

Thierry VandenDriessche: Meu nome é Thierry VandenDriessche. Eu sou professor na Vrije University de Bruxelas, na Bélgica. Sou o diretor do Departamento de Terapia Genética e Medicina Regenerativa. Tenho trabalhado no campo de terapia gênica pelos últimos 30 anos, particularmente em terapia gênica para hemofilia; é um prazer estar aqui hoje para falar com vocês sobre como se encontra este campo atualmente, e quais são as principais preocupações e incertezas relacionadas com o futuro da terapia gênica para hemofilia.

As preocupações comuns na terapia gênica são as seguintes: A terapia gênica é eficaz para hemofilia? Ela funciona? E como comparamos os desfechos dos diferentes estudos clínicos de terapia gênica? Por quanto tempo se espera que o efeito da terapia gênica perdure? Será para toda a vida ou será temporária? Existem questões de segurança importantes que devemos considerar?

Uma vez que um paciente tenha se submetido à terapia gênica, esse paciente poderá ser novamente tratado se houver uma queda nos níveis do fator VIII ou fator IX? Podemos também usar a terapia gênica para o tratamento de pacientes com inibidores para o fator VIII ou fator IX? E qual é, de fato, o risco de desenvolver inibidores após a terapia gênica? Será mais elevado do que na terapia convencional de substituição de proteínas ou será igual ou inferior? E, finalmente, poderíamos considerar o tratamento de crianças com terapia gênica, de preferência antes do desenvolvimento da doença articular?

Estas são, de fato, algumas perguntas importantes para as quais não temos, realmente, uma resposta; mas certamente temos algumas indicações, com base no estado da arte, o que respalda nossa direção atual. Se analisarmos os estudos clínicos de terapia gênica para hemofilia, veremos que a maioria dos estudos se baseia em um “veículo de entrega” do gene, chamado vetor viral adeno-associado...

...que possui certa variação na sua composição, em termos das cápsides usadas para embalar o gene terapêutico (gene do fator VIII ou IX), como também em termos do próprio gene terapêutico. Quando analisamos os diversos estudos, uma coisa que todos eles têm em comum é o fato de usarem um fator VIII com deleção do domínio B, que é dito “otimizado”, mas a natureza da otimização varia de vetor para vetor.

Ademais, a natureza do transgene pode ter diferenças sutis. Por exemplo, na estrutura da *Freeline*, existe um domínio V3, que se acredita, valoriza a expressão. Todos esses vetores também dependem do uso de um promotor específico para o hepatócito (*hepatocyte-specific promoter*, HSP), para conduzir os genes terapêuticos. Em termos das cápsides que são usadas



para encapsular esses genes terapêuticos, elas variam um pouco e servem como chave molecular...

...para abrir a porta e entregar o gene terapêutico dentro das células. Com respeito à hemofilia A, sem entrar em detalhes, um estudo em particular vem à mente. É o estudo publicado por Rangarajan et al., no *New England Journal of Medicine*, no qual um vetor VAA5 foi usado para direcionar o fator VIII. Você pode imaginar imediatamente que a injeção IV única...

...deste vetor VAA5 contendo o gene do fator VIII resultou em um aumento estável e significativo da atividade do fator VIII, na faixa suprafisiológica. E esse achado foi compatível com uma redução significativa no número de sangramentos e no número de infusões de concentrado do fator VIII nesses pacientes. Portanto, este é um avanço muito significativo que ilustra a promessa da terapia gênica para hemofilia A.

Se analisarmos a expressão ao longo do tempo, veremos que a expressão parece declinar um pouco. Voltaremos a esse assunto mais tarde. Com relação à hemofilia B, novamente, existem muitos estudos em andamento em paralelo, todos fundamentados no vetor viral adeno-associado e contendo diferentes tipos de transgenes terapêuticos. Assim como no caso do fator VIII...

...o transgene do fator IX é um códon otimizado. O propósito da otimização deste códon é maximizar a quantidade de proteína produzida pelo vetor. E, na maioria dos estudos, está sendo usado um transgene otimizado do fator IX, o fator IX Pádua transgene, que incorpora uma mutação com ganho de função que aumenta a atividade do fator IX em cinco a dez vezes. Isto implica que, para a mesma quantidade de vetor, pode-se atingir uma atividade cinco a dez vezes maior do fator IX.

Existe, também, outro vetor desenvolvido pela Sangamo que se baseia na edição gênica, permitindo que a expressão do fator IX seja conduzida a partir do promotor de albumina endógena. Se analisarmos os promotores que são usados para conduzir o fator IX Pádua ou até mesmo a versão não-Pádua, estes são promotores específicos de hepatócitos (*hepatocyte specific promoters*, HSPs). No caso das nucleases *zinc fingers* da Sangamo...

...novamente, um promotor específico de hepatócitos está sendo usado. Assim, podemos ver aqui alguns pontos em comum entre cada um desses diferentes estudos clínicos. Quando focamos especificamente nas cápsides dos vetores, existem algumas diferenças sutis, diferentes sorotipos estão sendo usados, e as consequências dessas alterações moleculares no nível das cápsides ainda não são plenamente compreendidas.



O estudo clínico com VAA para o fator IX que deu origem à atividade robusta do fator IX foi relatado pela primeira vez por George et al. no periódico *New England Journal of Medicine* em 2017. Imediatamente se tornou obvio que com a injeção de uma dose relativamente pequena do vetor, de  $5 \times 10^{11}$  vg/kg, ocorreu uma atividade relativamente estável do fator IX na faixa de 30% a 50%.

Isso foi compatível com a queda significativa nas taxas médias anualizadas de sangramento e no número médio de infusões de concentrado do fator IX. De fato, isso reflete bem aquilo que vimos no estudo da hemofilia A que acabei de mencionar. Gostaria de chamar sua atenção, também, para a variação significativa entre pacientes que está aparente neste estudo em particular. Também observamos isso em outros estudos clínicos e é algo que precisamos entender e aprender a interpretar.

Por que alguns pacientes têm níveis mais elevados do fator IX ou fator VIII do que outros após a terapia gênica em comparação a outros pacientes? Ainda não temos a resposta para esta pergunta. A boa notícia é que se analisarmos os diferentes estudos e não tivermos tempo para descrever todos eles detalhadamente, é que esses estudos clínicos alcançaram níveis terapêuticos do fator VIII e fator IX. E estes níveis permaneceram relativamente estáveis por pelo menos um ano.

Ainda há alguma discussão quanto ao possível declínio depois de, digamos, 2 ou 3 anos. Voltaremos a esse ponto mais adiante. Este aumento nos níveis terapêuticos dos fatores VIII e IX está associado a uma redução significativa nas taxas anuais de sangramento e à redução no uso do fator. São considerados relativamente seguros, sem nenhum evento adverso importante. Existe alguma preocupação com hepatotoxicidade, que abordarei mais tarde.

O ganho de função da mutação Pádua também dá origem a uma atividade muito maior em comparação à versão não-Pádua, o que é particularmente interessante porque nos permite, teoricamente, usar doses mais baixas e mais seguras dos vetores. Não há inibidores relatados para o fator VIII ou fator IX após a terapia gênica. E talvez isso não seja totalmente surpreendente, porque os pacientes que foram incluídos nesses estudos foram selecionados com base na ausência de qualquer histórico de inibidor.

Os estudos de acompanhamento de longo prazo em modelos pré-clínicos se estendem, na verdade, além daquilo que já fomos capazes de demonstrar em sujeitos humanos. Mas é encorajador o fato de que, no modelo canino de hemofilia, já ter sido demonstrada a expressão na faixa de 5% a 10% por tempo superior a 12 anos. Em estudos com primatas não humanos, os



estudos de acompanhamento ainda não são tão longos; mas aqui já foi demonstrada a expressão por mais de 6 anos.

Existe um verdadeiro desafio em comparar a eficácia e segurança nestes diferentes estudos de terapia gênica. Parece que, no estudo conduzido pela BioMarin e UniQure, doses aparentemente maiores do vetor estavam sendo usados na faixa de  $10^{13}$  vg/kg, em comparação aos estudos conduzidos por Freeline e Spark...

...que se basearam em doses de vetor na faixa de  $2 \times 10^{12}$  vg/kg ou menor. Entretanto, não podemos realmente comparar essas doses devido ao fato de não haver padrões para doses de vetores. Existem também diferentes métodos de manufatura, diferenças na funcionalidade do vetor, significando que a razão de partículas vazias versus cheias pode, de fato, variar entre estudos.

Ademais, as estratégias usadas para titular esses vetores podem variar nesses diferentes estudos. E também não podemos ignorar a possibilidade de que nos próprios sujeitos do estudo pode haver diferenças relacionados, por exemplo, à incidência de anticorpos anti-VAA pré-existentes. Ainda nesta fase, foram desenvolvidos ensaios para determinar o título desses anticorpos anti-VAA...

...mas esses ensaios não são padronizados, e apresentam diferentes sensibilidades e pontos de corte. De maneira que, em resumo, estamos comparando maçãs e laranjas no contexto da ausência de quaisquer normas. Assim, precisamos lidar com a questão e lutar pelo desenvolvimento contínuo de normas que possam ser utilizadas para responder a estas perguntas. E uma das principais perguntas sobre terapia gênica está...

...relacionada ao fato de que, se a terapia gênica irá resultar na expressão do gene terapêutico por toda a vida ou talvez apenas na expressão por alguns anos após os quais a expressão diminuirá. Essa, então, é a pergunta de um milhão de dólares no campo. É encorajador o fato de que em cães, a expressão é de pelo menos 12 anos, e em primatas não humanos, de pelo menos 6 anos. Em camundongos, sabemos que dura por toda a vida.

A experiência clínica com a terapia gênica por via hepática com o fator IX já tem, pelo menos, 8 anos, durante os quais a expressão sustentada do fator IX tem sido demonstrada, o que é muito encorajador. E, de fato, em um dos estudos por via muscular anterior existem evidências de expressão por 10 anos. Se formos críticos na avaliação dos níveis de expressão do fator VIII no estudo BioMarin do fator VIII com o VAA, veremos que os níveis não são estáveis por si...



...porque se acompanharmos o nível de expressão do fator VIII, digamos por um maior período de tempo, veremos que os níveis medianos do fator VIII caíram de inicialmente mais de 150% para menos de 50%. Não entendemos muito bem os motivos desta cinética, e isso é algo que precisamos entender melhor. A questão agora é aguardar para ver se a expressão será sustentada além desse intervalo de dois anos, e isso terá que ser monitorado de perto.

Os hepatócitos se dividem lentamente em adultos, e isso pode ter repercussões com respeito à estabilidade da expressão. E qual o motivo disso? Quando as células se dividem os genomas do vetor VAA que expressam o fator VIII ou fator IX serão diluídos e até mesmo degradados. A consequência disso, é que a expressão do fator IX ou fator VIII irá declinar em função dessa divisão celular.

Entretanto, se uma célula não se dividir, poderemos presumir que os níveis de fator VIII ou fator IX se manterão relativamente estáveis. Todavia, em sujeitos pediátricos, há um aumento de hepatócitos em proliferação, e na ausência de uma integração estável dos genes terapêuticos do fator VIII ou fator IX no genoma alvo dos hepatócitos...

...os genes serão diluídos e será esperado que a expressão seja transitória. Existem alguns modelos animais pré-clínicos que sustentam esta hipótese, já que até agora, crianças ainda não foram tratadas usando a terapia gênica no contexto da hemofilia. Se o vetor fosse se integrar de forma estável no genoma da célula-alvo, seria esperada uma expressão estável, porque não haveria nenhum efeito de diluição do gene terapêutico neste contexto específico.

Os riscos de longo prazo associados à terapia gênica ainda não são plenamente entendidos. E isso cai no âmbito dos fatos desconhecidos que ignoramos e talvez dos fatos desconhecidos de que temos ciência. Qual é o risco do câncer hepático? Agora a integração genômica de um gene terapêutico no genoma da célula-alvo é uma faca de dois gumes.

Por um lado, sabemos que a integração muito provavelmente irá garantir uma expressão de longo prazo do gene de interesse, se não por toda a vida, de modo que se possa esperar um efeito terapêutico permanente. Por outro lado, não temos realmente qualquer controle quanto ao local no genoma no qual o gene irá se integrar. E, caso isso ocorresse perto de um oncogene...

...haveria um risco, pelo menos teórico, de que isso poderia induzir a formação de tumores. Caso que seria considerado uma oncogênese insercional. Portanto, este seria um fenômeno praticamente aleatório, nós



não controlamos onde o vetor poderá se integrar o que pode representar um risco teórico de segurança. A razão biológica para isso é que o gene de interesse...

...poderá, caso sua integração ocorra perto de um oncogene, conferir uma vantagem proliferativa às células com genes modificados, resultando na ativação de um oncogene e na indução da proliferação de hepatócitos. Não havendo nenhuma vantagem de sobrevivência ou proliferativa, nada acontecerá, por este motivo isso é um assunto que devemos considerar. Todavia, temos que analisar esses dados. Quais são os dados nos modelos pré-clínicos que abordam esta segurança de longo prazo?

É tranquilizador o fato de não haver evidências de aumento da malignidade em nenhum dos estudos pré-clínicos de terapia gênica para hemofilia A ou B, incluindo camundongos normais, camundongos hemofílicos com deficiência do fator IX ou deficientes do fator VIII, em cães hemofílicos com deficiência do fator hemofílico IX ou do fator VIII ou em primatas não humanos. De modo que embora não possamos formalmente excluir...

...que isso possa ou não ocorrer, as evidências pré-clínicas são realmente muito fortes. Não há evidências apoiando a ideia de que os vetores de terapia gênica que estão sendo avaliados atualmente em estudos clínicos resultem em aumento de malignidade nesses modelos. Voltando às questões de segurança, sabemos que a administração de vetores de VAA dos fatores VIII ou IX podem resultar em toxicidade hepática aguda.

Então isso é um fato que sabidamente conhecemos. Tomando, por exemplo, os dados que foram relatados por George et al., podemos ver que nestes pacientes, os níveis do fator IX se elevam, mostrado aqui na cor verde; mas há um aumento concomitante nas enzimas hepáticas no sangue desses pacientes. De maneira que podemos ver dois pacientes nos quais um aumento das enzimas hepáticas foi aparente no sangue desses pacientes.

No segundo paciente aqui, eles parecem coincidir com uma queda na atividade do fator IX. Assim, talvez as transaminases que poderiam ser mensurados no sangue sejam reminiscentes da toxicidade e inflamação hepática, resultando na depuração das células com gene modificado e na perda concomitante da expressão do fator IX. Até certo ponto, esses eventos adversos poderiam ser controlados pela administração de prednisona...

...ou seja, por tratamento com corticosteroides orais; e, na maioria dos estudos clínicos, já vimos tal resposta, mesmo que o mecanismo não seja completamente compreendido. Acredita-se que a resposta específica das células T ao VAA desempenhe um papel em pelo menos alguns pacientes,





mas esta pode não ser a história completa. Pode haver outros mecanismos imunológicos que também sejam capazes de responder pelo declínio na expressão e/ou no aumento das enzimas hepáticas refletindo uma transaminite.

Contudo, uma das hipóteses que tem sido confirmada até certo ponto em modelos pré-clínicos e que pode ocorrer em pelo menos alguns pacientes é o fato de que células T específicas para o VAA e que células T citotóxicas CD8 positivas sejam capazes de reconhecer peptídeos de cápsides derivados do VAA que são apresentados em associação com MHC classe 1 ao sistema imunológico dos pacientes...

...e, portanto, resultar na depuração destas células e na perda de expressão. Entretanto, se administrarmos supressão imunológica transitória por meio de corticosteroides, por exemplo, esta reação imunológica indesejada poderá ser suprimida podendo ser alcançada uma expressão estável. Sabemos agora que esta não é a única explicação e que outros mecanismos imunológicos podem responder pela transaminite...

...já que em alguns pacientes não há evidências de uma resposta de células T específicas para o VAA, mas a transaminite ainda ocorre. Então, este é um efeito colateral comum nos estudos clínicos sobre hemofilia A. Este efeito tem sido observado globalmente. De fato, também tem sido visto em outros estudos clínicos além da hemofilia, especialmente quando grandes doses de vetores foram usadas para o tratamento de pacientes. Nos estudos clínicos sobre hemofilia B também há evidências de transaminite.

E isso é, de fato, a razão por que esteroides são administrados aos pacientes para evitar que isso aconteça. Todavia, a administração de corticosteroides orais nem sempre é suficiente para limitar a transaminite. Em um dos estudos, houve perda da expressão do fator VIII a despeito do uso de corticosteroides orais. Em alguns estudos clínicos sobre hemofilia baseados em VAA, houve até toxicidade hepática grave, e esses estudos foram descontinuados.

Há muita discussão sobre a implantação de corticosteroides profiláticos a fim de assegurar que não haja nenhum risco da ocorrência de transaminite. Finalmente, existe a questão dos inibidores do fator VIII ou fator IX. É interessante observar que em muitos estudos foi demonstrado que a terapia gênica para o fator IX ou fator VIII resultam na indução de tolerância imunológica.

Em alguns casos, os anticorpos para o fator VIII ou fator IX poderiam até mesmo ser erradicados após a terapia gênica. Eu apenas quero chamar sua



atenção para um estudo publicado pelo grupo de Arruda e colegas; contudo, há muitos outros estudos que sustentam essa hipótese. Por exemplo, em estudos anteriores, já foi demonstrado que se desafiarmos camundongos com fator VIII ou fator IX, no final você terá anticorpos contra o fator VIII ou fator IX. A menos que se trate esses animais com terapia gênica,...

...então não haverá anticorpos contra o fator IX ou fator VIII, possivelmente envolvendo a indução de células T reguladoras. O Dr. Arruda e colegas têm demonstrado é que mesmo no caso do fator VIII em um grande modelo animal, anticorpos contra o fator IX podiam ser erradicados. Este é, então, um exemplo claro pelo qual, através da neutralização de anticorpos inibidores do fator VIII poderiam ser erradicados após a terapia gênica ...

...que apresenta um ângulo muito interessante para este problema. Existem várias questões importantes que já foram abordadas pela terapia gênica e outras questões que ainda estão no processo de serem abordados. A terapia gênica é eficaz? Sim, certamente para a hemofilia, mas também para outras doenças genéticas e até mesmo para o câncer. A terapia gênica tem resultado na aprovação da EMA e FDA para diversos produtos para outras doenças, além da hemofilia.

É apenas uma questão de tempo até vermos o primeiro produto de terapia gênica licenciado também para hemofilia. Qual é a duração esperada para o efeito da terapia gênica? Bem, ainda não sabemos se o efeito será de muitos anos ou por toda a vida, mas os dados atuais sustentam uma expressão de pelo menos oito anos. Quais são as principais questões de segurança? As principais questões de segurança estão relacionadas ao risco de hepatite e inflamação.

Ainda que isso possa ser controlado pela administração temporária de cortisona. Outro risco que diz respeito a um risco de segurança de longo prazo tem a ver com a integração aleatória do vetor. Mesmo que os estudos pré-clínicos tenham demonstrado que o risco de oncogênese insercional é muito baixo nos modelos hemofílicos e em outros modelos pré-clínicos que se fundamentaram no uso de vetores de terapia genética e que foram subsequentemente usados em estudos clínicos.

O tratamento dos pacientes pode ser repetido? Bem, no momento, isso não é possível. A razão é que esses pacientes já tratados com terapia gênica desenvolverão anticorpos contra o vetor, impedindo a readministração do vetor. De modo que eles não podem ser novamente administrados com o mesmo vetor que receberam anteriormente. Contudo, existem alguns desenvolvimentos em modelos pré-clínicos que sugerem maneiras para contornar isso. Assim, talvez seja simplesmente uma questão de tempo...





...até que encontremos maneiras de retratar os pacientes que, por ventura, apresentem um declínio da expressão após a terapia genética. Podemos tratar pacientes com inibidores? Por enquanto pacientes com inibidores não estão sendo incluídos nos estudos. Até mesmo pacientes que não tenham inibidores no momento, mas que com histórico de inibidores no passado, ainda não foram tratados. É provável que esses pacientes sem inibidores no presente, mas que tiveram inibidores no passado...

...venham a ser incluídos, eventualmente, em alguns dos futuros estudos clínicos sobre hemofilia. É encorajador, entretanto, que estudos em animais tenham demonstrado indução da tolerância após a terapia gênica e até o desaparecimento e, até mesmo, erradicação de inibidores pré-existentes do fator IX ou fator VIII. Assim, talvez o risco de inibidores após a terapia gênica seja menor do que seria esperado no contexto de terapia com substituição de proteínas.

Isso, contudo, ainda precisa ser investigado mais profundamente. Então, qual é o risco de desenvolver inibidores após a terapia gênica? Bem, com base nos estudos atuais, não podemos, de fato, abordar isso já que todos os pacientes foram previamente selecionados com base na ausência de inibidores. Contudo, como mencionei anteriormente, estudos pré-clínicos sugerem que talvez o risco de desenvolver inibidores seja menor após a terapia gênica. Em última instância, podemos tratar crianças usando a terapia gênica preferencialmente antes do início da doença articular?

Se você quiser fazer isso, precisaremos de um fator integrador, contudo, isso suscita questões associadas ao risco da integração genômica aleatória, ou talvez de edição genética na qual possamos modificar o genoma especificamente em um local muito específico. Outra opção é podermos readministrar os vetores do VAA. Mas, para tanto, precisamos de outras abordagens para nos livrar dos anticorpos que...

...podem desenvolver com a injeção de vetores VAA. Novamente isso é, possivelmente, uma questão de tempo até que estudos pré-clínicos nos apontem o caminho de como traduzir esses achados para a clínica. Portanto, em conclusão, a boa notícia é que níveis sustentados do fator IX e fator VIII poderiam ser obtidos após a terapia gênica. Até agora os níveis mais altos de atividade do fator IX foram de 30% a 40%.

A expressão de longo prazo sugere uma expressão de, pelo menos, oito anos de expressão na faixa de 2% a 5% em um dos estudos precoces. E, naturalmente, seria muito interessante ver de que forma esse nível de 30% a 40% irá se comportar ao longo do tempo nestas últimas coortes de pacientes. No caso do fator VIII, os níveis agora ficaram em torno de 50%, 2



anos após a terapia genética. Esses aumentos nos níveis dos fatores IX e VIII são compatíveis com uma correção significativa do fenótipo de sangramento...

...e na descontinuação da profilaxia. Existe uma diminuição no uso do fator e ausência de inibidores do fator IX ou VIII. As evidências em modelos pré-clínicos sugerem até tolerância imunológica ao fator VIII ou fator IX, o que é, de fato, muito encorajador. Devemos manter em mente que a terapia gênica não é magia. Há algumas incógnitas desconhecidas que temos de considerar, além de outros parâmetros.

Há questões de segurança no curto prazo, resposta imunológica contra o vetor e as células projetadas por engenharia genética, toxicidade hepática, que requer o uso de corticosteroides, questões de segurança de longo prazo e variação entre pacientes. Assim, ainda há um pouco de sorte envolvida. Alguns pacientes poderão ter níveis normais, outros poderão ter níveis abaixo de 10%. E ainda não entendemos muito bem o motivo para esta variação entre pacientes.

Finalmente, a moral da história é que devemos ser cautelosamente otimistas. Eu gosto de parafrasear Winston Churchill neste respeito. “Agora, isto não é o fim. Nem sequer é o começo do fim. Mas é, talvez, o fim do começo.”  
Muito obrigado.

