

Glenn Pierce: Bom dia! Meu nome é Glenn Pierce. Sou o vice-presidente da área médica da Federação Mundial de Hemofilia [*World Federation of Hemophilia*] e tenho interesse e envolvimento de longa data em terapia gênica para hemofilia. Hoje, conversaremos sobre outras estratégias e alvos da terapia gênica no tratamento da hemofilia. Nossos objetivos serão contemplar outras abordagens além de vetores do vírus adenoassociado (AAV, da sigla em inglês, *adeno-associated virus*) e analisar alguns prós e contras do vetor AAV ao longo desta conversa.

O conceito da terapia gênica teve seu início há quase 50 com um artigo publicado por Ted Friedmann na revista *Science*, considerando a possibilidade de terapia genética para doenças humanas. A publicação desse texto ocorreu não muito tempo após a identificação do DNA e RNA e de suas funções. Ele levantou a questão dos difíceis problemas científicos e éticos, semelhante ao que estamos fazendo hoje a respeito de edição gênica.

Agora, avançamos quase 50 anos e perguntamos o porquê de vetores AAV para a terapia gênica da hemofilia. Bem, basicamente porque eles, de fato, funcionam. Mas essa evolução ocorreu ao longo de um período de 25 a 30 anos com muitas falhas pelo caminho. No ponto em que chegamos, eles são a abordagem mais viável para conceder benefício terapêutico a indivíduos com hemofilia, tanto por deficiência do fator VIII quanto do fator IX.

Em geral, eles têm um bom registro de segurança e têm sido usados em vários tipos de doença e estudos clínicos. Estaremos discutindo muitas questões, incluindo a variabilidade e durabilidade das respostas, e o fato de que, talvez, até aproximadamente a metade das pessoas tenham imunidade pré-existente a diferentes sorotipos do AAV. Os sorotipos são partículas de AAV com relação próxima entre si, mas que evoluíram a partir do AAV primário...

...ao ponto de poderem infectar diferentes tecidos no corpo. Assim, temos usado vários desses sorotipos de AAV para terapia gênica. Existem evidências de exposição anterior ao AAV em muitas pessoas. Estas são respostas de anticorpos induzidas por contato prévio que impedem o seu uso naqueles que são positivos. Esta resposta imune observada antes de administrar o AAV é consideravelmente amplificada após a sua administração, o que impede a infusão de uma nova dose.

Títulos muito elevados de anticorpos resultam da administração da terapia gênica com AAV. Este é um dos menores vírus capazes de infectar seres humanos; por isso, mesmo após a remoção dos genes do próprio AAV, não sobra muito espaço no vírus. O gene do fator VIII com deleção do domínio B, por exemplo, quase não cabe em um AAV. Assim, temos também limitações de tamanho. O AAV é capaz de produzir um pouco de integração aleatória, que não está bem definida nem bem estudada...



...e levanta a questão sobre segurança de longo prazo. E então, a preocupação final acerca do AAV é que estamos administrando trilhões de genomas virais a pacientes, mas apenas uma fração muito pequena acaba produzindo proteínas que são secretadas e são úteis para terapia. Tendo dito isso, o AAV é um vetor viral funcionando capaz de nos oferecer um efeito terapêutico na hemofilia.

E quanto a soluções para melhorar os vetores do AAV? Como já analisamos todas essas questões que envolvem o uso do AAV, muitas soluções têm sido sugeridas, a maioria das quais ainda não foi testada. Este é um importante componente não apenas à medida que estudos clínicos progridem para fase 3, mas também à medida que novos estudos são estabelecidos e que poderão demonstrar um aprimoramento dos vetores AAV, das eficiências da transdução e assim por diante. Então, todas essas possíveis...

...soluções estão sendo estudadas, mas não com a velocidade necessária para entrarem nesta primeira geração de terapia gênica com AAV que poderá ser aprovada já em 2020, 2021. Se analisarmos a transdução de hepatócitos pelo vetor AAV, olhando esta ilustração, o que podemos ver no número 1 é que se você tiver anticorpos contra AAV de uma infecção natural pré-existente...

... isso impedirá que eles sequer alcancem a célula-alvo. Assim, a terapia gênica não será eficaz. Na ausência de anticorpos, no número 2, o AAV pode se ligar aos receptores de superfície de células específicas, e entrar na célula por endocitose através dos mecanismos usuais de transcitose do receptor. Uma vez dentro da célula, ele poderá encontrar alguma imunidade inata; porque, afinal de contas, nossas células foram projetadas para nos defender contra infecções virais.

E é esse o aspecto que ele pode apresentar quando estiver sendo usado na terapia gênica. Mesmo assim, uma quantidade suficiente de AAV poderá escapar e perder o seu revestimento (capsídio). No citoplasma, o DNA entra no núcleo onde eventualmente forma episômos, que são alças fechadas e estáveis capazes de usar o maquinário do receptor (paciente) para transcrever e traduzir a proteína que então poderá ser secretada. O próprio capsídio ...

...entra no retículo endoplasmático ou encontra importantes antígenos de classe I de histocompatibilidade. Alguns desses podem ser capazes de se ligar especificamente a peptídeos de capsídio, caso em que são distribuídos sobre a superfície da célula onde podem estimular células-T CD8 específicas anti-capsídio. Isso, então, pode resultar na destruição da célula contendo o transgene. Assim, estamos lidando com...

...questões de eficiência, variabilidade e durabilidade como uma função de todos esses passos complexos que ocorrem dentro da célula. O que podemos fazer a respeito de imunidade pré-existente? Bom, alguns grupos estão investigando a imunoadsorção em modelos animais. Isso envolve usar uma coluna, como uma coluna de proteína G ou proteína A, capaz de

adsorver e retirar imunoglobulina, IgG, de um paciente que tenha altos títulos de...

...anti-AAV. Este é um efeito transitório e não dura muito, mas pode durar o suficiente para diminuir os títulos o bastante para podermos administrar o vetor AAV e direcionar o transgene aos genes alvos. Existem trabalhos em andamento para analisar a eficiência da remoção de IgG, já que, em vários pacientes, quantidades significativas de IgG precisarão ser removidas para permitir...

...o direcionamento para os hepatócitos. Existe também a questão da toxicidade intracelular após a infusão do AAV. Reconhecemos que em vários pacientes, ocorre a elevação das transaminases hepáticas. Essa elevação é transitória e, na maioria dos casos, não é muito elevada, talvez 1½ a 2x acima do normal, na maioria dos casos. Entretanto, elas causam preocupação porque a elevação de transaminases hepáticas indica a morte de hepatócitos.

Quais são as possíveis causas da elevação de enzimas hepáticas? Bem, há 3 hipóteses e pode ser que uma ou mais dessas tenham um efeito sobre os hepatócitos em pacientes individuais. Em primeiro lugar, está a degradação de uma carga muito alta de capsídios do AAV. Muitos capsídios entram nas células porque muitas são administradas por via intravenosa e a célula precisa digerir esse capsídio. Ele precisa ser degradado em seus aminoácidos constituintes.

E a célula precisa de uma grande quantidade de energia para fazer isso. Depois, há o problema citotóxico da célula-T que eu acabei de descrever. E temos ainda a terceira possibilidade, conhecida como a resposta a proteínas mal enoveladas, que é mais específica do fator VIII. Há muitos anos foi estabelecido que é muito difícil para as células fabricarem a proteína do fator VIII. Esta é uma proteína complexa, uma das maiores no corpo.

E mesmo se estivermos usando o fator VIII com deleção do domínio B, já foi demonstrado em culturas celulares que sua fabricação pelas células é muito difícil e que ele pode causar toxicidade dentro dessas células. Essa toxicidade também pode resultar em morte da célula; e, naturalmente, em perda da expressão do fator VIII. Portanto, essas são todas áreas que precisam ser investigadas, mas ainda não estão sendo estudadas o suficiente para nos ajudar a obter algumas respostas a essas questões para, então, desenvolver possíveis ...

...soluções para esses problemas. Assim, vemos um exemplo da elevação de transaminases dentro do fígado no gráfico superior esquerdo. Ele mostra o desenvolvimento coincidente das células-T CD8 citotóxicas que são específicas para o capsídio do AAV, o que inclui morte e destruição das células. O que vemos na parte de baixo são as diversas respostas imunológicas que podem ocorrer em resposta à...

...transdução e expressão do transgene. O que vemos são células-T CD8 capazes de atacar o hepatócito contendo o transgene. Também vemos que



células-T CD4, células *helper*, podem ser ativadas e são importantes na geração de uma resposta significativa de anticorpos contra o capsídeo do AAV, impedindo sua subsequente readministração. Entretanto, quase não tem havido iniciativas para se investigar essas 3 questões críticas...

...envolvendo o capsídeo, células-T citotóxicas e a resposta a proteínas mal enoveladas. É necessário muito mais trabalho nessas áreas para uma melhor definição desta questão em pacientes individuais e grupos de pacientes. Quais são as alternativas ao AAV? Bem, muito trabalho tem sido feito com alternativas virais e não virais. Os vírus com estudos mais avançados na hemofilia são os lentivírus.

Os lentivírus derivam do HIV. Existe neles a ausência de vários genes do HIV. Assim, o gene do fator VIII ou fator IX pode ser inserido assim como é inserido no AAV. Trabalhos estão sendo feitos, tanto *ex vivo* com célula-tronco hematopoiéticas quanto *in vivo* com direcionamento específico para hepatócitos usando a entrega lentiviral tanto do fator IX quanto do fator VIII em vários modelos pré-clínicos, incluindo animais de grande porte.

Uma abordagem diferente envolve o não uso estruturas não virais, o que seria uma situação ideal. Nanopartículas lipídicas já têm sido pesquisadas há mais de 30 anos, com a finalidade de direcionar ácidos nucleicos, tal como DNA. Eu já disse sobre como o AAV é ineficiente. E as nanopartículas são até menos eficientes que os AAV com relação ao “empacotamento” dos genes dentro de células. Não obstante, não ocorre a geração de respostas imunológicas contra essas nanopartículas lipídicas, permitindo a aplicação de injeções repetidas.

Assim, se o paciente não tiver um nível alto o suficiente do fator VIII ou fator IX, seria possível aplicar essa terapia repetidamente a fim de alcançar um nível terapêutico. Outra abordagem, que é o futuro da terapia gênica, envolve a edição de genes. Essa abordagem envolve adicionar o gene diretamente dentro dos cromossomos podendo substituir um gene existente. No caso da hemofilia, isso não é realmente necessário. O gene pode simplesmente ser adicionado dentro do cromossoma.

Em alguns casos de hemofilia, se houver uma mutação específica, ele poderia até mesmo reparar o gene endógeno mutado. Como eu falei, a edição de genes representa o futuro da terapia gênica, porque ele permite a correção permanente do fenótipo. Uma vez dentro dos cromossomas, ele continuará a expressar a proteína pelo resto da vida da célula. Se a célula se dividir, ele também será encontrado nas duas células filhas. Enfim, é uma abordagem atraente que ainda não está pronta para...

...estudos clínicos em humanos, mas está sendo estudada em modelos pré-clínicos para hemofilia. A última abordagem é a terapia celular. Com a terapia celular, vários tipos celulares diferentes têm sido usados, tanto células-tronco quanto hepatócitos, para direcionar os genes do fator VIII ou fator IX diretamente a indivíduos com hemofilia. Este *slide* mostra um diagrama de nanopartículas lipídicas direcionando ácidos nucleicos.



A maior parte do trabalho feito aqui é com pequenas moléculas de RNA como RNAs inibidores. Contudo, potencialmente, genes também podem ser incorporados nestas nanopartículas lipídicas. Muito trabalho precisa ser feito ainda para torná-las não-tóxicas para as células e permitir que sejam direcionadas, por exemplo, aos hepatócitos. Aguardamos com expectativa por mais trabalhos nesta área. Essa terapia ainda não está pronta para estudos clínicos, mas está se movendo nessa direção.

Precisamos identificar meios de aumentar a eficiência da expressão do gene com o uso destas moléculas de RNA. Elas oferecem várias vantagens em relação ao direcionamento via vetor viral. Qual é a principal diferença entre os vetores lentivirais e vetores AAV? As principais diferenças entre os vetores lentivirais e vetores AAV são mostradas neste quadro. Eles vêm de diferentes famílias. Em um caso, são envelopados com um envelope lipídico como os lentivírus.

E em outro caso, estão sem envelope, apenas mostrando proteínas capazes de fazer interface com receptores nas superfícies celulares. A capacidade de “empacotamento” do lentivírus é duas vezes maior que para o AAV. Como mencionei, o lentivírus se integra dentro do DNA do receptor, enquanto o AAV praticamente não o faz. Este permanece extracromossômico a maior parte do tempo. Ambos podem transduzir células que estejam ou não estejam se dividindo.

Como também mencionei, o lentivírus proporciona uma correção permanente, enquanto o AAV na forma de episômos pode ser perdido na divisão celular. Se analisarmos a comparação da transferência genética usando vetores lentivirais e vetores AAV, ambos são muito semelhantes. Nos dois casos temos um vírus capaz de entrar nas células através de receptores específicos. Nos dois casos, o DNA ou RNA no caso dos lentivírus precisa entrar no núcleo...

...onde ambos utilizam o maquinário do receptor. O lentivírus utiliza o maquinário do receptor para fazer DNA a partir do RNA, e depois integrar esse DNA dentro do cromossoma. O AAV utiliza o maquinário do receptor para pegar o DNA de cadeia única, transformá-lo em um DNA de cadeia dupla, fazer com que forme um episôma ou um pedaço circular de DNA no qual o RNA pode então ser transcrito para fazer a proteína.

Portanto, ambas as abordagens podem funcionar e fornecer níveis terapêuticos do fator VIII, pelo menos em animais e, no caso de AAV, em humanos. A edição do genoma para hemofilia inclui abordagens *in vivo* ou *ex vivo*. Vamos analisar a edição genética em mais detalhes. Com a edição genética, uma técnica relativamente nova na tecnologia que tem sido estabelecida ao longo dos últimos 5 a 8 anos, somos capazes de...

...inserir um novo gene diretamente dentro dos cromossomas usando enzimas bacterianas específicas capazes de abrir nosso DNA e permitir a inserção do novo gene. Isso fornece uma correção permanente dentro do cromossoma. Se olharmos um método específico de edição genética, como



o CRISPR-Cas9, podemos ver neste caso, que é um *abstract* de uma apresentação feita na reunião do ISTH em julho de 2019...

...por Alan Brooks, como ele consegue cortar o DNA do receptor, neste caso hepatócitos, e inserir o gene do fator VIII com deleção do domínio B dentro dos cromossomas dos hepatócitos e produzir mRNA, RNA mensageiro, secretando o fator VIII. Isso foi feito em modelos animais e tem demonstrado níveis do fator VIII dentro da faixa terapêutica.

Considerando agora as abordagens de terapia celular, diversos grupos têm usado tanto células-tronco quanto hepatócitos maduros para direcionar os genes do fator VIII ou fator IX. Neste caso, mostrado na ilustração, o gene do fator VIII é colocado dentro de um vetor lentiviral. Esse vetor lentiviral é capaz de transduzir células-tronco mesenquimais que podem ser retiradas do receptor.

E todas essas células-tronco mesenquimais podem ser induzidas a se diferenciar em diversos tipos celulares diferentes, incluindo células da medula óssea e hepatócitos. Podendo, portanto, potencialmente produzir o fator VIII dentre esses tipos celulares diferenciados. Isso pode ser feito de maneira autóloga, significando que as células-tronco podem ser retiradas do paciente e manipuladas *ex vivo* sendo, em seguida, devolvidas ao pacientes com o gene do fator VIII onde poderão secretar a proteína do fator VIII.

Isso já foi feito em animais e, na verdade, foi também feito em humanos sem muito sucesso; mas um artigo de Roth e cols., publicado há cerca de 20 anos, mostrou que era possível remover fibroblastos de uma biópsia de pele, cultivar essas células *in vitro*, adicionar o gene do fator VIII e depois reimplantá-los na cavidade peritoneal. Eles acreditam ter evidenciado uma discreta atividade do fator VIII...

...por um curto período de tempo na circulação, mas não seguiram adiante ao ponto de alcançar um benefício terapêutico para os pacientes. Nesta próxima abordagem, células endoteliais podem expressar o fator VIII. Este é o tipo de célula natural que expressa o fator VIII, as células endoteliais sinusoidais do fígado. E o que pode ser feito é coletar células-tronco autólogas, células-tronco pluripotentes induzidas, da circulação do paciente.

Uma vez transduzido o gene do fator VIII usando um vetor lentiviral, estas células podem então ser diferenciadas em células endoteliais e devolvidas ao paciente, o que proporciona reparar o fenótipo hemofílico. Os benefícios conceituais desta abordagem são muito claros e muito simples. O desafio aumenta quando tentamos levá-la para a prática. Mesmo assim, isto já foi feito em animais e produziu níveis terapêuticos do fator VIII quando os animais receberam essas novas células.

Depois, em um conjunto final de experimentos, células semelhantes a hepatócitos podem ser geradas a partir de células-tronco pluripotentes induzidas. A abordagem, então, seria coletar células mononucleares do sangue periférico de pacientes, reprogramá-las usando fatores de transcrição, potencialmente pequenas moléculas em células-tronco



pluripotentes induzidas, fazer a edição do gene para inserir o gene do fator IX,...

...direcionar a diferenciação para células semelhantes a hepatócitos e, em seguida, reimplantá-las no paciente onde se fixariam no fígado ou poderiam residir na cavidade peritoneal e produzir quantidades substanciais do fator IX terapêutico. Isso já foi feito em camundongos. Então, com todas essas abordagens em terapia celular, alcançamos alguns resultados razoáveis que ocorreram em modelos animais e nos perguntamos se esta transição pode ser feita para estudos clínicos em humanos.

Até agora, não há plano em curto prazo para um estudo clínico em humanos. Mais trabalho precisa ser feito. Houve o desenvolvimento de um IND aberto com células-tronco hematopoiéticas na terapia lentiviral em humanos. Isso envolve expressar o gene do fator VIII especificamente em plaquetas. Entrando nas células-tronco com o fator VIII lentiviral, realizando sua transdução, permitindo que se diferenciem em...

...uma variedade de tipos celulares, mas colocando um promotor no gene do fator VIII que permita a produção do fator VIII apenas dentro de plaquetas maduras. Esta abordagem tem sido demonstrada em vários modelos animais e tem, atualmente, um IND aberto. Infelizmente, com este tipo de abordagem, é preciso promover um espaço na medula óssea para que as células editadas com o gene transduzido possam voltar e estabelecer um nicho.

Isso significa que um agente citotóxico tal como bussulfano precisa ser usado para remover parte da medula óssea. Existem preocupações com isso em termos da razão risco/benefício, de forma que isso precisa ser proposto e planejado sem pressa e com muita cautela, para ter certeza de não prejudicar o paciente com a ablação de parte da sua medula óssea. Se voltarmos para o AAV e analisarmos algumas das limitações, eu descrevi a necessidade de aprimoramentos nos vetores...

... que precisam abordar amplamente a eficiência, variabilidade e durabilidade da terapia AAV. Eu já falei sobre a direcionamento alternativo de genes, direcionamento dos genes sem o uso dos AAV como através de nanopartículas lipídicas e lentivírus que estão emergindo. E, pelo menos no caso dos lentivírus, estes logo devem estar em estudos clínicos. Depois existe a terapia celular combinada com a terapia gênica, combinada com edição de genes que também aparenta poder ser...

...muito eficaz em fornecer novas "fábricas", novas fábricas celulares para produzir o fator VIII ou fator IX. Contudo, ainda não foi feita a transição dos modelos pré-clínicos para conceitos clínicos. Muito obrigado pela sua atenção.

