

Barbara Konkle: Eu sou a Barbara Konkle. Eu sou professora de medicina na Universidade de Washington e Diretora Científica da Bloodworks Northwest, onde também sou vice-diretora do Washington Center for Bleeding Disorders. Hoje eu vou falar sobre terapia gênica e hemofilia e, mais especificamente, sobre a terapia gênica com o vetor viral adeno-associado ou VAA e sua aplicação na hemofilia.

O objetivo desta aula é identificar as principais características dos estudos clínicos atuais na terapia gênica, tanto para hemofilia A quanto para hemofilia B. O princípio da terapia gênica é bastante simples. Temos um gene que é colocado dentro do vetor VAA e injetado na circulação periférica. E, devido ao vetor e sua região promotora, que discutiremos adiante...

... este gene é direcionado para o fígado, onde ficam as células alvo que discutiremos. O VAA é, essencialmente, extracromossômico e, então, ocorre a produção da proteína. Em relação ao que acontece na célula alvo, ainda existe muita coisa que não sabemos e que precisamos entender melhor. Tem havido um número impressionante de modelos animais usando terapia gênica e mais de 200 estudos clínicos para diferentes doenças...

... foram realizados em humanos usando-se a terapia gênica baseada no VAA nos últimos 30 anos. Então, especificamente sobre o vírus VAA, no topo podemos ver o vírus selvagem. Ele tem os genes rep e cap, os quais são removidos para criar o vetor. O VAA selvagem é um membro da família Parvoviridae. Ele tem um genoma com um DNA de fita simples com cerca de 4,7 kb.

Sua replicação é deficiente; portanto, ele precisa de um vírus auxiliar. Na verdade, foi assim que ele recebeu esse nome. Ele foi encontrado como um contaminante em uma cultura de adenovírus, mas não tem nenhuma relação com o adenovírus. Ele não é patogênico e infecta os humanos naturalmente. No caso dos vetores VAA, eles apresentam defeito na sua replicação.

Como veremos em um slide subsequente, eles se apresentam tanto como vetores de ocorrência natural e vetores resultantes de bioengenharia. O capsídeo viral governa para onde o vetor vai, o tropismo tecidual. Foi documentado que ele tem expressão por longo prazo em células pós-mitóticas e, predominantemente, não se integra a elas e, muito importante, até o momento, ele possui um bom perfil de segurança em modelos animais e em estudos clínicos realizados em humanos. Como mencionado acima, nós somos expostos ao VAA.

Por isso, cerca de 30% a 50% da população tem anticorpos anti-VAA. E os anticorpos mais comuns são contra o sorotipo VAA2. Foi realizado um estudo no qual eles pegaram amostras coletadas de 62 garotos ao longo do



tempo e analisaram o desenvolvimento de soropositividade para o VAA no início da vida.

No gráfico à direita, você pode ver que esses garotos foram expostos ao VAA. E, mais comumente, ao VAA2. Este estudo analisou especificamente VAA2, VAA5 e VAA8. Ao longo de anos, foi realizado um trabalho para melhorar a expressão desses vetores e poder usá-los para hemofilia. Inicialmente, havia a preocupação de que a resposta imune ao capsídeo poderia ser diminuída com a remoção dos capsídeos vazios...

... o que parece ser uma boa ideia e provavelmente é; contudo, não ficou claro se isso modulou a resposta imune geral. Existe o uso de diferentes sorotipos de VAA. Inicialmente, foi usado o VAA2, seguido por outros sorotipos. Há menos soropositividade na população, além de um tropismo tecidual variável. Existe a otimização do promotor específico para o fígado e dos elementos reguladores para garantir que ele seja direcionado para o fígado.

Na figura você pode ver um promotor do CMV, mas outros promotores são usados. Os cientistas também otimizam o códon para aumentar a produção do Fator VIII e Fator IX. Existem duas modificações que agora são uniformes: uma modificação no Fator VIII refere-se ao uso de um Fator VIII com deleção do domínio B para permitir que ele tenha um tamanho que possa ser inserido no VAA.

Em seguida, existe a variante Pádua no Fator IX. Essa alteração com troca de um aminoácido foi descoberta em uma família de Pádua, na Itália, que apresentava níveis muito altos de atividade do Fator IX. E isso foi devido a esta única variante. E, como veremos, ao inserir essa variante no cassete do Fator IX, podemos aumentar acentuadamente a atividade específica do Fator IX.

O primeiro estudo clínico mediado por VAA na hemofilia foi com injeções intramusculares. Isso foi feito no Children's Hospital of Philadelphia. E não houve nenhuma expressão do fator IX de forma sistêmica. Contudo, é interessante observar que, depois, quando voltaram e fizeram a biópsia do músculo, encontraram expressão persistente do gene do Fator IX. A primeira infusão hepática foi realizada usando a construção VAA2-Fator IX, mostrado no gráfico à direita, do manuscrito original.

Com a dose mais alta, a atividade do Fator IX aumentou inicialmente, conforme mostrado na linha vermelha, para cerca de 12%, o que foi incrivelmente empolgante. Houve, porém, um aumento das enzimas hepáticas, especialmente da ALT, o que foi associado a uma diminuição na expressão do Fator IX. Isso foi surpreendente de fato; em parte porque os estudos foram baseados em modelos caninos



e isso não aconteceu nos cães, mostrando que pessoas não são cães; não obstante, um achado inesperado. Posteriormente, houve um paciente que recebeu infusão e que tinha anticorpos anti-VAA2 preexistentes e que, presumivelmente, não apresentou uma resposta devido a isso. Em seguida, realizaram a infusão em outro indivíduo para entender melhor a resposta imune.

Novamente, houve um aumento das provas de função hepática, mas nenhuma expressão do Fator IX. A primeira expressão com duração de longo prazo é do estudo de St. Jude/UCL; e a figura à direita é da sua publicação. No primeiro estudo, já temos indivíduos com até 8 anos de acompanhamento, e eles continuam a ter expressão de Fator IX. As linhas douradas são níveis de fator e as setas azuis acima referem-se as infusões de fator.

Assim, é possível observar o fator aumentando e diminuindo com a infusão, mas isso é seguido por uma expressão realmente estável do fator à medida que a dose aumentou, de cerca de 2% para 6%, o que persiste. Uma coisa importante que aprendemos neste estudo clínico é que, quando havia um aumento na ALT, como mostrado na seta verde e você pode ver no paciente 5 como houve um aumento acentuado, eles instituíram a terapia com prednisona.

E mostraram que era possível manter a atividade do fator através da instituição da terapia com prednisona. Esta é uma abordagem atualmente usada em todos os estudos clínicos de terapia gênica. Temos aqui uma tabela de estudos clínicos em andamento de Fase 1/2 e Fase 3 selecionados. Entretanto, algum estudo pode ter sido deixado fora desta tabela. A ideia aqui não foi cobrir todos os estudos, mas ilustrar mais ou menos em que ponto nós estamos.

Este também é um campo que está avançando rapidamente e, portanto, estes dados já podem estar desatualizados. Primeiro mostramos a hemofilia A e, em seguida, os 3 estudos com hemofilia B com seus respectivos patrocinadores e diferentes nomes. Como se pode observar, os vetores têm sorotipos diferentes e também existem alguns vetores desenvolvidos por engenharia genética, tal como o Spark 100 e o AAVhu37, o Ultragenyx.

As células usadas na produção dos vetores são de insetos ou mamíferos. A vantagem do uso de células de inseto é a possibilidade de se produzir mais proteína, mas a modificação pós-translacional é diferente entre estas e a de mamíferos. Ainda não sabemos se isto faz diferença. Na próxima coluna mostramos a fase dos estudos clínicos. O estudo da BioMarin é o que está mais avançado. Na Fase 3, os pacientes receberam 2 doses e estas referem-se a genomas de vetor por quilograma.



Embora a inclusão tenha realmente sido na dose mais alta, na Fase 1/2 temos uma dose crescente para determinar qual a dose será usada na Fase 3. O estudo da Spark, de Fase 1/2, encontra-se na fase de observação, o que dura pelo menos seis meses, durante a qual o paciente anota seu regime de tratamento e qualquer sangramento em seu diário eletrônico...

... de modo que, após receber a terapia gênica, os resultados possam ser comparados aos dados do próprio paciente antes da terapia gênica. Existem dois estudos clínicos de Fase 3 na hemofilia B. A Pfizer tem um estudo clínico de Fase 3 e existe o estudo clínico uniQure — também na Fase 3.

E em fase mais inicial há o estudo clínico Freeline. Então, o que os resultados dos estudos nos dizem até o momento? Bom, alguns resultados publicados ou apresentados de alguns dos estudos clínicos ilustrarão em que ponto estamos. Este é o estudo clínico AMT-061 com VAA-Fator IX Pádua

... à esquerda temos o AMT-060 na figura, que foi o primeiro em termos de Fase 1/2, e eles alcançaram um Fator IX em torno de 7,5%. O que, quando eu comecei a trabalhar ou até mesmo depois de já estar trabalhando com hemofilia, seria inusitado. Nós acreditávamos que, na terapia gênica, se pudéssemos simplesmente elevar discretamente o nível de fator isso já seria um sucesso. E realmente tem sido um grande sucesso.

Se analisarmos os estudos clínicos nos quais há níveis persistentes de 6%, esses pacientes não estão recebendo infusões e não estão sangrando. Mas, graças a estudos clínicos mais recentes, sabemos que podemos alcançar níveis até mais elevados. Então, o que eles fizeram foi pegar o vetor, adicionar a variante Pádua e realizar a infusão em três sujeitos. Os resultados de até 36 semanas são mostrados aqui e, de fato, eles já apresentaram dados posteriores no congresso da ASH.

Nesses 3 participantes, a atividade média do Fator IX em 36 semanas foi de 45%! O interessante é que neste estudo clínico, os pacientes não necessitaram imunossupressão. Os pacientes apresentavam baixa titulação de soropositividade para o VAA5, o que levanta a questão de se os pacientes poderiam receber infusão de alguns vetores em caso de evidência de resposta de anticorpos.

E este estudo está na Fase 3 com esta dose. Isso mostra a atualização de dois anos do estudo Spark-9001 com VAA-Fator IX Pádua, que mostra expressão por até 29 meses. Ele mostra alguma variabilidade na expressão, mas todos esses níveis teriam um impacto clínico significativo e provaram que realmente eliminam a necessidade de infusão do fator e a ocorrência de sangramento.



O BMN 270 era de Fase 1/2, que agora está na Fase 3 nesta dose; portanto 6 vezes 10 elevado a 13 genomas vetoriais por quilograma. E estes são os resultados de 3 anos usando o ensaio cromogênico. Inicialmente, com este vetor, ocorreram regiões de vale na faixa normal do Fator VIII, o que diminuiu um pouco ao longo do tempo.

Ainda assim, apresentando uma faixa mediana em torno de 40, o que é certamente notável. Acredito que teremos que esperar para ver, pois este é o estudo clínico mais avançado. Teremos que ver se é isso o que veremos nos outros estudos clínicos do Fator VIII e realmente não sabemos neste momento. Outro estudo clínico de terapia genética do Fator VIII é o estudo Alta. E esta é a atualização dos resultados que foram apresentados no congresso recente da ASH.

Esta é a Fase 1/2. No topo você pode ver que estes são os sujeitos que receberam doses de 2 elevado a 12<sup>a</sup>. Contudo, a coorte com a dose mais elevada é 3 vezes 10 elevado a 13<sup>a</sup>. Existe um efeito de dose. E, no painel à esquerda, você pode ver a atividade do Fator VIII em um gráfico linear, que separa bem os resultados.

Em seguida, em escala logarítmica, demonstrando que os pacientes na coorte de dose alta atingem níveis na faixa normal. Repetindo, ainda é cedo; então precisamos continuar acompanhando estes sujeitos ao longo do tempo. E este Fator VIII será usado em um estudo clínico de Fase 3 que está sendo conduzido pela Pfizer. Portanto, em geral, existem algumas coisas realmente positivas com a terapia gênica com VAA e outras continuam a ser desafios e perguntas.

Então, uma destas questões é a elegibilidade limitada dos pacientes. Atualmente, os sujeitos não podem ter nenhum histórico de inibidores. Contudo, devo dizer que existem vários estudos que estão sendo desenvolvidos para avaliar a terapia gênica em pacientes com inibidores. Então é provável que isso não seja mais verdade no futuro. Eles são homens adultos. Para o Fator VIII, eles geralmente precisam de menos de 1%...

... embora isso esteja mudando e, com o Fator IX, menor ou igual a 2%. Pacientes com anticorpos preexistentes contra o vetor VAA são excluídos dos estudos. O uniQure, em seu estudo clínico de hemofilia B, tem uma baixa positividade de titulação do vetor. Portanto, quer isso tenha a ver com a titulação ou com o sorotipo, em termos de ainda ter eficácia é algo que ainda não entendemos completamente.

Portanto, os alvos para futuros estudos são pacientes com inibidores atuais ou passados e eu ouvi que a Spark tem um estudo clínico com estes pacientes e há outras empresas que estão trabalhando em protocolos para um estudo clínico semelhante. A presença do anticorpo anti-VAA



preexistente é um problema e exclui vários pacientes dos estudos, tais como hemofilia menos grave e adolescentes. O problema com o VAA é que ele não se integra, mas também significa que no fígado em crescimento ele irá se perder.

Portanto, nesse ponto isso seria uma limitação para crianças pequenas e não sabemos, à medida que diminuimos a idade, em que ponto esse tratamento perderia sua eficácia. Existem mulheres com hemofilia grave, e isso também está começando a ser flexibilizado em termos de alguns protocolos permitirem a inclusão de mulheres. Além disso, no caso de pacientes que perderam a expressão ou estavam nas fases iniciais do estudo e não alcançaram um resultado, também não temos uma resposta em termos de terapia com VAA.

E não há outras abordagens para terapia gênica e hemofilia que estejam na mesma fase. Então, quais são os riscos? Agora temos um tratamento realmente muito bom para hemofilia. Portanto, enquanto consideramos esse tratamento para nossos pacientes, precisamos ter certeza que os benefícios para os pacientes são maiores que os riscos. Então, temos alguns riscos conhecidos.

Um risco é a toxicidade hepática de curto prazo observada em alguns pacientes em praticamente todos os estudos clínicos. E, em geral, isso tem respondido a rápidos tratamentos com esteroides. Porém, a partir de vários estudos clínicos, sabemos que alguns pacientes necessitaram de tratamento imunossupressor mais longo e isso levanta questões sobre a toxicidade. Os pacientes desenvolverão anticorpos anti-VAA se forem expostos ao vírus, o que, neste momento, impedirá que recebam doses adicionais.

Também sabemos que, em geral, tem havido realmente uma ampla expressão e variabilidade entre indivíduos, o que é parcialmente explicado pela resposta imune anticapsídeo das células T. Contudo, nós sabemos que existem pacientes que estão perdendo a resposta ou que apresentam uma resposta reduzida, para os quais não há evidências dos motivos. Existem diferentes teorias sobre o motivo disso, mas nesse ponto eu acredito que simplesmente não sabemos.

Portanto, existem pontos que não sabemos. Não sabemos se haverá toxicidade hepática a longo prazo. No momento, não temos evidências disso, mas é algo que será muito importante acompanhar. Como eu mencionei, o VAA tem uma taxa de integração muito baixa. Contudo, estamos dando 10 elevado a 13ª genomas virais por quilograma, então este é um número real.

Na minha opinião, podemos ficar tranquilos com o grande número de pacientes que receberam VAA em vários estudos clínicos para diferentes doenças, mas isso é algo que precisaremos observar de perto. Não há

evidências de transferência de linha germinativa. Os modelos animais não corroboram essa possibilidade. Nos estudos em humanos, o vetor é detectado no sêmen e isto está claro, mas não há evidências de que ele esteja no esperma. Então isso é tranquilizador.

Portanto, em resumo, a terapia gênica mediada por VAA tem sido bem-sucedida em aumentar os níveis do Fator VIII e Fator IX em pacientes com hemofilia. E em todos os diferentes níveis que foram alcançados, ela reduziu muito o uso de fatores e diminuiu o sangramento. Até a presente data, considerando estudos clínicos com VAA para hemofilia e outras doenças, ele parece ter um perfil de segurança muito bom. Contudo, precisamos estar vigilantes no acompanhamento a longo prazo para observar quaisquer sinais de problemas na segurança.

Também precisamos de dados de eficácia a longo prazo para entender se essa expressão será transitória ao longo dos anos, porque já sabemos, neste momento, que a expressão pode ser observada por anos. Será que isso vai durar? Será que desaparecerá? Realmente precisamos de dados a longo prazo sobre isso. E, depois, modificações na abordagem com VAA e o uso de outros vetores, para que possamos tratar uma população mais ampla de hemofílicos, incluindo crianças pequenas.

Muito obrigada.

