

Барбара Конкл: Меня зовут Барбара Конкл. Я профессор медицины в Вашингтонском университете и главный научный сотрудник компании Bloodworks Northwest, в которой я также занимаю должность содиректора Вашингтонского центра нарушений гемостаза. Сегодня я хочу поговорить о генной терапии и гемофилии и, в частности, об аденоассоциированном вирусном (или AAV) векторе для генной терапии гемофилии.

Целью обучения является выявление ключевых характеристик современных клинических исследований в области генной терапии как гемофилии А, так и гемофилии В. Идея генной терапии довольно проста. У нас есть ген, который помещается в AAV-вектор, а затем вводится внутривенно. Благодаря этому вектору и промоторам-энхансерам, о которых мы поговорим позже,

терапия направляется на клетки печени, являющиеся клетками-мишенями. Сейчас мы их обсудим. AAV является по существу внехромосомным вирусом, и приводит к продукции белка. Однако, многое из того, что происходит в клетке-мишени, по-прежнему остаётся загадкой, и нам ещё многое предстоит разгадать. В генной терапии было невероятное количество моделей животных, а в течение последних 30 лет было проведено более 200 клинических исследований различных заболеваний

с применением генной терапии на основе AAV. Так что, если говорить о самом вирусе AAV, вверху изображен вирус дикого типа. Он содержит гены гер и сар, которые удалены для вектора. AAV дикого типа принадлежит к семейству парвовирусов. Он содержит около 4,7 kb генома из одноцепочечной ДНК.

У данного вируса имеется дефект репликации, поэтому ему необходим вирус-помощник. И так он получил свое название: он был обнаружен в качестве контаминации культуры аденовируса. Кроме этого, ничего общего с аденовирусом у AAV дикого типа нет. Он не является патогенным, но человек легко им заражается. Для AAV-векторов AAV дикого типа является дефектным по репликации.

Как мы увидим на следующем слайде, у них есть как естественно присутствующие, так и биоконструкционные векторы. Вирусный капсид определяет тканевой тропизм, то есть направление движения вектора. Документально подтверждено, что он обладает долговременной экспрессией и возможностью трансдуцировать постмитотические клетки, являясь преимущественно неинтегрирующим и, что на сегодняшний день особенно важно, характеризуется хорошим профилем



безопасности на доклинических моделях и в исследованиях с участием людей. Как отмечалось ранее, мы подвергаемся воздействию AAV.

Приблизительно от 30 % до 50 % населения имеют антитела к AAV. Чаще всего к серотипу AAV2. Было проведено интересное исследование, в котором на образцах, отобранных у 62 мальчиков в динамике в рамках совместного исследования исходов гемофилии, изучали развитие серопозитивности AAV в раннем возрасте.

Как показано на графике справа, эти мальчики уже подверглись воздействию AAV. Чаще всего — AAV2. В этом исследовании более предметно рассматривались AAV2, AAV5 и AAV8. Чтобы использовать эти векторы при гемофилии, на протяжении многих лет проводилась работа по улучшению экспрессии. Первоначально существовало опасение, что иммунный ответ на капсид может быть снижен путем удаления пустых капсидов,

что кажется хорошей идеей. Хотя неясно, модулирует ли это общий иммунный ответ. Используются разные серотипы AAV. Первоначально использовался AAV2, а затем — другие; в них присутствует меньше серопозитивности и популяции, а также различного тканевого тропизма. Чтобы быть уверенным, что вирус таргетирован на печень, существует оптимизация печеночно-специфического промотора и регуляторных элементов.

На рисунке представлен промотор ЦМВ, но также используются и другие промоторы. Для увеличения фактора VIII и фактора IX ученые также оптимизируют кодон. Также существуют две распространённые модификации. Одна для фактора VIII — использование фактора VIII, с удалённым В-доменом, чтобы позволить ему иметь размер, который можно вставить в AAV.

Другая, это Radia вариант фактора IX. Это изменение одной аминокислоты было обнаружено в семье из г. Падуя, Италия, в которой наблюдались очень высокие уровни активности фактора IX. И это происходило из-за этого одного варианта. Итак, вставив его в кассету фактора IX, мы увидим, что можем заметно увеличить удельную активность фактора IX.

Таким образом, первое AAV-опосредованное исследование гемофилии фактически представляло собой внутримышечные инъекции. Оно проводилось в детской больнице Филадельфии. Фактическая экспрессия была несистемной. Но интересно, что, когда позже была сделана биопсия мышц, наблюдалась постоянная экспрессия гена



фактора IX. Конструкция первого печеночного экстракта представляла собой AAV2-фактор IX; он представлен на графике справа от схемы.

В высокой дозе фактор IX фактически увеличился по сравнению с исходным, который изображен в виде красной линии, примерно до 12 %, что представляет собой значительный интерес. Но затем произошло увеличение ферментов печени, особенно АЛТ, что было связано с уменьшением экспрессии фактора IX и было весьма неожиданно, отчасти потому, что исследования были основаны на моделях собаки.

Этого не происходило у собак, что подтверждало, что люди — не собаки, но все же это было удивительным открытием. Впоследствии инъекция была сделана пациенту, у которого уже присутствовали антитела к AAV2. Вероятно, из-за последнего факта он не продемонстрировал ответа. Затем, чтобы лучше понять иммунный ответ, инъекция была сделана другому пациенту.

И опять-таки было отмечено увеличение биохимических показателей функции печени, но экспрессии фактора IX не наблюдалось. Первая долгосрочная экспрессия наблюдалась в ходе исследования St. Jude/UCL; справа приведена их публикация. Первичное последующее наблюдение еще продолжается (у нас есть пациенты с самым продолжительным периодом наблюдения — до 8 лет) и эти пациенты продолжают демонстрировать экспрессию. Графики показывают, что золотые линии являются факторными уровнями, а синие стрелки выше — факторными инфузиями.

Таким образом, можно видеть, что с помощью инфузии фактор повышается и понижается, но затем при увеличении дозы примерно с 2 до 6 % наблюдается действительно стабильная экспрессия фактора, которая сохраняется. Важная вещь, которая открылась в данном исследовании, заключается в том, что наблюдалось увеличение уровня АЛТ, как показано зеленой стрелкой. У пациента 5 можно наблюдать резкое увеличение. Была начата терапия преднизолоном.

Результаты показали, что посредством введения терапии преднизолоном можно сохранять активность фактора. И сегодня этот подход используется во всех исследованиях в области генной терапии. Итак, вот таблица избранных продолжающихся исследований фазы 1/2 и фазы 3. Здесь, возможно, еще что-то осталось. Это не исчерпывающая информация, но она призвана проиллюстрировать, на каком этапе находится данная область исследований.



Это достаточно динамично развивающаяся область, и поэтому данные по своей природе могут быть устаревшими. Сначала показаны гемофилия А, а затем три гемофилии В с их спонсорами и различными наименованиями. Обратите внимание, что векторы имеют разные серотипы; также существуют некоторые векторы, полученные методами генной инженерии, Spark 100 и AAVhu37, Ultragenyx.

Клетки, которые используют для производства, взяты у насекомых или млекопитающих. Ценность насекомых в том, что с их помощью можно повысить уровень производства, но существуют различные посттрансляционные модификации. На данный момент мы не знаем, имеет ли это значение. В следующем столбце указывается фаза исследования. Наиболее отдаленное — BioMarin. В ходе фазы 3 применяли 2 дозы: геномы вектора на килограмм.

Хотя включение в исследование фазы 1/2 фактически было с более высокой дозой, существует возрастающая дозировка для определения дозы, которая будет использоваться в исследовании фазы 3. В исследовании Spark фазы 1/2, фактор VIII в настоящее время находится в фазе наблюдения, которая проводится в течение не менее 6 месяцев, чтобы пациент записал или внес в свой электронный дневник информацию о схеме лечения и любых наблюдаемых эпизодах кровотечения.

Так что, как только пациенты получают генную терапию, результаты можно будет сравнить с зафиксированными до генной терапии собственными данными пациентов. Что касается гемофилии В, проведено 2 исследования фазы 3. Компания Pfizer провела исследование фазы 3 по результатам исследования фазы 1/2 Spark, и потом исследование uniQure — также фазы 3.

А до этого было проведено исследование Freeline. Итак, о чем же на сегодняшний день говорят нам результаты исследования? Некоторые из опубликованных или представленных результатов нескольких испытаний проиллюстрируют положения вещей. Итак, это AMT-061, исследование AAV-фактор IX Padua, и это исследование

(показанное слева исследование AMT-060 на рисунке) было первым с точки зрения фазы 1/2, и в нем было достигнуто значение фактора IX около 7,5 %. В то время, когда я начала заниматься гемофилией, и даже позже это было бы неслыханно. Вы знаете, мы подумали, что, если бы мы в генной терапии могли бы вывести пациентов только в умеренном диапазоне с помощью только что проведенного лечения, это было бы успехом. И действительно, это был успех.



Если мы посмотрим на исследования, где присутствуют постоянные уровни 6 %, то заметим, что этим пациентам не делают инфузию, у них нет кровотечения. Но из недавних исследований известно, что возможно достичь более высоких уровней. И вот что они сделали: они взяли свой вектор и добавили вариант Padua, сделали инфузию трем пациентам. Здесь представлены результаты до 36 недель, и фактически впоследствии в ASH были представлены более поздние данные.

И у этих трех пациентов средняя активность фактора IX через 36 недель составила 45 %. Интересно, что в данном исследовании им не понадобилась иммуносупрессия. И у пациентов была низкая серопозитивность по титру AAV5, что поднимает вопрос о том, могут ли пациенты быть инфузирваны некоторыми векторами, если существуют доказательства образования антител.

И это исследование находится в фазе 3 по этой дозе. Здесь продемонстрировано двухлетнее обновление исследования AAV-фактор IX Padua Spark-9001, которое показывает экспрессию до 29 месяцев. Продемонстрирована некоторая изменчивость и экспрессия, но все уровни, которые будут иметь значительное клиническое влияние, показали отсутствие необходимости инфузии фактора и вероятности кровотечения.

Это исследование BMN 270 фазы 1/2, которое в настоящее время находится в фазе 3 в этой дозе, то есть  $6 \times 10^{13}$  геномов вектора на килограмм. И это трехлетние результаты хромогенного анализа. Первоначально с этим вектором поглощение было в нормальном диапазоне для фактора VIII, но со временем несколько сократилось.

Но все же средний диапазон был около 40, что, безусловно, замечательно. И я думаю, что мы еще должны увидеть новые результаты, так как это испытание наиболее отдаленное. Также в ближайшем будущем покажет, сможем ли мы увидеть подобную картину и в других исследованиях по фактору VIII — в настоящий момент мы этого не знаем. Другое исследование генной терапии в отношении фактора VIII — исследование Alta. Это новые результаты, которые были представлены на последней конференции ASH.

Это исследование фазы 1/2. Наверху вы увидите пациентов, которые получили дозу от 2 до 12. Но группа самой высокой дозы  $3 \times 10^{13}$  (три на десять в тринадцатой степени). Присутствует эффект дозы. На левой панели можно увидеть активность фактора VIII в линейном графике, который хорошо разделяет результаты.



И далее логарифмическая шкала, демонстрирующая, что пациенты в группе высоких доз достигают уровней в нормальном диапазоне. Опять же еще рано делать выводы, и поэтому нам придется продолжать следить за этими вопросами. И данный фактор VIII будет использован в фазе 3 исследований, проводимых компанией Pfizer. В целом есть кое-что действительно положительное в генной терапии AAV, а некоторые факты продолжают поднимать проблемы и вопросы.

Итак, одним из вопросов является ограничение пригодности пациентов к участию в исследовании. Таким образом, текущие субъекты не должны были быть подвержены влиянию ингибиторов. Хотя необходимо отметить, что существует ряд исследований, которые разрабатываются для изучения ингибиторов. Так что, вероятно, в будущем это не будет соответствовать действительности. Они взрослые мужчины. Что касается фактора VIII, как правило, необходимо значение для него — менее 1 %,

хотя это требование становится немного менее строгим, а значение для фактора IX меньше или равно 2 %. Пациенты, у которых уже есть антитела к вектору AAV, исключаются. UniQure в их исследовании гемофилии B имеет векторную позитивность низкого титра. Итак, связано ли это с титром или с серотипом? С точки зрения сохранения защиты интересов, я думаю, окончательное понимание отсутствует.

Поэтому будущие мишени для пациентов — это действующие или используемые в прошлом ингибиторы. И у меня есть информация, что у компании Spark есть исследование, как и у других компаний, которые работают над протоколами исследований. Существующее ранее анти-AAV антитело представляет собой проблему и исключает ряд пациентов с менее тяжелой гемофилией и подростков. Проблема с AAV заключается в том, что он не интегрируется. Но дело также и в другом: он будет потерян в растущей печени.

И на данный момент именно это, безусловно, стало исключаящим фактором для детей младшего возраста. Мы пока не знаем о зависимости снижающейся эффективности и возраста. Есть женщины с тяжелой формой гемофилии — с точки зрения некоторых протоколов это становится ослабляющим фактором для разрешения участия женщинам в исследовании. И затем пациенты, которые потеряли экспрессию или находились на ранних этапах исследования и не получили результата — для них также нет ответа с точки зрения терапии AAV.



И нет других подходов к генной терапии и гемофилии, которые находятся в одной фазе. Итак, каковы риски? В настоящий момент существует действительно эффективная терапия при гемофилии. Поэтому, рассматривая ее для наших пациентов, мы должны быть уверены, что польза для пациентов превышает риск. Существуют некоторые известные риски.

Первый из них — это кратковременная токсичность для печени, которая наблюдается у некоторых пациентов практически во всех исследованиях. Такие последствия в целом являются ответом на короткий курс стероидов. Но из нескольких исследований известно, что некоторым пациентам требуется более длительная иммуносупрессия, и поэтому возникает вопрос о токсичности. Пациенты будут продуцировать антитела против AAV, если их подвергнуть воздействию вируса, что на этом этапе исключает получение дополнительной дозы.

Также известно, что, как правило, действительно наблюдалась широкая межиндивидуальная экспрессия, изменчивость и экспрессия, что частично объясняется иммунным ответом антикапсидных Т-клеток. Но мы знаем, что мы видим пациентов, которые теряют ответ или демонстрируют сниженный ответ, у которых нет доказательств этого. Существуют разные теории относительно того, почему такое может быть, но я думаю, что на данный момент мы действительно этого не понимаем.

Таким образом, риски также неизвестны. Мы не знаем, будет ли токсичный процесс для печени долговременным. Сейчас у нас нет доказательств этого, но для последующего наблюдения это будет очень важно. AAV, как я уже говорила, характеризуется крайне низким уровнем интеграции. Тем не менее мы даем  $10^{13}$  геномов вируса на килограмм, так что это становится реальным числом.

Я думаю, большое количество пациентов, которые получили AAV в нескольких исследованиях по различным заболеваниям, внушает уверенность, но есть аспекты, за которыми нам нужно внимательно наблюдать. Нет доказательств переноса в клетки зародышевых линий. Модели на животных его не поддерживают. В исследованиях с участием человека в семенной жидкости обнаружен очищающий вектор, но нет никаких доказательств того, что он находится в сперме. Так что это обнадеживает.

Итак, в итоге AAV-опосредованная генная терапия характеризовалась успехами в повышении уровней фактора VIII и фактора IX у пациентов с гемофилией. И на всех различных уровнях, которые были достигнуты,



Генная терапия при гемофилии — применение аденоассоциированного вирусного (AAV) вектора для генной терапии при гемофилии

она заметно уменьшила использование фактора и сократила кровотечения. На сегодняшний день по данным гемофилии и других исследований AAV у нее очень хороший профиль безопасности. Тем не менее необходимо сохранять бдительность при долгосрочном последующем наблюдении, исследуя любые сигналы безопасности.

Также необходимы данные о долгосрочной эффективности, чтобы понять, будет ли эта экспрессия кратковременной в течение многих лет, потому что мы знаем, что мы можем наблюдать экспрессию в течение многих лет. Будет ли это продолжаться? Или прекратится? Нам очень нужны долгосрочные данные относительно этого. А затем будет необходима модификация подхода с использованием AAV и других векторов, чтобы мы могли лечить более широкую популяцию больных гемофилией, включая детей младшего возраста.

Спасибо.

