

Glenn Pierce: Guten Tag. Mein Name ist Glenn Pierce. Ich bin Vizepräsident der World Federation of Hemophilia, habe ein langjähriges Interesse an der Genherapie für Hämophilie und beteilige mich an der Forschung auf diesem Gebiet. Wir werden heute weitere Strategien und Ziele für die Genherapie zur Behandlung der Hämophilie besprechen. In diesem Vortrag werde ich auf andere Vorgehensweisen neben den Arbeiten über adeno-assoziierte Viren eingehen, und das Für und Wider der adeno-assoziierten Viren besprechen.

Der konzeptionelle Beginn der Genherapie liegt fast 50 Jahre zurück und begann mit einem Artikel von Ted Friedmann in der Zeitschrift Science, in dem über Genherapie beim Menschen spekuliert wurde. Das war nicht so lange, nachdem DNA und RNA und deren Funktionen beschrieben wurden. Friedman stellte Fragen über schwierige wissenschaftliche und ethische Probleme, die wir auch heute noch im Hinblick auf Gen-Editing haben.

Wir überspringen fast 50 Jahre und fragen uns, warum AAV-Vektoren bei Hämophilie für die Genherapie in Frage kommen. Die Frage kann grundlegend beantwortet werden: weil es damit klappt. Die Entwicklung dauerte 25 – 30 Jahre mit vielen Misserfolgen, auf dem Weg. Momentan ist diese Methode nun die beste, um Personen mit Hämophilie einen therapeutischen Nutzen zu verschaffen, und zwar sowohl bei Faktor-VIII- als auch Faktor-IX-Mangel.

Insgesamt gesehen haben sie ein günstiges Sicherheitsprofil, und die Anwendung erfolgte bei verschiedenen Stadien der Erkrankung, und in klinischen Studien. Es gibt viele Probleme, die wir besprechen werden, u. a. die Variabilität und Dauerhaftigkeit des Ansprechens, also die Tatsache, dass bei ca. der Hälfte der Personen eine vorbestehende Immunität gegenüber verschiedenen AAV-Serotypen vorliegt. Serotypen sind AAV-Partikel, die alle ähnlich sind, sich aber weit genug von den primären AAV-Serotypen wegentwickelt haben ...,

...sodass sie verschiedene Gewebe im Körper infizieren können. Wir haben eine Reihe dieser AAV-Serotypen für eine Genherapie verwendet. Bei vielen konnte ein früherer Kontakt nachgewiesen werden, der die Bildung von Antikörpern induzierte. Bei Personen, die positiv waren, konnte diese Therapie also nicht angewendet werden. Diese Immunantwort, die wir vor Verabreichung von AAV sehen, wird wesentlich durch die Verabreichung von AAV verstärkt, weshalb eine erneute Verabreichung nicht erfolgen kann.

Bei Verabreichung der AAV-Genherapie kommt es zu sehr hohen Antikörper-Titern. AAV ist eines der kleinsten Viren, die Menschen infizieren können. Daher bleibt auch nach Entfernen der AAV-Gene nicht viel Platz. Zum Beispiel passt nach Entfernen der B-Domain das Faktor-VIII-Gen kaum in das AAV. Es gibt also auch Einschränkungen wegen der Größe. AAV kann gelegentlich eine Random-Integration bewirken. Dies wurde jedoch nicht genau definiert und untersucht...

...und stellt die Frage der langfristigen Sicherheit. Und das letzte Problem bezieht sich darauf, dass wir Billionen Virusgenome Patienten verabreichen, jedoch nur ein sehr kleiner Teil davon Proteine produziert, die sezerniert



werden und brauchbar für die Therapie sind. Nichtsdestotrotz ist AAV ein funktionierender Virus-Vektor, der eine therapeutische Wirkung bei Hämophilie hat.

Welche Möglichkeiten bestehen zur Verbesserung der AAV-Vektoren? Wir haben uns alle Probleme bei Anwendung von AAV angesehen, viele Lösungen wurden vorgeschlagen, die meisten wurden jedoch nicht untersucht. Dies ist wichtig, nicht nur, weil die klinischen Studien in Phase 3 übergehen, sondern auch weil neue Studien in die Wege geleitet werden, die eine Besserung der AAV-Vektoren, Wirksamkeit der Transduktion und Ähnliches zeigen könnten. Es werden also ...

mögliche...Lösungen untersucht, jedoch nicht schnell genug, dass sie als erste Generation der AAV-Gentherapie 2020 bzw. 2021 zugelassen werden könnten. Wenn wir uns die AAV-Vektortransduktion von Hepatozyten ansehen, wenn wir uns also diese Abbildung anschauen, sehen wir Folgendes: Nummer 1: Wenn Antikörper gegen AAV aufgrund einer vorbestehenden natürlichen Infektion vorliegen,

...werden diese sogar ein Erreichen der Zielzelle verhindern. Daher kann die Gen-Therapie nicht wirksam sein. Nummer 2: Sollten keine Antikörper vorhanden sein, kann AAV an spezifische Zelloberflächenrezeptoren gebunden und durch den üblichen Mechanismus der Rezeptortranszytose endozytiert werden. Sobald es in der Zelle ist, kann es auf eine angeborene Immunität stoßen, da unsere Zellen so angelegt wurden, dass sie Virusinfektionen bekämpfen.

Das kann also geschehen, wenn es als Therapie benutzt wird. Aber dann könnte jedoch genug AAV entweichen so, dass es „uncoated“ geugt würde. Vom Zytoplasma gelangt die DNA in den Kern, wo sie dann Episome bildet, die stabil geschlossene Schleifen sind. Sie können die Wirt-Maschinerie benutzen, um Protein zu transkribieren und eine Translation des Proteins zu bewirken, welches dann sezerniert werden kann. Das Kapsid selbst ...

...gelangt in das endoplasmatische Retikulum oder trifft auf Major Histokompatibilitäts-Antigene der Klasse I. Einige von ihnen können sich speziell an Kapsidproteine binden. In diesem Fall sind sie auf der Zelloberfläche verteilt, wo sie spezifische zytotoxische Anti-Kapsid-CD8-T-Zellen stimulieren können. Das kann dann zu einer Destruktion der Zelle, die das Transgen enthält, führen. So haben wir also Probleme ...

...mit Effizienz, Variabilität und Haltbarkeit als Funktionen aller dieser komplexen Schritte, die sich innerhalb der Zelle abspielen. Was können wir bei vorbestehender Immunität tun? Einige Gruppen untersuchen Immunadsorption in Tiermodellen. Dabei wird eine Säule, wie beispielsweise eine Protein-G- oder Protein-A-Säule benutzt, die Immunglobulin (IgG) von einem Patienten, der möglicherweise hohe Anti-AAV-Titer hat, adsorbieren kann .

Dies ist eine vorübergehende Wirkung. Sie besteht nicht sehr lange, kann aber lang genug vorhanden sein, um die Titer ausreichend zu senken,



sodass AAV verabreicht werden kann, und das Transgen zu den Zielgenen gelangen kann. Derzeit laufen Studien, die die Wirksamkeit der Entfernung von IgG untersuchen, da bei vielen Patienten größere Mengen IgG entfernt werden müssen, ...

...um das Ansteuern auf Hepatozyten zu ermöglichen. Dann erhebt sich noch die Frage der intrazellulären Toxizität nach AAV-Abgabe. Bei mehreren Patienten wurde ein Anstieg der Transaminasen beobachtet. Dieser Anstieg ist vorübergehend, und in den meisten Fällen nicht sehr hoch, etwa 1½ bis 2 Mal so hoch wie der Normalwert. Trotzdem ist dies beunruhigend, da ein Anstieg der Transaminasen Zelltod von Hepatozyten bedeutet.

Welche Gründe für erhöhte Leberenzyme könnte es geben? Es gibt drei Hypothesen und eine oder mehr könnten für Hepatozyten bei bestimmten Patienten zutreffen. Zuerst einmal die Degradierung einer sehr hohen AAV-Kapsid-Last. Eine Menge Kapsid geht in die Zellen, da eine Menge intravenös verabreicht wird. Die Zelle muss dieses Kapsid verdauen. Es muss in seine Komponenten,

... Aminosäuren, abgebaut werden. Die Zelle benötigt dazu eine große Menge Energie. Dann gibt es noch das Problem mit zytotoxischen T-Zellen, das ich gerade beschrieben habe. Die dritte Möglichkeit ist eine fehlende Proteinfaltung. Dies trifft mehr für Faktor VIII zu. Seit mehreren Jahren weiß man, dass es sehr schwer für Zellen ist, das Faktor-VIII-Protein herzustellen. Es ist ein komplexes Protein, eines der größten Proteine im Körper.

Auch wenn wir Faktor VIII mit entfernter B-Domain verwenden, wurde in Zellkulturen gezeigt, dass es sehr schwer für Zellen ist, das Protein herzustellen. Dies kann auch Toxizität in diesen Zellen verursachen. Diese Toxizität kann zu einem Zelltod und natürlich zu einem Verlust der Faktor-VIII-Protein-Expression führen. Dies sind also die Bereiche, die untersucht werden müssen. Sie sind noch nicht genügend erforscht, um Antworten auf unsere Fragen zu bekommen und potenzielle Lösungen ...

...dieser Probleme zu erhalten. Im linken oberen Diagramm sehen Sie ein Beispiel von erhöhten Transaminasen in der Leber. Es zeigt auch die gleichzeitige Entwicklung von zytotoxischen CD8-T-Zellen, die spezifisch für AAV-Kapsid sind. Dies führt zum Tod und der Zerstörung der Zellen. Unten sehen Sie verschiedene Immunantworten auf ...

...eine Transduktion und Transgen-Expression, die auftreten können. Wir sehen hier CD8-Zellen, die Hepatozyten, die das Transgen enthalten, angreifen können. Wir können auch sehen, dass CD4-T-Zellen (Helfer-Zellen), aktiviert werden können. Diese sind wichtig für eine wesentliche Antikörperreaktion auf das AAV-Kapsid, was eine weitere Verabreichung ausschließt. Daher gibt es auch fast keine Bestrebungen, diese 3 kritischen Fragen, ...

...die die Rolle des Kapsids, zytotoxische T-Zellen, und die fehlende Proteinantwort betreffen, zu untersuchen. Viel Arbeit ist noch erforderlich auf diesen Gebieten, um diese für bestimmte Patienten und Patientengruppen



besser zu definieren. Welche Alternativen gibt es für AAV? Es wurden viele Arbeiten über Viren und Nicht-Virus-Alternativen durchgeführt. Am weitesten fortgeschritten ist die Arbeit über die bei Hämophilie verwendeten Lentiviren.

Lentiviren stammen von HIV ab. Mehrere HIV-Gene sind jedoch nicht vorhanden, und das Faktor-VIII- oder Faktor-IX-Gen kann wie bei AAV eingeschleust werden. Untersuchungen laufen ex vivo mit hämatopoetischen Stammzellen und in vivo speziell mit Hinblick auf Hepatozyten, wobei Lentiviren-Abgabe von Faktor IX und Faktor VIII in vorklinischen Modellen mit großen Tieren benutzt wird.

Bei einer anderen Vorgehensweise werden keine Viren benutzt, was eine ideale Situation wäre. Lipid-Nanopartikel werden in der Forschung mehr als 30 Jahre verwendet, um Nukleinsäuren wie DNA abzugeben. Ich habe erwähnt, wie ineffizient AAV ist. Diese Nanopartikel sind bei der Abgabe von Genen an Zellen sogar noch weniger effizient. Jedoch werden auf diese Lipid-Nanopartikel keine Immunantworten ausgelöst. Daher könnten wiederholte Injektionen möglich sein.

Wenn ein Patient nicht genügend hohe Spiegel von Faktor VIII oder Faktor IX hat, kann man diese Partikel wiederholt verabreichen, um therapeutische Spiegel zu erhalten. Eine weitere Methode, die die Zukunft der Gentherapie darstellt, besteht in Gen-Editing. Sie besteht darin, dass das Gen direkt in Chromosomen eingefügt wird, das ein existierendes Gen ersetzen könnte. Im Falle der Hämophilie ist dies nicht unbedingt nötig. Es kann einfach dem Chromosom zusätzlich eingefügt werden.

Bei einigen Hämophilie-Fällen könnte dies sogar das endogene Gen reparieren, bei spezifischen Mutationen. Gen-Editing ist die Zukunft der Gentherapie, da es, wie ich sagte, eine permanente Korrektur eines Phänotyps ermöglicht. Sobald sich das Gen in den Chromosomen befindet, wird es Protein exprimieren, solange die Zelle lebt. Wenn sich die Zelle teilt, findet sich das Gen in beiden Tochterzellen. Daher ist das eine attraktive Methode, die allerdings nicht so weit ist, ...

...dass sie in klinischen Studien am Menschen angewendet werden kann, jedoch in vorklinischen Studien zur Hämophilie bereits untersucht wird. Die letzte Methode ist die Zelltherapie. Für Zelltherapie wurden eine Reihe verschiedener Zellarten benutzt, und zwar sowohl Stammzellen als auch Hepatozyten, um das Faktor-VIII oder Faktor-IX-Gen direkt Personen mit Hämophilie zu verabreichen. Diese Folie zeigt ein Diagramm mit Lipid Nanopartikeln, die Nukleinsäuren abgeben.

Die meiste Arbeit wird mit kleinen RNA-Molekülen wie hemmende RNAs durchgeführt. Gene können jedoch auch in diese Lipid-Nanopartikel eingebaut werden. Viel Arbeit wurde geleistet, damit sie für Zellen nicht toxisch sind, und zu ermöglichen, dass sie z. B. zwei Hepatozyten zum Ziel haben. Wir freuen uns auf weitere Arbeit auf diesem Gebiet. Wir sind noch nicht so weit, dass klinische Studien durchgeführt werden können, aber wir machen Fortschritte in dieser Richtung.



Wir müssen Wege finden, mit denen die Wirksamkeit der Genexpression verbessert werden kann, wenn diese verwandt werden. Sie bietet einige Vorteile gegenüber einer Virus-Vektor-Abgabe. Worin besteht der wesentliche Unterschied zwischen Lentivirus-Vektoren und Vektoren des adeno-assoziierten Virus (AAV)? Wesentliche Unterschiede zwischen Lentivirus- und AAV-Vektoren werden in diesem Diagramm gezeigt. Sie stammen von verschiedenen Familien. In einer davon sind AAV von einer Lipidumhüllung umgeben wie die Lentiviren.

Andere haben keine Umhüllung, sondern zeigen Protein, das mit Rezeptoren auf Zelloberflächen interagieren kann. Die Verpackungskapazität für Lentiviren ist doppelt so groß wie diejenige für adeno-assoziierte Viren. Und wie bereits erwähnt werden die Lentiviren in die Wirt-DNA integriert, während dies bei AAV im Allgemeinen nicht der Fall ist. Sie bleiben meist extrachromosomal. Beide können sich teilende und nicht teilende Zellen transduzieren.

Wie bereits erwähnt, bieten Lentiviren eine permanente Korrektur, wohingegen AAV in Form von Episomen mit der Zellteilung verloren gehen können. Wenn wir den Gentransfer von Lentivirus- und AAV-Vektoren vergleichen, sehen wir, dass er sehr ähnlich ist. In beiden Fällen handelt es sich um ein Virus, das durch spezifische Rezeptoren in die Zellen gelangt. DNA bei AAV und RNA bei Lentiviren müssen in den Kern gelangen...

...wo sie beide die Wirt-Maschinerie benutzen. Lentiviren nutzen die Wirt-Maschinerie, um DNA aus RNA herzustellen und die DNA dann in das Chromosom zu integrieren. Das AAV nutzt die Wirt-Maschinerie, um die einzelsträngige DNA in eine doppelsträngige DNA umzuwandeln. Diese bildet nun ein Episom oder ein zirkuläres Teil der DNA, wo RNA transkribiert werden kann, um Protein herzustellen.

Beide Methoden können funktionieren, um therapeutische Spiegel von Faktor VIII herzustellen, zumindest bei Tieren und bei Verwendung von AAV beim Menschen. In-vivo- und ex-vivo-Methoden können für Genom-Editing für Hämophilie benutzt werden. Betrachten wir das Gen-Editing etwas genauer. Gen-Editing ist eine relativ neue Technik in der Technologie, die sich in den letzten 5 bis 8 Jahren durchgesetzt hat. Mit dieser Technik können wir ...

...ein neues Gen direkt in die Chromosomen einbringen, wozu spezielle bakterielle Enzyme benutzt werden, die unsere DNA öffnen können und es ermöglichen, dass sich ein neues Gen selbst einbringt. Dies ermöglicht eine permanente Korrektur innerhalb des Chromosoms. Betrachten wir eine spezielle Methode für Gen-Editing, wie CRISPR-Cas9. Dies ist ein Abstract einer Präsentation von Alan Brooks beim ISTH-Meeting im Juli 2019.

Es zeigt, dass er die DNA des Wirts, in diesem Fall Hepatozyten, schneiden und das Faktor-VIII-Gen nach Entfernen der B-Domain in die Chromosomen der Hepatozyten einsetzen kann, wodurch mRNA (messenger RNA) produziert und Faktor VIII sezerniert wird.



Dies wurde in Tiermodellen durchgeführt, bei denen die Faktor-VIII-Spiegel im therapeutischen Bereich lagen. Mehrere Gruppen haben sowohl Stammzellen als auch reife Hepatozyten benutzt, um Faktor VIII- und Faktor IX-Gene zu liefern. In dieser Abbildung sehen Sie wie das Faktor-VIII-Gen in den Lentivirus-Vektor eingebracht wird. Dieser Lentivirus-Vektor kann mesenchymale Stammzellen, die dem Wirt entnommen werden, transduzieren.

Eine Differenzierung dieser mesenchymalen Stammzellen in verschiedene Zelltypen, einschließlich Zellen des Knochenmarks und Hepatozyten, kann induziert werden. So kann potenziell Faktor VIII in diesen differenzierten Zellarten hergestellt werden. Dies kann auf autologe Art erfolgen, d. h., dass die Stammzellen dem Patienten entnommen, ex vivo manipuliert werden und dann mit dem Faktor-VIII-Gen zurück in den Körper des Patienten gebracht werden, wo sie Faktor-VIII-Protein sezernieren können.

Dieser Vorgang wurde bei Tieren durchgeführt, auch bei Menschen, aber nicht sehr erfolgreich. Vor fast 20 Jahren wurde ein Artikel von Roth et al. veröffentlicht, der beschrieb, dass Fibroblasten, isoliert von einer Hautbiopsie, gewachsen in vitro, denen das Faktor-VIII-Gen zugesetzt wurde, in die Peritonealhöhle zurück implantiert werden können. Die Autoren glauben, dass sie kurze Zeit im Kreislauf ein wenig Faktor-VIII-Aktivität sahen ...

...dies wurde jedoch nicht weiter verfolgt und es wurde nicht festgestellt, ob eine therapeutische Wirkung erzielt werden könnte. Bei der nächsten Vorgehensweise können Endothelzellen Faktor VIII exprimieren. Dies sind die natürlichen Zellen, die Faktor VIII exprimieren, die Endothelzellen der Sinusoide in der Leber. Man kann autologe Stammzellen, induzierte pluripotente Stammzellen auch der Zirkulation des Patienten entnehmen.

Das Faktor-VIII-Gen kann unter Verwendung eines Lentivirus-Vektors transduziert werden. Diese Zellen können dann in Endothelzellen differenziert werden und zurück in den Patienten eingebracht werden, wodurch der hämophile Phänotyp hergestellt werden kann. Diese konzeptionellen Vorteile sind sehr eindeutig und sehr einfach. Es ist mehr herausfordernder, wenn wir dies in der Praxis versuchen. Dies wurde aber bereits bei Tieren durchgeführt, wobei therapeutische Faktor-VIII-Spiegel erreicht wurden, wenn die Tiere diese neuen Zellen erhielten.

In einer letzten Reihe von Experimenten konnten hepatozytenartige Zellen aus induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnen werden. Dabei werden einkernige Zellen aus dem peripheren Blut von Patienten entnommen und unter Verwendung von Transkriptionsfaktoren erneut programmiert. Potenziell kleine Moleküle werden in induzierte pluripotente Stammzellen eingebracht. Gen-Editing wird durchgeführt, um das Faktor-IX-Gen einzubringen...

...Die Differenzierung wird so gesteuert, dass hepatozytenartige Zellen produziert werden und diese wieder in den Patienten implantiert werden, wo sie in die Leber oder die Peritonealhöhle gelangen und bedeutende Mengen



Faktor IX produzieren. Dies konnte bei Mäusen erreicht werden. Mit all diesen Methoden der Zelltherapie erhielten wir einige vernünftige Ergebnisse in Tierexperimenten. Nun erhebt sich die Frage, ob klinische Studien mit Menschen möglich sind.

Derzeit sind keine klinischen Studien für die nahe Zukunft geplant. Weitere Untersuchungen sind erforderlich. Ein Prüfpräparat wurde mit hämatopoetischen Stammzellen für eine Therapie mit Lentiviren beim Menschen entwickelt. Dabei wird das Faktor-VIII-Gen speziell in Thrombozyten exprimiert. In Stammzellen mit einem Lenti-Faktor-VIII eingebracht, werden diese transduziert und können sich ...

...in eine Reihe von verschiedenen Zellarten differenzieren. Dabei wird jedoch ein Promoter auf dem Faktor-VIII-Gen angebracht, der eine Produktion von Faktor VIII ausschließlich in reifen Thrombozyten ermöglicht. Dies wurde in einer Reihe von Tierexperimenten gezeigt und wird derzeit in einer offenen Prüfpräparat-Studie untersucht. Leider muss bei dieser Methode Platz im Knochenmark für Zellen mit dem transduzierten, editierten Gen gemacht werden, damit sie zurück gegeben werden können und eine Nische etablieren.

Das bedeutet, dass ein zytotoxisches Präparat wie Busulfan benutzt werden muss, um einen Teil des Knochenmarks zu entfernen. Es gibt Bedenken hinsichtlich eines Risiko-Nutzen-Verhältnisses. Daher müssen derartige Studien sehr umsichtig geplant werden, um sicher zu sein, dass dem Patienten durch die Knochenmark-Ablation nicht geschadet wird. Zurück zu AAV und die damit verbundenen Probleme. Ich habe die Notwendigkeit einer Verbesserung des Vektors beschrieben.

Beachtet werden müssen Wirksamkeit, Variabilität und Dauerhaftigkeit der AAV-Therapie. Ich habe über eine alternative Abgabe von Genen gesprochen – Nicht-AAV wie beispielsweise Lipid-Nanopartikel und Lentiviren, die in Entwicklung begriffen sind. Zumindest für Lentiviren sollte es bald klinische Studien geben. Dann kommt die Zelltherapie kombiniert mit Gentherapie und Gen-Editing. Dies sieht auch so aus, ...

...dass diese sehr wirksam sein können, indem sie neue Herstellungsverfahren für Zellen liefern, um Faktor VIII oder Faktor IX zu produzieren. Dabei wurde der Übergang von vorklinischen zu klinischen Studien noch nicht erreicht. Danke für Ihre Aufmerksamkeit.

