR-183 in miR-199. MikroRNA so majhne nekodirajoče RNA in se pogosto izražajo v tkivno, linijsko, aktivacijsko ali diferencijsko specifičnem vzorcu. Običajno uravnavajo izražanje genov z vezavo na nepopolno komplementarna zaporedja v 3' neprevedenem območju (UTR) mRNA. Za nadzor eksogene transgenske ekspresije se tandemske ponovitve ciljnih mest umetnih mikroRNA običajno vključijo v 3' UTR transgenske ekspresijske kasete (v AAV), kar vodi do nadaljnje razgradnje transgenske mRNA v celicah, ki izražajo ustrezno mikroRNA

Zaporedje miRNA vezavnih mest:

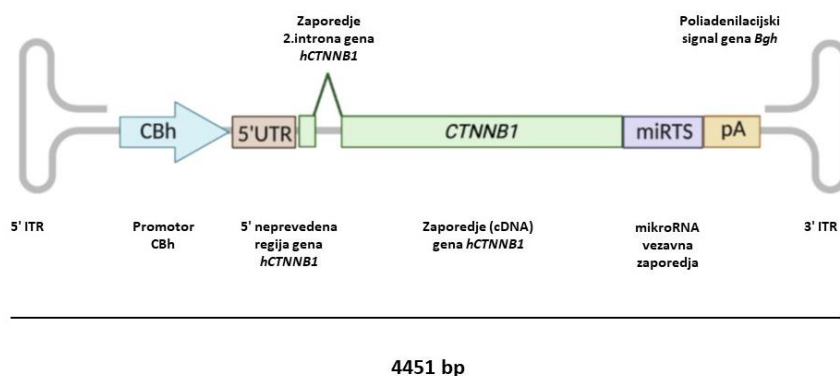
CAAACACCATTTGTCACACTCCAAGTGAATTCTACCAGTGCCATAGAACAGGTAGTCTGAACACTGG
GCAAACACCATTTGTCACACTCCAAGTGAATTCTACCAGTGCCATAGAACAGGTAGTCTGAACACTG
GGCAAACACCATTTGTCACACTCCAAGTGAATTCTACCAGTGCCATAGAACAGGTAGTCTGAACACT
GGG

- **BGH polyA**

Zaporedje BGH poly-A (ang. bovine growth hormone polyadenylation) služi kot terminacijski signal in poliadenilacijo mRNA transgena. Dodatek poli(A) repa je pomemben za stabilnost mRNA, zaščito pred razgradnjo in je sestavni del procesov jedrskega izvoza in prevajanja (Molina in sod. 2023).

Zaporedje BGH polyA:

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAG
GTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCA
TTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGG
CATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG



Slika 4: Shematski prikaz genoma Urbagena (rAAV9-CTNNB1); med ITR zaporedji je vstavljen kodirajoč zaporedje za človeški gen *CTNNB1*, vključno z neprevedeno regijo 5' (5'UTR) in delom introna 2 pod nadzorom

promotorja CBh, ki nadalje vključuje ciljno regijo miRNA, ki obsega mešanico ciljnih zaporedij mikroRNA (miRTS) in signal poliA govejega rastnega hormona (pA).

2.3 Lastnosti novonastalega GSO (Urbagen; rAAV9-CTNNB1)

Novonastale GSO - rAAV9-CTNNB1 (URBAGEN), ki jih bomo prejeli s strani Viralgena, se od prejemnega organizma ne razlikujejo, razen, da vsebujejo zapis za izražanje proteina β -katenina ter vezavna mesta za miRNA za povečanje varnosti terapije ter poly A zaporedje ter da vsebujejo kapsido značilnosti tropizma AAV9. Gre torej za ssDNA AAV virus URBAGEN, ki deluje torej kot vektor, ki bo dostavil v celice pacienta kopije človeškega gena *CTNNB1* z namenom produkcije proteina β -katenina in zdravljenje sindroma CTNNB1, kar se bo prverjalo tekom klinične študije GAIN-CTNNB1. rAAV9-CTNNB1 se ne more razmnoževati, ne rekombinirati zaradi odsotnosti helexer virusa (potrjeno s strani QC analiz) in odsotnosti genov *rep* in *cap*.

rAAV9-CTNNB1 (URBAGEN) za cerebrointraventricularno kirurško injiciranje pacientom s sindromom CTNNB1 tekom kliničnega preizkušanja je formuliran kot suspenzija virusnih delcev rAAV9-CTNNB1. Primarna ovojnina so 2 mL Daikyo CZ® viala (Westar stoper), ki vsebujejo 0.62 mL/vialo sterilnega virusnega pripravka. Stopnja čistosti je 100%, 90% partikov je polnih.

Koncentracija rAAV9-CTNNB1 (URBAGEN) znaša $4,7 \times 10^{13}$ vg/mL, ki so resuspendirani v 8.1 mM Na₂HPO₄·7H₂O, 1.5 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl z 0.005% Poloxamer 188; pH 7.40. Produkt je zamrznjen na $\leq -60^\circ\text{C}$. Dostavo URBAGENA v UKC LJ bo opravil verificiran prevoznik, ki bo vršil še sekundarno pakiranje. Do nadaljnje uporabe rAAV9-CTNNB1 na UKC LJ bo le-ta skladiščen v validirani in zaklenjeni skrinji na -80 v skladišču Lekarne UKC LJ.

Kot omenjeno je produkt Urbagen prešel vrsto nekliničnih preizkušanj. Proizvajalec je izvedel številne QC analize, kjer je dokazal čistost produkta, odsotnost plazmidne DNA helper virusa, odsotnost endotoksinov, mikoplazem ipd. In vitro na organoidih in iPSC je bila dokazana učinkovitost produkta, dokaz učinkovitosti je bil pokazan tudi na mišjem bolezenskem modelu. Izvedene so bile tudi številne GLP in ne-GLP študije toksičnosti na miših (28-dnevna, 3-mesečna in 8-mesečna) ter nehumanih primatih (3-mesečna), kjer je bil Urbagen injiciran na isti način, kot je to predvideno v klinični študiji (kirurško cerebrointraventricularna administracija). V sklopu 3-mesečne toksikološke študije na miših je bila izvedena tudi biodistribucijska študija, ki je pokazala kljub direktnemu paranhimskemu injiciranju Urbagena v možgane široko razporejenost AAV9-CTNNB1 vektorja po celotnem organizmu. Virus je bil dokazan (v izredno nizkih količinah; 10000-krat manjše vrednosti virusnega genoma) v krvi in urinu poskusnih živali.

2.4 Značilnosti nameravanega sproščanja v okolje in njegovega obsega

Namerno sproščanje GSO v okolje na UKCL vključuje proces zdravljenja sindroma CTNNB1 pediatričnih pacientov (starostna skupina: 2-12 let) s potrjeno genetsko diagnozo sindroma CTNNB1 v sklopu klinične študije GAIN-CTNNB1, katere sponzor je CTNNB1 fundacija. Gre za odprto klinično študijo faze I/II, pri katerem je študija zasnovana kot študija enkratnega odmerka, ki ocenjuje varnost, toleranco in preliminarno učinkovitost enkratne cerebrointraventricularne aplikacije URBAGENA pri 12 pediatričnih bolnikih z genetsko potrjeno diagnozo nevrorazvojnega sindroma CTNNB1 ter dokumentirano patogeno mutacijo v genu *CTNNB1*. Študija se bo izvajala na Pediatrični kliniki UKC LJ. Protokol klinične študije je bil pregledan s strani treh tujih znastvenikov/klinikov, ki imajo izkušnje na področju AAV9 genske terapije.

Vloga za izvedbo klinične študije je bila oddana na Javno agencijo za zdravila in medicinske pripomočke (JAZMP). Klinična študija je torej zasnovana kot dvostopenjska (A in B), kjer so v delu A tretira otroke višje starosti (starost: 6-12 let), v delu B pa otroke tudi nižje starosti (starost: 2-12 let). Odmerek Urbagena znaša 4×10^{14} vektorskega genoma (vg)/otroka. Odmerek je zasnovan na osnovi NOAEL pridobljen na predklinični stopnji. Pri klinični študiji (čas opazovanja: 36 mesecev) so določeni vključitveni (npr. potrjena diagnoza z določeno klinično sliko) in

izključitveni kriteriji (določen titer protiteles proti AAV9 ipd.), natančno so opisani postopki spremljanja pacientov pred in po terapiji.

Urbagen bo iz Viralgena dostavil v registrirani zaprti sistem za delo z GSO v 1.VR Čisti prostor za pripravo zdravil iz nevarnih učinkovin Lekarne UKC LJUBLJANA certificirani prevoznik (Almac). Prevoz bo vršen na osnovi suhega ledu z ustreznim temperaturnim datalogerjem (temperatura $>-60^{\circ}\text{C}$). V skladišču Lekarne UKC Ljubljana bodo odmerki Urbagena skladiščeni v zamrzovalni validirani, zaklenjeni skrinji do nadaljnje uporabe. Na dan kirurškega injiciranja se bodo odmerki iz zamrzovalne skrinje prenesli v zamrzovalni torbi v Čisti prostor Lekarne UKC Ljubljana, kjer se bodo ustrezno redčili s PBS (pH=7,4; proizvedeni v Viralgnu tudi pod pogoji GMP) v mikrobiološki komori. Tam bodo delavci vialo odtalili na sobni temperaturi. Vse delo se bo izvajalo v mikrobiološki komori. Nato bodo vsebino vialo redčili s pufrom PBS in suspenzijo prestavili v kirurški kateter, ki se bo uporabil za intracerebroventrikularno injiciranje. Kateter se prestavi v vrečko in zavari. Pripravek se tako prestavi v transportno torbo, ki ga delavec takoj odnese (skozi podzemne hodnike; čas poti približno 10 minut) do kirurške sobe, oz. operacijske sobe (OP soba v 1.nad. KOITO – C trakt), ki se nahaja v 1. nadstropju na Pediatrični kliniki v Ljubljani.

Zaprta sistem (Operacijska soba PeK; velikost 32,02m²) za delo z GSO v 1.VR se nahaja v prostorih Pediatrične klinike na Bohoričevi ulici 20, 1000 Ljubljana, in sicer v 1.nadstropju Kliničnega oddelka za intenzivno terapijo otrok (KOITO)-C trakt. Prostor je opremljen v skladu s predpisi, ki urejajo opremljenost in delovanje tovrstnih prostorov. V prostoru je uvedeno čiščenje in razkuževanje vseh površin in opreme (brez izjeme se celoten prostor dezinficira po koncu operacije). Pred Operacijsko sobo PeK je še predprostor za osebje ter predprostor za operacijo, ki pa nista del zaprtega sistema. Ob operacijski sobi je še ločen čisti del in nečisti del (priprava pacienta ipd.), ki pa prav tako nista del zaprtega sistema. Umivalniki ipd. so v predprostoru, tukaj se kirurgi tudi pripravijo, preoblečejo, vendar vsi odpadki/kirurški plašči, rokavice po koncu operacije ostanejo v operacijski sobi, torej v zaprtem sistemu, ki se jih nato odstrani med odpadke. V zaprtem sistemu 1. varnostne stopnje so vse površine (talne obloge, vrata, police) in oprema gladki in narejeni iz materialov, ki so pralni, neporozni in odporni na čistila in vodo. Površine so sterilne. Tla so iz epoksi smole z zaokrožnicami ter iz antistatičnih PVC oblog, ki so trajne in ne drsijo. V zaprtem sistemu za delo z GSO 1. varnostne stopnje ni talnih odtokov, ni oken. Stene so izdelane iz gladkih, odpornih in neporoznih materialov, ki zagotavljajo enostavno čiščenje, preprečujejo nabiranje bakterij in omogočajo vzdrževanje visoke higiene. Stene so tudi ojačane zaradi integracije vgrajene tehnične opreme - priključkov (elektrika, medicinski plini). Strop je visok, izdelan iz gladkih in pralnih materialov, vgrajen je prezračevalni sistem s HEPA filtri (redna letna validacija), svetlobna in zvočna oprema ter stropni stativi za kirurško opremo (operacijske luči). V prostoru so tudi vgrajene električne in informacijske vtičnice, priključki za medicinske pline (kisik, vakuum, CO₂). Dostop do prostora je omogočen zgolj pooblaščenim zaposlenim na PeK in je urejen s službeno kartico. Zdravstveni delavci vstopajo čisto sobo preko dveh predprostorov, kjer si umijejo roke, se preoblečejo v ustrezno zaščitno oblačilo in zamenjajo delovno obutev. Pri delu z GSO osebje upošteva ustrezne preventivne ukrepe in ob standardni zaščitni uniformi uporablja še dodatno varnostno opremo. Le-ta je v bistvu popolna kirurška oprema (plašč, maske, očala, kapa, obuvala, rokavice). V predprostoru je nameščen umivalnik z milom, ustrezna razkužila.

Po prejemu genske terapije (rAAV9-CTNNB1), bolnikovo telo deluje kot »zaprti sistem«, kar predstavlja dodatno bariero pred nenamernim sproščanjem GSO v okolje, se pa lahko pričakuje izločanje GSO s telesnimi tekočinami kliničnega preizkušanca, vendar v izjemno nizkih odmerkih, zaradi česar ne pričakujemo negativnih vplivov na zdravje ljudi, živali in vplivov na okolje. Bolnik, ki bo prejel virusni pripravek, ima po odpustu iz bolnišnice vedno s sabo opozorilno kartico. Na kartici je navedeno, da bolnik ne sme darovati krvi, organov, tkiv ali celic. Kartica vsebuje tudi kontakt zdravnika, ki ga je potrebno poklicati pred uvedbo katerega koli zdravljenja. V protokolu zdravljenja so natančno opisani ključni parametri spremljanja in postavljen je časovni načrt, ki omogoča sistematično spremljanje bolnikov. Poleg standardnega pregleda in laboratorijske ocene se bo v krvi, cerebrospinalni tekočini in urinu ali fecesu bolnika spremljalo tudi protitelesa proti AAV9 ter samo DNA virusa z

metodami kot so qPCR ali ddPCR in preverjalo njihovo obstojnost. V skladu s protokolom bodo vsi bolniki, ki prejmejo terapijo vključeni v vsaj 36 mesečno spremljanje.

Na UKCL ne bomo spreminjali, gojili ali kakorkoli drugače manipulirali virusnega pripravka, ki ga prejmemo iz Viralgena, razen, da ga bomo ustrezno (glede na potrebno dozo za kliničnega preizkušanca) redčili s PBS in prestavili v kirurški kateter, ki ga bomo zavarili v plastično vrečko in vstavili v transportno torbo. V PeK UKCL se bo izvajalo namerno sproščanje GSO v okolje v okviru zaprtega sistema 1. varnostnega razreda v obliki kirurškega cerebrointraventricularnega injiciranja Urbagena biventrikularno v bolnika. Postopke bo izvedla usposobljena kirurška ekipa, ki jo vodi nevrokirurg.

2.5 Značilnosti predvidenega prejemnega okolja in možnosti razširjanja

V okviru procesa sproščanja v okolje bo rAAV9-CTNNB1 kirurško cerebrointraventricularno injiciran v kliničnega preizkušanca; pediatričnega pacienta s sindromom CTNNB1 tekom klinične študije GAIN-CTNNB1. Pričakujemo, da se bo Urbagen iz mesta injiciranja (levi in desni lateralni ventrikel možganov) razširil po možganih in transduciral nevronske celice. Predvidevamo, da se bo Urbagen preko CSF prenesel v določeni meri tudi v spodaj ležeče dele CŽS. Transdukcija celic bo vodila do sinteze proteina β -katenina. Zaradi odsotnosti genov *rep* in *cap* in odsotnosti helper virusa (adenovirus, herpes simplex virus, pseudorabies virus, humani papiloma virus) se rAAV9-CTNNB1 ne more razmnoževati. Genomska integracija načeloma ni predvidena, vendar so poročila da se rAAV9 lahko trajno integrirajo na lokus AAVS1 na kromosomu 19 (Deyle DR in sod.2009; Sabatino DE in sod. 2022). Virus se (tudi na osnovi naše študije biodistribucije *in vivo*) iz mesta injiciranja prenese po celotnem organizmu (jetra, srce, vranica, gonade), prav tako se lahko izloča s telesnimi tekočinami (kri, urin, feces, sperma, slina, solze) (18), vendar smo v študiju predklinične biodistribucije dokazali v krvi in urinu izjemno nizko prisotnost virusa (10000-krat manjšo od injiciranja), kar sovpada tudi s podatki od Zolgensme (EMA, 2020).

Odsotnost helper virusa je ključnega pomena, da se Urbagen ne more razmnoževati. Eden izmed vključitvenih faktorjev v klinično študijo je tudi neinfektivno stanje kliničnega preizkušanca. Na osnovi predkliničnega preizkušanja smo tudi pokazali, da je transgen netoksičen. Urbagen je prav tako močno občutljiv na spremembo temperature, enako velja za seve AAV9, ki se hitro inaktivirajo pri temperaturi nad 50°C, temperaturna nihanja ter prisotnost UV svetlobe prav tako virus hitro inaktivirajo, oziroma drastično vplivajo na infektivnost virusa, tako da tudi v primeru, da bi se rAAV9-CTNNB1 izločal iz kliničnega preizkušanca to ne predstavlja tveganje za okolje. Poudariti je tudi treba, da zaenkrat ni podatkov o tem, da bi AAV9 povzročali kakršnokoli bolezen pri ljudeh in živalih, divje seve AAV9 so prav tako izolirali iz velikega števila vzorcev, razširjenih po celem svetu. Omenjen prejemni organizem je rekombinantni klinični vektor, uporabljen za različne genske terapije *in vivo*, divji tip AAV9 pa je razširjen po celem svetu (endemično). Približno 50 do 80 % evropske človeške populacije je seropozitivnih na vsaj en serotip AAV.

Potencialno bi sproščen Urbagen lahko inficiral druge vretenčarje, vendar je tveganje za to dejanje minimalno, saj je odmerek, ki bi se izločal mnogo manjši od tega, ki je sposoben inficirati živ organizem. Potencialno bi se lahko Urbagen tudi razmnoževal, vendar samo v primeru, da bi ista oseba, ki bi Urbagen prejela, bila sočasno še inficirana s helper virusom in divjim tipom AAV9, da bi lahko potekla rekombinacija in tvorba novih infektivnih virionov, za kar pa je izredno nizka možnost.

2.6 Medsebojni vplivi

Pričakujemo, da bo Urbagen po injiciranju v kliničnega preizkušanca transduciral nevronske celice in ostale živčne celice. Pričakujemo, da se bo preko CSF prenesel tudi po hrbtenjači in transduciral nižje ležeče nevronske celice. Cilj transdukcije/infekcije nevronov je tvorba proteina β -katenina iz transgena, ki se prepisuje pod kontrolo promotorka CBh, ki se nahaja med regijami ITR.

Predvidevamo, da bo dodatna produkcija proteina β -katenina izboljšala klinično sliko pacientov z diagnosticiranim sindromom CTNNB1. Na osnovi predkliničnega preizkušanja (študije toksikologije *in vitro* in *in vivo*) nismo zaznali

statistično značilnih negativnih vplivov terapije. Dokazali smo, da je transgen (človeški *CTNNB1*) učinkovit in varen (nismo zaznali nobene kancerogenosti, genotoksičnosti in vpliva na razvoj posameznikov). Vendar so določena tveganja, ki ga predstavlja uporaba kliničnih vektorjev AAV9 za gensko terapijo. Za AAV9 klinične vektorje so znani opisani primeri toksičnosti ganglijev dorzalnih korenov živcev, hepatotoksičnost, splošna imunska preobčutljivost na AAV9, trombocitična mikroangiopatija kot posledica močne aktivacije sistema komplementa v telesu (Ertl HCJ in sod. 2022; Stone D. in sod. 2023; Kachanov in sod. 2023; Perez BA. in sod. 2020). Ravno vključitev miRNA vezavnih mest v Urbagenu je ciljno zmanjšati neciljno akumulacijo AAV9, s čimer neposredno vplivamo na zmanjšano hepatotoksičnost.

AAV9 se v glavnem nahaja v episomalni obliki znotraj celic (latentna infekcija celic), stopnja genomske integracije je izjemno nizka (pod 0,1%; Deyle in sod. 2009) in je predvidljiva na lokus AAVS1 kromosoma 19. Genomska integracija pri Zolgenzmi ni bila dokazana (EMA, 2020).

Znotraj preverjanje učinkovitosti, toksičnosti in biodistribucije smo dokazali, da transgen *CTNNB1*, ki se izraža iz Urbagena ne predstavlja tveganja. Izvedene dolgotrajne toksikološke študije na glodavcih niso pokazale škodljivih učinkov, RNAseq prav tako ni pokazal nobenih aktivacij onkogenov ali supresije tumor supresorskih genov. Na osnovi podatkov in priporočil EMA (ICH guideline S12 on nonclinical biodistribution considerations for gene therapy products) smo izvedli (deloma tudi GLP študije) študije toksičnosti in biodistribucije in vivo, pri katerem smo uporabljali dve živalski vrsti (miši in nehumani primati). Toksičnih sprememb nismo opazili (dokazani s patohistološko analizo tkiv ter analizami krvi), raziskave biodistribucije pa nakazujejo na široko razširjenost rAAV9-*CTNNB1* (določeno z ddPCR, kjer začetni oligonukleotidi specifično nalegajo na transgen in določeno ITR regijo) v vseh tkivih poskusne živali kljub direktni cerebriintraventrikularni aplikaciji URBAGENA. Ključnega pomena je 10.000-krat nižji titer Urbagena, določen v krvi in urinu, v fecesu in slini Urbagena nismo zaznali.

V rAAV9-*CTNNB1* je ostanek divjega tipa AAV9 le regija ITR, ki omogoča pakiranje transgena v vektor. Veliko ljudi (do 80%) lahko vsebuje nevtralizirajoča se protitelesa proti AAV, kar lahko onemogoči učinkovito gensko terapijo z AAV9 virusnimi vektorji, kar je tudi eden izmed izključitvenih kriterijev za klinično študijo.

Omenjena tveganja bomo zmanjšali z doslednim nadzorom in hitrim ukrepanjem ob neželenih dogodkih. Klinična študija je zasnovana več stopenjsko, prav tako so natančno opisani vključitveni kot tudi izključitveni kriteriji, prav tako pa je podrobno opisan načrt ukrepanj (kliničnih, diagnostičnih) v primeru pojava določenih stranskih učinkov, ki izhajajo bodisi neposredno iz uporabe GSO ali samega kirurškega postopka. Med drugim se bodo spremljala prisotnost protiteles proti AAV9 (ELISA), prisotnost AAV9 virusa v krvi, urinu ipd (qPCR, ddPCR). Upoštevajo se priporočila za spremljanje varnosti in učinkovitosti ter obvladovanje tveganj zdravil za napredno zdravljenje, ki so objavljena na spletni strani Evropske agencije za zdravila.

3. OVREDNOTENJE MOŽNIH VPLIVOV NAMERNEGA SPROŠČANJA GSO V OKOLJE IN RAVNI TVEGANJA ZA OKOLJE IN ZDRAVJE LJUDI

3.1 Možni vplivi in tveganja za zdravje ljudi

Potencialne nevarnosti za zdravje ljudi so povezane s samim delovanjem Urbagena, sproščanjem vektorskih delcev Urbagena, nastankom rekombinantnih replikativno-kompetentnih virusov po aplikaciji v kliničnega preizkušanca in z insercijsko mutagenezo.

Transgen *CTNNB1*, ki se bo izražal iz Urbagena je netoksičen, kar smo dokazali. Pričakovati je mogoče stranske učinke genske terapije z rAAV9 (morebitni učinki so opisani v točki 2.6), vendar samo pri kliničnemu preizkušancu.

Možno je sproščanje virionov Urbagena s telesnimi izločki kliničnega preizkušanca, vendar smo Urbagen dokazali zgolj v urinu in krvi poskusnih živali, in to v 10.000-krat nižjem odmerku, kot so ga živali prejele. Iz literature sledi, da je prenos AAV možen preko inhalacije aerosola, preko direktnega kontakta s sluznico in preko oralno-fekalne poti (Baldo in sod. 2009). Poročila nakazujejo tudi, da se manj kot 0,001% rAAV injiciranih intravensko v paciente izloča s telesnimi tekočinami (Fleishman, 2013). Tveganje, da bi Urbagen inficiral osebe v bližini so zanemarljivo majhne, odmerki, ki se jih izloča so premajhni, da bi lahko inficirali neciljno osebo. Klinični preizkušanec bo po opravljeni operaciji v izoliranem bolnišničnem okolju vsaj 28 dni, osebe, ki bodo prišle v stik s pacientom bodo imele oblečeno zaščitno obleko, skrbniki pa so tudi poučeni, kako postopati s telesnimi tekočinami kliničnega preizkušanca. Gibanje kliničnega preizkušanca je prav tako omejeno (večinoma v domačem okolju ob spremstvu skrbnikov), enako velja za omejen stik z drugimi osebami.

Pri delu z rAAV9-CTNNB1 virusnim vektorjem obstaja možnost, da postane replikativno kompetenten, če bi oseba, ki bo prejela Urbagen sočasno okužena še z divjim tipom AAV in helper virusom. Tovrstni dogodek je nemogoč, saj se vsakega kliničnega preizkušanca z diagnostičnimi testi pred vstopom v klinično študijo pregleda. Pregleda se njegova protitelesa proti AAV9 ter odsotnost infekcij z ostalimi virusi. Proizvajalec Urbagena je prav tako izdal certifikat, v katerem je navedeno, da je virusni produkt prost kontaminantov, torej ostankov plazmidne DNA helper virusov, kar eksplicitno izkazuje, da je Urbagen replikativno nekompetenten, prav tako od divjega tipa AAV9 vsebuje le regije ITR, ne pa genov *rep* in *cap*. Možnost, da bi osebe, ki bodo zraven kliničnega preizkušanca bile sočasno okužene z divjim tipom in helper virusom so prav tako izredno nizke, tako da je tveganje prenosa Urbagena na neciljno osebo zanemarljive.

Genomska integracija pri Zolgenzmi ni bila dokazana (EMA, 2020), prav tako do sedaj ni poročil o insercijski mutagenizi pri uporabljenih kliničnih vektorjih v kliničnih študijah, tako da ni tveganje za insercijsko mutagenozo pri ciljnih in neciljnih osebah.

Okoliščina pri kateri bi lahko prišlo do nenamernega sproščanja in katere potencialna verjetnost pojava je minimalna je transfuzija krvi ali presaditev celic, tkiv ali organov darovalca, ki je bil zdravljen z Urbagenom. Bolniki s sabo nosijo opozorilno kartico, kjer je navedeno, da ne smejo darovati krvi, organov, tkiv ali celic, tako da je tveganje za ta dogodek nič. Klinični preizkušanci so v spremstvu staršev ali skrbnikov ves čas.

3.1.1 Možni vplivi in tveganje za okolje

Urbagen zunaj dobro nadzorovanega okolja (izven kliničnega preizkušanca, shranjen pri temperaturi nad -60 °C) ne morejo preživeti dolgo, oziroma jim hitro pade infektivnost, zato za razširitev v okolje ne predstavljajo večjega tveganja in ne pričakujemo negativnih učinkov na rastline, živali in okolje. Odmerki, ki bi se v okolje na predvidene načine (preko telesnih tekočin pacienta) nenamerno sprostili so izjemno majhni in nimajo učinka. Kot večkrat omenjeno, AAV9 ne povzroča bolezni, so klinični vektorji z odsotno genomsko integracijo. Ob upoštevanju vseh predpisanih previdnostnih in zadrževalnih ukrepov je ocenjena potencialna verjetnost za pojav škodljivih učinkov zanemarljiva. Načeloma so AAV9 izjemno občutljivi na spremembo temperature in UV svetlobo. Hitro ga inaktivirajo različni dezinficijensi (npr. 10% Na-hipoklorit), periacetna kislina (Rutgers Environmental Health and Safety Recommendations on AAV). Rekombinantni AAV prav tako hitro razpadajo v okolju, npr. določena je 7-dnevna razpolovna doba AAV virionov v vodah (Fleishman 2023). Mesto aplikacije v pacienta je sterilno pripravljeno, enako velja za pripravo opreme. Po koncu injiciranja se odpadke inaktivira, prostore pa se očisti in razkuži.

4. DOLOČITEV POTREBNIH ZADRŽEVALNIH IN DRUGIH VARNOSTNIH UKREPOV PRI NAMERAVANEM DELU Z GSO

4.1 Določitev skupne ravni tveganja za zdravje ljudi in okolje

Ravnanje z AAV9-CTNNB1 vključuje natančno upoštevanje vseh previdnostnih in zadrževalnih ukrepov ter izvajanje vseh ukrepov za nadzor in varno delo ter opisanih zadrževalnih ukrepov pri delu z GSO (Načrt zadrževalnih ukrepov pri delu z GSO v zaprtem sistemu Operacijska soba PeK).

Klinično preizkušanje Urbagena in namerno sproščanje v okolje bo izvedeno v skladu z načeli dobre klinične prakse. Zaradi doslednega upoštevanja vseh varovalnih in zadrževalnih ukrepov in načel dobre klinične prakse kot tudi izredne občutljivosti gensko spremenjenih organizmov, morebitnega izločanja v nizkih dozah, odsotnost sposobnosti replikacije, je verjetnost za pojav škodljivih učinkov za zdravje ljudi in okolja določena kot zanemarljiva.

4.2 Zadrževalni ukrepi

Pri delu z virusnim pripravkom natančno izvajamo vse ukrepe za nadzor in varno delo ter spodaj opisane zadrževalne ukrepe pri delu z GSO. Klinično preskušanje bo izvedeno v skladu z načeli dobre klinične prakse. Ocenjujemo, da je direktna raven tveganja pri delu s celičnim pripravkom AAV9-CTNNB1 za zdravje ljudi in okolja minimalna.

V prostorih (opisano podrobno v točki 2.4), ki so klasificirani za delo z GSO iz 1. varnostnega razreda (Operacijska soba PeK), se izvajajo fizični, biološki, kemični in organizacijski zadrževalni ukrepi. V namen preprečevanja širjenja GSO v okolje in navzkrižnih kontaminacij imamo vzpostavljenih več ukrepov in sicer:

- Imenovan je pooblaščenec za biološko varnost.
- Delo je ustrezno evidentirano, kar je zahtevano v ZRGSO.
- Vstop je omejen in med delom z GSO omogočen le pooblaščenim osebam s kartičnim dostopom.
- Skladnost prostora in opreme, ki se redno čisti, validira in vzdržuje.
- V namen preprečevanja širjenja GSO v okolje in navzkrižnih kontaminacij so pred Operacijsko sobo še dodatni predprostor, kjer je onemogočeno hkratno odpiranje vhodnih in izhodnih vrat iz predprostora.
- Ves zrak v zaprtem prostoru 1. varnostnega razreda je filtriran preko filtrov HEPA.
- Vrata so zaprta, oken in odtokov ni.
- Potrošni material, ki prihaja v stik z GSO, je za enkratno uporabo in se ga pred odstranitvijo kemično inaktivira.
- Pri rokovanju z GSO osebje upošteva ustrezne previdnostne ukrepe in ob standardni zaščitni uniformi uporabljati še varnostno opremo (kirurška oprema-popolno pokritje osebja, pacienta) za preprečevanje možnosti prenosa infekcijskih bolezni in za zaščito delavca pred neposrednim stikom z GSO. Osebje je izobraženo.
- Vzpostavljen je način odstranjevanja odpadkov.

Zadrževalni ukrepi po odpustu bolnika iz bolnišničnega okolja:

- Bolnik, ki bo prejel GSO, ima po odpustu iz bolnišnice vedno s sabo opozorilno kartico. Na kartici je navedeno, da bolnik ne sme darovati krvi, organov, tkiv ali celic. S tem se preprečuje namerni prenos GSO na neciljno osebo.
- Bolnikovo zdravstveno stanje se v skladu s protokolom redno spremlja.
- Sponzor kliničnega preskušanja ima vzpostavljen sistem farmakovigilance.

4.2.1 Osebna varovalna oprema

Zdravstveni delavci vstopajo čisto sobo preko dveh predprostorov, kjer si umijejo roke, se preoblečejo v ustrezno zaščitno oblačilo in zamenjajo delovno obutev. Pri delu z GSO osebje upošteva ustrezne preventivne ukrepe in ob standardni zaščitni uniformi uporablja še dodatno varnostno opremo; kirurška oprema (plašč, maske, očala, kapa, obuvale, rokavice). V predprostoru je nameščen umivalnik z milom, ustrezna razkužila. Sproščanje GSO poteka po upoštevanju načel asepse.

4.2.2 Ravnanje z odpadki

Vsi odpadki, ki nastanejo pri delu z GSO/operaciji se pustijo v Operacijski sobi, kjer jih osebje nato prestavi v vrečko, le-to pa hermetično zapre v zaboj, ki se odstrani v skladu z infektivnimi odpadki. Za to skrbi pooblaščen služba UKC LJ. V Operacijski sobi je vzpostavljeno temeljito, dokumentirano dnevno čiščenje/razkuževanje (Navodilo za delo_čiščenje operacijskih prostorov). Kateter se pred odstranitvijo še prepere z 10% Na-hipokloritom. V nadaljevanju se postopa skladno z Načrtom za gospodarjenje z odpadki UKCL (Služba za varstvo in zdravje pri delu, enota Varstvo okolja). Odpadki se oddajo pooblaščenemu zbiralcu odpadkov, ki dnevno vrši odvoz odpadkov in poskrbi za njihovo varno odstranitev in uničenje. Avtoklav se nahaja v prostorih Pediatrične klinike in UKC LJ (npr. v specializiranem hematološkem laboratoriju).

5. ZAKLJUČEK OCENE TVEGANJA ZA NAMERNO SPROŠČANJE GENSKO SPREMENJENIH ORGANIZMOV V OKOLJE

Kot GSO je opisan rekombinantni klinični vektor AAV9, ki ima med zaporedje ITR vstavljeno kaseto za izražanje transgena; človeški gen *CTNNB1* in se ga bo namerno sproščalo v okolje tekom klinične študije GAIN-CTNNB1, kjer se bo preverjala varnost, razporeditev in terapevtska učinkovitost priprava za zdravljenje sindroma CTNNB1 pri 12-ih pediatričnih pacientih. Transgen ne daje morebitne selekcijske prednosti ali pomanjkljivosti, prav tako GSO ne pridobi dodatnih toksičnih ali škodljivih lastnosti, ki bi lahko predstavljale nevarnost in tveganje za zdravje ljudi, živali in okolja. AAV9 so prav tako široko razširjeni in ne povzročajo bolezni. Transgen je v AAV9-CTNNB1 stabilno integriran, slednja pa po infekciji celice kliničnega preizkušanca najverjetneje ni možna.

Verjetnost, da GSO v pogojih nameravanega namernega sproščanja v okolje postane obstojen in invaziven v naravnih habitatih je zanemarljiva, izvorni organizem je prav tako razširjen po celem svetu v vseh geografskih področjih.

Tveganj povezanih z AAV9-CTNNB1 ne pričakujemo, saj je uporabljen virusni vektor replikativno inkompetenten. Odsotnost helper plazmida je določena s certifikatom proizvajalca GSO (pod pogoji GMP). Med transdukcijo celic kliničnega preizkušanca pride do prenosa zapisa za transgen, vektor ne vsebuje nobenega zapisa za odpornost proti antibiotikom. GSO ne pridobi drugih zapisov za gene (podobno velja za celice kliničnega preizkušanca), ki bi lahko povzročili bolezen pri ljudeh, živalih ali rastlinah in bi povzročali škodljive vplive na okolje ter ogrožali biotsko raznovrstnost. Uporabljen rAAV9-CTNNB1 je bil predhodno uspešno testiran v več korakih predkliničnih študijah, kjer smo zaključili, da je transgen varen in učinkovit.

Možnosti za genski prenos na druge vrste je zanemarljiva. Za prenos genskega vključka bi morali biti v neciljnem organizmu hkratna infekcija divjega tipa AAV in helper virusa, ki bi omogočali replikacijsko sposobnost GSO; možnost za slednje je izredno majhna, oziroma zanemarljiva.

Zaradi doslednega upoštevanja in izvajanja vseh varovalnih in zadrževalnih ukrepov, je tveganje za neposreden stik osebja, ki dela z GSO ali za nenamerno sproščanje GSO v zunanje okolje izredno majhno. V kolikor bi prišlo do nenamernega sproščanja GSO izven zaprtega sistema negativnih vplivov na ljudi in okolje ne pričakujemo ker virus hitro izgubi infektivnost, prav tako AAV9 ne povzročajo bolezni. Verjetnost za škodljive posledice za zdravje ljudi in okolje je zanemarljiva.

Preučili smo nekaj potencialnih dogodkov in situacij, v katerih bi lahko prišlo do nenamernega prenosa GSO na neciljne osebe. V vseh navedenih scenarijih je verjetnost za tak dogodek in posledično škodljive učinke za neciljne osebe izjemno majhna.

Zaključimo lahko, da namerno sproščanje GSO (Urbagen) tekom klinične študije pacientov s sindromom CTNNB1 predstavlja zanemarljivo, oziroma nično tveganje za okolje.

6. POSTOPEK IZDELAVE OCENE TVEGANJA

Ocena tveganja je bila izdelana v skladu s Pravilnikom o oceni tveganja za namerno sproščanje gensko spremenjenih organizmov v okolje (*Uradni list RS*, št. 32/21).

Pri pripravi ocene smo sledili evropskim smernicam opisanim v dokumentu: *Good Practice on the assessment of GMO-related aspects in the context of clinical trials with AAV clinical vectors (version 3)*, ki jih je privzela tudi Slovenija leta 2020 (Good Practice, 2023).

6.1 Specifičnost ocene tveganja

Oceno tveganja za okolje smo pripravili na znanstvenih osnovah glede na nam dostopne podatke za gensko terapijo na osnovi kliničnih vektorjev AAV9 ter naših rezultatov predkliničnih raziskav rAAV9-CTNNB1 produkta. V procesu priprave ocene tveganja za okolje nam je bila poznana vrsta virusnega vektorja ter vloga vključkov vektorja ter vsa zaporedja rAAV9-CTNNB1.

6.2 Utemeljitev določitve podatkov, ki naj se varujejo kot zaupni

V tej oceni tveganja ni zaupnih podatkov.

7. VIRI

1. A healthcare professional's guide to minimizing risks with Zolgensma® (onasemnogene abeparvovec). Novartis guidelines. © 2024 Novartis Europharm Limited.
2. Baldo A, van den Akker E, Bergmans HE, Lim F, Pauwels K. General considerations on the biosafety of virus-derived vectors used in gene therapy and vaccination. *Curr Gene Ther*. 2013 Dec;13(6):385-94.
3. Cao J, Novoa EM, Zhang Z, Chen WCW, Liu D, Choi GCG, Wong ASL, Wehrspaun C, Kellis M, Lu TK. High-throughput 5' UTR engineering for enhanced protein production in non-viral gene therapies. *Nat Commun*. 2021 Jul 6;12(1):4138.
4. Deyle DR, Russell DW. Adeno-associated virus vector integration. *Curr Opin Mol Ther*. 2009 Aug;11(4):442-7
5. Ertl HCJ (2022) Immunogenicity and toxicity of AAV gene therapy. *Front. Immunol*. 13:975803
6. Fleischmann T. Assessing the environmental fate of rAAV in activated sludge and water: Implications for environmental risk assessments and GMO regulatory frameworks. *J Environ Manage*. 2023 Nov 1;345:118754.
7. Good Practice on the assessment of GMO related aspects in the context of clinical trials with AAV clinical vectors. Version 3. 2022.
8. Gray in sod. 2011. Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. *Hum. Gen. Ther.*, 22(9):1143-53.
9. Hordeaux in sod. 2020. MicroRNA-mediated inhibition of transgene expression reduces dorsal root ganglion toxicity by AAV vectors in primates. *Sci Transl Med.*, Nov 11;12(569): 9188.
10. https://www.zkbs-online.de/ZKBS/SharedDocs/Downloads/02_Allgemeine_Stellungnahmen_englisch/viruses/Adeno-

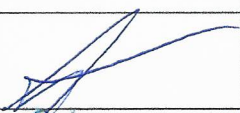
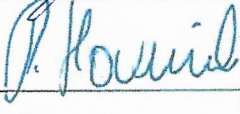
associated_viruses_from_primates_and_derived_vectors_updated_2021.pdf?__blob=publicationFile&v=6 (28.5.2025)

11. Kachanov in sod. 2023. The menace of severe adverse events and deaths associated with viral gene therapy and its potential solution. *Med Res Rev.*, 44:2112–2193.
12. Krause F. in sod. 2024. A shedding analysis after AAV8 CNS injection revealed fragmented viral DNA without evidence of functional AAV particles in mice. *Gene Ther.*, 31: 345–351.
13. Li C, Samulski RJ. Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet.* 2020 Apr;21(4):255-272.
14. Liu J, Xiao Q, Xiao J et al (2022) Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther* 7:3.
15. Lu J, Williams JA, Luke J, Zhang F, Chu K, Kay MA. A 5' Noncoding Exon Containing Engineered Intron Enhances Transgene Expression from Recombinant AAV Vectors in vivo. *Hum Gene Ther.* 2017 Jan;28(1):125-134.
16. Matsuzaki Y, Fukai Y, Konno A, Hirai H. Optimal different adeno-associated virus capsid/promoter combinations to target specific cell types in the common marmoset cerebral cortex. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2024 Sep 13;32(4):101337.
17. Maurya S, Sarangi P, Jayandharan GR. Safety of Adeno-associated virus-based vector-mediated gene therapy-impact of vector dose. *Cancer Gene Ther.* 2022 Oct;29(10):1305-1306.
18. Mirošević Š in sod. 2022. Correlation between phenotype and genotype in CTNNB1 syndrome: a systematic review of the literature. *Int J Mol Sci* 23:12564.
19. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL 3rd, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *BioDrugs.* 2017 Aug;31(4):317-334.
20. Pattali R. in sod. 2019. AAV9 Vector: a Novel modality in gene therapy for spinal muscular atrophy. *Gene therapy*, vol.26, 287-295.
21. Pellenz S. in sod. 2019. New Human Chromosomal Sites with "Safe Harbor" Potential for Targeted Transgene Insertion. *Hum Gene Ther.* 2019 Jul;30(7):814-828.
22. Perez BA. in sod. 2020. Management of Neuroinflammatory Responses to AAV-Mediated Gene Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Brain Sci.* 10, 119
23. Qiao C in sod. Liver-specific microRNA-122 target sequences incorporated in AAV vectors efficiently inhibits transgene expression in the liver. *Gene Ther.* 2011 Apr;18(4):403-10.
24. Rodríguez-Molina JB, Turtola M. Birth of a poly(A) tail: mechanisms and control of mRNA polyadenylation. *FEBS Open Bio.* 2023 Jul;13(7):1140-1153
25. Sabatino DE in sod. 2022. Evaluating the state of the science for adeno-associated virus integration: An integrated perspective. *Molecular Therapy*, Volume 30, Issue 8, 2646 – 2663.
26. Savy, A., Dickx, Y., Nauwynck, L., Bonnin, D., Merten, O.-W., & Galibert, L. (2017). Impact of Inverted Terminal Repeat Integrity on rAAV8 Production Using the Baculovirus/Sf9 Cells System. *Hum Gene Ther Methods*, 28(5), 277–289.
27. Stone D. 2023. Breaching the blood-brain barrier: AAV triggers dose-dependent toxicity in the brain. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*, Volume 31, 101105.
28. Tucci V in sod. 2014. Dominant β -catenin mutations cause intellectual disability with recognizable syndromic features. *J Clin Invest* 124:1468–1482.
29. Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2019 May;18(5):358-378.
30. Weitzman MD and RM Linden. (2011). Adeno-associated virus biology. *Methods Mol Biol* 807:1-23
31. Yohari JB. In sod. 2022. Engineering of the CMV promoter for controlled expression of recombinant genes in HEK293 cells. *Biotechnol J.*, 17(8):e2200062
32. Zhuang W, Ye T, Wang W et al (2023) CTNNB1 in neurodevelopmental disorders. *Front Psychiatry* 14.
33. Zolgensma International non-proprietary name: onasemnogene abeparvovec. Assessment Report. EMA. Procedure No. EMEA/H/C/004750/0000.

8. REFERENČNI DOKUMENTI

- GAIN-CTNNB1 trial: a Phase I/II open-label, dose-escalation clinical trial to evaluate the safety, tolerability, and preliminary efficacy of a single intracerebroventricular administration of an AAV9-based gene replacement therapy in paediatric patients with CTNNB1 syndrome.
- UKCL_Požarni red 2018
- SD UKCL 0006 - Hišni red Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana.
- Načrt gospodarjenja z odpadki UKCL za obdobje 2021-2025
- Načrt ukrepov zadrževalnih ukrepov pri delu z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtem sistemu Operacijska soba PeK
- GSO_Načrt ukrepov za primer nesreče pri delu z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtem sistemu Operacijska soba PeK
- Navodila za delo z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtem sistemu Operacijska soba PeK
- Ocena tveganja GSO_AAV9-CTNNB1_OT-injiciranje
- Navodilo za delo_čiščenje operacijskih prostorov
- ND UKCL 0351 NAVODILO ZA DEKONTAMINACIJO NEVARNE KEMIČALIJE
- SOP 0008 - Ravnanje s citotoksičnimi in citostatičnimi odpadki
- Načrt ukrepov zadrževalnih ukrepov pri delu z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtem sistemu Lekarna UKC LJ
- GSO_Načrt ukrepov za primer izrednega dogodka pri delu z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtem sistemu Lekarne UKC LJ
- GSO_Načrt ukrepov za primer nesreče pri delu z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtem sistemu Lekarne UKC LJ
- Navodila za delo z gensko spremenjenimi organizmi v zaprtem sistemu Lekarna UKC LJ

	Ime in priimek	Podpis	Datum
Pripravil	Znan. sod. dr. Duško Lainšček		
Pripravila	doc. dr. Tinka Hovnik		
Pripravila	dr. Špela Miroševič		
Pregledal	izr. prof. dr. Damjan Osredkar		

	Ime in priimek	Podpis	Datum
Pripravil	Znan. sod. dr. Duško Lainšček		26.06.25
Pripravila	doc. dr. Tinka Hovnik		18.6.25
Pripravila	dr. Špela Miroševič		26.06.25
Pregledal	izr. prof. dr. Damjan Osredkar		23. 6. 2025