

Glenn Pierce: Salve, mi chiamo Glenn Pierce. Sono il vicepresidente della Federazione mondiale dell'emofilia e ho da tempo un grande interesse per la terapia genica dell'emofilia. Oggi parleremo di altre strategie e altri obiettivi per la terapia genica nel trattamento dell'emofilia. I nostri obiettivi comprenderanno la ricerca di altri approcci, oltre ai virus adeno-associati AAV, e i lati positivi e negativi di quest'ultimi.

Il concetto della terapia genica nasce circa 50 anni fa con un articolo di Ted Friedmann pubblicato sulla rivista Science, incentrato sulla terapia genica per le patologie umane. Non era passato tanto tempo dall'identificazione del DNA e dell'RNA e delle funzioni di questi ultimi. Friedmann aveva sollevato la questione di complessi problemi scientifici ed etici, un po' come facciamo noi oggi ponendoci le stesse domande sul "gene editing" .

In circa 50 anni abbiamo fatto enormi progressi e la domanda che ci poniamo oggi è: perché utilizzare i vettori AAV per la terapia genica nell'emofilia? Ebbene, il motivo è semplice: perché funzionano. Tuttavia, la questione si è evoluta in un periodo di 25-30 anni trascinando con sé anche diversi fallimenti lungo il percorso. Al momento rappresentano l'approccio più valido nel fornire benefici terapeutici ai soggetti affetti da emofilia, sia con deficit del fattore VIII sia del fattore IX.

Complessivamente, hanno ottenuto un buon risultato dal punto di vista della sicurezza e sono stati utilizzati in diversi stadi della patologia e in diversi studi clinici. Ci sono diverse problematiche di cui discuteremo, tra cui la variabilità e durata delle risposte e il fatto che forse addirittura metà della popolazione ha un'immunità pre-esistente verso i diversi sierotipi di AAV. I sierotipi sono particelle AAV strettamente correlate tra loro ma che si sono evolute da com'era il virus in principio...

... tanto da poter infettare diversi tessuti del corpo. Quindi, abbiamo utilizzato un certo numero di questi sierotipi di AAV per la terapia genica e hanno mostrato tutti alcune evidenze di una precedente esposizione in diverse persone, le cui risposte anticorpali impediscono il loro utilizzo in coloro che risultano positivi. Questa risposta immunitaria che osserviamo prima di somministrare l'AAV si amplifica notevolmente dopo aver somministrato l'AAV, tanto da precludere una successiva somministrazione .

Titoli anticorpali molto alti derivano dalla somministrazione della terapia genica con AAV. L'AAV è uno dei virus più piccoli che può infettare l'uomo e, in quanto tale, persino dopo la rimozione dei geni dell'AAV non resta molto "spazio" per il gene di interesse da inserire. Il gene del fattore VIII privato del dominio B, ad esempio, si adatta a stento nell'AAV. Quindi, esistono anche dei limiti relativi alle dimensioni del gene che si vuole inserire. Inoltre l'AAV ha anche una bassa probabilità di integrarsi casualmente nel genoma , questo fenomeno però non è ben definito né studiato adeguatamente...

... e solleva la questione relativa alla sicurezza a lungo termine. Inoltre, il dubbio finale relativo all'AAV sta nel fatto che si somministrano trilioni di



genomi virali ai pazienti, ma solo una frazione molto piccola di questi ultimi produce la proteina che viene poi secreta, diventando utile per la terapia. Ciò detto, l'AAV è un vettore virale funzionante che può fornire un effetto terapeutico nell'emofilia.

Che dire delle soluzioni per il miglioramento dei vettori dell'AAV? Visto che abbiamo accennato a tutti questi problemi legati all'uso dell'AAV, sono state suggerite diverse soluzioni, molte delle quali, tuttavia, non ancora testate realmente. Si tratta di un aspetto importante non solo per il progresso degli studi clinici di fase 3 ma anche per le nuove sperimentazioni avviate che potrebbero mostrare miglioramenti nell'uso dei vettori AAV, nell'efficienza della trasduzione e in altre cose. Quindi, tutte queste potenziali...

... soluzioni vengono studiate ma con un ritmo non sufficientemente rapido per farsi strada in questa prima generazione di terapia genica con AAV, ma che potrebbero essere approvate già nel 2020 o 2021. Se osserviamo la trasduzione del vettore AAV negli epatociti, come si vede in questa immagine al punto 1, ci sono anticorpi contro il vettore AAV derivanti da un'infezione naturale preesistente....

... che impedirà a quest'ultimo di giungere nella cellula bersaglio. Quindi, non si ottiene una terapia genica efficace. In assenza di anticorpi, come mostrato al punto 2, il vettore AAV può legarsi ai recettori di membrana di una specifica cellula e venire endocitato tramite i meccanismi tipici della transcosi recettoriale. Quando si trova all'interno della cellula, potrebbe imbattersi in un'immunità innata perché, dopo tutto, le nostre cellule sono destinate a difendersi da infezioni virali.

E questo è quello che accade quando il vettore virale viene utilizzato come terapia. Tuttavia, una parte del AAV potrebbe eludere questo meccanismo e perdere il suo involucro esterno. Nel citoplasma, il DNA virale entra nel nucleo, e si stabilisce in forma di episomi, ossia di elementi genetici stabili e chiusi che possono utilizzare l'apparato replicativo dell'ospite per fare la trascrizione e produrre la proteina di interesse che può essere infine secreta. Il capsido stesso...

... entra nel reticolo endoplasmatico dove incontra il complesso maggiore di istocompatibilità di classe I. Alcuni di questi complessi sono in grado di legarsi specificatamente ai peptidi del capsido, che successivamente vengono esposti sulla superficie della cellula e possono stimolare la risposta delle cellule T CD8 citotossiche specifiche per le proteine del capsido. Questo può portare alla distruzione della cellula contenente il transgene. Quindi dobbiamo affrontare...

... problemi relativi ad efficienza, variabilità, durata nel tempo in relazione a tutte queste complesse fasi che si verificano all'interno della cellula. Che cosa possiamo fare relativamente all'immunità pre-esistente? Alcuni gruppi stanno analizzando l'immunoassorbimento in modelli animali. Ciò comporta l'utilizzo di una colonna funzionalizzata con la proteina G o la proteina A, in grado di legare le immunoglobuline, IgG del paziente che potrebbe avere elevati titoli di anticorpi...



... anti-AAV. Si tratta di un effetto transitorio. Non dura a lungo ma potrebbe persistere abbastanza da ridurre i titoli anticorpali in maniera sufficiente da riuscire a somministrare l'AAV e far arrivare il transgene alle cellule bersaglio. Stiamo lavorando per valutare l'efficienza di rimozione dell'IgG perché in un numero di pazienti, significative quantità di IgG dovranno essere eliminate per...

... raggiungere l'epatocita. Quindi, è necessario affrontare la questione della tossicità intracellulare dopo che l'AAV ha raggiunto la cellula target. Ciò che abbiamo dimostrato è che in un numero di pazienti è stato rilevato un aumento delle transaminasi epatiche. Questo aumento è transitorio, non sono molto alti nella maggior parte dei casi, forse livelli 1½ - 2 volte superiori alla norma. Tuttavia, un aumento delle transaminasi epatiche è da considerare con attenzione perché indica la morte degli epatociti.

Quali sono le possibili cause dell'aumento degli enzimi epatici? Le ipotesi sono 3 e una o più di una potrebbero avere un effetto sugli epatociti nei singoli pazienti. Innanzitutto, si ha la degradazione di un carico molto alto di proteine del capsido del virus adenoassociato. Una quantità elevata di proteine del capsido penetra nelle cellule perché il virus viene somministrato per via endovenosa in dose massiccia. E la cellula deve assimilare queste proteine del capsido, degradandole nuovamente nei suoi costituenti...

... gli amminoacidi. Ciò richiede un significativo dispendio di energia da parte della cellula. (Inoltre, esiste anche il problema della cellula T citotossica che ho appena descritto). La terza possibilità è nota come risposta della proteina non ripiegata ed è più specifica per il fattore VIII. Ciò che è stato dimostrato da diversi anni è che è molto difficile per le cellule produrre una proteina come il fattore VIII. Si tratta di una proteina complessa, una delle più grandi dell'organismo.

Anche se abbiamo sempre utilizzato il fattore VIII privato del dominio B, è stato rilevato nelle colture cellulari che è molto difficile produrlo da parte delle cellule causando tossicità all'interno delle cellule stesse. Questa tossicità può causare la morte della cellula e, ovviamente, la perdita dell'espressione del fattore VIII. Quindi, queste sono tutte le aree che devono essere studiate ma che finora non sono state approfondite sufficientemente per consentirci di ottenere alcune delle risposte a queste domande e, quindi, sviluppare potenziali...

... soluzioni a questi problemi. Nel grafico superiore in alto a sinistra possiamo osservare un esempio dell'aumento delle transaminasi all'interno del fegato ed il concomitante sviluppo delle cellule T citotossiche CD8, specifiche per il capsido dell'AAV che induce la morte e la distruzione delle cellule. Nella parte inferiore osserviamo le varie risposte immunitarie che possono verificarsi in seguito alla...

... trasduzione e all'espressione del transgene. Notiamo che le cellule T CD8 possono attaccare l'epatocita contenente il transgene. Inoltre, vediamo che le cellule T CD4, cellule helper, possono essere attivate. E queste ultime sono



importanti nella generazione di una significativa risposta anticorpale contro il capsido dell'AAV, precludendo una successiva somministrazione. Attualmente, non ci sono ancora molti studi che analizzano queste 3 questioni critiche...

... che coinvolgono il capsido, le cellule T citotossiche e la risposta della proteina non ripiegata. È necessario svolgere un lavoro molto più ampio in queste aree per definire meglio tutto ciò nei singoli pazienti e in gruppi di pazienti. Quali sono le alternative all'AAV? È stato svolto un lavoro approfondito con alternative sia virali sia non virali. I lentivirus sono i virus più avanzati utilizzati nell'emofilia.

Derivano dall'HIV. Al loro interno diversi geni dell'HIV sono stati eliminati e il gene del fattore VIII o del fattore IX può essere inserito così come viene usato nell'AAV. L'analisi è stata effettuata sia ex-vivo con cellule staminali ematopoietiche sia in vivo con epatociti mirati specificamente, utilizzando sia il fattore IX che il fattore VIII in numerosi modelli preclinici, tra cui animali di taglia grande.

Un approccio differente prevede l'utilizzo di elementi diversi da virus che rappresenterebbero una situazione ideale. Le nanoparticelle lipidiche sono oggetto di ricerca da oltre 30 anni per la distribuzione di acidi nucleici come il DNA. Ho spiegato quanto è inefficiente l'AAV. Queste ultime sono persino meno efficienti nel trasporto di geni all'interno delle cellule. Nonostante questo però non vengono generate risposte immunitarie verso queste nanoparticelle lipidiche. Quindi potrebbe essere possibile ripetere le somministrazioni.

Se il paziente non ha un livello sufficientemente alto di fattore VIII o fattore IX, potrebbe essere possibile somministrarglielo più volte fino a generare un livello terapeutico. Un altro approccio che rappresenta realmente il futuro della terapia genica è il "gene editing", la modifica del gene. Quest'ultima prevede l'aggiunta del gene direttamente nei cromosomi con la possibilità di sostituire il gene esistente. Nel caso dell'emofilia, non è necessario agire in questo modo. Può essere semplicemente aggiunto nel cromosoma.

In alcuni casi di emofilia, se è presente una mutazione specifica, si potrebbe persino riparare il gene endogeno. La modifica del gene rappresenta il futuro della terapia genica, come ho appena detto, e consente una correzione permanente del fenotipo. Visto che il gene si trova all'interno dei cromosomi, la cellula continuerà a esprimere la proteina per l'intera vita cellulare. Se la cellula si divide, il gene passerà anche nelle cellule figlie. Quindi, si tratta di un approccio piuttosto interessante, non ancora pronto per...

... studi clinici sugli esseri umani, ma in fase di studio in modelli preclinici per l'emofilia. L'approccio finale è la terapia cellulare. Con la terapia cellulare sono stati utilizzati diversi tipi di cellule, sia staminali sia epatiche, per fornire i geni del fattore VIII o del fattore IX direttamente ai soggetti affetti da emofilia. Questa diapositiva mostra uno schema delle nanoparticelle lipidiche che forniscono acidi nucleici.



La maggior parte del lavoro svolto in questo caso è con molecole di RNA di piccole dimensioni, come gli RNA inibitori. Ma potenzialmente anche i geni potrebbero essere inseriti in queste nanoparticelle lipidiche. È stato svolto un lavoro approfondito per renderli atossici per le cellule e consentire loro di mirare direttamente gli epatociti per esempio. Ci auguriamo di approfondire al meglio questo ambito. Non siamo ancora pronti per studi clinici ma ci stiamo muovendo in questa direzione.

Abbiamo bisogno di identificare dei metodi in grado di incrementare l'efficienza dell'espressione genica utilizzando queste particelle. Questo sistema offre diversi vantaggi rispetto alla distribuzione dei vettori virali. Qual è la principale differenza tra virus lentivirali e virus adeno-associati, ossia i vettori AAV? Le differenze chiave tra vettori lentivirali e AAV sono mostrate in questa tabella. Provengono da famiglie diverse. I primi sono racchiusi in un pericapside lipidico come i lentivirus.

Gli altri, non presentano pericapside lipidico ma mostrano solo le proteine del capsido che interagiscono direttamente con i recettori sulla superficie delle cellule. La presenza del pericapside nei lentivirus dà loro un doppio involucro rispetto ai virus adeno-associati. Come ho accennato in precedenza, il lentivirus si integra nel DNA dell'ospite mentre l'AAV non sempre ci riesce. Resta nella maggior parte dei casi a livello extracromosomale. Entrambi possono trasdurre sia le cellule che si replicano sia quelle che non si replicano .

Come già detto, il lentivirus offre una correzione permanente mentre il DNA dell'AAV, in forma di episomi, potrebbe essere perso con la divisione cellulare. Se confrontiamo l'efficienza del trasferimento del gene tra i vettori lentivirali e AAV, notiamo che è davvero molto simile. Il virus può integrarsi nelle cellule tramite specifici recettori in entrambi i casi. E in entrambi i casi, il DNA virale, o l'RNA per i lentivirus, ha bisogno di accedere al nucleo...

... dove utilizza l'apparato della cellula ospite. Il lentivirus utilizza l'apparato dell'ospite per creare il DNA dall'RNA e, quindi, per integrare questo DNA nel cromosoma. L'AAV utilizza l'apparato ospite per trasformare il DNA a singolo filamento in DNA a doppio filamento e creare da quest'ultimo un episoma, che è una particella circolare di DNA da cui viene trascritto l'RNA per la successiva produzione delle proteine.

Quindi, entrambi gli approcci possono funzionare e fornire livelli terapeutici del fattore VIII almeno negli animali e, nel caso dell'AAV, negli esseri umani. Il "gene editing", che significa "modifica del gene", per l'emofilia include approcci in vivo ed ex vivo. Analizziamo più attentamente la modifica del gene. Con la modifica del gene, che rappresenta una tecnica relativamente nuova che è stata studiata negli ultimi 5-8 anni, siamo in grado di...

... inserire un nuovo gene direttamente nei cromosomi utilizzando specifici enzimi batterici che possono aprire il nostro DNA e consentire l'inserimento del nuovo gene. Questo fornisce una correzione permanente all'interno del cromosoma. Guardiamo nello specifico al metodo di modifica del gene come



CRISPR-Cas9 e consideriamo l'abstract di una presentazione del meeting dell'ISTH di luglio 2019...

...di Alan Brooks, in cui egli mostra che è in grado di tagliare il DNA dell'ospite, in questo caso degli epatociti, e inserire il gene del fattore VIII senza dominio B, all'interno dei cromosomi degli epatociti, quindi produrre mRNA, RNA messaggero, e successivamente il fattore VIII viene secreto. Lo studio è stato condotto in modelli animali e ha mostrato livelli di fattore VIII assolutamente rientranti nell'intervallo terapeutico.

Se ora passiamo agli approcci della terapia cellulare, alcuni gruppi hanno utilizzato sia cellule staminali sia epatociti maturi per fornire i geni del fattore VIII o del fattore IX. In questo caso, come mostrato nell'immagine, il gene del fattore VIII viene inserito in un vettore lentivirale. Il vettore lentivirale è in grado di trasdurre cellule staminali mesenchimali che sono state prelevate dall'organismo ospite.

Tali cellule staminali mesenchimali possono essere indotte a differenziarsi in diversi tipi di cellule, tra cui le cellule del midollo osseo e gli epatociti. Pertanto, hanno la potenzialità di produrre il fattore VIII in questi tipi di cellule differenziate. Questa operazione può essere eseguita in maniera autologa, ossia le cellule staminali sono prelevate dal paziente e manipolate ex-vivo, quindi reinserte insieme al gene del fattore VIII nell'organismo del paziente dove possono produrre la proteina del fattore VIII.

Questo è stato fatto negli animali, mentre negli esseri umani non ha avuto un esito positivo. Tuttavia, in un articolo di circa 20 anni fa, Roth e collaboratori hanno dimostrato di essere riusciti a rimuovere dei fibroblasti da una biopsia cutanea, di averli fatti crescere in vitro, di aver inserito al loro interno il gene del fattore VIII, e di averli quindi reimpiantati nella cavità peritoneale. Hanno osservato una lieve attività del fattore VIII...

... in circolo per un breve periodo di tempo, ma questa procedura non è mai stata approfondita al punto di ottenere benefici terapeutici per i pazienti. Nell'approccio che analizzeremo ora, le cellule endoteliali possono esprimere il fattore VIII. Questo è il tipo di cellula naturale che esprime il fattore VIII, le cellule endoteliali sinusoidali del fegato. La metodica da intraprendere prevede il prelievo di cellule staminali autologhe, cellule staminali pluripotenti, dal sangue del paziente.

Il gene del fattore VIII viene inserito mediante un vettore lentivirale. Le cellule possono essere differenziate in cellule endoteliali, reintegrate nell'organismo del paziente ed è possibile modificare così il fenotipo del paziente emofilico. Concettualmente i vantaggi di queste ultime terapie sono molto chiari e semplici. Però metterle in pratica non è così facile. Nonostante tutto, lo studio che è stato condotto in modelli animali ha mostrato di ottenere livelli terapeutici di fattore VIII negli animali che hanno ricevuto queste nuove cellule.

Quindi, con una serie finale di esperimenti, è possibile generare cellule simili agli epatociti stimolando la differenziazione di cellule staminali pluripotenti.



L'approccio prevede il prelievo di cellule mononucleate dal sangue periferico dai pazienti, la loro riprogrammazione mediante i fattori di trascrizione, potenzialmente queste piccole molecole inducono il differenziamento delle cellule staminali pluripotenti, il "gene editing" per l'inserimento del gene del fattore IX...

... la differenziazione verso le cellule simili a epatociti, quindi il reimpianto nel paziente dove le cellule vanno ad annidarsi nel fegato oppure rimangono nella cavità peritoneale e producono notevoli quantità di fattore IX terapeutico. Questa operazione è stata condotta sui topi. Con tutti questi approcci di terapia cellulare, abbiamo ottenuto risultati ragionevoli nei modelli animali: si tratta ora di capire se questo approccio può essere applicato anche in studi clinici sugli esseri umani.

Attualmente, nessuno studio clinico sugli esseri umani è previsto nel breve termine. C'è ancora molto lavoro da fare. Un IND in aperto ha sviluppato una terapia lentivirale negli esseri umani con cellule staminali ematopoietiche. Prevede l'espressione del gene del fattore VIII, in modo specifico nelle piastrine. Quindi, la trasduzione delle cellule staminali con un fattore VIII lentivirale, consentendo loro di differenziarsi in...

... un'ampia gamma di tipi di cellule ma ponendo un promotore sul gene del fattore VIII che permette la produzione del solo fattore VIII all'interno delle piastrine mature. Questo approccio è stato mostrato in una serie di modelli animali e, attualmente, è oggetto di un IND in aperto. Purtroppo, con questo tipo di approccio, bisogna agire sul midollo osseo per creare spazio e far sì che le cellule modificate col gene trasdotto tornino indietro e creino una nicchia.

Ciò significa che è necessario utilizzare un agente citotossico come il busulfan per eliminare parte del midollo osseo. Vi sono diversi dubbi in termini di rapporto rischio-beneficio e quindi è necessario pianificare l'approccio con molta attenzione e cautela per assicurarsi che non si provochino danni al paziente derivanti dall'ablazione di una parte del midollo osseo. Se torniamo all'AAV e osserviamo alcuni dei problemi ad esso associati, ho descritto la necessità di miglioramenti del vettore...

... per affrontare ampiamente le problematiche relative a efficienza, variabilità e durata della terapia con AAV. Ho parlato delle alternative per la trasduzione del gene, dell'utilizzo di virus diversi dall'AAV come i lentivirus e nanoparticelle lipidiche e, che stanno prendendo rapidamente piede. E, almeno per quanto riguarda i lentivirus, a breve saranno impiegati in studi clinici. La terapia cellulare combinata con la terapia genica, o con il "gene editing" (modifica del gene) sembrerebbe essere...

... molto efficace nel fornire nuovi macchinari cellulari per produrre il fattore VIII o il fattore IX, ma non è ancora avvenuta la transizione dai modelli preclinici a modelli clinici.
Vi ringrazio per la vostra attenzione.



Terapia genica per il trattamento dell'emofilia: altre strategie e altri obiettivi

