

Barbara Konkle: Mein Name ist Barbara Konkle. Ich bin Professorin für Medizin an der Universität von Washington und wissenschaftlicher Vorstand (Chief Scientific Officer) für die Abteilung Bloodworks Northwest, wo ich auch Kodirektorin des Washington Center for Bleeding Disorders bin. Ich spreche heute über Gentherapie und Hämophilie, speziell über adeno-assoziierte-Virus- bzw. AAV-Vektor-Gen-Therapie und ihre Anwendung bei Hämophilie.

Unser Lernziel ist es, Schlüsselcharakteristika derzeit durchgeführter klinischer Studien in der Gentherapie für Hämophilie A und Hämophilie B zu identifizieren. Gentherapie ist eigentlich ziemlich einfach. Wir haben ein Gen, das in einen AAV-Vektor eingebracht und dann injiziert wird. Dieses Gen wird mithilfe des Vektors und des Promotor-Enhancers (den wir später besprechen werden)...

...in die Leber transportiert, wo sich die Zielzellen befinden, die wir auch besprechen werden. Der AAV ist im Wesentlichen extrachromosomal... Dann wird ein Protein gebildet. Was sich in der Zielzelle abspielt, ist noch nicht ganz klar. In den letzten 30 Jahren wurden sehr viele Tierstudien zur Gentherapie und über 200 klinische Studien über verschiedene Krankheiten...

...mit AAV-basierter Gentherapie durchgeführt, speziell mit dem AAV-Virus. Das Wildtyp-Virus wird oben gezeigt. Es besitzt ein REP- und ein CAP-Gen, die für den Vektor entfernt wurden. Das Wildtyp-AAV ist ein Mitglied der Parvovirus-Familie. Es besitzt ein ca. 4.7-kb einzelsträngiges DNA-Genom.

Es kann sich nicht selbständig replizieren und benötigt daher ein Helfervirus. So kam es zu seinem Namen: Es wurde als Verunreinigung einer Adenoviruskultur gefunden, hat jedoch sonst nichts mit den Adenoviren zu tun. Es ist nicht pathogen und infiziert Menschen auf natürliche Weise. AAV-Vektoren können sich nicht selbständig replizieren.

Wie wir auf der nächsten Folie sehen, gibt es natürlich vorkommende und biotechnisch hergestellte Vektoren. Das Viruscapsid bestimmt, wohin der Vektor geht, was als Gewebetropismus bezeichnet wird. Eine lang anhaltende Expression und postmitotische Zellen wurden dokumentiert. Es ist vorwiegend nicht integrierend und, was sehr wichtig ist, hat bis jetzt ein gutes Sicherheitsprofil in Tiermodellen und in klinischen Studien. Wie bereits erwähnt, sind wir einer Infektion mit AAV ständig ausgesetzt.

Etwa 30 bis 50% der Population hat Antikörper gegen AAV, am häufigsten gegen den AAV2-Serotyp. In einer guten Studie wurden über einen gewissen Zeitraum Proben von 62 Jungen abgenommen als Teilergebn Joint Outcome



Study. Die Entwicklung einer AAV-Seropositivität in der Kindheit wurde untersucht.

Wie Sie auf dem Diagramm auf der rechten Seite sehen können, sind diese Jungen mit AAV in Kontakt gekommen, und zwar am häufigsten mit AAV2. Diese Studie untersuchte speziell AAV2, AAV5 und AAV8. Um diese Vektoren für Hämophilie zu verwenden, wurde viele Jahre gearbeitet, um die Expression zu verbessern. Anfangs dachte man, dass die Immunantwort auf das Kapsid durch Entfernung leerer Kapside reduziert werden könnte...

...was vielleicht eine gute Idee ist und wahrscheinlich eine solche ist. Es ist allerdings unklar, ob das der Grund für die veränderte Immunantwort war. Verschiedene AAV-Serotypen werden verwendet. Anfangs wurde AAV2 verwendet und dann andere, bei denen eine geringere Seropositivität und ein unterschiedlicher Gewebetropismus beobachtet wurden. Der leberspezifische Promotor und regulierende Elemente wurden optimiert, um sicher zu sein, dass das Ziel die Leber ist.

In der Abbildung sehen Sie einen CMV-Promotor, es wurden jedoch auch andere Promotoren benutzt. Auch wurde der Codon von den Wissenschaftlern so optimiert, dass sie Faktor VIII und Faktor IX erhöhen. Zwei Modifikationen wurden durchgeführt, die jetzt allgemein angewandt werden, die eine für Faktor VIII, um die B-Domain zu entfernen, damit das Codon kleiner wird, um in das AAV eingesetzt werden zu können.

Dann gibt es noch die Padua-Variante bei Faktor IX. Diese Änderung einer Aminosäure wurde bei einer Familie in Padua (Italien) entdeckt, die eine sehr hohe Faktor-IX-Aktivität aufwies, die auf diese Variante zurückgeführt werden konnte. Wenn man diese in die Faktor-IX-Kassette einsetzt, kann man die spezifische Aktivität von Faktor IX erhöhen.

Bei der ersten Studie mit AAV bei Hämophilie wurden intramuskuläre Injektionen verabreicht. Dies wurde im Children's Hospital in Philadelphia durchgeführt. Es kam allerdings nicht zu einer systemischen Expression. Interessant ist jedoch, dass sich bei einer späteren Muskelbiopsie eine persistierende Faktor-IX-Genexpression fand. Die erste Leberinfusion war mit einem AAV2-Faktor-IX-Konstrukt. Dies wird auf dem Diagramm auf der rechten Seite des Manuskripts gezeigt.

Beim Versuch mit der hohen Vektor Dosis nahm der Faktor IX tatsächlich zu, und zwar, wie die rote Linie zeigt, zunächst um ca. 12%, was sehr ermutigend war. Dann kam es jedoch zu einem Anstieg der Leberenzyme, insbesondere der ALT, was mit einer Abnahme der Faktor-IX-Expression

verbunden war. Das kam überraschend, zum Teil, da die Studien auf Hundemodellen basierten.

Es trat bei Hunden nicht auf, was zeigt, dass Menschen eben keine Hunde sind, war aber trotzdem ein überraschendes Ergebnis. Später wurde ein Patient infundiert, der vorbestehende AAV2-Antikörper hatte, was wahrscheinlich der Grund war, dass er keinen Anstieg zeigte. Später erhielt ein anderer Patient eine Infusion, um die Immunantwort besser zu verstehen.

Hier kam es ebenfalls zu einem Anstieg der Leberenzyme, aber nicht zu einer Faktor-IX-Expression. Die erste lang anhaltende Expression wurde in St. Jude bei der UCL-Studie gefunden. Auf der rechten Seite sehen Sie die Ergebnisse der Studie. Das ist die erste Nachuntersuchung. Die längste Nachuntersuchungsperiode bis jetzt beträgt 8 Jahre. Diese Patienten zeigen immer noch eine Expression. Die goldfarbenen Linien zeigen die Faktor-Spiegel und die blauen Pfeile darüber die Faktorinfusionen.

Sie können sehen, wie der Faktor mit der Infusion ansteigt und danach fällt und es dann mit steigender Dosis zu einem Anstieg der Faktorexpression um ca. 2 bis 6% kommt, die dann stabil bleibt. Wichtig in dieser Studie ist der ALT-Anstieg, den der grüne Pfeil zeigt. Bei Patient 5 können Sie den steilen Anstieg sehen. Es wurde dann mit einer Prednison-Therapie begonnen.

Es wurde gezeigt, dass die Faktoraktivität durch der Prednisontherapie aufrecht erhalten werden konnte. Diese Methode wird jetzt bei allen Gentherapie-Studien angewendet. Hier sehen Sie eine Tabelle mit derzeit laufenden Phase-1/2- und Phase-3-Studien. Es kann sein, dass etwas ausgelassen wurde. Wichtiger als die Vollständigkeit ist, zu zeigen, wo wir stehen.

Auf diesem Gebiet geht die Entwicklung rasch voran und es ist möglich, dass diese Daten bereits veraltet sind. Gezeigt werden zuerst Hämophilie A, und dann 3 Hämophilie-B-Studien mit ihren Sponsoren und verschiedenen Namen. Die Vektoren haben, wie Sie sehen, verschiedene Serotypen. Einige davon sind auch technisch veränderte Vektoren, und zwar Spark 100, AAVhu37, und Ultragenyx.

Die Zellen für die Herstellung stammen von Insekten oder Säugetieren. Der Wert der Insekten liegt daran, dass sie mehr produzieren können. Allerdings ist die posttranslationale Modifikation anders. Wir wissen zur Zeit noch nicht, ob das einen Unterschied macht. In der nächsten Reihe sehen Sie die Phase der Studie. Die BioMarin-Studie ist am weitesten fortgeschritten. In Phase 3 wurden 2 Dosen benutzt. Dies hier sind Vektorgenome pro Kilogramm.



Obwohl die Aufnahme in die Phase 1/2 Studie bei einer höheren Dosis erfolgte, wurde die Dosis schrittweise erhöht, um die zu verwendende Dosis in Phase 3 zu bestimmen. In der Spark-Phase-1/2-Studie, befindet sich Faktor VIII jetzt in der Beobachtungsphase, die mindestens 6 Monate dauern wird. Während dieser Phase führt der Patient auf Papier oder elektronisch ein Tagebuch, in dem die Behandlung und jede Blutung vermerkt wird...

...So können dann die Ergebnisse vor der Gentherapie mit seinen eigenen Daten verglichen werden. Für Hämophilie B laufen zwei Phase-3-Studien. Die Pfizer-Studie als Phase 3, die vorher die Phase-1/2-Spark-Studie war und die uniQure-Studie, auch eine Phase-3 Studie.

Und früher wurde die Freeline-Studie durchgeführt. Also, was sagen die Ergebnisse zum jetzigen Zeitpunkt aus? Einige der publizierten und vorgestellten Ergebnisse einiger dieser Studien zeigen ungefähr den derzeitigen Stand der Forschung. Dies hier ist die AMT-061-Studie mit AAV-Faktor-IX-Padua, mit der begonnen wurde...

...auf der linken Seite sehen Sie die AMT-060-Studie, die die erste Phase-1/2-Studie war. In dieser Studie wurde ein Faktor IX von ca. 7,5% erreicht. Als ich mit der Hämophilie begann, hätte man von soetwas geträumt! Später dachten wir, dass wir die Patienten mit der Gentherapie in einen Bereich der milden Hämophilie bringen könnten, der ausreichen würde, und das wäre dann bereits ein Erfolg. Und wir haben wirklich Erfolg gehabt.

Schauen wir uns Studien an, in denen wir persistierende Spiegel von 6% finden. Diese Patienten brauchen keinen Faktor nicht und bluten nicht. Von neueren Studien wissen wir jedoch, dass wir höhere Spiegel erreichen können. In diesen Studien wurde die Padua-Variante mit dem Vektor verwendet. Drei Patienten erhielten dies als Infusion und das Ergebnis über 36 Wochen wird hier gezeigt. Spätere Daten wurden dann beim ASH gezeigt.

Bei diesen 3 Patienten war die durchschnittliche Faktor-IX-Aktivität nach 36 Wochen 45%. Interessanterweise war eine Immunsuppression in dieser Studie nicht nötig. Bei diesen Patienten fand sich eine Seropositivität für AAV5 mit niedrigem Titer. Dies wirft die Frage auf, ob Patienten Infusionen mit einigen bestimmten Vektor erhalten können, obwohl eine Antikörper-Antwort nachgewiesen wurde.

Diese Studie befindet sich bei dieser Dosis in Phase 3. Hier wird das 2-Jahres-Update der AAV-Faktor-IX-Padua-Spark-9001-Studie gezeigt. Man sieht eine Expression bis zu 29 Monaten. Man sieht eine gewisse Variabilität der Expression, alle Spiegel hatten jedoch einen signifikanten klinischen



Einfluss und zeigten, dass Faktor–Infusionen nicht mehr nötig waren und keine Blutungen auftraten.

Dies ist die BMN-270-Studie in Phase 1/2, die jetzt in Phase 3 bei dieser Dosis ist, also 6×10^{13} Vektorgenome pro Kilogramm. Und dies sind die Drei-Jahres-Ergebnisse mit dem chromogenen Assay. Anfangs waren mit diesem Vektor periodenweise Anstiege in den Normbereich von Faktor VIII, die mit der Zeit abnahmen.

Aber immerhin lagen die FVIII Spiegel im Median um 40%, was sicher bemerkenswert ist. Und wir müssen abwarten, da diese Studie die am weitesten fortgeschrittene ist. Wir müssen abwarten, da wir jetzt noch nicht wissen, was wir bei den anderen Faktor-VIII-Studien sehen werden. Eine weitere Faktor-VIII-Gentherapie-Studie ist die Alta-Studie. Dies sind die neuesten Ergebnisse, die beim letzten ASH-Meeting gezeigt wurden.

Das ist die Phase 1/2. Oben sehen Sie, dass diese Teilnehmer eine Dosis von 2^{12} erhielten. Die höchste Dosis einer Gruppe war 3×10^{13} . Die Wirkung war dosisabhängig. Auf der linken Seite sehen Sie die Faktor-VIII-Aktivität in einem linearen Diagramm, das die Ergebnisse deutlich trennt.

Die logarithmische Skala zeigt, dass die Spiegel bei Patienten in der Gruppe mit der hohen Dosis im Normbereich lagen. Ich betone nochmals, dass wir am Beginn der Studie sind und dass wir diese Patienten über eine längere Zeit beobachten müssen. Dieser Faktor VIII wird in einer Phase-3-Studie benutzt, die von Pfizer durchgeführt wird. Insgesamt gesehen ist die AAV-Gentherapie vielversprechend und sie wird mit Herausforderungen verbunden sein und Fragen aufwerfen.

Eines der Probleme ist die beschränkte Eignung von Patienten. Zur Zeit dürfen die Teilnehmer keine Inhibitoren aufgewiesen haben. Es gibt allerdings auch mehrere Studien, die entwickelt werden, um den Einfluss von Inhibitoren festzustellen. Das wird also in Zukunft vermutlich nicht mehr zutreffen. Es handelt sich um erwachsene Männer, die im Allgemeinen weniger als 1% Faktor VIII aufweisen...

...obwohl dies etwas großzügiger werden wird. Für Faktor IX 2% oder weniger. Patienten mit vorbestehenden Antikörpern gegen den AAV-Vektor werden ausgeschlossen. In der Hämophilie-B-Studie von uniQure fand sich eine Vektor-Positivität mit niedrigem Titer. Ob das mit einem Titer oder mit dem Serotyp zu tun hat, verstehen wir, glaube ich, nicht vollständig.

Zukünftige Patienten sind solche mit derzeit oder früher beobachteten Inhibitoren. Ich habe gehört, dass Spark eine Studie durchführt und andere



Firmen arbeiten auch an Protokollen für Studien. Vorbestehende Anti-AAV-Antikörper sind ein Problem und schließen eine Reihe von Patienten aus, solche mit weniger schwerer Hämophilie und Jugendliche. Das Problem mit AAV ist, dass er nicht integrierend ist und dass er in einer wachsenden Leber verloren geht.

Dies war also nur beschränkt bei kleinen Kindern möglich. Wir wissen nicht, wie weit hinunter wir mit dem Alter gehen und dabei die Wirkung erhalten können. Es gibt Frauen mit schwerer Hämophilie, und in manchen Protokollen sind jetzt auch Frauen erlaubt. Dann sind da die Patienten, die die Expression verlieren oder sich in den Frühstadien einer Studie befanden ohne dass es zu anhaltenden Spiegeln kam. Es gibt keine Antwort für diese Patienten bezüglich AAV-Therapie.

Es gibt keine anderen Methoden für Gentherapie und Hämophilie in derselben Phase. Worin bestehen die Risiken? Wir haben zur Zeit eine wirklich gute Therapie für die Hämophilie. Wenn wir eine Behandlung für unsere Patienten in Erwägung ziehen, müssen wir sicher sein, dass die Vorteile größer sind als die Risiken. Es gibt bekannte Risiken.

Vor allem muss man an die Lebertoxizität denken, zu der es bei einigen Patienten in beinahe allen Studien kommt. Kurze Behandlungsperioden mit Steroiden sind bei Lebertoxizität wirksam. Wir wissen aber auch von mehreren Studien, dass einige Patienten eine längere Immunsuppression benötigen, was Fragen zur Toxizität aufwirft. Patienten entwickeln Anti-AAV-Antikörper, wenn sie dem Virus ausgesetzt sind, was eine weitere Verabreichung ausschließt.

Wir wissen auch, dass es im Allgemeinen zu großen Unterschieden in der interindividuellen Expression und Variabilität kam, was zum Teil durch mit der Anti-Kapsid-T-Zell-Antwort erklärt werden kann. Wir wissen auch, dass es Patienten gibt, bei denen der Erfolg wieder verschwindet, oder abnimmt oder nicht mehr nachgewiesen werden kann ohne daß eine T-zell Antwort nachgewiesen wurde. Es gibt verschiedene Theorien über die Gründe dafür. Ich glaube aber, dass wir das zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht wirklich verstehen.

Dies sind also die unbekannteten Tatsachen. Wir wissen nicht, ob die Lebertoxizität lange bestehen bleiben kann. Wir haben bis jetzt keine Hinweise darauf. Ein Langzeit follow-up diesbezüglich ist aber sehr wichtig. AAV hat, wie erwähnt eine sehr niedrige Integrationsrate. Wir geben allerdings 10^{13} Virusgenome pro Kilogramm, eine wirklich substanzielle Anzahl.



Ich glaube wir können durch die große Anzahl Patienten, die AAV in vielen Studien für verschiedene Krankheiten erhielten, ermutigt sein. Wir müssen dies aber noch engmaschig überwachen. Es besteht kein Hinweis auf eine Keimbahn-Übertragung. Tierstudien weisen nicht darauf hin. In klinischen Studien beim Menschen wurde der Vektor im Samen nachgewiesen, der aber wieder verschwindet. Es gibt keinen Nachweis eines Vektors in der Samenzelle. Dies ist beruhigend.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die AAV-vermittelte Gentherapie erfolgreich war, Faktor-VIII- und Faktor-IX-Spiegel bei Patienten mit Hämophilie zu erhöhen. Dies wurde auf verschiedene Art erreicht. Die Gentherapie hat die Behandlung mit dem Faktor und Blutungen deutlich reduziert. Zum jetzigen Zeitpunkt kann man aufgrund von Hämophilie-Studien und anderen AAV-Studien sagen, dass das Sicherheitsprofil sehr günstig zu sein scheint. Wir müssen jedoch bei Langzeitbeobachtungen alle Sicherheitssignale aufmerksam beachten.

Wir benötigen auch Langzeit-Daten zur Wirkung, um zu verstehen ob diese Expression nach Jahren noch anhält oder abnimmt. Wir wissen zum jetzigen Zeitpunkt, dass die Expression Jahre anhält. Wird sie anhalten oder wieder verschwinden? Wir benötigen Langzeit-Daten. Und weiterhin – Modifizierungen der Behandlungen mit AAV und dem Gebrauch anderer Vektoren, sodass eine größere Hämophilie-Population, einschließlich kleiner Kinder behandelt werden kann.

Dankeschön.

