

David Lillicrap: Hola, soy David Lillicrap. Soy profesor en el Departamento de Patología y Medicina Molecular en la Universidad de Queen en Canadá. Voy a presentarles un conjunto de diapositivas que abordan la terapia génica en la hemofilia. El objetivo de aprendizaje de estas diapositivas es describir la terapia génica de forma correcta, incluyendo términos y conceptos básicos.

Esta es una historia que comenzó hace 65 años y lo que se muestra en esta diapositiva es una imagen de Francis Crick a la derecha y James Watson a la izquierda, señalando su modelo elegante de doble hélice del ADN que describieron en Cambridge en 1953.

Ahora, avancemos rápidamente a principios de los años 80, cuando se describió el primero de los genes del factor de coagulación. Y éste es un artículo de noticias y opiniones publicado en Nature por mi mentor Arthur Bloom, describiendo los beneficios de esos experimentos de clonación con una comprensión mayor de la patogénesis de los trastornos hemorrágicos, diagnósticos avanzados y, en última instancia, con relación a esta presentación de diapositivas, la terapia génica.

El principio de la terapia génica es relativamente sencillo. Implica tomar un transgén terapéutico, llevarlo a las células, donde el ADN se incorpora en el núcleo. Luego el núcleo expresa el ARN mensajero (ARNm), que se transforma en proteína, y esa proteína terapéutica permanece dentro de la célula o se secreta de la célula y circula en el cuerpo como un beneficio terapéutico.

Antes de que siga con la descripción de los detalles del proceso de la terapia génica, es importante plantear el problema de que, actualmente, estamos limitados a la terapia génica de células somáticas. Es decir, ya sea induciendo un gen normal o reparando un gen dentro de la célula de un individuo y no para el beneficio de las futuras generaciones. La terapia génica de células somáticas se limita a una persona y no tenemos la intención de cambiar ni alterar ADN de células germinales.

Aquí en esta diapositiva ven una lista de enfermedades que siempre han sido buenas candidatas para la terapia génica. Se trata de enfermedades monogénicas, es decir, el fenotipo clínico se debe predominantemente a defectos génicos simples y pueden ver que la hemofilia se incluye en la lista de esta diapositiva. La hemofilia está en esta lista porque sabemos que pequeños incrementos en la proteína del factor de coagulación producen beneficios clínicos significativos. La célula secreta la proteína; por lo tanto, sólo necesita llegar hasta la circulación. No se requiere una expresión estricta de la proteína y tenemos muy buenos modelos animales en los que podemos probar las estrategias de la terapia génica, en ratones y en animales grandes.



La terapia génica de células somáticas. En esta diapositiva verán cuatro opciones posibles. La primera de ellas es la reparación de mutaciones. Hablaré un poco más sobre esto en la siguiente diapositiva. A continuación, tenemos la posibilidad de inducir transgenes a través de una transferencia de genes no virales. Estas son aun teóricamente posibles, pero no se acercan a la práctica clínica. Luego tenemos la terapia génica celular y hablaré más sobre esto en otra diapositiva más adelante. Posteriormente, en última instancia, viene la transferencia genética del vector viral, que es la estrategia que se ha usado en todos los estudios actuales de terapia génica en humanos para la hemofilia.

Esta diapositiva describe el problema de alterar genes o reparar genes potencialmente a través de las estrategias de edición de genes. En la parte izquierda de la diapositiva, ven la posibilidad de la recombinación homóloga como forma de reparar genes. Esto es posible en teoría, pero es un proceso muy ineficiente. En la parte derecha de la diapositiva, ven diferentes enfoques basados en la edición de nucleasas. Así, leyendo de izquierda a derecha, las nucleasas con dedos de zinc, las estrategias nucleasa de actividad similar a activador de transcripción (Transcription activator-like effector nuclease, TALEN) o repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) mediadas, en las que las proteínas o las formas basadas en el ácido nucleico de inducir una nucleasa hacia una región del genoma donde ocurre una ruptura de doble cadena -- ahora vemos en la parte inferior de la diapositiva -- y que esa ruptura de doble cadena se altera o repara de distintas formas. Estos estudios ahora son potencialmente utilizables -- están por entrar a los estudios clínicos -- pero para la hemofilia, creo que, aunque esto se puede hacer in vitro y en modelos animales, estas son algunas formas de la aplicación clínica.

¿Cuáles son los elementos de la estrategia de la terapia génica? Se presentan aquí en esta diapositiva. Les voy a hablar sobre el transgén terapéutico, un sistema de inducción y célula huésped adecuada, y posteriormente, de las medidas, las métricas de los resultados para la expresión de la proteína transgénica.

¿Cómo es el casete transgénico? Por lo general, contiene una secuencia de ADN codificada o secuencia de ADN complementario (ADNc), que carece de intrones. La mayoría de los ADNc se encuentran en alguna parte del rango de 2-7 kilobases de tamaño. En otra diapositiva voy a hablarles de dos formas a través de las cuales pueden alterar la secuencia de codificación.

La optimización de codones se describe aquí en esta diapositiva. Es un cambio de la secuencia de nucleótidos, es decir, los tripletes de nucleótidos que codifican los aminoácidos, pero no hay cambio en la secuencia de



aminoácidos. El objetivo de esta estrategia en particular es mejorar la tasa de transcripción del ARNm, optimizar su procesamiento y el corte de cualquier elemento intrónico restante y, por último, combinar la traducción del ARNm con la abundancia de transferencias del ARN que están presentes en la célula huésped prevista.

Los otros 2 grupos de elementos que se requieren en el casete transgénico son algunos elementos regulatorios en el extremo "5" del transgén. Se trata de elementos promotores que se pueden regular en un tipo de célula específico, específicos del desarrollo o incluso pueden ser inducidos por fármacos, y luego elementos más distantes, que se requieren para mejorar la expresión genética, también llamados elementos mejoradores, los cuales, de nuevo, se combinan generalmente con un tipo de célula huésped particular.

Luego en el otro extremo del casete transgénico está la secuencia 3', que por lo general está presente para estabilizar al ARN mensajero que está codificado por la secuencia de ADNc.

Las siguientes dos diapositivas abordan las estrategias generales de la entrega transgénica. La primera de ellas describe la transferencia genética directa in vivo, en la que el transgén se entrega con frecuencia por infusión intravenosa o posiblemente por un método, como la inyección intramuscular. Las ventajas de esto es que es prácticamente fácil, es un compromiso de muy poco tiempo para el médico y para el paciente. Las desventajas son la exposición in vivo del sistema de entrega del vector a la respuesta inmune del huésped y esto puede causar algunos problemas, como lo discutiremos en algún momento más adelante. Lo segundo es que hay una eficiencia prevista variable, así que en realidad podrían estar entregando el transgén a algunos tipos de células que preferirían no utilizar.

La segunda estrategia para la entrega del transgén se muestra aquí en esta diapositiva. Se conoce como transferencia genética indirecta o ex-vivo, en la que el transgén se entrega fuera del cuerpo. Pueden ver en el lado izquierdo de la diapositiva. Lo primero que hay que hacer es recolectar o aislar células autólogas, células progenitoras o células madre de larga vida del paciente.

Cuando se hayan aislado, pueden entregar una copia normal del gen que es mutante en el paciente o pueden editar el gen mutante que está presente en las células del paciente. Esas células genéticamente modificadas luego se expanden fuera del cuerpo y después se vuelven a introducir en el paciente, donde encuentran un lugar para vivir y producir el factor normal-- en el caso de la hemofilia, el factor de coagulación normal -- que le falta a las células del paciente.

Hay una cantidad de ventajas y debilidades en este sistema de entrega. Los puntos a favor incluyen la falta de exposición del vector in vivo, lo que es inmunológicamente importante. Esto es una ventaja. Hay una focalización

celular directa, así que las únicas células que ve el vector que el nuevo transgén - son las células que se han recolectado y son accesibles fuera del cuerpo. Las desventajas se relacionan con que es un procedimiento que requiere mucha mano de obra. Requiere centros especiales. Algo que también es importante es que requiere que el huésped se someta a un proceso de acondicionamiento para crear espacio para que las células genéticamente modificadas se reimplanten con éxito.

Todos los estudios actuales de la terapia génica para la hemofilia implican la transferencia genética de un vector viral y hay tres tipos de virus que se han usado: adenovirus, retrovirus y virus adenoasociados.

Tengo sólo una diapositiva para hablar sobre el adenovirus. Se ha tratado a un paciente con este sistema de vector viral. Es altamente efectivo en la transducción de células replicantes y no replicantes y se pueden hacer grandes cantidades de este vector con relativa facilidad. La desventaja significativa de la transferencia genética adenoviral es que hay una respuesta inmune innata importante que se instala en estos vectores. Así, obtienen el aumento de citosinas proinflamatorias, toxicidad del hígado, trombocitopenia y, en casos extremos, pueden desarrollar el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica que, en ocasiones, puede ser fatal por naturaleza. Este no es un sistema de entrega para los pacientes con hemofilia en su forma actual.

El segundo sistema viral es aquel de la transferencia genética mediada lentiviral y esto está siendo investigado por una cantidad de grupos para la posterior transformación clínica de la hemofilia. Los vectores lentivirales transducen células divisorias y no divisorias. La capacidad del vector, es decir, el tamaño del inserto transgénico, es bastante razonable, cerca de 8 kilobases máximo. Hay respuestas inmunes innatas menores. Una ventaja del sistema lentiviral es que hay una integración genómica estable que parece ser aleatoria y no oncogénica por naturaleza, al menos, de los estudios que se han hecho, que son amplios, en modelos animales.

Por último, el tercero de los sistemas de vectores virales es el virus adenoasociado. Esto es un micrográfico de electrones que muestra muchas partículas pequeñas de virus adenoasociados (Adeno-Associated Viruses, AAV). Hacia el centro de la diapositiva pueden ver una partícula adenoviral grande. Este es el sistema de vectores virales que se usa en todos los estudios actuales de terapias génicas para la hemofilia.

AAV, como mencionaré más adelante, es un virus que es parvovirus humano no patogénico. Tiene un genoma de ADN monocatenario que se ilustra en la parte superior de esta diapositiva. Tiene un tamaño de 4.7 kilobases. Tiene dos regiones codificadas, un gen "rep" y un gen "cap", y el genoma está tapado en ambos extremos por secuencias repetidas de terminales



invertidos. Este sistema de vectores virales induce inmunogenicidad innata mínima. Hay muchos serotipos diferentes, los cuales se representan por variaciones de proteína cápside. Una proporción muy pequeña del vector recombinante se integra en el gen huésped y la mayoría de los vectores existen como concatémeros circulares extracromosómicos.

Esta diapositiva básicamente les dice cómo convierten un genoma AAV de tipo silvestre en un genoma de vector terapéutico. Retiren los genes rep y cap y pueden ver insertado abajo en el segundo diagrama que el genoma del vector AAV ahora tiene un gen terapéutico del lado derecho y una secuencia promotora o reguladora que impulsa la expresión a un órgano particular o tipo de célula. Lo que se muestra aquí en esta diapositiva es un promotor hepático específico que podría impulsar la expresión de este transgén en hepatocitos. Aquí es donde todos los vectores se enfocan actualmente para la hemofilia. Al final de la diapositiva pueden ver que los insertos transgénicos varían entre el factor 9, donde la secuencia de ADNc tiene un tamaño cercano a 1.3 kilobases y para el factor 8 eliminado del dominio B es cerca de 4.7, una vez que se ha eliminado la secuencia codificada del dominio B.

¿Cómo hacer una partícula de vector AAV? Bien, esto se presenta en esta diapositiva. En la parte superior de la diapositiva pueden ver la secuencia transgénica de ácido nucleico con estas secuencias de repeticiones terminales invertidas (Inverted Terminal Repeats, ITR), que se han mantenido en los extremos “5” y “3” del transgén. La secuencia del promotor y el gen transgénico va en el medio y luego se inserta en el vector AAV cápside para hacer una partícula vector AAV. Y estas partículas son las que se inyectan en el hígado del paciente, son el material terapéutico.

Eso se ilustra aquí con más detalle. Pueden ver que la partícula interactúa con la membrana celular del huésped. Con el AAV, la interacción con ciertas formas de receptores funciona bien, pero todavía existen algunos vacíos en términos de conocimiento. La partícula se absorbe en un endosoma dentro de la célula. Con el tiempo, la partícula se libera del endosoma, la proteína cápside se rompe y sale a la superficie del tipo de célula transducida y el ácido nucleico transgénico se abandona en el núcleo, donde existe como concatémero extracromosómico o, en algunos casos, -- y con AAV se presenta en un grado menor -- se integra al ADN de la célula huésped.

Así, cuando colocan todo esto junto, en el caso de la hemofilia, los componentes de una estrategia de transferencia genética implican una transgénica terapéutica, que es una secuencia del ADNc del factor 9 de tipo silvestre o modificado, una secuencia del factor 8 eliminado del dominio B. Necesitan una estrategia de entrega, que actualmente es un virus adenoasociado. Aunque hay estudios, como el que mencioné, que implican



estudios lentivirales, que aún están en desarrollo inicial. Deben entregarlo a la célula del huésped receptor, que en este momento es el hígado, y luego deben ver si las métricas apoyan el éxito de los estudios que hicieron. Aquellos que implican medir los niveles del factor de coagulación en el plasma, medir las tasas anuales de hemorragias y el consumo de los pacientes de factor 8 exógeno. Luego, por supuesto, también necesitan vigilar las consideraciones de seguridad.

Esta diapositiva representa una versión del ciclo Hype de Gartner para la terapia génica. En esta diapositiva los llevaré de izquierda a derecha. El detonante tecnológico comenzó en los años 70. Pueden ver que en la parte superior del pico, para 1990-1995, creíamos que la terapia génica podía hacer cosas importantes y, de hecho, algunas formas del trastorno de inmunodeficiencia heredada, como la deficiencia de adenosina desaminasa (Adenosine Deaminase, ADA), se había curado con la terapia génica. Sin embargo, para 1999, fue un desastre, cuando un paciente tratado con la terapia génica adenoviral, Jesse Gelsinger, murió de una afección inflamatoria sistémica y esto, de hecho, fue una gran desilusión en el desarrollo de las estrategias de la terapia génica.

No obstante, en la siguiente década, desde 2000 hasta 2010, los trabajos científicos básicos sobre el desarrollo vectorial y una mejor comprensión de la respuesta inmune para la entrega de la terapia génica nos llevó a lo que actualmente es un nivel de productividad. Esto en realidad comenzó para la hemofilia cerca de 2010/2011, con el primer éxito clínico prolongado de la terapia génica para la hemofilia, así como el compromiso significativo de las compañías biofarmacéuticas en cuanto a las estrategias de la terapia génica. Y llegamos a 2019, al borde de una cantidad de estudios clínicos de fase 3 para la hemofilia A y B.

Ésta es la última diapositiva del conjunto total y describe la promesa de la terapia génica para la hemofilia. En la parte superior, la diapositiva describe los efectos de la hemostasia con reemplazo del factor, reemplazo del factor de vida media extendida, terapia sin factor y, a la derecha de la diapositiva, la posibilidad de lo que puede ocurrir con la terapia génica. En la parte inferior ven los niveles del factor de coagulación, que pueden medirse dentro de la circulación. Si dirigen su atención a la información ubicada a la izquierda de la diapositiva pueden ver que hay picos y valles intermitentes en los niveles del factor que corresponden a mejoras y luego a reducciones en las mejoras de la hemostasia. Esto es lo que pasa debido a la vidas medias de las proteínas en la circulación.

Esos beneficios mejoraron con los factores de vida media extendida (Extended Half-Life, EHL) y pueden verlo en el segundo conjunto de datos, es decir, los resultados en la hemostasia y los resultados con los niveles del



factor. Luego continuando con las terapias sin factor, estos factores no mejoran los niveles del factor de coagulación porque no usan factores de coagulación convencionales en la circulación, pero sí mejoran los niveles de hemostasia global y pueden ver esto ilustrado en la parte superior del gráfico.

En la parte derecha de la diapositiva ven lo que se puede lograr con la terapia génica. La terapia génica promete elevar los niveles de los factores de coagulación individuales, factor 9 y factor 8, a niveles dentro de los niveles significativos terapéuticamente, y luego son persistentes por la expresión continua del factor 9 o factor 8 de los transgenes terapéuticos que se han entregado. Esto debería ser más que adecuado para producir profilaxis mantenida a largo plazo con solo unos requisitos poco comunes para el reemplazo del factor de coagulación intermitente.

