

Barbara Konkle: Sono Barbara Konkle. Sono professoressa di medicina alla University of Washington e Chief Scientific Officer di Bloodworks Northwest, dove sono anche co-direttrice del Washington Center for Bleeding Disorders. Oggi vi parlerò della terapia genica e della sua applicazione in emofilia e in particolare della terapia genica con i vettori adeno-associati o AAV e del loro uso in emofilia.

L'obiettivo educativo di questa presentazione è quello di identificare le caratteristiche chiave degli attuali studi clinici nella terapia genica sia per l'emofilia A che per l'emofilia B. Pensiamo alla terapia genica, è una cosa abbastanza semplice. Abbiamo un gene che è inserito nel vettore AAV, che verrà iniettato perifericamente. Gli AAV si dirigono al fegato, che è la cellula bersaglio, di cui ne parleremo poi, grazie al vettore e a particolari sequenze nei promotori (o negli enhancer), e anche di questo ne discuteremo in seguito. L'AAV anche se non si integra nei cromosomi, permette alla proteina di essere prodotta. Sebbene ciò accada nella cellula bersaglio, ancora molto è quello che dobbiamo comprendere e ciò può essere visto come una sorta di scatola nera. C'è stato un numero incredibile di studi di terapia genica eseguiti nei modelli animali e ora oltre 200 studi sono in corso nell'uomo per la cura di diverse malattie...

... utilizzando vettori AAV, condotti negli ultimi 30 anni. Quindi, considerando in particolare il virus AAV, in alto è mostrato il virus wild-type. Ha un gene rep e un cap che sono rimossi durante la produzione del vettore. L'AAV wild-type è un membro della famiglia dei parvovirus. Ha un genoma a DNA, a singolo filamento di circa 4,7 kb.

Gli AAV sono virus difettivi che si replicano raramente, e richiedono la presenza di un herpesvirus per essere attivati ed essere quindi infettivi. E' proprio da qui che si può far derivare il suo nome perché è stato scoperto come virus contaminante di una coltura di adenovirus, anche se nulla a che fare con l'adenovirus, se non il fatto di essere stato scoperto in quel modo. È un virus non patogeno e infetta naturalmente gli esseri umani. Per quanto riguarda i vettori AAV, questi si replicano raramente.

Gli AAV, come vedremo in una diapositiva successiva, sono vettori presenti naturalmente ma possono essere anche bioingegnerizzati. Il capsido virale governa la destinazione del vettore, cioè il tropismo tissutale. È stato documentato che gli AAV hanno un'espressione a lungo termine e sono in grado di infettare cellule post-mitotiche, ed è fondamentale non integrante e, ad oggi, ha un buon profilo di sicurezza nei modelli animali e negli studi sugli esseri umani. Come già detto in precedenza, tutti siamo esposti ai virus AAV.

Circa il 30-50% della popolazione ha anticorpi contro gli AAV. E più comunemente al sierotipo AAV2. C'è stato uno studio interessante in cui



sono stati prelevati dei campioni da 62 ragazzi nel corso del tempo nell'ambito di uno studio legato all'emofilia e hanno esaminato l'evolversi della loro sieropositività agli AAV nei primi anni di vita.

Come mostrato nel grafico sulla destra, potete vedere che questi ragazzi sono stati esposti all'AAV. E più comunemente all'AAV2; questo studio ha osservato specificamente un'esposizione ad AAV2, AAV5 e AAV8. Per poter utilizzare questi vettori per l'emofilia, nel corso degli anni si è lavorato per migliorarne l'espressione. Inizialmente vi era preoccupazione che la risposta immunitaria al capsido potesse essere ridotta rimuovendo i capsidi vuoti...

... che sembrava una buona idea e probabilmente lo era, anche se non è chiaro se questo ha modulato la risposta immunitaria generale. Si utilizzano diversi sierotipi AAV. Inizialmente è stato utilizzato l'AAV2 e poi gli altri, con una bassa sieroprevalenza nella popolazione, così come per il tropismo tissutale. C'è stata anche l'ottimizzazione del promotore che deve essere specifico per il fegato e degli elementi regolatori per essere sicuri che sia diretto alle cellule epatiche. Nella figura è mostrato un promotore CMV, anche se sono utilizzati anche altri promotori. Gli scienziati ottimizzano anche il codone per aumentare l'espressione del fattore VIII e del fattore IX. Inoltre due modifiche sono state fatte, una per il fattore VIII, il dominio B del fattore VIII è stato eliminato per permettergli di avere una dimensione che possa essere inserito nell'AAV.

L'altra modifica è l'inserimento della variante Padua nel fattore IX, questa singola variante genica è stata scoperta in una famiglia di Padova che aveva livelli di attività del fattore IX molto elevati. Ciò era dovuto a questa variante. Così, come vedremo, inserendola nel gene del fattore IX, si può aumentare l'attività specifica del fattore IX in modo marcato.

Il primo studio mediato da AAV nell'emofilia è stato eseguito con iniezioni intramuscolari. Questo è stato svolto presso il Children's Hospital di Filadelfia. Ma non è stata osservata nessuna espressione sistemica. La cosa interessante era che quando è stata eseguita una biopsia del muscolo, si è osservata un'espressione persistente del gene del fattore IX. La prima infusione epatica è stata con un costrutto AAV2-fattore IX e quello riportato nel grafico a destra proviene dal manoscritto originale.

Ad alto dosaggio, il fattore IX è in realtà aumentato, come è mostrato inizialmente dalla linea rossa a circa il 12%, il che era incredibilmente entusiasmante. Ma poi si è registrato un aumento degli enzimi epatici, in particolare delle transaminasi, che è stato associato a una riduzione nell'espressione del fattore IX. E questo è stato molto sorprendente, in parte perché gli studi erano basati su modelli animali nei cani.



..dove questo non era avvenuto, il che dimostra che le persone non si comportano come i modelli animali; tuttavia, è stata una scoperta sorprendente. Successivamente è stato sottoposto a infusione un paziente, che aveva anticorpi AAV2 preesistenti, e non mostrava un aumento di fattore IX, probabilmente per la presenza di anticorpi, successivamente è stato sottoposto a infusione un altro soggetto per meglio comprendere la risposta immunitaria.

E si è nuovamente osservato un aumento degli enzimi epatici, ma non nell'espressione del fattore IX. La prima espressione a lungo termine è stata vista nello studio St. Jude/UCL, e a destra è mostrato un estratto della loro pubblicazione. A questo primo studio ne sono seguiti altri, e ora abbiamo individui osservati anche per 8 anni, che continuano a mostrare un'espressione del fattore IX. Questi mostrano che le linee di colore oro sono livelli del fattore e le frecce blu sopra corrispondono alle infusioni del fattore.

Quindi potete vedere il fattore che va su e giù con l'infusione, e poi un'espressione realmente stabile del fattore che varia da circa 2 al 6% man mano che la dose aumenta. Una cosa importante che abbiamo appreso in questo studio è che, quando si è verificato l'aumento delle transaminasi, come mostrato dalla freccia verde nel paziente 5, in corrispondenza del forte aumento, è stata avviata una terapia con prednisone.

E' stato così dimostrato che era possibile mantenere l'attività del fattore con l'avvio di una terapia con prednisone. E questo è un approccio che è utilizzato tutt'oggi in tutti gli studi di terapia genica. Eccovi una tabella con un elenco degli studi in corso di fase 1/2 e fase 3. Può darsi che qui sia stato omissso qualcosa. Lo scopo non è di essere esaustivi, ma di illustrare la situazione attuale.

Il settore è anche in rapida evoluzione, e quindi l'elenco potrebbe non essere aggiornato. È mostrata per prima l'emofilia A, quindi 3 studi sull'emofilia B con i relativi sponsor e i diversi nomi. I vettori, come noterete, hanno diversi sierotipi, inoltre vi sono alcuni vettori ingegnerizzati, lo Spark 100 e l'AAVhu37, l'Ultragenyx.

Le cellule utilizzate per la produzione sono di insetti o di mammiferi. Il valore dell'utilizzo delle cellule di insetto è che ne possono produrre di più, ma in queste cellule vi è una diversa modifica post-traduzionale. A questo punto non sappiamo se questo comporti una differenza. Nella colonna successiva, è riportata la fase dello studio. Quindi BioMarin è lo studio più avanzato. In fase 3, avevano 2 dosi diverse rappresentate dal numero di genomi virali per chilogrammo di peso corporeo.

L'arruolamento nella fase 1/2 è avvenuto alla dose più elevata. E' stato inserito un ulteriore alto dosaggio per determinare la dose da utilizzare nella



successiva fase 3. La fase 1/2 di Spark, è ora nella fase osservazionale e sarà attiva per almeno 6 mesi, per fare in modo che i pazienti annotino ed inseriscano nella loro agenda elettronica il proprio regime di trattamento e gli eventuali sanguinamenti...

... in modo che, una volta ricevuta la terapia genica, i risultati possano essere confrontati con i dati dello stesso paziente prima dell'inizio della terapia genica. Nell'emofilia B ci sono 2 studi in fase 3. Uno studio è quello della Pfizer che all'inizio era la fase 1/2 della Spark, poi c'è anche uno studio della uniQure, che è anch'esso in fase 3.

E prima c'è lo studio Freeline. Quindi, cosa ci dicono i risultati degli studi fino a oggi? Alcuni dei risultati sono stati pubblicati o presentati a congressi, che illustrano la situazione attuale. Quindi questo è lo studio AAV-Factor IX Padua, AMT-061 e questo studio è iniziato...

... a sinistra nella figura è mostrato lo studio sull'AMT-060 che è stato il primo studio di fase 1/2, in cui è stato ottenuto un livello di espressione del fattore IX di circa il 7,5%. Quello che si pensava, quando io ho iniziato ad occuparmi di emofilia, era che con la terapia genica, si potesse portare i pazienti a raggiungere un livello di fattore nel range tra il 5 -10% e questo sarebbe stato un successo. Ed è davvero stato un successo.

Se osserviamo gli studi in cui ci sono livelli duraturi del 6%, questi pazienti non sono sottoposti a infusione e non stanno sanguinando. Ma sappiamo, da studi più recenti, che possiamo ottenere livelli più elevati. E così, ciò che è stato fatto è quello di prendere il loro vettore e aggiungere la variante Padua e infonderlo in 3 soggetti e i risultati fino a 36 settimane sono mostrati qui e in realtà i dati successivi sono stati presentati, successivamente ad un meeting internazionale .

In questi 3 partecipanti, l'attività media del fattore IX a 36 settimane era del 45%. In questo studio, la cosa interessante è che non sono stati richiesti immunosoppressori. I pazienti avevano un basso titolo di sieropositività per AAV5, il che pone la domanda se i pazienti potessero essere sottoposti a infusione con alcuni vettori se c'era evidenza di una risposta anticorpale.

E questo studio è nella fase 3 a questa dose. Questo mostra l'aggiornamento a 2 anni dello studio AAV-Factor IX Padua Spark-9001 che mostra un'espressione fino a 29 mesi. Mostra una certa variabilità di espressione, ma tutti i livelli avrebbero un impatto clinico significativo e dimostrano di poter eliminare davvero la necessità di infusione del fattore e l'assenza di sanguinamento.

BMN 270 ha già superato la fase 1/2, ora è nella fase 3 a questa dose, 6 per 10 alla 13 genomi virali per chilogrammo. Questi sono i risultati dopo 3 anni



dosando l'attività con un test cromogenico. Inizialmente, con questo vettore, si ottenevano livelli di fattore VIII nel range della normalità che si sono poi ridotti nel tempo.

Ma comunque con livelli intorno al 40%, che è un risultato certamente importante. E penso che dovremo aspettare, perché questo studio è il più avanzato. Dovremo vedere se questo è quanto vogliamo vedere per gli altri studi sul fattore VIII e davvero non lo sappiamo a questo punto. Un altro studio di terapia genica con il fattore VIII è lo studio Alta. E questo è l'aggiornamento dei risultati che sono stati presentati alla recente riunione ASH tenutasi a dicembre 2019.

Questa è la fase 1/2. Come vedete nella parte superiore, ci sono soggetti a cui è stata somministrata la dose da 2 per 10 alla 12. Ma la coorte di dose più alta è 3 per 10 alla 13. Questo è un effetto della dose. E poi si può vedere sul pannello di sinistra l'attività del fattore VIII in un grafico lineare, che separa chiaramente i risultati.

E quindi la scala logaritmica, che dimostra come i pazienti nella coorte ad alta dose raggiungono livelli nel range della normalità. Ancora una volta, questo è nelle fasi iniziali e quindi dobbiamo continuare a seguire questi soggetti nel tempo. E questo fattore VIII sarà utilizzato in uno studio di fase 3 che è attualmente svolto da Pfizer. Quindi, complessivamente, ci sono alcuni aspetti realmente positivi con la terapia genica che utilizzano i vettori AAV anche se alcune sfide e domande continuano a rimanere.

Uno dei problemi è la limitata idoneità dei pazienti. I soggetti arruolati attualmente non possono avere alcuna anamnesi di inibitori. Sebbene debba dire che esistono alcuni studi che sono in via di sviluppo nei pazienti con inibitori. Quindi questo probabilmente non sarà un problema in futuro. Questi sono maschi adulti. Per il fattore VIII in generale, si richiede un'attività inferiore all' 1%...

... sebbene per il fattore IX questo fattore di inclusione sta diventando un po' più tollerante e possono essere arruolati pazienti con un livello minore o uguale al 2%. I pazienti che hanno anticorpi preesistenti al vettore AAV sono esclusi. uniQure nel suo studio sull'emofilia B arruola anche pazienti con positività al vettore a basso titolo. Non si sa se questo abbia a che fare con il titolo anticorpale o con il sierotipo, e penso che non lo si comprenda ancora pienamente.

Quindi i futuri pazienti arruolabili potranno avere inibitori in atto o pregressi e ho sentito che Spark ha in corso uno studio di questo tipo e ci sono anche altre aziende che stanno lavorando a protocolli di questo tipo. I pazienti che vengono esclusi sono quelli che hanno l'anticorpo preesistente anti-AAV, pazienti con emofilia meno grave, e adolescenti. Il problema degli AAV è che





sono virus non integranti, e quindi potrà essere perso in un fegato ancora in crescita.

Questo punto limita la terapia nei bambini piccoli e non sappiamo, fino a quale età si potrà scendere, e dove questo potrebbe perdere la sua efficacia. Ci sono anche donne con emofilia grave, e ci sono alcuni studi che stanno pensando a protocolli di terapia genica aperti anche alle donne. Inoltre, si dovrà pensare anche a quei pazienti che hanno perso l'espressione o che erano nelle prime fasi di studio e non hanno ottenuto un risultato, inoltre, non c'è per il momento un'alternativa per loro in termini di terapia con gli AAV.

E non ci sono altri approcci per la terapia genica e l'emofilia che siano nella stessa fase. Quindi, quali sono i rischi? Per il momento abbiamo un'ottima terapia per l'emofilia. Quindi, quando la consideriamo per i nostri pazienti, dobbiamo essere sicuri che i benefici siano maggiori del rischio. Anche perché qualche rischio è noto.

Per primo abbiamo la tossicità a breve termine per il fegato che è stata osservata in alcuni pazienti, praticamente in tutti gli studi. I pazienti sono stati sottoposti a brevi cicli di trattamento con steroidi. Ma in diversi studi sappiamo che alcuni pazienti hanno richiesto un trattamento con immunosoppressori per un periodo più lungo e ciò pone domande sulla tossicità. I pazienti svilupperanno anticorpi anti-AAV se sono esposti al virus il che, a questo punto, impedirà loro di ricevere un trattamento successivo.

E sappiamo anche che in genere c'è stata un'ampia variabilità di espressione tra gli individui, il che è parzialmente spiegato dalla risposta immunitaria delle cellule T contro il capsido virale. Ma stiamo vedendo che alcuni pazienti stanno perdendo la risposta immunitaria o che sta diminuendo, anche se le prove non ci sono ancora. Ci sono diverse teorie sul perché questo possa verificarsi, ma credo che a questo punto, non lo capiamo ancora appieno.

I motivi sono ancora sconosciuti. Non sappiamo se ci sarà una tossicità epatica a lungo termine. Non abbiamo prove di questo ora, ma è qualcosa che sarà molto importante da seguire. L'AAV, come ho detto, ha un tasso di integrazione molto basso. Tuttavia, stiamo infondendo nei pazienti dosaggi di 10 alla 13 genomi virali per chilogrammo, quindi diventa un numero reale.

Penso che possiamo essere rassicurati dal grande numero di pazienti che hanno ricevuto l'AAV in più studi per diverse malattie, questo è un punto che dovremo osservare attentamente. Non c'è prova di trasferimento nelle linee germinali. Nei modelli animali non ci sono tali evidenze. Negli studi sugli esseri umani, è stato rilevato un vettore nel liquido seminale ma non ci sono



prove che sia presente nelle cellule spermatiche. Quindi questo è rassicurante.

Quindi, riassumendo, la terapia genica mediata da AAV ha avuto successo nell'aumentare i livelli di fattore VIII e fattore IX nei pazienti con emofilia. E in tutti gli studi clinici sono stati ottenuti livelli di espressione anche se con livelli diversi, è stata dimostrata una notevole riduzione dell'utilizzo di fattori e una riduzione dei sanguinamenti. Fino ad oggi, basandosi sugli studi in emofilia e considerando anche gli altri studi sull'AAV, sembra che gli studi clinici abbiano un ottimo profilo di sicurezza. Tuttavia, dobbiamo essere vigili nel valutare il follow-up a lungo termine per osservare qualsiasi segnale di sicurezza.

Abbiamo anche bisogno di dati a lungo termine sull'efficacia per comprendere se i livelli di espressione ottenuti saranno transitori nel corso degli anni poiché sappiamo che possiamo vedere espressioni per anni a questo punto. Durerà? Andrà via? Abbiamo davvero bisogno di dati a lungo termine su questo. E quindi modifiche di approccio con AAV e utilizzo di altri vettori, in modo da poter trattare una popolazione più ampia con emofilia, compresi i bambini piccoli.

Abbiamo anche bisogno di dati sull'efficacia a lungo termine per capire se questi livelli di espressione saranno transitori nel corso degli anni, visto che ora sappiamo di poterla vedere per anni. Durerà? Passerà? Abbiamo davvero bisogno di dati a lungo termine su questo. E poi modifiche di approccio con l'AAV e l'uso di altri vettori, in modo da poter trattare una popolazione di pazienti con emofilia più ampia, compresi i bambini piccoli.

Grazie.

