

Флора Пейванди Цель моей презентации, как и многих запланированных на ближайшие несколько лет мероприятий ISTH, — поделиться знаниями о сложной области генной терапии и помочь вам понять, как она работает, что она означает для пациента, для врача, а также как можно достичь поставленных задач.

Суть лечения гемофилии состоит в заместительной терапии, основанной на внутривенном введении недостающего фактора свертывания крови. При гемофилии А вводится фактор VIII, а при гемофилии В — фактор IX.

Мы наблюдаем значительную эволюцию в лечении пациентов с гемофилией. Еще в 1950-х годах для лечения гемофилии применяли цельную кровь. Затем начали использовать свежезамороженную плазму (СЗП), криопреципитат, а в 1970-х годах — препарат, полученный из плазмы. К сожалению, это был очень сложный период с ужасными последствиями, когда многие пациенты с гемофилией в результате лечения заразились гепатитом С и ВИЧ.

Позднее, в 1990-е годы, у нас появилась возможность использовать данные клонирования генов факторов VIII и IX и получить антитимоцитарную сыворотку. Так, в 1992 году на рынке появилось первое поколение рекомбинантного фактора VIII, а в 1994 году — второе поколение рекомбинантного фактора IX, что привело к значительному улучшению качества и безопасности этих факторов, поскольку в конечном продукте использовалось меньше белка человека.

То есть нам удалось решить проблему заражения ВИЧ и ВГС и многие другие проблемы, связанные с инфицированием в результате переливания компонентов крови. К 2015 году мы получили рекомбинантный фактор VIII четвертого поколения, который уже не содержал белков человека.

Как я уже упоминала, лучшим достижением этой эволюции стала безопасность. Изменения на лицо. Для безопасности препаратов мы научились использовать двойную систему инактивации вирусов, а именно термическую обработку и промывку растворителями с последующей очисткой, например фильтрацией, и другие новые технологии.

В то же время менялись и стратегии лечения пациентов. Поначалу пациентов лечили только тогда, когда они обращались за помощью с кровотечением, но позже стало понятно, что клиническая картина у пациентов с легкой и умеренной формами гемофилии значительно отличается от таковой у пациентов с тяжелой формой гемофилии, у которых активность фактора ниже 1 %.



Количество эпизодов спонтанного кровотечения у пациентов с минимальной остаточной активностью фактора, с активностью 1–2 % и 3 % было намного меньше, чем у пациентов с тяжелой формой гемофилии. Это натолкнуло наших врачей на мысль изменить фенотип пациента с помощью профилактического лечения с регулярными внутривенными инфузиями недостающего фактора свертывания крови и тем самым повлиять на общую картину проявления кровотечений. Такая методика по-прежнему применяется в лечении пациентов с гемофилией А (2–3 инфузии в неделю) и гемофилией В (2 инфузии в неделю).

Безопасность значительно повысилась, но оказалось, что не так просто выполнять 2–3 внутривенные инфузии еженедельно, в особенности подросткам и детям. Проблемы возникали, когда у ребенка был затруднен либо отсутствовал венозный доступ. Для родителей это было сложно. Возникла опасность тромбозов и инфекций. Все это в совокупности создавало множество трудностей.

Кроме того, это было связано с достаточно коротким периодом полувыведения факторов, что приводило к необходимости делать инъекции часто, к тому же нередко у нас возникали ситуации как пиковой, так и минимальной концентрации препарата. Иными словами, уровень концентрации препарата был очень высоким сразу после инъекции, а через 8–12 часов значительно снижался. Это означало, что пациенты не получали полной защиты, так как концентрация препарата была нестабильной. Мы оказались в тупике, из которого нужно было найти выход и найти способ обеспечить дополнительную защиту наших пациентов.

И хотя улучшенные стандарты препаратов действительно меняли качество жизни наших пациентов, в том числе предоставляя возможность получения лечения на дому и применения профилактических методов, они все еще были далеки от идеала. Именно поэтому за последние десять лет лечение гемофилии значительно улучшилось. Все это благодаря новым терапевтическим возможностям, направленным на оптимизацию лечения пациентов как с ингибиторами, так и без них.

Так что же такое ингибиторы? Ингибиторы — это антитела, действие которых в основном направлено против фактора VIII и иногда против фактора IX. Они нейтрализуют активность фактора, вследствие чего пациенты уже не могут получать лечение фактором VIII, нуждаясь в более интенсивной терапии, а также в более дорогостоящем препарате, я имею в виду препарат шунтирующего действия.



Каковы эти новые терапевтические возможности? В течение последних нескольких лет появились и стремительно развиваются три новых стратегии лечения. Первая стратегия — использование препаратов с более долгим периодом полувыведения, вторая — нефакторная заместительная терапия и третья — генная терапия. Попробую показать вам, каких результатов нам удалось добиться после использования каждой категории препаратов.

В отношении препаратов с удлинённым периодом полувыведения применялись стратегии двух типов. Первая из них, та, что вы видите слева, называется пегилирование — химическое связывание полиэтиленгликоля с рекомбинантным фактором VIII, которое позволяет увеличивать гидродинамический объём молекул и предотвращает выведение этих молекул через почки. Объём пегилирования может быть различным, от 5 килодальтон до 10, 20, 40 или иногда 60 килодальтон.

Второй категорией препаратов являются слитые белки, и их можно получить, связав либо слитый кристаллизующийся фрагмент, Fc, часть иммуноглобулина IgG, либо альбумин, способный связываться с рекомбинантным фактором VIII или IX. Эта стратегия также заключается в уменьшении почечного клиренса молекул и увеличении периода полувыведения препарата в кровотоке, при этом фрагмент Fc и альбумин рециркулируют через рецептор лиганда Fc на поверхности эндотелиальных клеток, что увеличивает период полувыведения молекул.

Как я уже говорила, технологии пегилирования и слияния получили широкое применение. Различные компании предпринимали попытки применять обе стратегии, производя четыре препарата с фактором VIII, три пегилированных и один Fc-рекомбинантный фактор VIII, а также три фактора IX с увеличенным периодом полувыведения, по одному на каждый тип методики: один пегилированный, гликопегилированный препарат фактора IX, препарат слияния фактора Fc и препарат слияния альбумина фактора IX.

Главный вопрос состоит в том, какие из этих препаратов работают лучше всего с точки зрения безопасности и эффективности и достаточно ли у нас данных для того, чтобы врач мог понять, какой препарат безопаснее или эффективнее других?

Я попыталась свести все эти данные воедино: судя по фактору VIII очевидно, что нам удастся увеличить эффективность на 50–60 %, что так или иначе справедливо для всех препаратов. И если мы связываем такое увеличение эффективности с качеством жизни пациентов, то мы заметим ежегодное уменьшение количества инфузий у пациентов с гемофилией A приблизительно на 30–35 %.



А как же защищенность пациентов? Как вы помните, я объясняла, что профилактика — это метод, позволяющий поддерживать уровень фактора VIII или фактора IX выше 1 %, но на стандартных препаратах с имеющимся количеством инфузий достичь 3–5 % минимального уровня защиты пациентов было очень проблематично. И здесь мы видим, что у некоторых пациентов этот уровень мог подниматься до 3 % или даже немного выше.

Если мы объединим все эти данные, то сможем сделать вывод о том, что при использовании препаратов с длительным периодом полувыведения пациенты с тяжелой формой гемофилии А могли быть переведены на умеренный фенотип. Это означает уменьшение числа кровотечений и количества инфузий. Нам потребуется больше реальных данных, чтобы понять, какой может быть эффективность для таких пациентов в будущем.

Что касается гемофилии В и препаратов с увеличенным периодом полувыведения, мы видим, что препараты с фактором IX работают намного лучше и результаты гораздо более впечатляющие. По сравнению с лечением препаратами Fc при использовании альбумина и пегилированных препаратов наблюдалось приблизительно 3-6-кратное увеличение эффективности. Это означает, что количество инфузий у пациентов с гемофилией В снизилось почти на 50–60–65 %. А также, что особенно важно, минимальная остаточная концентрация препарата в крови у таких пациентов выросла до 5–10 международных единиц. С точки зрения клинической картины пациента это означает, что пациентов с тяжелой формой гемофилии можно отнести к умеренному фенотипу. И это действительно имеет очень большое значение, поскольку знаменует собой серьезное изменение качества жизни пациентов с гемофилией В.

Подводя итоги нашего обсуждения препаратов с увеличенным периодом полувыведения фактора IX, мы можем сказать, что достигли цели и даже получили частичный результат по фактору VIII, с сокращением на 30–35 % по фактору VIII, однако мы хотим добиться большего.

Почему существует подобное ограничение? Количество внутривенных инфузий уменьшилось, минимальный уровень концентрации препарата в крови повысился, и мы действительно наблюдали уменьшение числа кровотечений, что означает появление большего количества фактических данных в будущем. Но полноценного результата, которого мы ожидали, не удалось достичь.

Почему так случилось? Это было связано с тем, что фактор VIII при циркуляции в крови нуждается в носителях, а именно в факторе фон Виллебранда. А период полувыведения фактора фон Виллебранда в

кровотоке составляет 18 часов. И мы не сможем добиться более высокого показателя, чем тот, что характерен для фактора фон Виллебранда, если не изменим нашу стратегию, и именно поэтому следующие поколения препаратов с увеличенным периодом полувыведения (два из которых уже доступны, но еще не поступили на рынок, поскольку находятся на стадии клинических испытаний) содержат лишь небольшой фрагмент фактора фон Виллебранда.

Первый — это молекула Fc (фактор Франка — Кондона) рекомбинантного фактора VIII, добавленная к фактору D'D3 фон Виллебранда с XTEN, представляющая собой биоразлагаемый полипептид, снижающий почечный клиренс. Второй — это молекула, представляющая собой рекомбинантный одноцепочечный фактор VIII, введенный в альбумин, и он также представляет следующее поколение препаратов с увеличенным периодом полувыведения; эта молекула также добавляется к D'D3 фактора фон Виллебранда.

Если мы посмотрим на результаты применения первого упомянутого мной препарата, рекомбинантного Fc фон Виллебранда XTEN, то отметим очень интересный факт: исследование фазы 1/2a у пациентов с тяжелой формой гемофилии показало увеличение до 37 часов, при этом средняя активность фактора VIII составляла 13 % на пятый день и 5,6 % на седьмой день после инфузии. Это значительно меняет качество жизни пациентов с гемофилией А уже сейчас и дает надежду на будущее.

Перейдем ко второму виду лечения — нефакторной заместительной терапии пациентов с гемофилией, которая имеет иной механизм действия. Здесь мы не вводим факторы VIII и IX, применяя другой подход. Мы можем осуществить ингибирование не природного антикоагулянта. Благодаря этому методу мы можем усилить выработку тромбина и таким образом получить более эффективный гемостаз. Это происходит путем ингибирования активированного протеина С при помощи ингибитора пути тканевого фактора с использованием моноклональных антител. Мы можем подавлять транскрипцию антитромбина и РНК путем подавления РНК, и это опять-таки приведет к антикоагулянтному действию, или мы можем использовать совершенно другой метод, обходя или имитируя фактор VIII при помощи биспецифического моноклонального антитела против фактора IXa и фактора X.

Я уверена, что в будущем мы найдем и другие, новые стратегии, но сейчас это именно то, что мы знаем о гемостазе, и это иной механизм действия. А поскольку это иной механизм действия, количественное измерение факторов VIII и IX оказывается недостаточным, и нам



необходимо выяснить, какой анализ мы должны провести и как нам следует оценивать эффективность гемостаза при использовании этих препаратов, особенно во время кровотечения, когда мы комбинируем эти препараты с другими веществами и гемостатическими препаратами.

Единственный препарат, который уже доступен, представлен биспецифическими гуманизированными антителами, которые я и собираюсь продемонстрировать, а остальные еще проходят клинические испытания фазы 2, переходящие к фазе 3, и вскоре большинство из них будут доступны, SerpinPC находится в доклинической стадии и скоро перейдет в фазу 1 клинических испытаний.

Эмицизумаб — это опять-таки совершенно новая стратегия лечения, называемая ACE 9-10 или эмицизумаб. Это химерное биспецифическое гуманизированное антитело, действие которого направлено против факторов IXa и X. Это означает, что этот препарат имитирует кофакторную функцию фактора VIII, связываясь с фактором IXa с одной стороны и фактором X с другой, помещая их в особое подходящее положение и способствуя катализу фактором IXa активации фактора X. Такие характеристики препарата значительно меняют лечение пациентов с гемофилией A, с ингибитором и без него, и данный препарат может использоваться для лечения обеих групп пациентов, как и было показано.

FDA (Управление по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными препаратами США) и EMA (Европейская служба по надзору в сфере лекарственных средств) одобрили использование эмицизумаба в профилактике гемофилии как у взрослых, так и у детей с гемофилией A, с ингибиторами или без них. Применяемая доза составляла 3 мг/кг один раз в неделю в течение первых четырех недель, затем (в самом начале использования) прописывали 1,5 мг один раз в неделю в качестве поддерживающей дозы, а теперь этот интервал может составлять две недели и в будущем может составить четыре недели.

Данный препарат не может использоваться для лечения по обращению пациента во время острого кровотечения и предназначен только для профилактики. Данный препарат в настоящее время доступен в Соединенных Штатах как для пациентов с ингибиторами, так и без них, а в Европе в основном доступен для пациентов с ингибиторами. В некоторых европейских странах он также может быть доступен для пациентов без ингибиторов.

В начале клинических испытаний эмицизумаба было отмечено три эпизода тромботической микроангиопатии (ТМА), в частности, в связи с



применением активированного комплекса протромбина с высокой дозировкой в первые 24 часа, но после того как выяснилось, что сочетание с этим препаратом может представлять опасность, была предпринята попытка изменить стратегию лечения за счет перехода на другие препараты шунтирующего действия, после чего случаев ТМА уже не отмечалось.

Зарегистрировано несколько случаев тромбоза и десять летальных случаев, три летальных случая были зарегистрированы во время применения препарата в рамках гуманитарной миссии. Был также зарегистрирован один случай использования нейтрализующего препарат антитела. Как видите, теперь мы имеем все эти данные, в частности, данные по смертности, которых у нас не было по другим препаратам. Следовательно, нам необходимо провести послерегистрационный надзор, следя за безопасностью и эффективностью не только данного препарата, но и каждого нового препарата, который будет появляться, понимать принцип действия и безопасность этих препаратов, используя все представленные данные, которые я показала на слайдах.

Таким образом, мы приходим к выводу о том, что новые стратегии лечения, по-видимому, существенно изменяют подходы к лечению пациента и значительно улучшают эффективность контроля кровотечений по сравнению с существующим стандартом лечения пациентов с ингибиторами и без них. Остаются нерешенными некоторые вопросы безопасности, которые требуют применения стратегий снижения рисков, при этом часть из них уже применяется, а часть нам следует лучше изучить, так как проходящие лечение пациенты, особенно пациенты на нефакторной заместительной терапии, больше не относятся к группе тяжелых больных, их состояние скорее характеризуется как состояние средней тяжести, и во время острых кровотечений нам следует начать применять более эффективные методы лечения для них.

Я рекомендовала бы здесь провести долгосрочное наблюдение и информирование пациентов и врачей. Мы должны разъяснить нашим врачам, не обладающим достаточным опытом, а также нашим пациентам, что эти лекарства имеют иной механизм действия, и их следует лучше изучить, чтобы получить более полное представление об их действии.

Последняя стратегия лечения представляет собой генную терапию, то есть замену дисфункционального гена экзогенным работающим геном, который излечивает или обеспечивает долгосрочную экспрессию дисфункционального гена.



Доклинические исследования в сфере генной терапии стали проводиться в период с 1997 по 2006 год, первое клиническое исследование с использованием AAV2 было проведено компанией Avigen в 2006 году и, как я уже говорила, в основном затронуло гемофилию В. Однако представление сохранялось лишь в течение короткого периода времени. Затем, спустя почти четыре года, профессор Амит Натвали и профессор Тед Тудденхэм из Лондонского университетского колледжа вместе с нашими коллегами из Детской исследовательской больницы Святого Иуды использовали новый вектор AAV8 в лечении первых пациентов с тяжелой формой гемофилии В. Три различные дозировки для первых шести пациентов показали хороший результат, затем число пациентов было увеличено до десяти, и сейчас — почти через 9 лет с начала генной терапии — не выявлено никаких проблем с безопасностью, и уровень экспрессии остался практически стабильным. Это был очень важный результат в области гемостаза, полученный группой ученых из Лондона.

Основываясь на нем, различные компании перешли к использованию стратегии аденоассоциированной генной терапии с применением разных дозировок. Позже были добавлены новые компоненты с мутацией, описанной группой ученых из Padua, которая является вариантом гена с повышенным уровнем экспрессии. Это ознаменовало собой появление второго поколения генной терапии. По данным компании Spark, удалось достичь приблизительно 18–33% [активности], и сегодня такой уровень доступен и подтвержден также результатами uniQure, что, разумеется, коренным образом меняет картину лечения пациентов с тяжелой формой гемофилии В.

Что касается гемофилии А, в ней, как известно, генная терапия еще более затруднена, потому что ген здесь больше, крупнее, сложнее. Поэтому использовались различные методы и стратегии, такие как оптимизация кодонов, делеция В-домена с помощью специфичного для печени промотора и экспрессия генов *in vivo* у мышей и нечеловекообразных приматов в 2004–2011 г. Клиническое испытание генной терапии на людях было проведено с использованием AAV5 фирмы BioMarin, а результаты этого исследования были опубликованы в Медицинском журнале Новой Англии.

В таблице показаны все последние события в области генной терапии, и мы видим, что разные компании пытаются использовать разные уровни векторов, векторы AAV2, AAV5 и AAV8. При этом, как я уже говорила, были достигнуты различные экспрессии фактора VIII. Компании BioMarin действительно удалось нормализовать экспрессию фактора VIII, и этот результат поразителен. Теперь мы действительно надеемся на хорошие результаты, о которых сообщалось в выпуске BioMarin на фазе 3



клинических испытаний на конференции Международного общества по изучению тромбозов и гемостаза в этом году в Мельбурне. Кроме этого, интересных результатов удалось добиться и другим компаниям.

Если попытаться обобщить то, о чем я только упоминала в этой получасовой презентации, то в дополнение к тому, что я сообщила о препаратах с расширенным периодом полувыведения и нефакторной заместительной терапии, генная терапия, похоже, также является мощным подходом к лечению гемофилии и может предложить долгосрочное и эффективное использование других типов векторов, таких как лентивирус или даже такие стратегии, как редактирование генома, но мы можем сказать, что результаты клинических испытаний генной терапии с использованием адено-связанных вирусных векторов определенно демонстрируют долгосрочную экспрессию с фактором IX. Результаты по фактору VIII будут обнародованы на конференции Международного общества по изучению тромбозов и гемостаза через три года.

Разумеется, наше общество несет огромную ответственность перед всеми пациентами за обучение врачей и ученых, а также пациентов тому, как следует проводить долгосрочное наблюдение с точки зрения улучшения качества жизни, безопасности и эффективности. И нам действительно необходимо создать минимальный набор данных, который будет использоваться каждым медицинским центром, причем каждый проходящий лечение методом генной терапии пациент должен быть включен в базу данных, а доступ к общим национальным и международным базам данных со ссылкой на национальные базы данных должен быть предоставлен регуляторным органам и научному сообществу; такой сбор независимых данных позволит нам получать четкую информацию о ценности и эффективности этих стратегий, какими мы их видим сейчас.

Основные вопросы. Все это здорово, и все же я думаю, что нам необходимо следить за длительностью экспрессии фактора свертывания крови в генной терапии. Нам следует понимать, почему через 8–12 недель после инъекции наблюдается увеличение количества ферментов печени и что именно вызывает увеличение количества этих ферментов у некоторых пациентов. Также необходимо разобраться в профилях безопасности различных серотипов аденосателлитов (AAV). А еще — разобраться в процессе создания векторов и уровне экспрессии, а также изменчивости показателей у различных пациентов и в различных вариантах векторов.

Потенциальная генотоксичность — тоже серьезный вопрос. Нам чрезвычайно важно понимать влияние на печень интегрирующих

векторов доставки. Существуют ли риски, какова степень этой интеграции и насколько она безопасна, и на будущее было бы весьма важно получить некоторые результаты биопсии печени пациентов, проходивших лечение с применением генной терапии.

Наконец, нам нужно понимать, какого типа лабораторные анализы следует использовать, поскольку иначе результат, полученный с помощью одного клинического испытания, будет отличаться от другого, и мы не сможем сравнивать эффективность результатов, полученных с применением стратегий двух различных типов.

Благодарю вас за внимание.

