



STROKOVNO MNENJE

o uporabi URBAGENA v okviru »Klinične študije za določitev terapevtske učinkovitosti URBAGENA pri zdravljenju sindroma CTNNB1«

Mandat znanstvenega odbora:

Na svoji 56. redni seji je Vlada Republike Slovenije dne 28. 6. 2023 pod točko 2.7 (01101-7/2023/3) imenovala člane in namestnike v znanstveni odbor za namerno sproščanje gensko spremenjenih organizmov v okolje in dajanje izdelkov na trg (ZOOS) za mandatno dobo štirih let.

Izhodišča priprave strokovnega mnenja:

Znanstveni odbor je bil s strani odgovornega organa na podlagi 32. člena Zakona o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi¹ (številka prijave 35419-2/2025-2570) naprošen, da poda strokovno mnenje glede sproščanja URBAGENA v okviru: »Klinične študije za določitev terapevtske učinkovitosti URBAGENA pri zdravljenju sindroma CTNNB1«.

Znanstveni odbor je na 48. redni seji dne 17.7.2025 obravnaval zadevo in sprejel strokovno mnenje.

1. OSNOVNI PODATKI O SEJI ODBORA

Številka: 35422-3/2025-2570

Datum: 17.7.2025

Kraj: Ljubljana

2. OSNOVNI PODATKI

Številka prijave: 35419-2/2025-2570

Prijavitelj: Univerzitetni klinični center Ljubljana

Naslov prijavitelja: Zaloška cesta 2, Ljubljana

Namen prijave:

- ☒ sproščanje GSO v okolje za namene poskusov (III. poglavje ZRGSO, B del Direktive 2001/18/ES)
- ☐ GSO za uporabo kot živilo
- ☐ živilo, ki vsebuje GSO ali je iz njega sestavljeno
- ☐ GSO za uporabo kot krma
- ☐ krma, ki vsebuje GSO ali je iz njega sestavljena
- ☐ uvoz in predelava (C del Direktive 2001/18/ES)
- ☐ dajanje izdelkov na trg (IV. poglavje ZRGSO, C del Direktive 2001/18/ES)

¹ ZRGSO - Zakona o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (Uradni list RS, št. 23/05 – uradno prečiščeno besedilo, 21/10 in 90/12 – ZdZPVHVVR)

- ☐ pridobitev dovoljenja za promet z zdravilom za veterinarsko uporabo, ki vsebuje GSO ali je iz njega sestavljeno (3.1 in 31.2 člen Uredbe (ES) 726/2004 in C del Direktive 2001/18/ES ter IV. poglavje ZRGSO)
- ☐ GSO za uporabo kot seme ali drug rastlinski material za razmnoževanje/pridelavo v EU (C del Direktive 2001/18/ES)
- ☐ nadzor GSO (VII. poglavje ZRGSO)

Naslov projekta: »Klinična študija za določitev terapevtske učinkovitosti URBAGENA pri zdravljenju sindroma CTNNB1«

Trajanje projekta: 10 let (1.9.2025 – 1.9.2035)

Dokumentacija, ki jo je prejel znanstveni odbor:

- Priloga 1: Prijava namernega sproščanja v okolje (razen sproščanja višjih rastlin)
- Ocena tveganja namernega sproščanja GSO v okolje

3. OSNOVNI PODATKI O RAVNANJU Z GSO, POVZETI PO OCENI TVEGANJA

A. SPLOŠNE INFORMACIJE (GENERAL INFORMATION)

Namen projekta je izvedba klinične študije (faza I/II) GAIN-CTNNB1, v kateri se bo preverjalo terapevtsko učinkovitost, varnost in biodistribucijo virusnega pripravka AAV9-CTNNB1 (URBAGEN), in sicer na pediatričnih pacientih (2-12 let; upoštevajo se vključitveni in izključitveni faktorji), ki imajo diagnosticirano redko gensko bolezen sindrom CTNNB1.

V okviru zdravljenja z zdravilom URBAGEN bo potekalo namerno sproščanje virusnega pripravka.

URBAGEN je pripravljen v Viralgnu (podjetje iz Španije), dostavljen s transportno službo v UKC 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. Sistem proizvodnje je skladen z načeli dobre proizvodne prakse (ang. Good manufacturing practice; GMP) ter zagotavlja ponovljiv in standardiziran proizvodni postopek.

B. INFORMACIJE O PREJEMNEM ALI (KJER JE PRIMERNO) STARŠEVSKEM ORGANIZMU (INFORMATION RELATING TO THE RECIPIENT OR (WHERE APPROPRIATE) PARENTAL ORGANISM)

Prijavitelj v oceni tveganja navaja kot starševski organizem *Dependoparvovirus primate1* (adenovirusom pridruženi virus serotipa 9); rekombinanten klinični vektor.

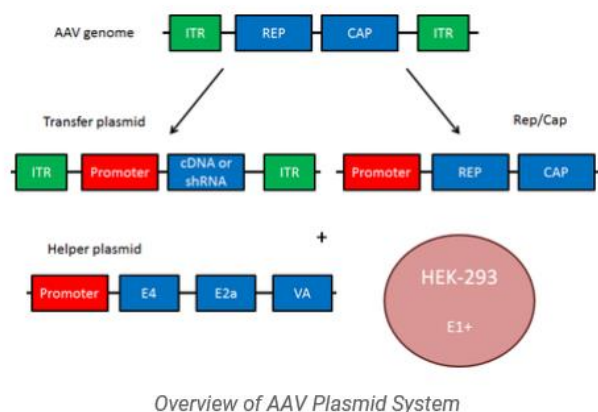
Rekombinantni adenovirusom pridruženi virusni vektorji (ang. recombinant adeno-associated virus; rAAV) so sestavljeni iz enake zaporednosti in strukture ovojnice kot divji tip AAV, vendar pa sta regiji rep in cap izbrisani iz genoma. V vektorju rAAV imamo tako prisotne samo virusne obrnjene terminalne 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*.

rAAV9 se razširjajo znotraj tretiranega organizma ali *ex vivo* v kultivacijskih pogojih. Izven človeškega organizma ali laboratorijskega okolja se AAV9 praktično brez replikacije (ob

prisotnosti helper virusa) ne morejo razmnoževati in širiti. Gre za rekombinanten klinični vektor, ki se ga uporablja za dostavni sistem v genski terapiji.

C. INFORMACIJE O GENSKI SPREMEMBI (INFORMATION RELATING TO THE GENETIC MODIFICATION)

Za pripravo AAV vektorjev se uporabljajo sistemi s plazmidi, ki se jih transfecira v HEK293 celice. Tako kot vsi AAV vektorji, ki se trenutno uporabljajo v kliničnih študijah, je tudi URBAGEN pripravljen z uporabo sistema 3 plazmidov, ki ga je prvi opisal Xiao leta 1998 (Slika 1).



Slika 1. Priprava AAV rekombinantnih vektorjev z uporabo sistema 3 plazmidov in transfekcije v HEK293 celice (povzeto po Xiao 1998).

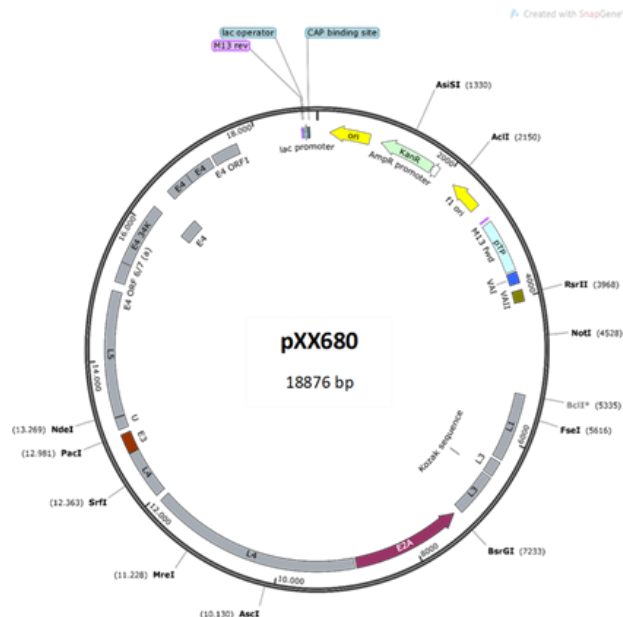
Uporabljeni plazmidi:

- **pTR_KAN.CTNNB1** (proizvajalec Aldevron). pTR_KAN.CTNNB1 je plazmid, ki vsebuje zaporedja obrnjenih terminalnih ponovitev (ang. inverted terminal repeats; 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 DNA kot gen, ki ga pakirajo. V prenosnem plazmidu transgen obdajata dva ITR-ja, ki se skupaj z genom ohranita v 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 z ITR (slika 2). Plazmid, ki se uporabljajo za pripravo rekombinantnega virusa, vsebuje kanamicinski selekcijski marker, ki se lahko prenese tudi v končni produkt.



- Slika 3: Mapa plazmida pGSK2/9, pomemben za pakiranje virionov

- **Adeno Helper pXX680** (proizvajalec Viralgen). Plazmid pXX680 (slika 4) 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. Prav tako vsebuje kanamicinski selekcijski marker.



Slika 4: Mapa plazmida pXX680; helper plazmid

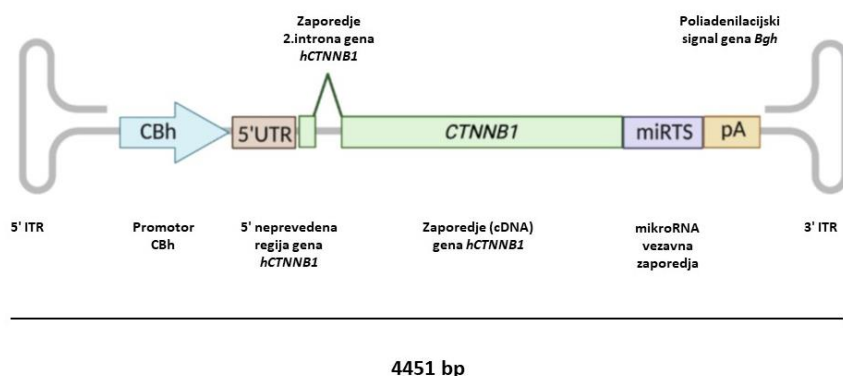
Sam AAV9-CTNNB1 deluje kot vektor, ki bo v transducirane celice v kliničnem preizkušancu vnesel zapis za izražanje proteina β -katenin. rAAV9-CTNNB1 se izolira iz lizata celic, ki se ga tretira z bromidom (za odstranitev preostale DNA), sledi filtracija za odstranitev celičnega debris. Sledi nadaljnjo čiščenje z imunoafinitetno kromatografijo. Z 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 (testiranje z ELISA), določitev titra (testiranje z ddPCR, qPCR), verodostojnost (testiranje z NSG) ipd. Podjetje Viralgen je izdalo ustrezen certifikat ustreznosti in kakovosti.

D. INFORMACIJE O GSO (INFORMATION RELATING TO THE GMO)

1. Opis lastnosti in značilnosti, ki so bile vnesene ali spremenjene

URBAGEN je vektor, ki bo v transducirane celice v kliničnem preizkušancu vnesel zapis za izražanje proteina β -katenin.

Slika genoma URBAGENA je prikazana na spodnji sliki (Slika 5).



Slika 5: Shematski prikaz genoma URBAGENA (rAAV9-CTNNB1); med ITR zaporedji je vstavljen kodirajoče 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. Informacije o zaporedju, ki je bilo dejansko vneseno ali odstranjeno

Vključki, ki sestavljajo URBAGEN so naslednji:

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

Virusne ITR 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 zaporedja ITR 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. 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 DNA kot gen, ki ga pakirajo. V prenosnem plazmidu transgen obdajata dva ITR-ja, ki se skupaj z genom ohranita v rAAV, vse ostalo zunaj ITR-jev ne tvori rAAV.

Zaporedje 5' ITR

```
TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAA
GGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG
CGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTCT
```

Zaporedje 3' ITR

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC
ACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTGGGCGACCTTTGGTCGCCCCG
CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAA

- **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. Promotor CBh 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.

Zaporedje CBh promotorja:

TCCTGCAGGCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGT
CATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGG
CCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGT
ATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGT
ATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTAC
GCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTA
CATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT
ATTACCATGTGCGAGGCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCC
CACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCG
GGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGG
CGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCG
AAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAA
GCGCGCGGCGGGGCGGGAGCAAGCTTGAACCTGAAAAACCAGAAAGTTAACTGGT
AAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTTCAAGTCCCGGATCCGGTGGTGGTGCAAAT
CAAAGAACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTTACTTCTAGGCCTGTACGGAAGT
GTTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGGAATTGTAC

- **Človeški gen CTNNB1**

Človeški transgen *CTNNB1* (ang. Catenin Beta 1) 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. 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 ribosomskih proteinov na mesto UTR. 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.

Zaporedje človeškega gena *CTNNB1*:

ATGGCTACGCAGGCTGACCTGATGGAACCTGGATATGGCGATGGAACCGGATCG
CAAGGCCCGCGTCTCTCATTGGCAACAGCAATCATATCTCGATTGAGGTATTAC

AGCGGGGCAACAACAACACTGCACCGTCCCTCAGCGGCAAGGGTAACCCAGAAGA
GGAAGACGTCGACACAAGCCAGGTGCTCTACGAATGGGAGCAAGGGTTCAGCC
AATCTTTTACCCAGGAGCAGGTGGCCGACATAGACGGGCAATACGCCATGACAA
GGGCCCAACGGGTCAGGGCCGCCATGTTTCCAGAAACGCTCGACGAAGGCATG
CAAATTCCCTCAACTCAATTGACGCGCCGCACACCCAACCAACGTGCAAAGACTG
GCCGAGCCCAGTCAAATGCTCAAGCACGCGGTAGTGAATCTGATCAATTACCAG
GACGACGCTGAGCTGGCTACTAGAGCCATACCCGAGCTTACTAAGCTTCTGAAC
GATGAAGATCAAGTAGTCGTGAACAAAGCAGCGGTAATGGTTCACCAACTCAGC
AAGAAAGAGGCAAGCCGTCATGCCATTATGAGGTCACCGCAAATGGTTTCAGCA
ATCGTGAGAACTATGCAAAACACCAACGACGTGGAACCGCAAGATGCACAGCG
GGCACTCTGCACAATCTCTCTACCACCGCGAAGGGCTCCTTGCAATTTTCAAAT
CCGGTGGAATCCCGGCTCTTGTCAGATGTTAGGGTCCCCTGTCGACAGCGTTC
TTTTCTACGCGATCACTACACTGCATAATCTCCTCTTGACCAAGAAGGGGCCAA
GATGGCTGTACGGCTGGCCGGCGGTTTACAAAAGATGGTGGCGCTCCTGAATA
AGACCAACGTGAAGTTTCTGGCCATCACAACGGATTGTCTGCAGATCCTGGCCT
ACGGAAATCAGGAGTCCAACTGATTATTTGGCCAGCGGCGGCCCGCAGGCA
CTTGTCACATCATGCGCACGTACACCTATGAGAAGCTCCTCTGGACAACCTTCTC
GCGTCCTCAAAGTCTTGAGCGTGTGTTCCAGCAACAAACCAGCCATCGTTGAGG
CCGGCGGCATGCAGGCCCTGGGCCTTCATCTCACTGACCCTTCCCAGAGGCTG
GTGCAAAATTGCCTCTGGACCCTGCGTAACCTGTCCGACGCAGCCACAAAGCAA
GAGGGCATGGAAGGGCTGCTGGGAACACTGGTCCAATTACTCGGGAGTGACGA
CATTACGTCGTGACTTGCGCCGCAGGCATCCTGTCCAAcCTGACcTGcAACAAC
TACAAGAAcAAgATGATGGTgTGTCAGGTTGGCGGCATCGAAGCATTAGTCCGGA
CGGTTCTCAGAGCAGGGGATCGAGAGGATATTACAGAACCAGCTATTTGCGCGC
TCCGACACCTTACAAGTAGACATCAGGAAGCCGAAATGGCGCAAAACGCTGTCC
GACTGCATTACGGGCTGCCCGTGGTTCGTCAAATTACTTCATCCGCCCTCACATT
GGCCCCTTATCAAAGCCACCGTAGGCCTTATCAGAACTTGGCACTCTGCCCTG
CTAACCACGCTCCCCTGAGAGAACAAGGAGCAATACCGAGATTAGTACAACCTGC
TGGTGCGCGCGCACCAAGACACACAACGGCGCACTAGTATGGGCGGCACCCAA
CAACAGTTCGTGCAAGGAGTTCGGATGGAAGAGATTGTAGAGGGCTGCACTGG
CGCACTCCATATTTTGGCCAGAGACGTCCATAATCGGATAGTAATACGCGGGTT
GAACACGATCCCTCTGTTTCGTCCAATTGCTGTACAGTCCTATAGAGAATATTCAG
AGGGTGGCCGCTGGCGTGCTTTGCGAGTTGGCCCAAGATAAAGAGGCCGCTGA
GGCCATCGAGGCAGAAGGCGCTACCGCGCCCCCTCACTGAACTGTTGCATAGTC
GGAACGAGGGAGTAGCTACCTACGCTGCAGCCGTGCTGTTTCGCATGTCAGAA
GATAAACCGCAGGACTATAAGAAGCGACTGTCTGTGGAACCTTACTTCCAGTCTGT
TTCGGACTGAACCTATGGCGTGGAACGAAACAGCAGACTTGGGCCTGGACATC
GGAGCTCAAGGTGAGCCATTAGGCTACAGGCAAGACGACCCAAGTTACCGGTC
CTTCCATTCCGGCGGGCTACGGTCAAGACGCTCTGGGCATGGACCCAATGATGG
AGCACGAAATGGGTGGACATCATCCAGGAGCAGATTACCCTGTGGACGGACTC
CCCGACCTCGGTACGCACAAGATTTGATGGACGGACTCCCGCCTGGCGATTG
AAACCAATTGGCTTGGTTCGACACAGATTTGTAA

Zaporedje introna 2 človeškega gena *CTNNB1*:

GTTTGTGTCATTAAATCTTTAGTTACTGAATTGGGGCTCTGCTTCGTTGCCATTAA
GCCAGTCTGGCTGAGATCCCCCTGCTTTCCTCTCTCCCTGCTTATTTCTAAAAAT

ATTTCAATGGGTCATATCACAGATTCTTTTTTTTTTAAATTAAAGTAACATTTCCAAT
CTACTAATGCTAATACTGTTTCGTATTTATAG

Zaporedje 5'UTR regije človeškega gena *CTNNB1*:

AAGCCTCTCGGTCTGTGGCAGCAGCGTTGGCCCCGGCCCCGGGAGCGGAGAGC
GAGGGGAGGCGGAGACGGAGGAAGGTCTGAGGAGCAGCTTCAGTCCCCGCCG
AGCCGCCACCGCAGGTCGAGGACGGTCGGACTCCCGCGGCGGGAGGAGCCTG
TTCCCCTGAGGGTATTTGAAGTATACCATACTGTTTGTAAAATCCAGCGTGG
ACA

- **Vezavna mesta za miRNA**

V vektorju so tri ponovitve vezavnih mest za mikroRNA (miRNA), ki so namenjene zmanjšanju izražanja transgena izven tarčnih celic, 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. 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 diferenciacijsko 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:

CAAACACCATTGTCACACTCCAAGTGAATTCTACCAGTGCCATAGAACAGGTAGT
CTGAACACTGGGCAAACACCATTGTCACACTCCAAGTGAATTCTACCAGTGCCAT
AGAACAGGTAGTCTGAACACTGGGCAAACACCATTGTCACACTCCAAGTGAATT
CTACCAGTGCCATAGAACAGGTAGTCTGAACACTGGG

- **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 jedrnega izvoza in prevajanja.

Zaporedje BGH polyA:

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTT
GACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCA
TCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGA
CAGCAAGGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTG
GGCTCTATGG

3. Informacije o izražanju vključka (Information on the expression of the insert)

Novonastali GSO - rAAV9-CTNNB1 (URBAGEN) se bo po vezavi na površino celice in internalizaciji, prepisal v dsDNA, ki se nato začne prevajati v terapevtski protein.

4. Informacije, kako se GSO razlikuje od prejemnega organizma v razmnoževanju razširjanju in preživetju (Information on how the GMO differs from the recipient organism: reproduction, dissemination, survivability)

Novonastali GSO - rAAV9-CTNNB1 (URBAGEN), ki se od prejemnega organizma ne razlikujejo, razen, da vsebujejo zapis za izražanje proteina β -katenina, vezavna mesta za miRNA za povečanje varnosti terapije, poly A zaporedje in da vsebujejo kapsido značilnosti tropizma AAV9.

V procesu priprave rAAV9 vektor pridobi gensko informacijo za promotor, gen CTNNB1 z regulatornimi regijami, miRNA vezavna mesta ter polyA signal. Vključek nadomesti lasten genom vektorja.

URBAGEN se torej ne razlikuje od rekombinantnega virusnega vektorja glede razmnoževanja, razširjanja in preživetja.

Gre torej za ssDNA AAV virus URBAGEN, ki deluje 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 preverjalo tekom klinične študije GAIN-CTNNB1. rAAV9-CTNNB1 se ne more razmnoževati, ne rekombinirati zaradi odsotnosti helper virusa (potrjeno s strani QC analiz) in odsotnosti genov *rep* in *cap*.

5. Genska stabilnost vključka in fenotipska stabilnost GSO (Genetic stability of the insert and phenotypic stability of the GMO)

Vstavev terapevtske genske informacije med ITR regije je stabilno. Rekombinacije in replikacije v odsotnosti helper virusa niso možne. Genska informacija se načeloma v genom transducirane celice ne vgrajuje, ker se nahaja v latentni episomalni obliki.

6. Kakršnekoli spremembe v sposobnosti GSO za prenos genskega materiala v druge organizme (Any change to the ability of the GMO to transfer genetic material to other organisms)

Ne. Novo nastali GSO nima nobene dodatne sposobnosti za prenos genskega materiala. Novi vključki so vezani specifično na izražanje terapevtskega gena in na vezavna mesta za miRNA.

7. Informacije glede patogenosti GSO (Information on pathogenicity of GMO)

Po do sedaj znanih podatkih AAV tako naravno prisotni kot rekombinantni ne povzročajo bolezni pri ljudeh. Možnost integracije v genom je zanemarljiva, ampak možna. Vsekakor se vektor ne bo integriral na znano mesto integracije naravno prisotnih AAV na kromosomu 19, kjer je vezavno mesto za Rep, ker ima virusne gene odstranjene. Samo študije, ki bodo spremljale bolnike na daljši čas bodo lahko pokazale, ali pride do integracije in kakšne so posledice – zaenkrat teh podatkov še ni, je pa tveganje za to zanemarljivo. Prenos v zarodne celice praktično ni mogoč, ker AAV9 nima tropizma za te celice.

8. Mehanizem interakcije med GSO in ciljnim organizmi (če je primerno) (Mechanism of interaction between GMO and the target organisms (if applicable))

Aplikacija URBAGENA bo potekala v zaprtem sistemu za delo z GSO 1. varnostnega razreda, in sicer v zaprtem sistemu Operacijska soba PeK v 1. nadstropju KOITO (Klinični oddelek za intenzivno terapijo otrok)-C trakt. Po odpustu bolnika iz bolnišnice bo kot zaprt sistem delovalo njegovo telo, seveda z upoštevanjem dejstva, da se lahko AAV9 izloča iz

telesa kliničnega preizkušanca s telesnimi tekočinami. Hitrost in raven izražanja novega genskega materiala sta odvisni od več dejavnikov, in sicer od doze GSO, tarčnega tkiva, ki ga želimo transducirati, načina dostave vektorja. Generalno velja, da se transgeni iz AAV9 pod kontrolo močnega CBh promotorja začnejo izražati med 2-5 dni po transdukciji, kjer nivo izražanja doseže vrh *in vivo* okoli 4 tedne po injiciranju AAV9.

9. Potencialne spremembe interakcij med GSO in biotskim okoljem zaradi genske spremembe (Potential changes in the interactions of the GMO with the biotic environment resulting from the genetic modification)

rAAV9-CTNNB1 se v okolju ne more razmnoževati ob odsotnosti helper virusa. Razmnoževal se bo le, če bo ista celica iste osebe ali živali sočasno okužena s helper virusom in divjim tipom AAV (čas replikacije ca 24-48h). Ne pričakujemo razširjanja URBAGENA, ker je možnost, da bi bila ista celica človeka ali živali sočasno z AAV9 okužena še s helper virusom izredno majhna. Prav tako ni dokazov, da bi rAAV9 povzročal bolezni, pri nas gre za klinični vektor, ki je varen, transgen je prav tako netoksičen. Vpliv na biotsko okolje (zaprt sistem je bolnik) ima lahko samo izražanje transgena v netarčnih tkivih bolnika. Znano je namreč, da je prekomerno izražanje β -katenina povezano z raki jeter, pljuč, dojke, ovarijskih, endometrija in debelega črevesa. Z vključitvijo vezavnih mest za miRNA v rAAV9-CTNNB1 bo izražanje β -katenina v netarčnih tkivih manjše.

10. Potencialne interakcije z abiotskim okoljem (Potential interactions with the abiotic environment)

Ni relevantno. GSO načeloma nima vpliva na okolje, v odsotnosti helper virusa in žive celice se virus ne more razmnoževati. Temperatura nad 37 °C močno zmanjša preživetje AAV9 (temperatura nad 50 °C ga inaktivira zelo hitro). V vlažnih tleh (temperatura 20-25 °C) je preživetje lahko nekaj tednov. So izredno občutljivi na UV svetlobo. Že 0,1% Na-hipoklorit inaktivira virus v nekaj minutah. Nizka temperatura in vlaga podaljšujeta čas preživetja, vendar je verjetnost razširjanja GSO z naravnimi viri izjemno nizka; teoretično je možen prenos URBAGENA z aerosolom in s kontaminiranimi vodami, vendar so to vse dejavniki, ki močno zmanjšujejo infektivnost virusa.

11. Metode odkrivanja in identifikacije GSO (Detection and identification techniques of GMO)

Raven izražanja transgena iz AAV9 ali samega AAV9 se lahko detektira z uporabo qPCR, ddPCR ali DNA sekveniranjem, pri čemer so omenjene metode izjemno občutljive in natančne, npr. z ddPCR lahko detektiramo tudi 0,1 kopijo genoma na mikroliter. Transgen se lahko detektira tudi s specifično imunodetekcijo, z ELISA testom, ki je relativno občutljiva metoda glede na specifičnost protiteles. Slednja se je izkazala kot težavna, saj večina komercialnih protiteles ne razlikuje med človeško in npr. mišjo obliko proteina.

Aktivnost izraženega proteina β -katenina se lahko meri s specifično imunodetekcijo, ELISA testom ter z določitvijo signalizacije poti, ki jo aktivira β -katenin (aktivacija transkripcijskih faktorjev: TCF, LEF), kar lahko detektiramo s qPCR, RNA sekveniranjem. Raven izraženega proteina je odvisna od doze AAV9, časa od transdukcije, mesta transdukcije *in vivo* in postranslacijskih modifikacij proteina ter naravne regulacije WNT signalne poti, v katero je β -katenin vključen.

12. Povzetek možnih vplivov na okolje zaradi sproščanja GSO (Summary of the potential environmental impact of the release of the GMOs)

Pri delu z virusom AAV9 bi potencialno tveganje predstavljala replikacija virusa, vendar gre za replikativno nezmožen virus (ni prisoten helper virus, kar je QC analiza ocenjevanega produkta tudi potrdila), prav tako zaenkrat ni podatkov, da bi AAV9 povzročali klinično zaznavno bolezen pri ljudeh in živalih, se pa dogajajo okužbe ljudi z različnimi serotipi AAV. Posledično tako veliko ljudi (30-60%) lahko vsebuje nevtralizirajoča se protitelesa proti AAV,

kar lahko onemogoči učinkovito gensko terapijo z AAV9 virusnimi vektorji. Tveganja, ki ga predstavljajo AAV9, so vezana na opisane primere v literaturi in so neposredna posledica injiciranja AAV9 v organizem. Za AAV9 so znani opisani primeri toksičnosti ganglijev dorzalnih korenov živcev, hepatotoksičnost, splošna imunska preobčutljivost na AAV9, trombotična mikroangiopatija kot posledica močne aktivacije sistema komplementa v telesu. Določeni raziskovalni članki poročajo o posledicah poškodbe krvno-možganske bariere zaradi neposrednega vnosa AAV9 v možgane. AAV9 se v glavnem nahaja v episomalni obliki znotraj celic, stopnja genomske integracije je izjemno nizka in predvidena na lokus AAVS1 na kromosomu 19, kjer se nahajajo zaporedja vezavnega elementa *rep*, ki so tudi na ITR zaporedjih AAV. Protein *rep* tako omogoča integracijo AAV na kromosomu 19. Ker je v genetskem konstrukt rAAV9-CTNNB1 v URBAGEN-u gen *rep* odstranjen, je tveganje za insercijsko mutagenozo zmanjšano.

Znotraj preverjanja učinkovitosti, toksičnosti in biodistribucije so prijavitelji dokazali, da transgen *CTNNB1*, ki se izraža iz AAV9, 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) so prijavitelji izvedli (deloma tudi GLP študije) študije toksičnosti in biodistribucije in vivo, pri katerem so uporabljali dve živalski vrsti, pri kateri ena vrsta ni bila glodavec. Opazili niso nobenih toksičnih odstopanj, raziskave biodistribucije pa nakazujejo na široko razširjenost AAV9-CTNNB1 (določeno z ddPCR, kjer začetni oligonukleotidi specifično nalegajo na transgen in določeno ITR regijo) v vseh tkivih poskusne živali kljub direktni intraventrikularni aplikaciji URBAGENA. Glede na to, da je bil prisoten URBAGEN v vseh tkivih, se predvideva, da bo AAV9-CTNNB1 v transduciranih celicah kliničnega preizkušanca dostavil kopijo človeškega gena *CTNNB1*, kar bo vodilo v translacijo proteina β -katenin. Morebiti se bodo pokazali v kliničnem preizkušanju tudi negativni toksični učinki (kot opisano v literaturi: hepatotoksičnost, DRG toksičnost, trombotična mikroangiopatija) AAV9 in tudi β -katenina (povečano karcinogenost), vendar pa se vplivov na okolje ne pričakuje.

4. OCENA O TEM, ALI OBSEG IN VSEBINA PRIJAVE ZADOŠČATA ZA SPREJEM STROKOVNEGA MNENJA

Prijavitelj (UKC Ljubljana, Zaloška 7, Ljubljana) je znanstvenemu odboru za sproščanje v okolje (ZOOS) posredoval potrebne dokumente in priloge z zahtevanimi informacijami, ki so vsebovale vse potrebne elemente: opis GSO ter namen sproščanja, opis postopkov, ki bodo omogočali varno sproščanje GSO ter oceno tveganja za okolje.

Priložena dokumentacija po obsegu in vsebini zadoščata za sprejem strokovnega mnenja.

5. STROKOVNO MNENJE (v SI in EN verziji)²

Strokovno mnenje/nasvet in dodatne pripombe iz 6.in 7. točke

Povzetek

URBAGEN (rAAV9-CTNNB1) je rekombinantni, replikativno nekompetenten virusni vektor, ki se uporablja za vnos terapevtskega gena *CTNNB1* v celice centralnega živčnega sistema kot del klinične študije GAIN-CTNNB1. Terapija je namenjena pediatričnim bolnikom s sindromom CTNNB1 in vključuje enkratno kirurško cerebrolintraventricularno aplikacijo pripravka v zaprtem sistemu prve varnostnega razreda. Virusni vektor je bil proizveden v skladu z načeli dobre proizvodne prakse (GMP), ne vsebuje genov *rep* in *cap*, in ni sposoben replikacije ali prenosa na druge organizme brez prisotnosti helper virusa, kar je bilo potrjeno z ustreznimi analizami kakovosti. Predklinične študije biodistribucije in toksičnosti so pokazale široko razširjenost vektorja po telesu brez znakov toksičnih učinkov. Možnost sproščanja virusa v okolje preko telesnih tekočin preizkušanca je ocenjena kot zanemarljiva, saj so odmerki izločanja izjemno nizki, virus pa je občutljiv na okoljske dejavnike

² Na osnovi 8. člena Uredbe o delovanju znanstvenih odborov (Ur.l. RS 66/03 in 95/11) v strokovnem mnenju ne smejo biti navedeni podatki iz prijave, ki se skladno z zakonom v postopku za izdajo dovoljenja varujejo kot zaupni

(UV svetloba, temperatura, čistila). Glede na trenutna znanstvena spoznanja, predlagane varnostne ukrepe in naravo vektorja, Znanstveni odbor meni, da sproščanje URBAGENA v okolje v okviru uporabe kot gensko zdravilo v klinični študiji GAIN-CTNNB1 ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi, živali ali okolje.

Abstract

URBAGEN (rAAV9-CTNNB1) is a recombinant, replication-incompetent viral vector used for the delivery of the therapeutic CTNNB1 gene to the central nervous system as part of the GAIN-CTNNB1 clinical study. The therapy targets pediatric patients with CTNNB1 syndrome and involves a single surgical cerebrointraventricular administration of the product under closed biosafety level 1 conditions. The viral vector is manufactured according to Good Manufacturing Practice (GMP) standards and lacks the *rep* and *cap* genes, rendering it incapable of replication or environmental spread without the presence of helper viruses, as confirmed by quality control analyses. Preclinical studies of biodistribution and toxicity have shown broad systemic distribution without evidence of toxic effects. Potential release into the environment via patient bodily fluids is considered negligible due to extremely low concentrations and the vector's sensitivity to environmental conditions (e.g., UV light, temperature, disinfectants). Taking into account the current state of scientific knowledge, the proposed safety measures, and the vector's characteristics, the Scientific Committee concludes that the release of URBAGEN into the environment, in the context of its use as advanced therapy medicinal product in the GAIN-CTNNB1 clinical study, does not pose a risk to human health, animal health, or the environment.

6. UTEMELJITEV MNENJA

6.1. Uvod

Namen namernega sproščanja GSO v okolje je 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.

Sindrom CTNNB1 je redka nevrorazvojna motnja, ki jo povzročajo *de novo* mutacije, ki vodijo v izgubo funkcije enega alela gena *CTNNB1*. Sindrom je trenutno diagnosticiran pri približno 500 bolnikov na globalni ravni, 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. Gen *CTNNB1* (Catenin Beta 1) kodira protein β -katenin, ki je ključen za celično adhezijo in Wnt signalno pot, bistveno za razvoj zarodka, celičnega povezovanja ipd.

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 cerebrointraventricularna (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 izražanje 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 enoveržni DNA virusni vektorji, ki jih uporabljajo v genski terapiji in raziskavah za vnos genetskega materiala v celice. 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).

6.2. Vidiki organizma

Novonastale GSO - rAAV9-CTNNB1 (URBAGEN) se od prejemnega organizma ne razlikujejo, razen, da vsebujejo zapis za izražanje proteina β -katenina, vezavna mesta za miRNA za povečanje varnosti terapije, poly A zaporedje ter da vsebujejo kapsido značilnosti tropizma AAV9. Gre torej za ssDNA AAV virus URBAGEN, ki deluje 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 preverjalo tekom klinične študije GAIN-CTNNB1. rAAV9-CTNNB1 se ne more razmnoževati, ne rekombinirati zaradi odsotnosti helper virusa (potrjeno s strani QC analiz) in odsotnosti genov *rep* in *cap*.

6.3. Molekularna karakterizacija

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

Koncentracija rAAV9-CTNNB1 (URBAGEN) znaša $4,7 \times 10^{13}$ vg/mL, ki so resuspendirani v 8.1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5 mM KH_2PO_4 , 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°C v skladišču Lekarne UKC LJ. Na UKCL ne bodo spreminjali, gojili ali kakorkoli drugače manipulirali virusnega pripravka, ki ga prejmejo iz Viralgena, razen da ga bodo ustrezno (glede na potrebno dozo za kliničnega preizkušanca) redčili s PBS in prestavili v kirurški kateter, ki ga bodo 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 cerebrointraventrikularnega injiciranja URBAGENA biventrikularno v bolnika. Postopke bo izvedla usposobljena kirurška ekipa, ki jo vodi nevrokirurg.

6.4. Ocena tveganja za okolje

rAAV9-CTNNB1 se injicira kirurško v kliničnega preizkušanca (pediatrični pacient, starosti 2-12 let) z uporabo stereotaktičnega intracerebroventrikularnega injiciranja. Injiciranje vrši usposobljen nevrokirurg. GSO se nahaja v kirurškem katetru. Pacient deluje kot bariera pred zunanjim okoljem in deluje kot »zaprt sistem«. Posamezen klinični preizkušanec bo prejel med 5×10^{14} virusa v maksimalnem volumnu 15 mL (suspenzija AAV9-CTNNB1 v sterilnem fosfatnem pufu).

Injiciranje URBAGENA se bo izvajalo v zaprtem sistemu (Operacijska soba PeK; velikost $32,02 \text{ m}^2$), ki je registriran za delo z GSO v 1. varnostnem razredu in se nahaja v prostorih Pediatrice klinike na Bohoričevi ulici 20, 1000 Ljubljana, v 1. nadstropju Kliničnega oddelka za intenzivno terapijo otrok (KOITO)-C trakt. V prostoru je uvedeno čiščenje in razkuževanje vseh površin in opreme. 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. varnostnega razreda 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. varnostnega razreda 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.

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 nevrone. 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. Novonastali GSO rAAV9-CTNNB1 nima gena *rep*, produkt katerega omogoča integracijo v kromosom 19, zato je njegova integracija malo verjetna. Virus se (tudi na osnovi študije prijaviteljev 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), vendar so v študiju predklinične biodistribucije dokazali v krvi in urinu izjemno nizko prisotnost virusa (10000-krat manjšo od injiciranja).

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 so 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 tveganja 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, vsi ti elementi bi morali biti prisotni v isti celici, da bi lahko potekla rekombinacija in tvorba novih infektivnih virionov, za kar pa je izredno nizka možnost.

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

Možno je sproščanje virionov URBAGENA s telesnimi izločki kliničnega preizkušanca, vendar so ga 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. Poročila nakazujejo tudi, da se manj kot 0,001% rAAV injiciranih intravensko v paciente izloča s telesnimi tekočinami. 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 kliničnim preizkušancem 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 klinični preizkušanec, ki bo prejel URBAGEN, sočasno okužen 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 zanemarljivo.

Genomska integracija pri Zolgensmi ni bila dokazana, prav tako do sedaj ni poročil o insercijski mutagenizi pri uporabljenih kliničnih vektorjih v kliničnih študijah, tako da je tveganje zanemarljivo za insercijsko mutagenezo pri ciljnih in neciljnih osebah..

6.5. Splošni nadzor po sproščanju

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. V kolikor bi prišlo do nenamernega sproščanja GSO izven zaprtega sistema, pa se zaradi nezmožnosti preživetja GSO izven dobro nadzorovanega okolja (shranjen pri T>-60st.C), negativnih vplivov na ljudi, živali in okolje ne pričakuje.

6.6. Mnenje

Znanstveni odbor ugotavlja, da je bilo v preteklosti že prijavljeno namerno sproščanje podobnega GSO (Zolgensma) in da so v kliničnih študijah tudi drugi GSO, ki so pripravljeni na osnovi AAV9 virusnega vektorja.

Znanstveni odbor meni, da ob upoštevanju trenutnega stanja znanosti in tehnike ter ob zagotovitvi predvidenih varnostnih ukrepov, sproščanje URBAGENA, ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi, živali ali okolje.

6.7. Reference

- Direktiva 2001/18/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 12. marca 2001 o namernem sproščanju gensko spremenjenih organizmov v okolje in razveljavitvi Direktive Sveta 90/220/EGS.
- (ICH guideline S12 on nonclinical biodistribution considerations for gene therapy products)
- Pravilnik o vsebini prijave namernega sproščanja gensko spremenjenih organizmov v okolje
- Pravilnik o oceni tveganja za namerno sproščanje gensko spremenjenih organizmov v okolje (Uradni list Republike Slovenije Številka 32/2021 z dne 8.3.2021)
- Zakon o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi (Uradni list RS, št. [23/05](#) – uradno prečiščeno besedilo, [21/10](#) in [90/12](#) – ZdZPVHVVR)
- [Clinical Trials register - Search for clinimacs](#) dostopano 12.7.2025.
- Daya, S., & Berns, K. I. (2008). Gene Therapy Using Adeno-Associated Virus Vectors. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(4), 583–593. <https://doi.org/10.1128/CMR.00008-08>
- Xiao, X., Li, J., & Samulski, R. J. (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *Journal of Virology*, 72(3), 2224–2232. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9499080>
- [EU/3/15/1509 - orphan designation for treatment of spinal muscular atrophy | European Medicines Agency \(EMA\)](#) dostopano 12.7.2025

7. ZAKLJUČKI O MOŽNEM VPLIVU SPROŠČANJA ALI DAJANJA GSO V PROMET ZA OKOLJE IN PRIPOROČILA

Prijava se nanaša na sproščanje v okolje URBAGENA (AAV9-CTNNB1) z namenom uporabe v klinični študiji za določitev terapevtske učinkovitosti URBAGENA pri zdravljenju sindroma CTNNB1 pri pediatričnih bolnikih (2-12let).

Po pregledu prijave in ob upoštevanju trenutnega stanja znanosti in tehnike ter ob zagotovitvi predvidenih varnostnih ukrepov Znanstveni odbor ugotavlja, da sproščanje URBAGENA (rAAV9-CTNNB1), ki je rekombinantni, virusni klinični vektor na osnovi adenovirusom pridruženega virusa serotipa 9 (rAAV9), in nosi zapis za človeški gen CTNNB1, ne predstavlja tveganja za zdravje ljudi, živali ali okolje.

Dr. Jelka Zabavnik Piano
PREDSEDNICA ZOOS