

Flora Peyvandi: O objetivo da minha apresentação, e de muitas atividades do ISTH durante os próximos anos, é educação, especialmente no difícil campo da terapia genética, além do entendimento de como a terapia genética funciona, o que isso significa para o paciente e para o médico, e de que forma podemos alcançar esse objetivo e o que precisamos saber?

O tratamento da Hemofilia é uma terapia de reposição com base na administração endovenosa de um fator de coagulação deficiente. No caso da hemofilia A, administramos o fator VIII. Na hemofilia B, seria o fator IX.

Houve uma ampla mudança no tratamento de pacientes com hemofilia, representando uma grande evolução desde os anos 50 quando um paciente com hemofilia era tratado com sangue total. Depois foi indicado o tratamento com PFC, com crioprecipitado e, a seguir, nos anos 70, com produtos derivados do plasma. Infelizmente, tivemos um período sombrio no tratamento de pacientes com hemofilia, com infecções de nossos pacientes com hepatite C e HIV.

Posteriormente, durante os anos 90, tivemos a oportunidade de usar os dados de clonagem dos fatores VIII e IX obtidos de ATs, com a primeira geração do fator VII recombinante chegando ao mercado em 1992, em 1994 tivemos a segunda geração do fator IX recombinante e assim por diante. Houve uma grande melhora na qualidade dos fatores, com o uso de cada vez menor de proteínas humanas, tornando-os cada vez mais seguros.

O problema causado pelas infecções associadas a HIV e HCV já se encontra quase resolvido, assim como as infecções relacionadas a outros hemoderivados. Chegamos a 2015 com a quarta geração do fator VIII recombinante, que não contém em sua formulação nenhum tipo de proteína humana.

O melhor aspecto dessa evolução mencionado foi segurança. Definitivamente isso foi uma mudança, entendemos os dois sistemas de inativação do vírus, por tratamento térmicos e por solventes detergentes, assim como purificação adicional, como filtragem e as novas técnicas, tornando o produto cada vez mais seguro.

Ao mesmo tempo, as estratégias de tratamento do paciente também estavam mudando. No início os pacientes eram tratados apenas no momento do sangramento; mas depois, entendemos que os quadros clínicos dos nossos pacientes portadores de hemofilia leve ou moderada eram significativamente diferentes em comparação àqueles com menos de 1% de atividade, chamado hemofilia grave.

O número de episódios de sangramento espontâneo em pacientes com fatores residuais mínimos, cerca de 1 a 3%, foi muito menor em relação aos



pacientes graves. Esse foi um ponto de ensino importante para os nossos médicos, no sentido de mudar o fenótipo do paciente com tratamento profilático, uma infusão intravenosa do fator de coagulação deficiente, para mudar o quadro de manifestação de sangramento nos nossos pacientes. Isso ainda é feito para pacientes com hemofilia A com infusões intravenosas 2 a 3 vezes por semana e cerca de 2 vezes por semana para pacientes com hemofilia B.

A segurança melhorou significativamente, mas ainda não era fácil para os pacientes, especialmente crianças e adolescentes, receberem 2 a 3 infusões intravenosas [semanais]. Era complicado, especialmente se o acesso venoso não estivesse perfeito - se a criança não tivesse um bom acesso venoso. Isso era difícil para os pais. O problema de trombose, infecção. Todos esses fatores estavam criando uma situação muito difícil.

Essa situação resultava da curta meia-vida dos fatores, o que estava associado à frequência das injeções e, ao mesmo tempo, estávamos observando títulos altos e baixos muito frequentemente. Os níveis eram altos imediatamente após a injeção e muito mais baixos após 8 a 12 horas, significando que nossos pacientes não estavam completamente protegidos porque os níveis não eram estáveis, e esse era o aspecto terapêutico que precisava mudar. Nós precisávamos de mais proteção para nossos pacientes.

Entretanto, os padrões do produto, estavam realmente mudando a qualidade de vida dos nossos pacientes, com tratamento em casa, com terapia profilática, mas ainda não eram subótimos. E foi esta a razão, ao longo dos últimos dez anos, para a melhora significativa do tratamento da hemofilia com novas opções terapêuticas que estavam tentando otimizar o manejo dos pacientes com e sem inibidores.

E o que vem a ser um inibidor? Inibidores são aqueles anticorpos, principalmente contra o fator VIII e às vezes contra o fator IX, que neutralizam a atividade do fator; os pacientes não podiam mais ser tratados com o fator VIII e precisavam de uma terapia mais intensiva e de um tratamento mais caro, chamado de agente de *bypassing*.

Quais são essas novas opções terapêuticas? Três estratégias compõem o novo tipo de tratamento que se iniciou nos últimos anos e está progredindo sensivelmente. Um são produtos com meia-vida estendida; o segundo é uma terapia sem reposição; o terceiro é a terapia genética. Eu estou apenas procurando mostrar onde estamos com os resultados de cada categoria de produtos.

Como produtos com meia-vida estendida, dois tipos de estratégia têm sido usados. O primeiro, no lado esquerdo, é a PEGuilação, que significa um



acoplamento químico de polietileno glicol que se liga ao fator VIII recombinante capaz de aumentar o volume hidrodinâmico das moléculas. Isto leva a diminuição da depuração desta molécula pelo rim. O tamanho da PEGuilação poderia ser diferente, de 5 quilodaltons para 10, 20, 40 ou às vezes, 60 quilodaltons.

A segunda categoria de produtos foram proteínas de fusão, que podiam ser feita pela ligação por fusão de um fragmento cristalizável, Fc, região de uma imunoglobulina IgG, ou poderia ser albumina, capaz de se ligar ao fator VIII recombinante ou fator IX. E mesmo esta estratégia reduz a depuração da molécula pelo rim e aumenta a meia-vida do produto na circulação; o fragmento Fc e a albumina são reciclados pelo receptor do Fc ligante na superfície das células endoteliais, o que aumenta a meia-vida das moléculas.

Como eu disse, as tecnologias eram PEGuilação e fusões. Diferentes empresas tentaram usar essas duas estratégias, produzindo, no total, quatro produtos do fator VIII, três PEGuilados e um Fc de fusão do fator VIII recombinante além de três produtos com meia-vida estendida do fator IX, cada um por cada tipo de técnica, um PEGuilado, um produto glico-PEGuilado do fator IX, um produto Fc de fusão do fator e um produto de fusão da albumina do fator IX.

A pergunta principal é qual desses produtos funciona melhor em termos de segurança e eficácia, e será que temos dados suficientes para entender, como médicos, qual produto é mais seguro ou melhor que os outros?

Eu tentei reunir todos os dados e me parece que, para o fator VIII, estamos atingindo um aumento de cerca de 50 a 60% vezes e isso é mais ou menos similar para todos os produtos. Se fizermos a associação e considerarmos o efeito que este tipo de aumento teve na vida dos pacientes, veremos que ele está reduzindo o número de infusões anuais em cerca de 30 a 35% nos pacientes com hemofilia A.

E sobre a proteção? Como você pode lembrar, eu expliquei que profilaxia é um método para manter o nível do fator VIII ou fator IX acima de 1%; mas com o padrão do produto e a frequência atual de infusões, era muito difícil atingir esse nível mínimo de 3 a 5% para a proteção dos pacientes. Aqui podemos ver que alguns pacientes poderiam alcançar 3% ou até um pouco mais.

Se reunirmos todos esses dados, podemos concluir que com o uso de produtos com meia-vida estendida, pacientes com hemofilia A grave poderiam ser convertidos para um fenótipo moderado. Isso significa um menor número de sangramentos e um menor número de infusões. Precisamos de mais dados da vida real para entender a eficácia nesses pacientes no futuro.



Em termos de hemofilia B para os produtos com meia-vida estendida, temos observado que produtos com fator IX funcionam muito melhor e os resultados foram muito mais animadores. Foi observado um aumento de cerca de 3 a 6 vezes entre produtos Fc, albumina e produtos PEGuilados. Isso significa que o número de infusões nos pacientes com hemofilia B foi associado a uma redução de quase 50 a 65%. E, em especial, o nível mínimo foi significativamente aumentado até 5 a 10 unidades internacionais. Isso no quadro clínico de um paciente significa que pacientes com hemofilia grave poderiam ser convertidos em um fenótipo leve. E isso significa muito - significa uma mudança significativa na qualidade de vida de pacientes com hemofilia B.

Se tivermos que concluir sobre os produtos de meia-vida estendida do fator IX, podemos dizer que atingimos o alvo, e, até para o fator VIII podemos dizer que conseguimos um resultado parcial; porém, apesar da redução de 30 a 35% do fator VIII ser interessante, queremos mais.

Por que existe essa limitação? Nós obtemos um menor número de infusões, alcançamos um nível mínimo mais elevado e observamos uma diminuição no sangramentos, o que significa mais dados da vida real no futuro; mas não alcançamos o resultado completo pelo qual esperávamos.

Por que razão isso estava acontecendo? Estava acontecendo porque o fator VIII circulante leva consigo ao circular carreadores, que é o fator de von Willebrand. E a meia-vida do fator von Willebrand na circulação é de 18 horas. E não podemos ter uma extensão maior do que aquela do fator de von Willebrand se não mudássemos nossa estratégia. Por esta razão as futuras gerações dos produtos de meia-vida estendida contêm um fragmento do fator von Willebrand. De fato, dois deles já estão disponíveis, ainda não no mercado, mas em estudos clínicos.

O primeiro é uma molécula de Fc do fator VIII recombinante adicionado ao fator de von Willebrand D'D3 com o XTEN, um polipeptídeo biodegradável esse baixo clearance renal. A segunda molécula é o fator VIII recombinante de cadeia única infundida com albumina; novamente uma próxima geração do produto com meia-vida estendida, e essa molécula também é adicionada ao fator de von Willebrand D'D3.

Se olharmos os resultados da primeira molécula que mencionei, o fator recombinante Fc von Willebrand XTEN parece ser muito interessante, e o estudo de fase 1/2a em pacientes com hemofilia grave mostrou uma extensão de até 37 horas. A média de atividade do fator VIII era de 13% a cada cinco dias, e de 5,6% sete dias após a infusão. Isso significa mudar significativamente a qualidade de vida de pacientes com hemofilia A também no futuro.



Passando para o segundo grupo de tratamentos, temos a terapia sem reposição para pacientes com hemofilia, com um mecanismo de ação diferente. Aqui nós não estamos administrando o fator VIII ou fator IX. Nosso tipo de ação é diferente. Podemos usar a inibição de anticoagulantes não naturais. Com isso, podemos preparar uma geração de trombina obtendo uma hemostasia mais eficaz, o que poderia ser feito pela inibição da proteína C ativada, podendo ser feito com o uso do fator inibidor da via de inibição do pelo uso de anticorpos monoclonais. Podemos realizar a infra-regulação da transcrição da antitrombina e do RNA silenciando o RNA; e isso, novamente, seria o efeito anticoagulante ou podemos usar um método completamente diferente fazendo o *bypass* ou mimetizando o fator VIII usando um anticorpo monoclonal biespecífico contra o fator IXa e fator X.

Tenho certeza de que no futuro encontraremos ainda mais novos tipos de estratégia, mas é isso que sabemos sobre hemostasia e seus mecanismos de ação diferentes. Ter mecanismos de ação diferentes, significa que a medição dos fatores VIII e IX não é suficiente. Precisamos aprender que tipo de ensaio temos que usar e como devemos avaliar a eficácia da hemostasia quando usamos esses produtos, especialmente durante o sangramento quando estamos combinando esses produtos com outros tipos de agentes e produtos hemostáticos.

O único produto já disponível são os anticorpos humanizados biespecíficos que vou mostrar; os demais estão em estudos clínicos, alguns na fase 2 avançando para a fase 3, e logo a maioria deve estar disponível. O SerpinPC está em ensaios pré-clínico e logo estará em um estudo clínico de fase 1.

Emicizumabe - novamente, uma estratégia de tratamento completamente nova, chamada de ACE IX-X ou emicizumabe, é o anticorpo quimérico humanizado biespecífico contra o fator IXa e fator X. Isso significa que este produto mimetiza a função do cofator do fator VIII, ligando-se ao fator IXa com um braço e ao fator X com o outro, colocando-os em uma posição especialmente apropriada e promovendo a ativação do fator 10 pela catalisação do fator 9a. Este tipo de propriedade está mudando significativamente o tratamento de pacientes afetados pela hemofilia A, com e sem inibidor, e poderia ser usado para os dois grupos de pacientes como foi mostrado neste desenho.

A FDA e a EMA aprovaram emicizumabe para profilaxia em pacientes adultos e pediátricos com hemofilia A com ou sem inibidores. No início foram usadas doses de 3 mg/kg uma vez por semana durante as primeiras quatro semanas, seguido por 1,5 mg uma vez por semana, como dose de manutenção, e agora esse intervalo poderia ser de duas semanas ou até de quatro semanas no futuro.



Ele não poderia ser usado para tratamento sob demanda, durante sangramento ativo, e se destina unicamente à profilaxia. Atualmente este produto está disponível nos Estados Unidos para pacientes com e sem inibidores, e está disponível na Europa principalmente para pacientes com inibidores e em alguns países europeus, também pode estar disponível para pacientes sem inibidores.

No início do estudo clínico de emicizumabe, tivemos três episódios de microangiopatia trombótica, particularmente associado ao complexo de protrombina ativada com dose alta nas primeiras 24 horas, mas depois entendemos que a combinação com este medicamento poderia ser prejudicial para os pacientes. Em seguida tentamos mudar a estratégia terapêutica para outros agentes de *bypass* e depois disso não tivemos mais nenhum outro caso de MAT.

Alguns eventos trombóticos e dez casos de morte foram relatados; três ocorreram durante o uso do produto por uso compassivo. Foi relatado um caso de anticorpo neutralizante contra o medicamento. Agora, estes dados também estão chegando, especialmente para o relatório de mortalidade, que, como podemos reconhecer, não tínhamos os dados para todos os outros tipos de produto. Assim, precisamos de uma boa vigilância pós-registro para analisar a segurança e eficácia, não apenas para deste medicamento, mas para cada novo medicamento no futuro, a fim de entender como estão atuando e qual a segurança desses produtos. Atualmente, o número relatado até agora é aquele que mostrei nos *slides*.

Em suma, poderíamos dizer que as novas estratégias terapêuticas parecem alterar significativamente o tratamento de pacientes e causar uma melhora significativa no controle de sangramentos relativo ao padrão atual de cuidado de pacientes, com e sem inibidores. Ainda permanecem algumas questões de segurança que requerem a implantação de estratégias para mitigação de risco. Desses, alguns já foram iniciados e alguns ainda precisamos entender melhor, porque os pacientes tratados, especialmente sem a terapia de reposição, não são mais pacientes graves, eles são mais moderados, e precisamos aprender melhor como tratá-los durante um sangramento agudo.

Minha recomendação seria a observação de longo prazo e planos educacionais para pacientes e médicos. Precisamos ensinar nossos médicos não especialistas e nossos pacientes, que esses medicamentos são diferentes e que eles precisam conhecê-los melhor, e nós precisamos entender melhor de que forma estão agindo.

A última categoria, que são terapias genéticas, é a reposição do gene disfuncional com um gene exógeno funcional que cura ou causa uma expressão de longo prazo do gene que não era funcional.



Os estudos pré-clínicos da terapia genética começaram em 1997 até 2006 e o primeiro ensaio clínico usando AAV2 foi usado pela Avigen em 2006, como falei, na hemofilia B. Todavia, a expressão permaneceu apenas por um período curto de tempo. Depois de quase quatro anos, o grupo do Professor Amit Nathwani e Ted Tuddenham na University College de Londres, juntamente com nossos colegas do St. Jude's Children's Research Hospital usaram o novo vetor, AAV8, e trataram os primeiros pacientes com hemofilia B grave; os primeiros seis pacientes tratados com três diferentes dosagens mostraram um bom resultado. A partir daí, o número tem aumentado até dez pacientes, e por agora estamos há cerca de 9 anos do início da terapia genética, nenhuma questão de segurança foi notada e o nível de expressão continuou quase estável. Esse foi um resultado muito importante no campo da hemostasia obtida por esse grupo em Londres.

Depois desse resultado, várias empresas começaram a usar a estratégia de terapia genética associada com diferentes dosagens, e depois foram inseridos novos componentes de mutação relatados pelo grupo de Pádua, a variante do gene que foi capaz de aumentar o nível de expressão. Com isso, a segunda geração de terapia genética começou com cerca de 18 a 33% relatado por Spark, expressão agora também disponível com os resultados de uniQure. Isso está mudando o quadro de tratamento de pacientes com hemofilia B grave.

Para hemofilia A, como você sabe, a terapia genética é ainda mais complicada, porque o gene é maior e mais complexo. Assim, diferentes métodos e estratégias, como a otimização de códons, deleção do domínio B com o promotor específico do fígado, têm sido usados, e a expressão genética *in-vivo* foi usada em camundongos e primatas não humanos entre 2004 e 2011; o primeiro ensaio clínico de terapia genética em humanos foi feita usando AAV5 por BioMarin, e este resultado foi publicado no New England Journal of Medicine mostrando resultados interessantes.

Nesta tabela você pode ver como as coisas estão caminhando, existem diferentes empresas tentando trazer o uso de diferentes níveis de vetor pelo emprego dos vetores AAV2, AAV5 e AAV8. Novamente, como eu falei, diferentes expressões do fator 8 têm sido alcançados. BioMarin veio com a normalização da expressão do fator 8, um resultado surpreendente, agora esperamos ver um bom resultado, como foi relatado pelo comunicado da BioMarin, que eles tinham disponível junto ao leito para um ensaio clínico de fase 3 durante o ISTH deste ano em Melbourne. Igualmente, também outras empresas estão trazendo resultados interessantes.

Resumindo o que tentei dizer nesta meia hora de apresentação, somado ao que falei sobre produtos com meia-vida estendida e sem terapia de reposição, a terapia genética também parece ser uma abordagem poderosa



no manejo de hemofilia e poderia oferecer um resultado de longo prazo. Finalmente, no futuro, usando outros tipos de vetor, como lentiviral ou até estratégias como edição, poderão levar a uma cura definitiva. Contudo, podemos dizer que os resultados de ensaios clínicos de terapia genética usando o vetor viral adenoassociado mostram, sem dúvida, a expressão de longo prazo com o fator IX. O resultado com o fator VIII será relatado durante o ISTH após três anos.

Naturalmente, em todos esses pacientes, nossa sociedade tem uma grande responsabilidade de ensinar todos os médicos, cientistas e pacientes como fazer o seguimento e a vigilância de longo prazo em termos de ganho, segurança e eficácia. Precisamos também projetar um conjunto de dados mínimo que será usado por todos os centros. Todos os pacientes tratados com terapia genética devem estar nesse banco de dados e, bancos de dados nacionais e internacionais, devem ter um link disponível dos bancos de dados nacionais; os reguladores devem ter acesso a esses dados e à academia. Este tipo de coleta de dados independentes deve nos dar informações claras quanto a se esses tipos de estratégia são bons e eficazes, como estamos vendo agora.

Questões críticas. Está tudo lindo, mas eu ainda penso que precisamos ficar de olho na durabilidade da expressão do fator de coagulação na terapia genética. Precisamos entender porque, 8-12 semanas após a injeção, há um aumento das enzimas hepáticas e qual é o elemento em alguns pacientes causando o aumento desta enzima. Ademais, os perfis de segurança de diferentes sorotipos de AAV precisam ser entendidos: o efeito do processo de fabricação do vetor e o nível de expressões e a variabilidade entre os diferentes pacientes e a variabilidade do vetor entre lotes.

A potencial genotoxicidade, é extremamente importante, e precisamos entender se temos integrados vetores de entrega de genes ao fígado. Se existe risco, qual a percentagem dessa integração e se ela é segura? No futuro seria muito importante termos alguns dados sobre biópsias hepáticas de pacientes que foram tratados com terapia genética.

Finalmente, precisamos entender que tipos de ensaios laboratoriais precisamos realizar, caso contrário o que estamos alcançando com um estudo clínico é diferente do outro e não poderemos comparar a eficácia dos resultados alcançados com dois tipos diferentes de estratégia.

Muito obrigada pela sua atenção.

