



EVALUACIÓN DE RIESGO DE LA LIBERACIÓN AL MEDIO AMBIENTE DE VIRUS ADENOASOCIADOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE (Notificación B/ES/25/15)

Título del ensayo

Ensayo clínico de Fase 1/2a para evaluar la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética y eficacia exploratoria de una única inyección intraarticular de ATX-2a en participantes con osteoartritis moderada de rodilla, que comprende una Parte A con escalado de dosis y una Parte B aleatorizada, controlada con placebo, del promotor Altos Labs Inc.

Características del ensayo

El ensayo clínico está diseñado para determinar la dosis terapéutica óptima de AXT-2a. En la Parte A del ensayo, se evaluarán dos dosis diferentes para determinar su seguridad y eficacia. Posteriormente, en la Parte B, los pacientes recibirán la dosis óptima identificada en la fase anterior.

ATX-2a se administrará como una única dosis intraarticular tras la asignación aleatoria del paciente. No se prevé una segunda dosis durante el estudio.

El estudio se realizará en la Clínica CEMTRO.

Organismo modificado genéticamente

hCDKN2A-hOS o ATX-2A es un virus adenoasociado no replicativo que contiene los transgenes humanos Oct4 y Sox2, bajo el control del promotor humano CDKN2A (que limita la expresión de Oct4 y Sox2 a células altamente estresadas o senescentes, que están presentes en números muy pequeños en el cuerpo), empaquetado en una cápside del vector AAV-DJ (AAV-DJ es un vector AAV químérico artificial que contiene secuencias híbridas de cápside de tres serotipos naturales (AAV2, 8, and 9).

El proceso de fabricación de ATX-2a, se realiza mediante la transfección de células empaquetadoras con tres plásmidos, que contienen genes auxiliares y el transgén, y es un proceso libre de virus auxiliares.

Se realizan pruebas para detectar virus adventicios en diferentes etapas del proceso de fabricación para asegurar la seguridad del vector.

Evaluación y control del riesgo

-Estabilidad

ATX-2a, se basa en un vector recombinante derivado del virus adenoasociado serotipo DJ (rAAV-DJ). La estabilidad genética del rAAV-DJ se debe fundamentalmente a la preservación de las repeticiones terminales invertidas (ITRs), las únicas secuencias virales conservadas en el genoma vectorial. Las ITRs son esenciales para la replicación y empaquetamiento del vector, pero no codifican proteínas virales, y su mantenimiento intacto evita eventos de recombinación o



reordenamientos genómicos indeseados. El diseño del vector AAV ATX-2a excluye secuencias virales codificantes y regiones repetitivas con potencial recombinogénico, lo que reduce la probabilidad de inestabilidad estructural durante la producción.

El sistema de producción utilizado está libre de virus auxiliares replicativos y se basa en transfecciones transitorias con plásmidos auxiliares en líneas celulares autorizadas para uso clínico. Esta estrategia de producción minimiza la ocurrencia de mutaciones puntuales, delecciones o rearreglos durante la replicación del genoma vectorial. Durante el desarrollo y fabricación del vector AAV ATX-2a, se implementan estrictos controles de calidad, incluyendo técnicas de secuenciación de próxima generación (NGS) y ensayos de integridad estructural, con el fin de verificar la conservación del transgén terapéutico y la ausencia de modificaciones no deseadas.

Una vez administrado e internalizado en las células del organismo receptor, el genoma del vector se encuentra mayoritariamente en forma episomal, formando estructuras concatéméricas circulares estables en el núcleo celular. Estas formas extracromosómicas son altamente resistentes a la degradación por nucleasas y no se integran en el genoma de la célula huésped, lo que reduce de forma significativa el riesgo de mutagénesis por inserción o alteración genética en el receptor.

-Toxicidad

Una vez administrados, los factores de Yamanaka se expresarán en las células de cartílago senescentes del hospedador, lo que podría conducir al rejuvenecimiento de las células y una mejora en la función de la articulación de la rodilla.

Oct4 y Sox2 son dos de los cuatro factores prototípicos de Yamanaka (YFs). Cuando los cuatro YFs se expresan de manera ubicua y continua a niveles altos en ratones transgénicos, se han observado problemas de seguridad, como morbilidad y mortalidad aguda, displasia de células epiteliales y desarrollo de teratomas debido a la desdiferenciación celular de células adultas al estado de células madre. El casete de expresión ATX-2a ha sido diseñado para mitigar este riesgo de toxicidad de dos maneras:

- 1) La regulación de la expresión del transgen que limita la expresión de Oct4 y Sox2 a células altamente estresadas o senescentes, que están presentes en números muy pequeños en el cuerpo.
- 2) El casete de expresión contiene solo dos YFs y carece de c-Myc, el principal impulsor de la desdiferenciación celular, transformación neoplásica y toxicidad observada en ratones transgénicos que expresan YFs.

No se ha observado toxicidad aguda ni crónica, mortalidad ni morbilidad en los animales de los estudios preclínicos a los que se les ha administrado dosis 5 veces mayores que la dosis clínica humana máxima planeada en el ensayo clínico (actualmente tienen 5 meses post-administración).

Además, a los ratones se les administró un vector similar que contenía los transgenes de interés por vía intravenosa a dosis 2 veces mayores que la dosis máxima que se administrará a los humanos. No se observó toxicidad aguda ni se detectaron teratomas durante el examen macroscópico y microscópico *post-mortem* a los 4 meses de la dosis.

-Eliminación/diseminación

La biodistribución viral y la eliminación están siendo evaluadas en estudios preclínicos en roedores y en caninos, y los datos estarán disponibles antes de comenzar la dosificación en humanos.



ATX-2a utiliza una cápside de AAV recombinante (DJ), que es altamente similar a AAV2. La eliminación de AAV2 ha sido extensamente evaluada en clínica en el contexto de dosificación intravenosa (IV) e intramuscular (IM).

AAV2 se elimina principalmente por orina, heces y semen, y la cantidad de eliminación está correlacionada con la cantidad de AAV presente en la circulación. Se espera que la dosificación intraarticular en la rodilla humana resulte en una cantidad de partículas AAV en circulación sistémica de 10 a 100 veces menor en comparación con la dosificación intravenosa. Además, se anticipa que los patrones de eliminación sean similares a los observados tras la dosificación intramuscular (IM) en la pierna. En un estudio donde se administraron partículas virales de AAV2 por vía intramuscular en el músculo de la pierna humana, se detectó eliminación viral en la orina únicamente durante las primeras 24 horas posteriores a la dosis. No se detectó eliminación en las heces ni en el semen.

El transgen viral recombinante derivado del candidato clínico de AAV será detectado mediante un ensayo de PCR Digital Droplet (ddPCR), una tecnología para cuantificación en punto final.

Fuera del huésped humano, las partículas virales pierden viabilidad progresivamente en función de las condiciones físicas y químicas del entorno.

Factores como la exposición a temperatura ambiente, la radiación UV, la variabilidad del pH, la presencia de detergentes y enzimas proteolíticas afectan negativamente a la integridad de la cápside viral, reduciendo su estabilidad estructural. En medios como agua, suelo o superficies expuestas, se espera una rápida degradación biológica o inactivación física.

-Teniendo en cuenta el resultado de la evaluación del riesgo para los profesionales de la salud y/o contactos cercanos del sujeto del ensayo clínico (incluidos los grupos vulnerables):

Se han definido estrategias específicas para mitigar los posibles riesgos para terceros y para el medio ambiente asociados al uso clínico del vector ATX-2a (AAV-DJ), en todas las etapas del proceso, desde la preparación del producto hasta la manipulación de muestras biológicas del paciente tras la administración. Estas medidas siguen los principios de contención biológica aplicables a medicamentos de terapia génica no replicativos y cumplen con los requisitos establecidos para organismos modificados genéticamente en ensayos clínicos.

1. Prevención de la exposición durante la preparación, manipulación y administración del producto:

- El producto se presenta en formulación estéril y lista para su administración, sin necesidad de reconstitución ni mezclas, lo que reduce el riesgo de exposición accidental.
- La preparación y administración del vector se realizará por personal sanitario debidamente formado en el manejo de medicamentos de terapia génica y en buenas prácticas de contención biológica.
- La administración intraarticular se efectuará en condiciones asépticas, en áreas clínicas con acceso restringido, empleando equipo de protección individual (EPI) adecuado: guantes, bata desechable, protección ocular.
- El material en contacto con el producto (jeringas, viales, gasas, agujas) se considerará residuo biológico con OMG y será eliminado siguiendo los protocolos específicos para este tipo de productos.

2. Medidas durante la manipulación de muestras del paciente tras la administración:

- Aunque no se han detectado problemas de biodistribución en modelos preclínicos y no se dispone de evidencia actual de excreción significativa, como medida de precaución, se aplicarán



medidas de contención biológica equivalentes al nivel de bioseguridad 2 (BSL-2) durante la manipulación de muestras biológicas (sangre, orina, heces, líquido sinovial) recogidas en los primeros 14 días tras la administración.

- Las manipulaciones deberán realizarse por personal cualificado, utilizando EPI adecuado (guantes, bata, mascarilla o pantalla facial si hay riesgo de salpicadura), y preferentemente en cabinas de seguridad biológica tipo II si se requiere apertura de tubos con fluidos.
- Todo el material de desecho derivado de la manipulación de estas muestras será tratado como residuo biológico de riesgo con OMG y eliminado conforme a los procedimientos establecidos por la normativa nacional.

3. Recomendaciones al sujeto del ensayo y a sus contactos cercanos:

- Los sujetos del ensayo recibirán instrucciones claras (orales y por escrito) sobre las medidas higiénicas a seguir tras la administración del producto, especialmente durante los primeros 14 días.
- Se recomendará evitar el contacto directo de fluidos corporales (por ejemplo, sangre o secreciones) con otras personas, y no compartir objetos personales que puedan estar contaminados (toallas, apósticos, ropa interior).
- En caso de convivencia con personas inmunodeprimidas, embarazadas o niños pequeños, se reforzarán las precauciones generales durante este período.

4. Restricciones relativas a la donación de sangre, células, tejidos u órganos

- Se establecerá una restricción permanente a la donación de sangre, células, tejidos u órganos por parte de los sujetos que reciban ATX-2a, como medida preventiva ante la posibilidad teórica de presencia residual del vector.
- Esta restricción se aplicará salvo que, en el futuro, existan datos adicionales que demuestren la ausencia total de riesgo y permitan su reevaluación.

Esta información ya se incluye explícitamente en el protocolo y en el consentimiento informado del ensayo clínico.

-Teniendo en cuenta el resultado de la evaluación del riesgo para el medio ambiente:

Dado que el vector ATX-2a es un organismo modificado genéticamente (AAV-DJ no replicativo), se han implementado medidas específicas para minimizar el riesgo de liberación involuntaria al medio ambiente durante su uso clínico. Las estrategias adoptadas se centran en la prevención de su excreción y eliminación inadecuada, así como en la correcta gestión de residuos.

Las principales medidas aplicadas son:

- Administración localizada y controlada: el producto se administra por vía intraarticular como dosis única, lo que limita la posibilidad de diseminación sistémica y excreción a través de fluidos corporales.
- Seguimiento y manipulación de muestras: aunque no se esperan niveles relevantes de excreción, se aplicarán precauciones reforzadas durante los primeros 14 días tras la administración, utilizando protocolos de contención biológica de nivel 2 (BSL-2) para la manipulación de muestras clínicas (sangre, orina, heces, líquido sinovial), según lo descrito en el protocolo.



- Gestión de residuos clínicos: todo el material que haya estado en contacto con el vector (viales, jeringas, gasas, tubos) será considerado residuo biológico con OMG y eliminado conforme a la normativa vigente para residuos sanitarios que contienen organismos modificados genéticamente.
- Recomendaciones al paciente: se proporcionará al sujeto del ensayo información clara sobre las medidas higiénicas a seguir tras la administración, incluidas pautas para evitar el contacto directo de fluidos corporales con otras personas o con el entorno durante el período de precaución.

En el caso de que se produzca cualquier incidencia o accidente se deberá informar de manera inmediata a la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB) y al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG).

CONCLUSIÓN: Se considera que en el estado actual de conocimientos y con las medidas de uso propuestas, este ensayo clínico no supone un riesgo significativo para la salud humana, la salud animal y/o el medio ambiente.

Una vez concluido el ensayo, se remitirá un informe de resultados del mismo al Consejo Interministerial de OMG (CIOMG) y a la Comisión Nacional de Bioseguridad (CNB), siguiendo el modelo de informe de resultados elaborado por la CNB, que se encuentra disponible en la [web del MITECO](#). En este informe se deberá incluir información sobre las posibles incidencias, si las hubiera. La remisión de esta información será condición indispensable para la concesión de futuras autorizaciones de ensayos con organismos modificados genéticamente.

Madrid a 6 de noviembre de 2025