

David Lillicrap: Hallo, ich bin David Lillicrap. Ich bin Professor an der Abteilung für Pathologie und Molekulare Medizin der Queen's University in Kanada und werde Ihnen eine Reihe von Folien vorstellen, die sich mit Gentherapie bei der Hämophilie beschäftigen. Das Lernziel mit diesen Folien ist eine korrekte Beschreibung der Gentherapie, einschließlich grundlegender Begriffe und Konzepte.

Dies ist eine Geschichte, die vor über 65 Jahren begann, und auf dieser Folie ist hier ein Bild von Francis Crick auf der rechten Seite und James Watson auf der linken Seite zu sehen, die ihr elegantes Modell der Doppelhelix der DNS zeigen, die sie 1953 in Cambridge beschrieben haben.

Im Schnellvorlauf geht es nun in die frühen 80er Jahre, als die ersten Gene des Gerinnungsfaktors beschrieben wurden. Und dieser Nature-Artikel „News and Views“, veröffentlicht von meinem Mentor Arthur Bloom, beschreibt den Nutzen dieser Klonierungsexperimente, ein verbessertes Verständnis der Pathogenese von Blutungsstörungen, Fortschritte bei der Diagnose und schließlich, zu dieser Folienpräsentation, die Gentherapie.

Das Prinzip der Gentherapie ist relativ einfach. Dabei wird ein therapeutisches Transgen verwendet, das an Zellen abgegeben wird, in deren Kerne die DNA eingebaut wird. Der Kern exprimiert dann mRNA, die in Protein übersetzt wird, und dieses therapeutische Protein bleibt entweder in der Zelle oder wird aus der Zelle ausgeschieden und zirkuliert im Körper als therapeutischer Nutzen.

Bevor ich weiter auf die Details des Gentherapieprozesses eingehe, ist es wichtig, klar hervorzuheben, dass wir uns derzeit auf die somatische Zellgentherapie beschränken. Das heißt, entweder ein normales Gen zu einzubringen oder ein Gen innerhalb der Zellen eines Individuums zu reparieren, und nicht zum Nutzen nachfolgender Generationen. Die Gentherapie mit somatischen Zellen ist auf diese Person beschränkt, und wir beabsichtigen nicht, die DNA von Keimzellen zu verändern oder zu modifizieren.

Auf dieser Folie sehen Sie hier eine Liste von Krankheiten, die schon immer sehr gute Kandidaten für die Gentherapie waren. Es handelt sich um monogene Erkrankungen, d.h. der klinische Phänotyp ist überwiegend auf einzelne Gendefekte zurückzuführen, und Sie können sehen, dass die Hämophilie auf dieser Folie aufgeführt ist. Hämophilie steht da, weil wir wissen, dass geringe Abstufungen im Gerinnungsfaktor-Protein signifikante klinische Vorteile bringen. Das Protein wird aus der Zelle ausgeschieden, und es muss nur in den Kreislauf gelangen. Eine enge Expression des Proteins ist nicht erforderlich, und wir haben sehr gute Tiermodelle, in denen wir diese Gentherapie-Strategien testen können, bei Mäusen und Großtieren.



Somatische Zellgentherapie, auf dieser Folie sehen Sie vier mögliche Optionen. Der erste von ihnen ist die Reparatur von Mutationen. Ich werde auf der nächsten Folie etwas mehr dazu sagen. Als nächstes haben wir die Möglichkeit, Transgene durch nicht-viralen Gentransfer bereitzustellen. Dies stellt weiterhin eine theoretische Möglichkeit dar, ist aber noch weit von der klinischen Anwendung entfernt. Als nächstes haben wir die zellbasierte Gentherapie, und ich werde mehr dazu in einer nachfolgenden Folie ausführen, und dann schließlich den viralen Vektor-Gentransfer, der die Strategie ist, die in allen derzeit laufenden Studien zur Humangentherapie der Hämophilie angewendet wird.

Diese Folie beschreibt dann die Problematik der potenziellen Veränderung von Genen oder der Reparatur von Genen durch Genbearbeitungsstrategien. Auf der linken Seite der Folie sehen Sie die Möglichkeit der homologen Rekombination als eine Option, Gene zu reparieren. Dies ist theoretisch möglich, aber es ist ein sehr ineffizienter Prozess. Auf der rechten Seite der Folie sehen Sie eine Reihe verschiedener Bearbeitungen von nukleasebasierten Ansätzen. Also von links nach rechts: Zink-Finger-Nukleasen, TALENs-oder CRISPR-vermittelte Strategien, bei denen protein- oder nukleinsäurebasierte Wege zur Abgabe einer Nuklease an eine Region des Genoms, in der ein Doppelstrangbruch vorgenommen wird – jetzt betrachten wir den unteren Teil der Folie – und dieser Doppelstrangbruch wird auf verschiedene Weise verändert oder repariert. Diese Studien sind jetzt potenziell verwendbar – sie sind gerade dabei, in klinische Studien einzutreten – aber für die Hämophilie denke ich, obwohl dies in vitro und in Tiermodellen durchgeführt werden kann, sind diese ziemlich weit entfernt von einer klinischen Anwendung.

Was sind die Elemente einer Gentherapie-Strategie? Sie sind auf dieser Folie hier aufgeführt. Ich werde über das therapeutische Transgen, ein Abgabesystem und eine geeignete Wirtszelle sprechen, und dann über Messungen, Ergebnismetriken für die Expression des transgenen Proteins.

Wie sieht die Transgen-Kassette aus? Sie enthält in der Regel eine kodierende DNA-Sequenz oder eine cDNA-Sequenz ohne Introne. Die Größe der meisten dieser cDNAs liegt irgendwo im Bereich von 2–7 Kilobasen, und ich werde auf einer späteren Folie über zwei Möglichkeiten sprechen, die Codiersequenz zu ändern.

Die Codon-Optimierung wird auf dieser Folie beschrieben, es ist eine Änderung der Nukleotidsequenz, d.h. der Nukleotidtriplets, welche die Aminosäuren kodieren, aber es gibt keine Veränderung in der Aminosäuresequenz. Ziel dieser speziellen Strategie ist es, die Rate der mRNA-Transkription zu erhöhen, die mRNA-Verarbeitung und das Spleißen aller verbleibenden intronischen Elemente zu optimieren und schließlich die



mRNA-Translation an die Fülle der Transfer-RNA anzupassen, die in der Ziel-Wirtszelle vorhanden sind.

Die beiden anderen Gruppen der Elemente, die in der Transgenkassette benötigt werden, sind einige regulatorische Elemente am 5'-Ende des Transgens. Dabei handelt es sich um Promoterelemente, die durch einen zelltypspezifischen, entwicklungsspezifischen oder sogar medikamenteninduzierbaren Wirkstoff reguliert werden können, sowie weiter entfernte Elemente, die zur Verbesserung der Genexpression erforderlich sind, so genannte Enhancer-Elemente, die wiederum in der Regel auf einen bestimmten Wirtszelltyp abgestimmt sind.

Am anderen Ende der Transgenkassette befindet sich dann die 3'-Sequenz, die in der Regel zur Stabilisierung der Messenger-RNA dient, die von der cDNA-Sequenz kodiert wird.

Die nächsten beiden Folien befassen sich mit den allgemeinen Strategien für die Transgenübertragung. Die erste beschreibt den direkten Gentransfer in vivo, bei dem das Transgen oft entweder durch intravenöse Infusion oder möglicherweise durch eine Methode wie die intramuskuläre Injektion verabreicht wird. Der Vorteil dabei ist, dass dies praktisch einfach ist, es ist ein minimaler Zeitaufwand für den Arzt und den Patienten. Die Nachteile sind, dass es in vivo zu einer Immunantwort des Wirtes auf das Vektor-Lieferungssystem kommt, was einige Probleme verursachen kann, wie wir etwas später diskutieren werden. Zweitens gibt es eine variable Targeting-Effizienz, sodass Sie das Transgen möglicherweise an einige Zelltypen liefern, die Sie eigentlich nicht vorgesehen hatten.

Die zweite Strategie für die Transgenvermittlung ist auf dieser Folie hier dargestellt. Dies wird als indirekter oder ex-vivo-Gentransfer bezeichnet, wenn das Transgen außerhalb des Körpers verwendet wird. Auf der linken Seite der Folie sehen Sie, dass zuerst autologe, langlebige Vorläufer- oder Stammzellen aus dem Patienten entnommen oder isoliert werden müssen. Sobald diese Zellen isoliert wurden, erfolgt die Zugabe einer normalen Kopie des Gens, das im Patienten mutiert wird, oder das mutierte Gen, das in den Zellen des Patienten vorhanden ist, wird bearbeitet. Diese gentechnisch veränderten Zellen werden dann außerhalb des Körpers expandiert und dann dem Patienten wieder zugeführt, wo sie verbleiben und den Normalfaktor – im Falle der Hämophilie den normalen Gerinnungsfaktor – produzieren, der in den Zellen des Patienten fehlt.

Diese Zufuhr hat eine Reihe von Vor- und Nachteilen. Zu den Vorteilen zählt, dass es keine in vivo Vektor-Exposition gibt – das ist immunologisch wichtig und von Vorteil. Es liegt ein direktes Zell-Targeting vor, sodass die einzigen Zellen, die mit dem Vektor des neuen Transgens in Kontakt kommen, die Zellen sind, die entnommen wurden und außerhalb des Körpers zugänglich



sind. Der Nachteil ist, dass es sich um ein arbeitsintensives Verfahren handelt. Es erfordert spezielle Einrichtungen. Wichtig ist auch, dass der Wirt einen Konditionierungsprozess durchlaufen muss, um Platz für eine erfolgreiche Reimplantation der gentechnisch veränderten Zellen zu schaffen.

Alle aktuellen Studien zur Hämophilie-Gentherapie beinhalten den viralen Vektor-Genstransfer, und es wurden drei Arten von Viren verwendet: Adenoviren, Retroviren und adeno-assoziierte Viren.

Ich habe nur eine Folie zum Thema Adenovirus. Es wurde ein Patient mit diesem viralen Vektorsystem behandelt. Es ist sehr effizient bei der Umwandlung von replizierenden und nicht-replizierenden Zellen, und man kann große Mengen dieses Vektors relativ einfach herstellen. Die signifikanten Nachteile des adenoviralen Genstransfers sind, dass es eine signifikante angeborene Immunantwort auf diese Vektoren gibt. So erhalten Sie eine Erhöhung von proinflammatorischen Zytokinen, Toxizität der Leber, Thrombozytopenie und können im Extremfall ein systemisches Entzündungsreaktionssyndrom entwickeln, das von Natur aus gelegentlich tödlich verlaufen kann. Dies ist in seiner jetzigen Form kein Verabreichungssystem für Hämophiliepatienten.

Das zweite viral basierte Verabreichungssystem ist der lentiviral vermittelte Genstransfer, und dies wird von einer Reihe Gruppen für die anschließende klinische Translation der Hämophilie untersucht. Lentivirale Vektoren transformieren sowohl sich teilende als auch sich nicht teilende Zellen. Die Vektorkapazität, d.h. die Größe des Transgen-Inserts, ist mit maximal etwa 8 Kilobasen recht gut. Es gibt nur geringfügige angeborene Immunantworten. Ein Vorteil des lentiviralen Systems ist, dass es eine stabile genomische Integration gibt, die zufällig und nicht-onkogen zu sein scheint, was zumindest aus den umfangreichen Studien, die in Tiermodellen durchgeführt wurden geschlossen werden kann.

Schließlich das dritte der viralen Vektorsysteme, das adeno-assoziierte Virus. Dies ist eine Elektronenmikroskopaufnahme, die viele kleine AAV-Partikel zeigt. In Richtung der Mitte der Folie sehen Sie ein großes adenovirales Partikel. Dies ist das virale Vektorsystem, das in allen aktuellen Studien zur Hämophilie-Gentherapie verwendet wird.

AAV, wie ich es in Zukunft bezeichnen werde, ist ein nicht-pathogenes menschliches Parvovirus. Es besitzt ein einzelsträngiges DNA-Genom, das oben auf dieser Folie dargestellt ist. Seine Größe beträgt also 4,7 Kilobasen. Es weist zwei kodierende Regionen auf, ein Rep-Gen und ein Cap-Gen, und das Genom wird an beiden Enden durch invertierte terminale Wiederholungssequenzen begrenzt. Dieses virale Vektorsystem induziert eine minimale angeborene Immunogenität. Es gibt viele verschiedene Serotypen, die durch Kapsidproteinvarianten dargestellt werden. Ein sehr



kleiner Teil des rekombinanten Vektors integriert sich in das Wirtsgenom, und der größte Teil des Vektors existiert als stabile extrachromosomale kreisförmige Konkatemere.

Diese Folie zeigt Ihnen im Wesentlichen, wie man ein Wildtyp-AAV-Genom in ein therapeutisches AAV-Vektorgenom umwandelt. Sie entfernen sowohl das rep- als auch das cap-Gen, und Sie sehen unten in das zweite Diagramm eingefügt, dass das AAV-Vektorgenom nun ein therapeutisches Gen auf der rechten Seite und einen Promotor oder eine regulatorische Sequenz aufweist, die die Expression in einem bestimmten Organ oder Zelltyp antreibt. Auf dieser Folie hier ist ein leberspezifischer Promotor, der die Expression dieses Transgens in Hepatozyten fördern würde. Bei der Hämophilie ist dies derzeit der Ort, auf den alle Vektoren abzielen. Am unteren Ende der Folie sehen Sie, dass die Transgen-Inserts unterschiedlich sind, beim Faktor IX umfasst die cDNA-Sequenz etwa 1,3 Kilobasen, und dem für die B-Domäne gelöschten Faktor VIII etwa 4,7, nachdem die B-Domänen-Kodierungssequenz entfernt wurde.

Wie stellt man ein AAV-Vektorpartikel her? Nun, das ist auf dieser Folie hier beschrieben. Oben sehen Sie die transgene Nukleinsäuresequenz mit diesen ITR-Sequenzen, die an den 5'- und 3'-Enden des Transgens erhalten wurden. Die Promotorsequenz und das transgene Gen befinden sich in der Mitte, und dann wird dieses in das AAV-Vektor-Kapsid eingesetzt, um ein AAV-Vektorpartikel herzustellen, und es sind diese Partikel, die dem Patienten in die Leber injiziert werden, das therapeutische Material.

Das wird hier näher erläutert. Sie sehen also, dass das Partikel mit einer Wirtszellmembran interagiert. Mit AAV ist die Interaktion mit bestimmten Formen von Rezeptoren ganz gut ausgearbeitet, es gibt aber noch einige Wissenslücken. Das Partikel wird in ein Endosom innerhalb der Zelle aufgenommen. Schließlich wird das Partikel aus dem Endosom freigesetzt, das Kapsidprotein wird abgebaut und auf der Oberfläche des transduzierten Zelltyps exprimiert, und die transgene Nukleinsäure bleibt im Kern zurück, wo sie entweder als extrachromosomale Konkatemere oder in einigen Fällen – und bei AAV in geringerem Ausmaß – in die DNA der Wirtszelle integriert wird.

Wenn man also all dies für die Hämophilie zusammenfasst, beinhalten die Komponenten einer Gentransferstrategie ein therapeutisches Transgen, entweder ein Wildtyp oder eine modifizierte Faktor IX cDNA-Sequenz, ein B-Domäne gelöschter Faktor VIII. Man benötigt eine Lieferstrategie, derzeit adeno-assoziiertes Virus, obwohl es Studien gibt, wie ich bereits erwähnt habe, die lentivirale Studien enthalten, die sich noch in einer frühen Entwicklung befinden. Es muss an eine Empfänger-Wirtszelle überführt werden, und zum jetzigen Zeitpunkt ist das die Leber, und dann muss man



schauen, ob Metriken den Erfolg der durchgeführten Studien unterstützen. Dazu gehören die Messung des Gerinnungsfaktors im Plasma, der jährlichen Blutungsraten und des Verbrauchs an exogenem Faktor VIII des Patienten. Dann müssen natürlich auch die Sicherheitserwägungen beachtet werden.

Diese Folie stellt eine Version des Gartner-Hype-Zyklus für die Gentherapie dar. Gehen wir die Folie von links nach rechts durch. Also begann der technologische Auslöser in den 1970er Jahren, und Sie können sehen, dass wir an der Spitze des Gipfels hier, 1990–1995, glaubten, dass die Gentherapie bemerkenswerte Dinge vollbringen könne, und in der Tat wurden einige Formen der erblichen Immundefizienz, wie der ADA-Mangel, durch die Gentherapie geheilt. Jedoch kam es 1999 zu einer Katastrophe, bei der ein Patient, der mit adenoviraler Gentherapie behandelt wurde, Jesse Gelsinger, an einer systemischen Entzündung starb, und dies war in der Tat ein Tiefpunkt der Ernüchterung bei der Entwicklung von Gentherapie-Strategien.

Dennoch führten uns in den nächsten zehn Jahren, von 2000–2010, grundlegende wissenschaftliche Arbeiten zur Vektor-Entwicklung und zum besseren Verständnis der Immunantwort auf die Verabreichung von Gentherapie zu dem, was heute ein Plateau der Produktivität ist. Für Hämophilie begann es wirklich etwa 2010/2011, mit dem ersten verlängerten klinischen Erfolg der Hämophilie-Gentherapie und einem signifikanten biopharmazeutischen Engagement bei Gentherapie-Strategien. Und so stehen wir im Jahr 2019 vor einer Reihe von klinischen Phase-3-Studien, sowohl für die Hämophilie A als auch für die Hämophilie B.

Dieses letzte Bild beschreibt das Versprechen der Gentherapie bei Hämophilie. Oben sehen Sie die Auswirkungen der Hämostase mit Faktorerersatz, Ersatz mit verlängerter Halbwertszeit, Behandlung ohne Faktorerersatz und rechts die Möglichkeit, was mit Gentherapie geschehen kann. Unten sehen Sie die Gerinnungsfaktorwerte, die im Kreislauf gemessen werden können. Wenn Sie also Ihre Aufmerksamkeit auf die Informationen auf der linken Seite richten, sehen Sie, dass die Faktorwerte intermittierende Gipfel und Täler bilden, entsprechend den Verbesserungen und folgenden Reduzierungen der Hämostase. Dies geschieht aufgrund der Halbwertszeiten der Proteine im Kreislauf.

Diese Vorteile wurden mit verlängerten Halbwertszeiten, EHL-Faktoren, verbessert, und man kann im zweiten Datensatz die Ergebnisse in der Hämostase und die Ergebnisse mit den Faktorwerten erkennen. Dann bewegen wir uns weiter nach rechts, zu den Nicht-Faktor- Therapien. diese Faktoren verbessern nicht die Spiegel der Gerinnungsfaktoren, weil sie keine konventionellen Gerinnungsfaktoren im Kreislauf verwenden, aber sie



verbessern das Niveau der globalen Hämostase, und das ist im oberen Teil der Grafik dargestellt.

Auf der rechten Seite sehen Sie, was mit der Gentherapie erreicht werden kann. Die Gentherapie verspricht also, die Werte der einzelnen Gerinnungsfaktoren, Faktor IX und Faktor VIII, auf ein Niveau innerhalb der therapeutisch sinnvollen Werte zu erhöhen. Diese sind dann persistent, weil Faktor IX bzw. Faktor VIII weiterhin aus den abgegebenen therapeutischen Transgenen exprimiert wird. Sie sollten mehr als ausreichend sein, um eine langfristig aufrecht erhaltene Prophylaxe mit nur seltenen Anforderungen an den Austausch von intermittierenden Gerinnungsfaktoren zu produzieren.

