

Barbara Konkle : Je m'appelle Barbara Konkle. Je suis professeur de médecine à l'Université de Washington et Directrice scientifique de Bloodworks Northwest, où j'occupe également le poste de codirectrice du Centre de traitement des troubles de l'hémostase de Washington. Aujourd'hui, je vais vous parler de thérapie génique et d'hémophilie, en particulier de thérapie génique par le vecteur viral adéno-associé (vecteur AAV) et son application pour l'hémophilie.

L'objectif académique est d'identifier les principales caractéristiques des essais cliniques en cours de thérapie génique, à la fois pour l'hémophilie A et pour l'hémophilie B. Le principe de la thérapie génique est assez simple. Un gène est inséré dans le vecteur AAV, qui est ensuite injecté dans la circulation périphérique. Le vecteur et les éléments amplificateurs du promoteur, que nous décrirons plus tard,...

... permettent d'acheminer le gène vers sa cible, la cellule hépatique. L'AAV ne s'intègre pas au génome de la cellule pour produire la protéine. Sur ce qui se passe exactement à l'intérieur de la cellule, nos connaissances restent incomplètes et doivent être améliorées. Il y a eu un nombre incroyable de modèles animaux de thérapie génique, et désormais plus de 200 essais cliniques ont été menés chez des patients atteints de diverses maladies ...

...en utilisant la thérapie génique à base d'AAV au cours des 30 dernières années. Voici une description de l'AAV. Le dessin du haut représente le virus de type sauvage. Il contient un gène rep et un gène cap, qui sont retirés du vecteur utilisé en thérapie génique. L'AAV de type sauvage est un membre de la famille des parvovirus. Il contient un génome d'ADN simple brin d'environ 4,7 kb.

Il présente une déficience de réplication, et requiert donc un virus auxiliaire. En fait, son nom est dérivé de cette propriété, car il a été découvert à titre de contaminant dans une culture d'adénovirus. Mais mis à part cette circonstance lors de sa découverte, il n'a finalement rien à voir avec les adénovirus. Les vecteurs AAV ne sont pas pathogènes et sont souvent présents naturellement chez l'homme. Les vecteurs AAV sont incapables de se reproduire.

Comme nous le verrons plus tard, il existe des vecteurs naturels et des vecteurs issus de la bioingénierie. La capsid virale dirige le vecteur vers sa destination (tropisme tissulaire). Une expression à long terme des AAV a été documentée dans des cellules post-mitotiques. Les AAV ne s'intègrent habituellement pas au génome et, ce qui est très important, ils présentent à ce jour un bon profil d'innocuité à la fois dans les modèles animaux et chez l'homme lors des essais cliniques. Comme mentionné précédemment, nous sommes régulièrement exposés aux AAV dans notre environnement.



Environ 30 à 50 % de la population possède des anticorps contre les AAV, le plus souvent contre le sérotype AAV2. Au cours d'une étude portant sur l'évolution des articulations chez 62 jeunes garçons hémophiles, les échantillons prélevés au cours du temps ont permis de suivre le développement de la séropositivité aux AAV au cours de cette période précoce de la vie.

Comme le montre le graphique de droite, on peut constater que ces garçons deviennent progressivement exposés à l'AAV, le plus souvent l'AAV2. Cette étude s'est penchée spécifiquement sur l'AAV2, l'AAV5 et l'AAV8. Afin d'utiliser ces vecteurs pour le traitement de l'hémophilie, des travaux ont été réalisés au fil des années pour améliorer l'expression. Au début, on pensait que la réponse immunitaire contre la capsid pourrait être réduite en retirant les capsides vides,...

...ce qui semble être une bonne idée et l'est probablement, bien que son impact sur la réponse immunitaire soit finalement resté incertain. Différents sérotypes d'AAV ont été utilisés. L'AAV2 a été utilisé en premier, suivi d'autres sérotypes pour lesquels il y a à priori moins de séropositivité dans la population et qui présentent différents tropismes tissulaires. Le promoteur spécifique du foie et les éléments de régulation ont également été optimisés pour s'assurer que le foie soit bien ciblé.

Cette figure montre un promoteur CMV, mais d'autres promoteurs sont utilisés. Les scientifiques ont également optimisé la séquence codante pour amplifier l'expression du facteur VIII et du facteur IX. Deux modifications en particulier sont désormais utilisées systématiquement. La première est une réduction de la taille du facteur VIII en retirant le domaine B, afin de permettre son insertion dans le vecteur AAV.

Et pour le facteur IX, le variant Padoue est utilisé. Ce variant, découvert dans une famille de Padoue, en Italie, est dû à un changement d'un seul acide aminé et entraîne une augmentation importante de l'activité du facteur IX. Comme nous allons le voir, l'insertion de ce changement dans la cassette du facteur IX a permis d'augmenter considérablement l'activité spécifique du facteur IX.

Le premier essai clinique à base d'AAV en hémophilie a été réalisé par injections intramusculaires. Cet essai a été mené à l'Hôpital pour enfants de Philadelphie. Aucune expression systémique n'a pu être mesurée. Mais, fait intéressant, lorsqu'ils ont ensuite réalisé des biopsies des muscles, ils ont observé une expression persistante du gène du facteur IX. La première perfusion dans le foie a été réalisée avec une construction de FIX dans un vecteur AAV2. La figure de droite est tirée de cette publication.

A dose élevée, le taux d'activité du facteur IX, indiqué par la ligne rouge, a initialement augmenté jusqu'à environ 12% ce qui était incroyablement

excitant. Malheureusement, les taux d'enzymes hépatiques ont également augmenté, en particulier l'ALT, et ceci a entraîné une diminution de l'expression du facteur IX. Cet effet était inattendu, en partie parce que les études étaient basées sur des modèles canins...

où rien de tel n'avait été observé. Alors oui, les humains ne sont pas des chiens mais malgré tout il s'agissait là d'un effet totalement surprenant. Par la suite, un patient ayant des anticorps préexistants contre le vecteur AAV2 a été perfusé, et n'a développé aucune réponse, probablement pour cette raison. Ensuite, un autre sujet a été perfusé pour mieux comprendre la réponse immunitaire.

Pour ce patient, de nouveau une augmentation des taux d'enzymes hépatiques a été observée, mais aucune expression de facteur IX. Le premier succès d'expression à long terme provient de l'étude du Collège universitaire de Londres/Hôpital de recherche pour enfants St-Jude, et la figure de droite est tirée de leur publication. Cette première étude de suivi rapporte l'expression la plus longue à ce jour, soit de 8 ans, et ces personnes continuent d'exprimer le facteur IX. Les lignes dorées représentent l'évolution des taux de facteur IX et les flèches bleues au-dessus indiquent les infusions de facteur.

Les taux de facteur IX montent et descendent avec les perfusions. Mais l'expression s'est stabilisée autour d'environ 2 à 6 % après une augmentation progressive de la dose. Cet essai clinique nous a appris une chose importante. En effet, les patients qui ont présenté une forte augmentation des taux d'ALT, comme l'indique la flèche verte pour le patient no 5, ont reçu un traitement de prednisone.

Et ce traitement de prednisone a permis de maintenir l'expression et l'activité du facteur. Cette approche est actuellement utilisée dans tous les essais cliniques de thérapie génique. Ce tableau décrit quelques-uns des essais cliniques de phase 1/2 et de phase 3 qui sont en cours. Il est possible que certains essais ne soient pas mentionnés. Le but n'est pas de présenter une liste complète, mais d'illustrer l'état actuel du domaine de recherche.

Étant donné que ce domaine évolue rapidement, ces résultats pourraient être dépassés. Ce tableau montre d'abord les essais sur l'hémophilie A, suivis de trois essais sur l'hémophilie B, avec le nom des commanditaires et des essais. Les vecteurs utilisés sont de différents sérotypes, y compris des vecteurs issus de la bioingénierie, notamment Spark100 et AAVhu37 de Ultragenyx.

Les cellules utilisées pour la production des AAV proviennent d'insectes ou de mammifères. L'avantage des insectes est que les taux de production sont plus élevés, mais les modifications post-traductionnelles sont différentes.



Nous ignorons à ce stade si cela a une importance. La colonne suivante indique la phase de l'essai clinique. L'essai de BioMarin est le plus avancé en phase 3. Ils utilisent deux doses exprimées en génomes de vecteur par kilogramme.

Bien que la plupart des patients aient été assignés à la dose élevée, un essai de phase 1/2 à doses croissantes permet de déterminer la dose à utiliser pour la phase 3. L'essai Spark de phase 1/2 sur le facteur VIII est actuellement à l'étape de la phase d'observation d'au moins 6 mois, pendant laquelle les patients doivent noter ou saisir dans leur journal électronique leur schéma thérapeutique et les épisodes hémorragiques.

Ainsi, les résultats recueillis par un patient après son traitement par thérapie génique peuvent être comparés à ceux obtenus pour le même patient avant la thérapie génique. Deux essais de phase 3 portent actuellement sur l'hémophilie B. L'essai Pfizer de phase 3 représente l'étape suivante de l'essai Spark de phase 1/2. Puis, il y a l'essai uniQure également en phase 3.

Plus précocément, il y a eu l'essai Freeline de phase 1/2. Au final, qu'avons-nous appris des résultats de ces études jusqu'à présent ? Certains des résultats publiés ou présentés à partir de quelques essais cliniques illustrent où nous en sommes aujourd'hui. Voici par exemple, l'essai clinique AMT-061 mené avec la construction AAV-facteur IX Padoue.

La figure de gauche montre le vecteur AMT-060 d'abord utilisé pour la phase 1/2, avec laquelle ils ont obtenu un taux d'expression du facteur IX d'environ 7,5 %. Lors de mes débuts dans le domaine de l'hémophilie, un tel taux d'expression était inespéré. Nous pensions que si la thérapie génique pouvait seulement transformer un patient sévère en patient modéré, ce serait déjà une belle réussite. Et cela a réellement été une réussite.

Dans les essais cliniques ayant permis de maintenir un taux d'expression de 6 %, les patients n'ont pas besoin de perfusions et ils ne saignent pas. Mais les essais plus récents démontrent que nous pouvons atteindre des taux plus élevés. Dans cette optique, le variant Padoue a été inséré dans le vecteur pour produire l'AMT-061, et a été perfusé dans 3 sujets. Cette figure montre les résultats des 36 premières semaines, et des données plus récentes ont été présentées lors du congrès de Société Américaine d'Hématologie.

Chez ces 3 sujets, le taux moyen d'activité du facteur IX était de 45 % après 36 semaines. Fait intéressant, ils n'y a pas eu besoin d'un traitement immunosuppresseur. Les patients traités présentaient une faible séropositivité pour l'AAV5, ce qui interroge sur la possibilité de perfuser les patients présentant des anticorps contre l'AAV.

Cette étude est actuellement en phase 3 à la même dose.



Voici ici une mise à jour après 2 ans des résultats de l'étude Spark-9001 sur la construction AAV-facteur IX Padoue, qui démontre une expression soutenue après 29 mois. Il existe une certaine variabilité dans les taux d'expression, mais tous les taux ont un impact clinique important, car ils ont éliminé le recours aux perfusions de facteurs et les saignements.

Le BMN 270 était l'essai de phase 1/2 dont le vecteur est actuellement étudié en phase 3 à la dose de  $6 \times 10^{13}$  génomes de vecteur par kilogramme. Cette figure présente les résultats des dosages chromogéniques obtenus sur 3 ans. Ce vecteur a initialement permis d'atteindre des taux de facteur VIII dans la plage normale, qui ont ensuite diminué au fil du temps.

Mais la valeur médiane de l'activité d'environ 40 IU/dL est tout de même remarquable. Nous devons suivre ces résultats, car il s'agit de l'essai clinique le plus avancé. Et nous devons savoir si les autres essais sur le facteur VIII produiront les mêmes résultats, ce que nous ignorons actuellement. L'essai Alta évalue également une thérapie génique pour le facteur VIII. Voici la mise à jour des résultats présentés lors du récent congrès de la Société Américaine d'Hématologie.

Il s'agit d'une étude de phase 1/2. En haut, vous voyez les sujets ayant reçu une dose de  $2 \times 10^{12}$ , alors que les autres ont reçu  $1 \times 10^{13}$  ou  $3 \times 10^{13}$  génomes de vecteur par kilogramme. Il existe une relation dose-effet. Le graphique de gauche montre que les résultats de l'activité du facteur VIII sont clairement séparés sur une échelle linéaire.

L'échelle logarithmique montre que les patients ayant reçu une dose élevée ont obtenu des taux de FVIII dans la plage normale. Encore une fois, il est trop tôt pour conclure. Il faudra continuer à suivre ces sujets au fil du temps. Ce facteur VIII sera utilisé dans un essai de phase 3 mené par Pfizer. Alors, dans l'ensemble, la thérapie génique par AAV comporte des éléments extrêmement positifs, mais des défis et des questions persistent.

L'un des problèmes concerne les restrictions d'admissibilité des patients. Actuellement, les sujets ne doivent avoir aucun antécédent d'inhibiteurs. Mais un certain nombre d'études sont en développement pour examiner spécifiquement ces patients avec inhibiteurs. Ainsi, cette restriction pourrait éventuellement être éliminée. Les sujets inclus sont des hommes adultes et le taux de facteur VIII doit être inférieur à 1 %,...

...mais cette exigence devient un peu moins stringente, et pour le facteur IX, un taux égal ou inférieur à 2 % est accepté. Les patients ayant des anticorps préexistants contre le vecteur AAV sont normalement exclus, toutefois, les sujets de l'essai uniQure sur l'hémophilie B ont de faibles titres de positivité pour le vecteur. A l'heure actuelle, nous n'avons pas une image claire de l'importance relative du titre ou du sérotype dans l'efficacité observée.





Les futurs groupes de patients ciblés sont ceux qui ont actuellement, ou ont déjà eu, des inhibiteurs. J'ai entendu dire que Spark mène un essai clinique dans cette direction et c'est également le cas d'autres entreprises qui élaborent des protocoles d'essais cliniques. Les anticorps préexistants contre le vecteur AAV sont effectivement un réel problème puisqu'ils entraînent l'exclusion de certains patients. D'autres cibles sont les cas d'hémophilie modérée ainsi que les adolescents. Puisque l'AAV est un vecteur non intégratif, il va progressivement être perdu lors de la croissance du foie.

C'est pourquoi cette thérapie n'est actuellement pas accessible pour les jeunes enfants. Nous ignorons à partir de quel âge il pourrait être administré sans craindre une trop grande perte d'efficacité. Certaines femmes souffrent d'hémophilie grave, et donc certains essais cliniques commencent à accepter la participation des femmes. Enfin, il n'y a actuellement aucune option de nouvelle thérapie par AAV pour les patients qui auraient perdu l'expression après un premier essai, ou qui ont participé aux premières phases des essais et n'ont pas répondu à la thérapie.

Finalement, il n'existe aucune autre approche de thérapie génique pour l'hémophilie aux mêmes phases de développement. Alors, quels sont les risques? Nous disposons actuellement d'excellents traitements pour l'hémophilie. Ainsi, lorsque nous envisageons la thérapie génique pour nos patients, nous devons nous assurer que les avantages sont plus importants que les risques. Quelques risques sont connus.

La première est une toxicité hépatique à court terme observée chez quelques patients dans pratiquement tous les essais. Elle répond habituellement favorablement à de brefs traitements de stéroïdes. Mais dans plusieurs essais, quelques patients ont nécessité un traitement immunosuppresseur de plus longue durée, ce qui soulève des questions concernant la toxicité. Les patients développeront des anticorps anti-AAV s'ils sont exposés au virus, ce qui exclut actuellement la possibilité de leur administrer des doses supplémentaires.

Nous savons aussi qu'il y a habituellement une large variation interindividuelle dans le taux d'expression, en partie expliquée par la réponse immunitaire des lymphocytes T à la capsid. Mais certains des patients qui perdent la réponse, ou présentent une diminution de réponse, n'ont aucune preuve de cette réaction. Il existe plusieurs théories pour expliquer ce phénomène. Mais je pense qu'à ce stade, nous ne comprenons pas vraiment.

Il existe également des facteurs inconnus. Nous ignorons s'il existe un risque de toxicité hépatique à long terme. Nous n'avons actuellement aucune preuve de cela, mais il sera très important de le vérifier. Comme je l'ai mentionné précédemment, l'AAV présente un très faible taux d'intégration.



Mais nous perfusions  $1 \times 10^{13}$  génomes de vecteur par kilogramme, ce qui est une dose très élevée.

Je pense que nous pouvons être rassurés par le grand nombre de patients qui ont reçu l'AAV dans de nombreux essais cliniques sur plusieurs maladies, mais nous devons surveiller cela de près. Il n'y a aucune preuve de transmission germinale. Les modèles animaux n'appuient pas cette possibilité. Dans les études chez les humains, les vecteurs détectés dans le liquide séminal sont éliminés, et il n'y a aucune preuve qu'ils se trouvent dans le sperme. C'est donc rassurant.

En résumé, la thérapie génique par AAV a réussi à augmenter les taux de facteur VIII et de facteur IX chez les patients atteints d'hémophilie. Et tous les différents taux atteints ont permis de réduire considérablement les perfusions de facteurs et les épisodes de saignement. À ce jour, les essais menés sur l'AAV pour l'hémophilie et d'autres maladies semblent présenter de très bons profils d'innocuité. Mais nous devons être vigilants pendant notre suivi à long terme pour déceler tout signe d'alerte concernant l'innocuité.

De plus, il nous faut des données sur l'efficacité à long-terme pour savoir si cette expression sera transitoire même si nous l'avons déjà observé pendant des années. Va-t-elle persister ? Va-t-elle disparaître ? Nous avons vraiment besoin de données à long terme à ce sujet. Et nous devons modifier notre approche avec l'AAV et aussi commencer à utiliser d'autres vecteurs pour pouvoir traiter une plus grande population de patients atteints d'hémophilie, y compris les jeunes enfants.

Je vous remercie.

