

Glenn Pierce: Hola, mi nombre es Glenn Pierce. Soy la vicepresidenta de medicina de la Federación Mundial de Hemofilia y por años me he interesado e involucrado en terapia génica para la hemofilia. Hoy hablaremos de otras estrategias y objetivos para la terapia génica en el tratamiento de la hemofilia. Nuestros objetivos serán realmente examinar otros enfoques además del virus adeno-asociado y examinar algunos de los pros y contras del virus adeno-asociado a lo largo de esta charla.

La terapia génica se inició conceptualmente hace casi 50 años con un artículo que Ted Friedmann escribió en Science preguntándose sobre la terapia génica para la enfermedad humana. Esto no fue mucho después de la identificación del ADN y el ARN y sus funciones. Él planteó la cuestión de los arduos problemas científicos y éticos, al igual que nosotros estamos planteando algunas de esas mismas preguntas hoy en día sobre la edición de genes.

Nos adelantamos ahora casi 50 años y nos preguntamos por qué los vectores del virus adeno-asociado (adeno-associated virus, AAV) para la terapia génica de la hemofilia. Bueno, la respuesta final es porque funcionan. Pero eso ha evolucionado en un período de 25 a 30 años con muchos fracasos en el camino. Para cuando llegamos a este punto, resultan ser los enfoques más viables para dar un beneficio terapéutico a las personas con hemofilia, tanto las deficiencias del factor VIII como del factor IX.

En general, tienen un buen historial de seguridad y han sido utilizados en diferentes estados de la enfermedad y en ensayos clínicos. Hay muchos asuntos que vamos a estar analizando, incluyendo la variabilidad y durabilidad de las respuestas y el hecho de que tal vez hasta la mitad de las personas tienen inmunidad preexistente a diferentes serotipos del AAV. Los serotipos son partículas del AAV que están estrechamente relacionadas entre sí pero que han evolucionado lo suficiente como para alejarse del AAV primario...

...que pueden infectar diferentes tejidos del cuerpo. Por lo tanto, hemos utilizado varios de esos serotipos del AAV para la terapia génica, y todos ellos tienen alguna evidencia de exposición previa en un número de personas que es la inducción de las respuestas de anticuerpos que impiden su uso en aquellos que son positivos. Esta respuesta inmune que vemos antes de administrar el AAV se amplifica considerablemente después de administrarlo, lo que impide que se vuelva a dosificar.

La administración de la terapia génica del AAV genera títulos de anticuerpos muy altos. El AAV es uno de los virus más pequeños que pueden infectar a los seres humanos y, como tal, incluso después de eliminar los genes del AAV, no hay mucho espacio. El gen del factor VIII sin el dominio B, por ejemplo, apenas encaja en el AAV. Así que también hay limitaciones de tamaño. El AAV puede producir un poco de integración aleatoria, que no está bien definida y no está bien estudiada...



...y plantea la pregunta de la seguridad a largo plazo. Y entonces la última preocupación sobre el AAV es que les estamos administrando trillones de genomas virales a los pacientes, pero una fracción muy pequeña de ellos termina produciendo proteínas que son secretadas y útiles para la terapia. Dicho esto, el AAV es un vector viral que funciona y que puede darnos un efecto terapéutico en la hemofilia.

¿Qué pasa con las soluciones para mejorar los vectores AAV? Al examinar todos estos asuntos que rodean el uso del AAV se han sugerido muchas soluciones, aunque la mayoría no han sido realmente probadas. Este es un punto importante no solo a medida que los ensayos clínicos avanzan hacia la fase 3, sino también a medida que se establecen nuevos ensayos que pueden mostrar mejoras en los vectores del AAV, la eficiencia de la transducción y otros aspectos similares. Así que con todo este potencial...

...se están estudiando soluciones, pero no al ritmo tal que permita su introducción en esta primera generación de terapia génica con AAV que se podría aprobar tan pronto como en 2020, 2021. Si nos fijamos en la transducción del vector AAV en hepatocitos, mirando esta caricatura, lo que podemos ver en el número 1 es que si tienes anticuerpos contra el AAV de una infección natural preexistente...

...eso evitará que llegue a la célula de destino. Por lo tanto, no se logrará ninguna eficacia de la terapia génica. En ausencia de anticuerpos, número 2, el AAV se puede unir a receptores específicos en la superficie de la célula y generar endocitosis a través de los mecanismos habituales de la transcitosis de los receptores. Una vez que está en la célula, puede encontrar alguna inmunidad innata porque después de todo, nuestras células están diseñadas para defendernos contra la infección viral.

Y así es como esto puede parecer cuando se usa como terapia. Pero entonces suficiente AAV puede escapar de tal manera que se queda sin recubrir. En el citoplasma, el ADN entra en el núcleo donde finalmente forma episomas, que son bucles cerrados, estables que pueden utilizar la maquinaria del huésped para transcribir y traducir proteínas que luego pueden ser secretadas. La cápside en sí misma...

...entra en el retículo endoplásmico o encuentra importantes antígenos de clase I de histocompatibilidad. Algunos de ellos pueden ser capaces de unirse específicamente a los péptidos de la cápside, en cuyo caso se distribuyen en la superficie de la célula, donde pueden estimular células T citotóxicas CD8 con especificidad contra la cápside. Esto puede ocasionar la destrucción de la célula que contiene el transgén. Así que, estamos tratando con...

...asuntos de eficiencia, variabilidad y durabilidad como una función de todos estos pasos complejos que ocurren dentro de la célula. ¿Qué podemos hacer con respecto a inmunidad preexistente? Bueno, algunos grupos están investigando la inmuoadsorción en modelos animales. Esto implica el uso de una columna como la proteína G o la proteína A que puede adsorber la inmunoglobulina, IgG, de un paciente que puede tener títulos altos de...



...anti-AAV. Es un efecto pasajero. No dura mucho tiempo, pero puede durar lo suficiente para dejar caer los títulos lo suficiente para que uno pueda administrar el AAV y entregar el transgén a los genes blanco. Se está trabajando aquí para examinar la eficacia de la eliminación de la IgG, ya que en varios pacientes será necesario eliminar cantidades significativas de IgG para permitir...

...la localización a los hepatocitos. Luego está también la pregunta sobre la toxicidad intracelular después del ingreso del AAV. Lo que reconocemos es que en muchos pacientes se observan elevaciones en las transaminasas hepáticas. Son transitorios, no son muy altos en la mayoría de los casos, tal vez de 1 y ½ a 2 veces por encima de lo normal en la mayoría de los casos. Sin embargo, son preocupantes porque la elevación de la transaminasa hepática indica muerte de los hepatocitos.

¿Cuáles son las posibles causas de la elevación de la enzima hepática? Bueno, hay 3 hipótesis y puede ser una o más de estas con efecto sobre los hepatocitos en algunos pacientes. En primer lugar, es la degradación de una carga muy alta de cápside del AAV. Una gran cantidad de cápside entra en las células porque una gran cantidad se administra por vía intravenosa. Y la célula tiene que digerir esta cápside. Tiene que degradarla de nuevo en

...aminoácidos. Y eso requiere una cantidad significativa de energía para que la célula lo haga. Luego, está el problema citotóxico de las células T que acabo de describir. Y la tercera posibilidad es lo que se conoce como una respuesta a las proteínas desdobladas.. Y eso es más específico para factor VIII. Lo que se ha establecido desde hace varios años es que es muy difícil para las células producir la proteína del factor VIII. Es una proteína compleja, una de las más grandes del cuerpo.

Incluso si estamos usando el factor VIII sin dominio B, se ha demostrado en cultivos celulares que es muy difícil que las células lo sinteticen y que puede causar toxicidad dentro de estas células. Esta toxicidad también puede ocasionar muerte celular y, por supuesto, pérdida de expresión de la proteína del factor VIII. Así que estas son todas las áreas que necesitan ser investigadas pero que aún no están siendo suficientemente estudiadas para ayudarnos a llegar a algunas de las respuestas a estas preguntas y luego desarrollar el potencial...

...de encontrar soluciones a estos problemas. Aquí se muestra un ejemplo de la elevación de las transaminasas hepáticas en el gráfico superior izquierdo. Y muestra el desarrollo coincidente de células T citotóxicas CD8 que son específicas para la cápside del AAV, lo que induce muerte y destrucción de las células. Lo que vemos en la parte inferior son las diversas respuestas inmunológicas que pueden ocurrir en respuesta a...

...transducción y expresión transgénica. Lo que vemos son células T CD8 que pueden atacar al hepatocito que contiene el transgén. También vemos que las células T CD4, células auxiliares, pueden activarse. Esto es importante para generar una respuesta significativa de anticuerpos a la



cápside del AAV, lo que impide su posterior administración. Casi no hay esfuerzos para investigar estas 3 preguntas críticas...

...que involucran la cápside, las células T citotóxicas y la respuesta a proteínas desdobladas. Se necesita mucho más trabajo en estas áreas para definirlo mejor en pacientes y en grupos de pacientes. ¿Cuáles son algunas alternativas al AAV? Bueno, se ha trabajado mucho con alternativas virales y no virales. El virus más avanzado que se utiliza en la hemofilia son los lentivirus.

Los lentivirus derivan del VIH, pero sin varios de los genes del VIH. Los genes del factor VIII o del factor IX pueden ser insertados de la misma manera que para el AAV. Se está trabajando tanto *ex vivo* con células madre hematopoyéticas como *in vivo* específicamente dirigiendo el virus a hepatocitos, y utilizando lentivirus tanto para el factor IX como el factor VIII en una serie de modelos preclínicos que incluyen animales grandes.

Un enfoque diferente implica no utilizar virus en absoluto, lo que sería una situación ideal. Las nanopartículas de lípidos han estado en investigación durante más de 30 años para suministrar ácidos nucleicos como el ADN. Hablé de lo ineficiente que es el AAV. Estos son aún menos eficientes para introducir genes en las células. Sin embargo, no se generan respuestas inmunitarias a estas nanopartículas de lípidos, por lo que es posible repetir las inyecciones.

Si el paciente no tiene un nivel lo suficientemente alto de factor VIII o factor IX, se puede repetir para generar niveles que serían terapéuticos. Otro enfoque que realmente es el futuro de la terapia génica implica la edición de genes y consiste en añadir el gen directamente en los cromosomas que podrían reemplazar a un gen existente. En el caso de la hemofilia, no es necesario que lo haga. Puede únicamente añadirse al cromosoma.

En algunos casos de hemofilia, si hay una mutación específica, podría incluso reparar el gen endógeno. La edición de genes representa el futuro de la terapia génica, como he dicho, porque permite la corrección permanente de un fenotipo. Una vez que está en los cromosomas continuará expresando proteínas durante toda la vida de la célula. Si la célula se divide, también se encontrará en ambas células hijas. Por lo tanto, es un enfoque atractivo que no está listo para...

...ensayos clínicos en humanos, pero está en estudio en modelos preclínicos de hemofilia. El enfoque final es la terapia celular. Con la terapia celular, se han utilizado diferentes tipos de células, tanto células madre como hepatocitos, para administrar los genes del factor VIII o del factor IX directamente en personas con hemofilia. Esta diapositiva muestra un diagrama de nanopartículas lipídicas entregando la carga de ácidos nucleicos.

La mayor parte del trabajo que se realiza aquí es con pequeñas moléculas de ARN, como los ARN inhibidores. Pero potencialmente los genes también pueden ser incorporados a estas nanopartículas de lípidos. Se ha trabajado



mucho para hacer que esto no sea tóxico para las células y para que pueda dirigirse a hepatocitos, Por lo que esperamos con interés seguir trabajando en esta área. Todavía no está lista para los ensayos clínicos, pero se está moviendo en esa dirección.

Necesitamos identificar maneras para aumentar la eficacia de la expresión génica con éstas. Ofrecen una serie de ventajas sobre el uso de vectores virales. ¿Cuál es la diferencia clave entre los virus lentivirales y adenoasociados, vectores AAV? Las diferencias clave entre los vectores lentivirales y los vectores de AAV se muestran en esta gráfica. Vienen de familias diferentes. En un caso, están envueltos con una envoltura de lípidos como los lentivirus.

Y en otro caso, no están envueltos, solo muestran proteínas que pueden interactuar con los receptores en la superficie de las células. La capacidad de empaquetado de los lentivirus es el doble de la de los virus adenoasociados. Y como mencioné, el lentivirus se integra en el ADN del huésped, mientras que el AAV no lo hace en la mayoría de los casos. Permanece extracromosómico en su mayor parte. Ambos pueden transducir células que se encuentran o no en división.

Y como mencioné, el lentivirus proporciona una corrección permanente, mientras que el AAV en forma de episomas se puede perder con la división celular. Si observamos la comparación de la transferencia de genes con los vectores lentivirales y el AAV, es realmente muy similar. Es un virus que puede llegar a las células a través de receptores específicos en ambos casos. En ambos casos, tanto el ADN como el ARN en el caso de los lentivirus necesitan entrar en el núcleo...

...donde ambos utilizan maquinaria anfitriona. El lentivirus utiliza la maquinaria del huésped para producir ADN a partir del ARN, y luego integrar ese ADN en el cromosoma. El AAV utiliza maquinaria del huésped para tomar el ADN que es de una sola cadena, convertirlo en ADN de doble cadena, hacer que forme un episoma o un trozo circular de ADN donde el ARN puede ser transcrito para hacer proteína.

Por lo tanto, ambos enfoques pueden funcionar y proporcionar niveles terapéuticos del factor VIII, al menos en animales, y en el caso del AAV, en humanos. La edición del genoma para la Hemofilia incluye enfoques que son in vivo o ex vivo. Veamos más de cerca la edición de genes. Con la edición de genes, que es una técnica relativamente nueva en tecnología que se ha establecido entre los 5 y 8 años pasados, somos capaces de...

...insertar un nuevo gen directamente en los cromosomas usando enzimas bacterianas específicas que pueden abrir nuestro ADN y permitir que el nuevo gen se inserte por sí solo. Esto permite una corrección permanente dentro del cromosoma. Si nos fijamos en un método específico de edición de genes como el CRISPR-Cas9, lo que podemos ver en este caso es un resumen de una presentación hecha en la reunión de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (International Society of Thrombosis and Haemostasis, ISTH) en julio de 2019....



...por Alan Brooks, en la que se muestra que es capaz de cortar el ADN del huésped, en este caso en hepatocitos, e insertar en los cromosomas el gen del factor VIII libre de dominio B, y producir mRNA mensajero y secreción de factor VIII. Esto se hizo en modelos animales y ha mostrado niveles de factor VIII dentro del rango terapéutico.

Si pasamos ahora a enfoques de terapia celular, varios grupos han utilizado tanto células madre como hepatocitos maduros para liberar genes del factor VIII o del factor IX. En este caso, mostrado en la caricatura, el gen del factor VIII se coloca en un vector lentiviral. Ese vector lentivirus es capaz de transducir células madre mesenquimales que pueden ser extraídas del huésped.

Y esas células madre mesenquimales pueden ser inducidas para diferenciar entre un número de diferentes tipos de células, incluso células de la médula ósea, así como hepatocitos. Y por lo tanto, potencialmente puede hacer el factor VIII dentro de esos tipos de células diferenciadas. Esto se puede hacer de manera autóloga, lo que significa que las células madre pueden ser tomadas del paciente y manipuladas ex vivo y luego devueltas con el gen del factor VIII al paciente, donde pueden secretar la proteína del factor VIII.

Esto se ha hecho en animales y, en realidad, se ha hecho en humanos con no mucho éxito, pero hace casi 20 años Roth y sus colegas publicaron un documento que mostraba que podían extraer fibroblastos de una biopsia de piel, cultivarlos in vitro, añadir el gen del factor VIII y luego reimplantarlos en la cavidad peritoneal. Ellos creen que vieron un poco de actividad del factor VIII...

...por un corto período en la circulación, pero nunca persiguieron esto hasta el punto de lograr un beneficio terapéutico para los pacientes. En este siguiente enfoque, las células endoteliales pueden expresar el factor VIII. Este es el tipo de célula que de manera natural expresa el factor VIII, en las células endoteliales sinusoidales del hígado. Y lo que se puede hacer es extraer células madre autólogas, células madre pluripotenciales inducidas de la circulación de un paciente.

Transducir el gen del factor VIII usando un vector lentiviral. Estas células pueden entonces ser diferenciadas en células endoteliales, y pueden ser devueltas al paciente para rescatar el fenotipo hemofílico. Los beneficios conceptuales de estos son muy claros, es muy simple. Es más desafiante cuando lo reducimos a la práctica o intentamos reducirlo a la práctica. Pero sin embargo, esto se ha hecho en animales y ha proporcionado niveles terapéuticos de factor VIII cuando los animales recibieron estas nuevas células.

Y luego, en un último conjunto de experimentos, se pueden generar células similares a los hepatocitos a partir de células madre pluripotenciales inducidas. Y el enfoque aquí sería entonces tomar células mononucleares de sangre periférica de los pacientes, reprogramarlas usando factores de



transcripción, moléculas pequeñas en células madre pluripotenciales inducidas, hacer edición de genes para incluir el gen del factor IX...

...dirigir la diferenciación hacia células similares a los hepatocitos, y luego reimplantarlas en el hígado del paciente, o podrían residir en la cavidad peritoneal y producir cantidades sustanciales terapéuticas de factor IX. Esto se ha logrado en ratones. Así que con todos estos enfoques en la terapia celular, tenemos algunos resultados razonables que han funcionado en modelos animales y es ahora cuestión de si esta transición se puede hacer en estudios clínicos en humanos.

En este momento, no se han planificado estudios clínicos en humanos a corto plazo. Hay más trabajo por hacer. Se ha desarrollado un IND abierto con células madre hematopoyéticas utilizando terapia lentiviral en humanos. Implica expresar el gen del factor VIII específicamente en las plaquetas. Por lo tanto, introducir el gen del Factor VIII en las células madre, lo que les permite diferenciarse en...

...una variedad de tipos de células pero poniendo un promotor en el gen del factor VIII que permite la producción del factor VIII solo dentro de las plaquetas maduras. Este enfoque se ha demostrado en varios modelos animales y actualmente tiene un IND abierto. Desafortunadamente, con este tipo de enfoque, se necesita hacer espacio en la médula ósea para que las células modificadas por genes transductores regresen y establezcan un nicho.

Y eso significa que un agente citotóxico como el busulfán necesita ser utilizado para eliminar parte de la médula ósea. Esto es preocupante en cuanto a la relación riesgo-beneficio, por lo que se debe proponer y planificar con mucha cautela y lentitud para asegurarse de que no se produzcan daños en el paciente por el ablación de la médula ósea. Si volvemos al AAV y observamos algunas de sus deficiencias, he descrito la necesidad de mejoras vectoriales...

...necesidades que deben abordar en gran medida la eficiencia, variabilidad y durabilidad de la terapia con el AAV. He hablado sobre la utilización alternativa de genes, y de no-AAV como las nanopartículas de lípidos y los lentivirus que están emergiendo. Y al menos para los lentivirus, en breve deberá de estar en ensayos clínicos. Y luego está la terapia celular combinada con la terapia génica, combinada con la edición de genes que también parece que puede ser...

...muy eficaz en la provisión de nuevas fábricas, nuevas fábricas celulares para producir factor VIII o factor IX, pero aún no se ha logrado una transición de los modelos preclínicos a los conceptos clínicos. Muchas gracias por su atención.

