

David Lillicrap: Olá, eu sou David Lillicrap. Sou professor no Departamento de Patologia e Medicina Molecular no Queen's University no Canadá, e vou apresentar um conjunto de *slides* que falam sobre a terapia genética na hemofilia. O objetivo de aprendizado desses *slides* é descrever corretamente a terapia genética, incluindo os termos e conceitos básicos.

Esta é uma história que começou há mais de 65 anos, e este *slide* mostra uma figura de Francis Crick do lado direito, e James Watson do lado esquerdo, apontando para seu elegante modelo de DNA de hélice dupla que descreveram em Cambridge em 1953.

Dando agora um salto até o início da década de 80, quando os primeiros genes de fatores de coagulação foram descritos. Este é um artigo publicado na Nature pelo meu mentor, Arthur Bloom, descrevendo os benefícios dos experimentos com clonagem para um melhor entendimento da patogênese dos distúrbios de sangramento, avanços no diagnóstico e, em finalmente, relacionado a esta aula, terapia genética.

O princípio da terapia genética é relativamente simples. Ele envolve pegar um transgene terapêutico, inseri-lo em células nas quais o DNA é incorporado no núcleo. O núcleo, então, expressa mRNA, que é traduzido em uma proteína, e essa proteína terapêutica ou fica dentro da célula ou é secretada da célula e circula pelo corpo como benefício terapêutico.

Antes de descrever os detalhes do processo de terapia genética, é importante levantar a questão de que, atualmente, estamos limitados à terapia genéticas de células somáticas. Isto é, a entrega um gene normal ou o reparo de um gene dentro das células de um indivíduo, e não para o benefício de gerações subsequentes. A terapia genética de células somáticas é limitada a um indivíduo, e não temos a intenção de mudar ou alterar o DNA de célula germinativa.

Neste *slide* é possível ver uma lista de doenças que sempre foram boas candidatas à terapia genética. São doenças monogênicas, ou seja, seu fenótipo clínico se deve predominantemente a defeitos de um único gene, e você pode ver que a hemofilia está listada neste *slide*. A hemofilia está ali porque sabemos que pequenos incrementos na proteína do fator de coagulação produzem benefícios clínicos significativos. A proteína é secretada da célula; portanto, ela só precisa cair na circulação. A expressão restrita da proteína não é necessária, e temos modelos animais muito bons nos quais podemos testar essas estratégias de terapia genética, em camundongos e em animais grandes.

Neste *slide*, você verá quatro opções possíveis da terapia genética de células somáticas. A primeira é um reparo de mutação. Vou descrevê-lo um pouco mais no próximo *slide*. A seguir, temos a possibilidade de entregar



transgenes por meio de transferência genética não viral. Estas ainda são teoricamente possíveis, mas não estão próximos à prática clínica. Depois temos a terapia genética baseada em células, e eu vou descrever mais sobre isso em um *slide* subsequente. Por fim, temos a transferência genética por vetor viral, que é a estratégia que tem sido usada em todos os estudos de terapia genética humana atualmente em andamento para hemofilia.

Assim, este *slide* descreve a questão de potencialmente alterar genes ou reparar genes através de estratégias de edição genética. Do lado esquerdo do *slide*, você vê a possibilidade de recombinação homóloga como meio de reparar genes. Isso é teoricamente possível, mas é um processo ineficiente. Do lado direito do *slide*, você vê várias diferentes abordagens de edição baseadas na nuclease. Assim, lendo da esquerda para a direita, as nucleases 'Zinc Fingers, estratégias mediadas por TALENs ou CRISPR nos quais os modos de entrega baseados em proteínas ou ácidos nucleicos a uma região do genoma onde é feita uma quebra da cadeia dupla -- agora olhando para a parte de baixo do *slide* -- e a quebra da cadeia dupla é alterada ou reparada de diferentes maneiras. Estes estudos agora são potencialmente usáveis – logo entrarão em estudos clínicos - mas para hemofilia, acredito que embora isso possa ser feito em modelos *in vitro* e em modelos animais, eles estão distantes da aplicação clínica.

Quais são os elementos de uma estratégia de terapia genética? Estão listados neste *slide*. Eu vou falar sobre o transgene terapêutico, um sistema de entrega e a célula hospedeira apropriada, e depois sobre medições, métricas de resultados para a expressão da proteína transgênica.

Qual a aparência do cassete transgene? Ele geralmente contém uma sequência DNA de codificação ou uma sequência de cDNA, na qual faltam íntrons. A maioria dos cDNAs está em alguma posição da faixa de 2 a 7 quilobases em tamanho, e eu vou falar sobre duas maneiras em que é possível alterar a sequência de codificação em um *slide* subsequente.

A otimização do códon é descrita neste *slide*; é uma mudança da sequência de nucleotídeos, ou seja, os tercetos de nucleotídeos que codificam aminoácidos, mas não há nenhuma mudança na sequência dos aminoácidos. O objetivo desta estratégia em particular é realçar a taxa de transcrição de mRNA, a fim de aperfeiçoar o processamento e a remoção por *splicing* de qualquer elemento intrônico restante e finalmente, parear a tradução de mRNA para a abundância de RNAs de transferência que estão presentes na célula hospedeira alvo.

Os dois outros grupos de elementos necessários no cassete transgene são alguns elementos regulatórios na extremidade "5" do transgene. Esses são os elementos promotores, que podem ser regulados em uma célula específica, em um desenvolvimento específico, ou pode até ser induzível por



medicamento. Assim elementos mais distantes necessários para realçar a expressão do gene, os chamados elementos potencializadores, os quais, novamente, estão geralmente pareados com um tipo particular de célula hospedeira.

Na outra extremidade do cassete transgene está a sequência 3', que normalmente está nesta posição para estabilizar o RNA mensageiro codificado pela sequência do cDNA.

Os próximos dois *slides* lidam com as estratégias gerais para entrega do transgene. O primeiro descreve a transferência direta do gene *in vivo*, no qual o transgene é frequentemente entregue por infusão intravenosa ou possivelmente por um método como injeção intramuscular. As vantagens deste é sua facilidade, exige um tempo mínimo para o clínico e para o paciente. As desvantagens são que há exposição *in vivo* do sistema de entrega do vetor à resposta imune do receptor, o que pode causar alguns problemas como veremos mais adiante. O segundo ponto é que uma eficiência variável no direcionamento, de forma que você poderá, na verdade, estar entregando o transgene a alguns tipos de célula que você preferia que não o recebesse.

A segunda estratégia para a entrega de transgene é mostrada neste *slide*. Esta estratégia é chamada transferência genética indireta ou *ex-vivo*, na qual o transgene é entregue fora do corpo. Como pode ver do lado esquerdo do *slide*, que a primeira coisa a fazer é colher ou isolar células autólogas, progenitoras de longa vida ou células tronco do paciente. Após isolar as células, você então entrega uma cópia normal do gene que é mutante dentro do paciente ou você pode editar o gene mutante que está presente dentro das células do paciente. Essas células geneticamente modificadas são então expandidas fora do corpo e depois reintroduzidas no paciente, onde encontram lugar para residir e produzir o fator normal -- no caso de hemofilia, o fator de coagulação normal -- que está faltando nas células do paciente.

Existem várias vantagens e desvantagens neste sistema de entrega. As vantagens são que não há nenhuma exposição do vetor *in vivo* - isso é imunologicamente importante, uma vantagem. Há um direcionamento direto à célula alvo, de forma que as únicas células a verem o vetor que é um novo transgene, são as células que foram colhidas e estão acessíveis fora do corpo. As desvantagens são que este é um procedimento muito trabalhoso. Requer instalações especiais. Ademais, também importante, o receptor precisa passar por um processo de condicionamento a fim de abrir espaço para que as células geneticamente modificadas possam ser reimplantadas com sucesso.



Todos os estudos atuais de terapia genética na hemofilia envolvem a transferência genética com vetor viral, e há três tipos de vírus que já foram usados: adenovírus, retrovírus, e vírus adenoassociado.

Tenho apenas um *slide* que discute o adenovírus. Houve um paciente tratado com esse sistema de vetor viral. O sistema é altamente eficiente em células de transdução, replicação e não replicação, e podem ser produzidas grandes quantidades desse vetor com relativa facilidade. As desvantagens significativas da transferência genética adenoviral é a existência de uma resposta imune inata significativa montada nesses vetores. Assim, ocorre uma elevação das citocinas pró-inflamatórias, toxicidade hepática, trombocitopenia e, em casos extremos, pode haver o desenvolvimento de uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica que ocasionalmente pode ser fatal. Este não é um sistema de entrega para pacientes com hemofilia na sua forma atual.

O segundo sistema de entrega baseado em vírus é o de transferência genética mediada por lentivírus e está sendo investigado por vários grupos para tradução clínica subsequente na hemofilia. Vetores lentivirais transduzem em células em divisão ou não. A capacidade do vetor, ou seja, o tamanho da inserção do transgene, é razoável com cerca de 8 quilobases no máximo. Existem também respostas imunes inatas discretas. Uma vantagem do sistema lentiviral é que há uma integração genômica estável que parece ser de natureza aleatória e não oncogênica, ao menos nos estudos que têm sido feitos que são extensivos em modelos animais.

Finalmente, um terceiro sistemas de vetor viral é de vírus adenoassociado. Esta é uma micrografia eletrônica que mostra pequenas partículas de AAV. Perto do centro do *slide*, você pode ver uma grande partícula adenoviral. Este é o sistema de vetor viral que esta sendo usado em todos os estudos atuais de terapia genética na hemofilia.

O AAV, como chamarei de agora em diante, é um parvovírus humano não patogênico. Ele tem um genoma de DNA de cadeia simples, que está ilustrado no topo deste *slide*, e tem 4,7 quilobases de tamanho. Possui duas regiões de codificação, um gene *rep* e um gene *cap*, e o genoma é coberto com sequências terminais repetidas invertidas nas duas extremidades. Este sistema de vetor viral induz mínima imunogenicidade inata. Há muitos sorotipos diferentes, representados pelas variações na proteína do capsídeo. Uma proporção muito menor do vetor recombinante se integra ao genoma do receptor, e a maior parte do vetor existe como concatâmeros circulares extracromossômicos estáveis.

Este *slide* basicamente nos diz como converter um genoma AAV do tipo selvagem em um genoma vetor AAV terapêutico. Você remove tanto o gene *rep* quanto o gene *cap*, e você pode ver que inserido abaixo no segundo



diagrama, o genoma vetor AAV agora tem um gene terapêutico do lado direito e um promotor ou sequência regulatória que conduz a expressão em um órgão ou tipo celular em particular. Mostrado neste *slide*, está um promotor específico do fígado que conduziria a expressão deste transgene em hepatócitos. Atualmente, na hemofilia, é para cá que todos os vetores estão sendo direcionados. Na parte de baixo do *slide*, você pode ver que as inserções transgênicas variam entre o fator IX, onde a sequência cDNA tem cerca de 1,3 quilobases de tamanho e para o domínio B com o fator VIII deletado, tem cerca de 4,7, já que a sequência de codificação do domínio B foi removida.

Como se faz uma partícula do vetor AAV? Bom, isso está descrito neste *slide*, aqui. No topo do *slide* você vê uma sequência de ácidos nucleicos transgênicos com estas sequências ITR que foram mantidas nas extremidades “5” e “3” do transgene. A sequência promotora e o gene transgênico no meio, e depois este é inserido na cápside do vetor AAV para fazer uma partícula de vetor AAV. Essas são as partículas injetadas no paciente, para o fígado, com o material terapêutico.

Isso está ilustrado com mais detalhes aqui, de forma que você vê que a partícula interage com a membrana da célula do receptor. Com o AAV a interação com certas formas de receptores está bem elaborada, porém ainda há algumas falhas no nosso conhecimento. A partícula é levada para o endossomo dentro da célula. Em algum momento, a partícula é liberada do endossomo, a proteína do capsídeo é desfeita e expressada na superfície do tipo de célula transduzida, e o ácido nucleico transgênico é deixado para trás no núcleo, onde ele existe como concatâmero extracromossômico, ou, em alguns casos -- e com AAV isso é em menor escala -- é integrado no DNA da célula receptora.

E então, quando juntamos tudo isso para a hemofilia, os componentes de uma estratégia de transferência genética envolvem um transgene terapêutico que é um tipo selvagem ou uma sequência modificada do fator 9 cDNA, uma sequência do domínio B com o fator VIII excluído. Você precisa de uma estratégia de entrega, que atualmente é um vírus adenoassociado, embora haja estudos, como já mencionei, envolvendo estudos com lentivírus que ainda estão em desenvolvimento inicial. Você precisa entregá-lo a uma célula hospedeira do receptor, e no momento, este é o fígado, e depois você precisa ver se as métricas dão suporte ao sucesso dos estudos que você fez. Isso envolve medir os níveis dos fatores de coagulação no plasma, medir as taxas anuais de sangramento e o consumo de fator VIII exógeno pelos pacientes. E depois, claro, você também tem de vigiar quanto as questões de segurança.



Este *slide* representa uma versão do ciclo de hype do Gartner para terapia genética. Eu vou levar vocês da esquerda para a direita neste *slide*. Então, a tecnologia começou na década de 70, e você pode ver que no topo do pico, de 1990 a 1995, acreditávamos que a terapia genética poderia fazer coisas notáveis. De fato, algumas formas de transtorno de imunodeficiência herdada, como a deficiência de ADA, já haviam sido curadas pela terapia genética. Todavia, em 1999, houve um desastre em que um paciente sendo tratado por terapia genética adenoviral, Jesse Gelsinger, faleceu de uma condição inflamatória sistêmica, e isso, sem dúvida, causou forte desilusão no desenvolvimento de estratégias de terapia genética.

Mesmo assim, ao longo da década seguinte, de 2000 a 2010, o trabalho básico de ciências no desenvolvimento de vetores e um entendimento muito melhor da resposta imune à entrega da terapia genética nos levou àquilo que atualmente é um platô de produtividade. Na realidade, isso começou para hemofilia em torno de 2010/2011, com o primeiro sucesso clínico prolongado de tratamento da hemofilia baseada em terapia genética, e engajamento biofarmacêutico significativo nas estratégias de terapia genética. Assim, agora estamos em 2019, na véspera de vários estudos clínicos de fase 3, para hemofilia A e hemofilia B.

Este é o último *slide* da apresentação, e ele descreve a promessa da terapia genética para hemofilia. A parte superior do *slide* descreve os efeitos da hemostasia com a reposição do fator, reposição do fator com extensão da meia-vida, terapia sem fator, e, do lado direito do *slide*, a possibilidade do que pode acontecer com terapia genética. Na parte inferior do *slide*, você vê os níveis do fator de coagulação, que pode ser medido dentro da circulação. Assim, se você voltar sua atenção para as informações do lado esquerdo do *slide*, você pode ver que há picos e vales intermitentes para os níveis do fator que correspondem a melhora e depois redução na melhora da hemostasia. É isso que acontece em função das meias-vidas das proteínas dentro da circulação.

Aqueles benefícios foram melhorados com os fatores com extensão de meias-vidas, fatores EHL, o que você pode ver no segundo conjunto de dados, os resultados da hemostasia e os resultados dos níveis dos fatores. A seguir, indo para a direita até as terapias sem fator, esses fatores não melhoram os níveis dos fatores de coagulação porque não estão usando fatores de coagulação convencionais na circulação, mas melhoram os níveis de hemostasia global, e você pode ver isso ilustrado na parte de cima do gráfico.

Depois, do lado direito do *slide*, você pode ver o que pode ser alcançado com a terapia genética. Assim, a terapia genética tem a promessa de elevar os níveis de fatores de coagulação individuais, fator IX e fator VIII, até níveis



significativos no tratamento, e esses então persistem por causa da expressão contínua do fator IX ou fator VIII dos transgenes terapêuticos que foram entregues, e devem ser mais do que adequados para produzir profilaxia mantida em longo prazo, com apenas raras exigências para reposição intermitente de fatores de coagulação.

