

Thierry VandenDriessche: Soy Thierry VandenDriessche. Soy profesor en la Vrije University Brussels en Bélgica. Y estoy dirigiendo el Departamento de Terapia Génica y Medicina Regenerativa. He trabajado en el campo de la terapia génica durante los últimos 30 años, particularmente en la terapia génica para la hemofilia. Y es un placer para mí hoy hablar de los avances actuales en este campo y cuáles son las principales preocupaciones y dudas relacionadas con el futuro de la terapia génica para la hemofilia.

Las preocupaciones comunes en la terapia génica son las siguientes: ¿Es eficaz la terapia génica para la hemofilia? ¿Funciona? ¿Cómo comparamos los resultados de los diferentes ensayos clínicos de terapia génica? ¿Cuánto tiempo se espera que dure el efecto de la terapia génica? ¿Es de por vida o transitoria? ¿Hay alguna preocupación principal de seguridad que debamos considerar?

Una vez que un paciente se ha sometido a la terapia génica, ¿puede repetir el tratamiento si los niveles de factor VIII o factor IX disminuyen? ¿Podemos considerar también el tratamiento de pacientes con inhibidores del factor VIII o del factor IX? ¿Cuál es realmente el riesgo de desarrollar inhibidores después de la terapia génica? ¿Es más alto que la terapia convencional de sustitución de proteínas, es igual o más bajo? Y en última instancia, ¿podríamos considerar el uso de la terapia génica en niños, idealmente antes de los inicios de la enfermedad articular?

Así que hay una serie de preguntas fundamentales para las que no tenemos una respuesta, pero ciertamente tenemos algunas indicaciones con base en los conocimientos actuales hacia donde se dirige. Si se analizan los ensayos clínicos de terapia génica para la hemofilia, podemos ver que la mayoría de estos se basan en un vehículo de entrega de genes llamado vector viral adeno-asociado...

...que varía un poco en su composición en términos de las cápsidas que recubren el gen terapéutico, y también en términos del propio gen terapéutico. Al observar los ensayos, notamos que todos tienen una cosa en común: utilizan un factor VIII con eliminación del dominio B que se denomina optimizado, pero la naturaleza del código de optimización varía de un vector a otro.

También pueden existir diferencias sutiles en la naturaleza del transgén. Por ejemplo, en el constructo Freeline, hay un dominio V3 que se cree que mejora la expresión. Todos estos vectores también dependen del uso de un promotor específico de hepatocitos, HSP, para dirigir el gen terapéutico. En cuanto a las cápsidas que se usan para encapsular estos genes terapéuticos, varían un poco y sirven como una clave molecular...



...para abrir la puerta y llevar el gen terapéutico a las células. Con respecto a la hemofilia A, sin entrar en detalles, me viene a la mente un ensayo en particular. Y es el ensayo que fue publicado por Rangarajan y cols, en el New England Journal of Medicine, en el que se utilizó un vector AAV5 para dirigir al factor VIII. Se puede apreciar de manera inmediata que la inyección intravenosa única

...de este vector AAV5- factor VIII provoca un aumento constante y significativo de la actividad del factor VIII, incluso en el rango suprafisiológico. Esto fue consistente con una disminución significativa en el número de hemorragias, y el número de infusiones de proteína de factor VIII en estos pacientes. Así que es un avance muy importante que demuestra la promesa de la terapia génica para la hemofilia A.

Ahora, si observamos la expresión a lo largo del tiempo, vemos que parece disminuir un poco. Ya volveremos a hablar de este tema más adelante. Con respecto a la hemofilia B, una vez más, hay muchos ensayos que se están llevando a cabo en paralelo, todos ellos basados en el vector viral adeno-asociado y que contienen diferentes tipos de transgenes terapéuticos. Al igual que en el caso del factor VIII...

...el transgén del factor IX está optimizado mediante codónes. El propósito de esta optimización de codón es maximizar la cantidad de proteína que es producida por el vector. En la mayoría de los ensayos se utilizó un transgén de factor IX hiperactivo, el transgén del factor IX Padua, que incorpora una mutación con ganancia de la función que aumenta la actividad del factor IX de 5 a 10 veces. Esto implica que para la misma cantidad de vector uno puede terminar con una actividad de factor IX de 5 a diez veces mayor.

También hay otro vector desarrollado por Sangamo que se basa en el paradigma de edición de genes, permitiendo que la expresión del factor IX sea dirigida desde el promotor endógeno de la albúmina. Si observa los promotores que se utilizan para dirigir la expresión del factor IX Padua o incluso la versión no Padua, estos son promotores específicos de hepatocitos o HSP. En el caso de las nucleasas con dedos de zinc de Sangamo...

...otra vez, se utilizó un promotor específico de hepatocitos. Así que se pueden ver aquí algunas semejanzas entre cada uno de estos diferentes ensayos clínicos. Cuando nos centramos en las cápsidas vectoriales propiamente dichas, existen algunas diferencias sutiles, se utilizan diferentes serotipos y las consecuencias de cada uno de estos cambios moleculares a nivel de las cápsidas no se pueden comprender completamente en este momento.



El ensayo clínico sobre el factor IX AAV que dio lugar a una intensa actividad del factor IX fue publicado por primera vez por George y cols en el New England Journal of Medicine en 2017. Y fue inmediatamente obvio que, al inyectar una dosis vectorial relativamente baja de 5 10 a la 11 vg por kg, la actividad relativamente sostenida del factor IX era evidente en un rango entre 30% y 50%.

Esto fue consistente con la caída significativa en la media de las tasas de sangrado anualizadas y el número medio de infusiones de factor IX. Así que esto refleja lo que hemos visto en el ensayo de la hemofilia A que acabo de mencionar. Solo quería llamar su atención también a la variación significativa de paciente a paciente que es evidente en este estudio en particular. También lo hemos visto en los otros ensayos, y es algo que tendremos que entender mejor y a lo que tendremos que enfrentarnos.

¿Por qué algunos pacientes tienen niveles de factor IX o factor VIII más altos que otros después de la terapia génica? Todavía no podemos responder esa pregunta. Así que la buena noticia, si observamos los diferentes ensayos, sin entrar a hacer una descripción detallada de todos ellos, es que se lograron los niveles terapéuticos de factor VIII y factor IX en estos ensayos clínicos. Fueron relativamente constantes durante al menos un año.

Todavía se discute si hay una posible disminución después de 2 o 3 años. Volveremos con este tema más adelante. Y este aumento en los niveles terapéuticos del factor VIII y factor IX se asocia con una reducción significativa de las tasas de sangrado anual y la reducción del uso del factor. Se consideran relativamente seguros, no hay mayores eventos adversos. Hay cierta preocupación por la hepatotoxicidad, de la que hablará después.

La mutación de ganancia de función Padua también da lugar a una actividad mucho mayor que la versión no Padua, lo cual es particularmente interesante porque nos permite teóricamente utilizar dosis vectoriales más bajas y seguras. No se han reportado inhibidores al factor VIII o factor IX. Y tal vez esto no sea del todo sorprendente porque los pacientes que se incluyeron en estos ensayos fueron, por supuesto, seleccionados con base en la ausencia de cualquier antecedente de inhibidores.

Los estudios de seguimiento a largo plazo en modelos preclínicos van más allá de lo que actualmente hemos podido demostrar en sujetos humanos. Sin embargo, es alentador que en el modelo canino de hemofilia, la expresión en el rango del 5% al 10% se ha venido demostrando durante más de 12 años. En el caso de los primates, los estudios de seguimiento aún no son tan extensos, sin embargo, también se ha demostrado la expresión durante más de 6 años.



En la actualidad existe un verdadero desafío en la comparación de la eficacia y la seguridad en los diferentes ensayos de terapia génica. Al parecer, en el ensayo realizado por BioMarin y UniQure se utilizaron dosis de vectores aparentemente más elevadas en el rango de 10 a la 13 vectores de genomas por kilogramo, a diferencia de los ensayos realizados por Freeline y Spark...

...que se basaron en dosis de vectores que estaban en el rango de 2 por 10 a la 12 vg por kg, o incluso menos. Sin embargo, no podemos comparar realmente estas dosis debido a la ausencia de normas para las dosis vectoriales. También hay diferentes métodos de fabricación, diferencias en la funcionalidad de los vectores, lo que significa que la proporción de partículas vacías frente a las llenas puede realmente diferir de un ensayo a otro.

Además, las estrategias utilizadas para la titulación de estos vectores pueden variar en estos diferentes ensayos. Y tampoco se debe ignorar la posibilidad de que en los propios sujetos del ensayo existan diferencias relativas, por ejemplo, a la incidencia de anticuerpos anti AAV preexistentes. También en esta etapa, se han desarrollado ensayos para determinar el título de estos anticuerpos anti-AAV...

...sin embargo, estos ensayos no están estandarizados y muestran diferentes sensibilidades y cortes. Así que, en pocas palabras, estamos comparando manzanas y naranjas en el contexto de la ausencia de cualquier norma. Por lo tanto, tenemos que enfrentarnos a esto y esforzarnos por desarrollar continuamente normas que se puedan utilizar para abordar estas preguntas. Y una de las preguntas fundamentales de la terapia génica está...

...relacionada con el hecho de si la terapia génica va a dar como resultado una expresión de por vida del gen terapéutico, o tal vez solo una expresión por una cantidad de años que después disminuirá. Así que esa es realmente, en sentido literal y figurativo, la pregunta del millón de dólares en este campo. Es alentador que en los perros la expresión sea de al menos 12 años, en los primates de 6 años y en los ratones de por vida.

La experiencia con el factor IX en la clínica durante los ensayos en hígado ha sido de al menos 8 años, en los que se ha demostrado una expresión constante del factor IX, lo cual es muy alentador. Y, de hecho, en uno de los primeros ensayos en músculos hay incluso evidencia de una expresión de 10 años. Si evaluamos de manera crítica los niveles de expresión del factor VIII en el ensayo del factor VIII de BioMarin...

...porque si seguimos el nivel de expresión del factor VIII durante un período más largo, vemos que los niveles medios del factor VIII han bajado de más del 150% iniciales a menos del 50%. No entendemos bien cuáles son las razones de esta cinética y es algo que debemos comprender mejor. La



pregunta ahora es si la expresión se mantendrá más allá de este intervalo de 2 años, un aspecto que tendrá que ser supervisado de cerca.

Ahora, los hepatocitos se dividen lentamente en los adultos, y esto puede tener repercusiones con respecto a la estabilidad de la expresión. ¿Por qué?, porque una vez que las células se dividen, los genomas del vector AAV que expresan el factor VIII o el factor IX se diluirán e incluso se irán degradando. La consecuencia de esto es que la expresión del factor IX o del factor VIII disminuirá en función de esta división celular.

Sin embargo, si una célula no se divide, podemos asumir que los niveles del factor VIII o el factor IX se mantendrían relativamente estables. En los sujetos pediátricos, sin embargo, hay un aumento en la proliferación de hepatocitos y en ausencia de una integración estable de los genes terapéuticos del factor VIII o del factor IX en el genoma de los hepatocitos...

...los genes se diluirán y se espera que la expresión sea transitoria. Hay algunos modelos animales preclínicos que apoyan esta hipótesis, ya que hasta ahora los niños no han sido tratados con terapia génica en el contexto de la hemofilia. Sin embargo, si el vector se integrara de manera estable en el genoma de la célula afectada, se espera que la expresión sea estable porque no habrá ningún efecto de dilución del gen terapéutico en este contexto particular.

Ahora, los riesgos a largo plazo asociados con la terapia génica no se entienden por completo. Y esto forma parte de un terreno desconocido o tal vez, incluso, de las incógnitas conocidas. Lo que sabemos y lo que no sabemos. ¿Cuál es el riesgo de desarrollar cáncer de hígado? En la actualidad, la integración genómica de un gen terapéutico en el genoma de la célula es un arma de doble filo.

Por un lado, sabemos que la integración garantizará muy probablemente la expresión a largo plazo, si no de por vida, del gen de interés, por lo que se puede esperar un efecto terapéutico permanente. Por otro lado, no tenemos ningún control sobre en qué parte del genoma se integrará el gen. Y si esto ocurriera cerca de un oncogén...

...hay un riesgo teórico, al menos, de que esto pueda inducir la formación de tumores, y en este caso se habla de oncogénesis insercional. Por lo tanto, es un fenómeno bastante aleatorio, no controlamos dónde se puede integrar el vector y esto puede suponer un riesgo de seguridad teórico. Y la razón biológica de esto es que el gen de interés...

...puede, si se integra cerca de un oncogén, conferir una ventaja proliferativa a las células modificadas por el gen, provocando la activación de un oncogén y la inducción de la proliferación de células hepáticas. Si no hay una ventaja



de supervivencia o de proliferación, entonces no va a ocurrir nada, Eso es algo que debemos considerar. Sin embargo, debemos tener en cuenta esta información. ¿Cuáles son los datos de los modelos preclínicos que abordan esta seguridad a largo plazo?

Es tranquilizador que no hay evidencia de incremento en neoplasias malignas en ninguno de los estudios preclínicos de terapia génica para la hemofilia A o B, incluidos los estudios en ratones normales, en ratones con deficiencia de factor IX o factor VIII, en perros con deficiencia de factor IX o factor VIII, o en primates. Por lo tanto, aunque no podemos descartar de manera formal...

...que esto pueda o no ocurrir, la evidencia preclínica es muy sólida. Y no hay pruebas que apoyen que los vectores de terapia génica que se están evaluando actualmente en los ensayos clínicos provoquen un incremento en neoplasias malignas en estos modelos. Volviendo a las preocupaciones de seguridad, sabemos que la administración de vectores de AAV con factor VIII o del factor IX puede provocar toxicidad aguda en el hígado.

Así que esta es una incógnita conocida. Tomando como ejemplo los datos comunicados por George et al, podemos ver que, en estos pacientes, los niveles del factor IX aumentan, como se muestra en verde, pero hay un aumento concomitante de las enzimas hepáticas en la sangre. Así que aquí podemos ver 2 pacientes en los que se hizo evidente un aumento de las enzimas hepáticas en la sangre.

Y en este segundo paciente, parecen coincidir con una disminución en la actividad del factor IX. Así que tal vez, la elevación de las transaminasas que se puede medir en la sangre, representa toxicidad e inflamación hepática, lo que da lugar a la eliminación de las células modificadas genéticamente y a la consiguiente pérdida de la expresión del factor IX. Hasta cierto punto, estos eventos adversos se podrían controlar con la administración de prednisona...

... con tratamiento de corticoesteroides orales. En la mayoría de los ensayos hemos visto esta respuesta, aunque no se entienda por completo el mecanismo. Se cree que la respuesta específica de las células T al AAV juega un papel en al menos algunos de los pacientes; sin embargo, puede que esta no sea la historia completa. Es posible que existan otros mecanismos inmunológicos que también pueden explicar la disminución de la expresión y/o el aumento de las enzimas hepáticas que refleja la elevación de las transaminasas.

Una de las hipótesis que se ha confirmado hasta cierto punto en los modelos preclínicos y que puede ocurrir en al menos alguno de los pacientes, es el hecho de que las células T CD8 positivas citotóxicas específicas del AAV pueden reconocer los péptidos de la cápside derivados del AAV que se





presentan en asociación con MHC clase 1 al sistema inmunológico de los pacientes...

...y, por lo tanto, provocan la eliminación de estas células y la pérdida de la expresión. Sin embargo, si se administra una inmunosupresión transitoria con corticoides, por ejemplo, esta reacción inmunológica no deseada puede ser suprimida y se puede lograr una expresión estable. Ahora sabemos que esta no es la única explicación y que otros mecanismos inmunológicos pueden explicar la elevación de las transaminasas...

...ya que en algunos pacientes no hay evidencia de una respuesta específica de las células T al AAV, y aún así se produce la elevación de las transaminasas. Por lo tanto, es un efecto secundario común en los ensayos de hemofilia A. Se ha visto de manera generalizada. De hecho, también se ha visto en otros ensayos más allá de la hemofilia, especialmente cuando se empleaban grandes dosis de vectores para tratar a los pacientes. En los ensayos de hemofilia B también hay evidencia de elevación de las transaminasas.

Y esta es, de hecho, la razón por la que se administran esteroides a los pacientes para evitar que esto suceda. Sin embargo, la administración de corticoesteroides por vía oral no siempre es suficiente para reducir la elevación de las transaminasas. En uno de los ensayos, se presentó la pérdida de la expresión del factor VIII a pesar del uso de corticosteroides orales. En algunos ensayos sobre la hemofilia utilizando el vector AVV, se presentó incluso toxicidad hepática grave y se suspendieron estos ensayos.

Hay muchos debates sobre la aplicación de corticoesteroides profilácticos para asegurarse de que no exista la posibilidad de una elevación de las transaminasas. Por último, está el tema de los inhibidores del factor VIII o del factor IX. Y lo que es interesante es que en muchos estudios se ha demostrado que la terapia génica con el factor IX o el factor VIII provoca la inducción de tolerancia inmunológica.

En algunos casos, los anticuerpos contra el factor VIII o el factor IX podrían incluso ser eliminados después de la terapia génica. Este es solo un ejemplo sobre un estudio publicado por el grupo de Arruda y sus colegas, pero hay muchos otros estudios que apoyan esta hipótesis. Por ejemplo, en estudios anteriores se ha demostrado que, si se hacen pruebas en ratones de exposición al factor VIII o factor IX, uno termina con anticuerpos contra el factor VIII o factor IX. Sin embargo, si se trata a estos animales con terapia génica...

...en este caso, no se producen anticuerpos contra el factor IX o el factor VIII, lo que posiblemente implique la inducción de células T reguladoras. Lo que el Dr. Arruda y sus colegas han demostrado es que incluso en el caso del



factor VIII en un modelo de animales grandes, se pueden eliminar los anticuerpos contra el factor. Por lo tanto, este es un claro ejemplo de que los inhibidores o anticuerpos neutralizantes del factor VIII se podrían eliminar después de la terapia génica...

...y este es un enfoque muy interesante para el problema. Hay una serie de preguntas fundamentales que se han abordado con la terapia génica y otras preguntas que todavía estamos en proceso de resolver. ¿Es eficaz la terapia génica? Sí, ciertamente para la hemofilia, pero también para otras enfermedades genéticas e incluso para el cáncer. La terapia génica ha dado lugar a la aprobación de la EMA y la FDA de varios productos para otras enfermedades además de la hemofilia.

Y es solo cuestión de tiempo para que veamos el primer producto de terapia génica con licencia para la hemofilia. ¿Cuánto tiempo se espera que dure el efecto de la terapia génica? Bueno, no sabemos si el efecto será de muchos años o de por vida, pero por ahora, los datos apoyan la expresión de al menos 8 años. ¿Cuáles son las principales preocupaciones de seguridad? Las principales preocupaciones de seguridad están relacionadas con el riesgo de hepatitis e inflamación.

Aunque esto se puede controlar con la administración transitoria de cortisona. Otro riesgo, cuando se trata de una preocupación de seguridad a largo plazo, es la integración aleatoria del vector. Aunque los estudios preclínicos han demostrado que ese riesgo de oncogénesis insercional es muy bajo en los modelos hemofílicos y en otros modelos preclínicos basados en el uso de terapia génica con vectores que se han utilizado en ensayos clínicos.

¿Los pacientes pueden volver a recibir el tratamiento? Por el momento no es posible. La razón es que estos pacientes que han sido tratados con terapia génica desarrollarán anticuerpos contra el vector, y eso impide la readministración del vector. Así que no pueden ser readministrados con el mismo vector que han recibido antes. Pero hay algunos modelos preclínicos que sugieren formas de evitar esto. Así que tal vez solo sea cuestión de tiempo...

...antes de que se encuentren maneras de retratar en caso de que la expresión disminuyera después de la terapia génica. ¿Podemos tratar a los pacientes con inhibidores? Por el momento los pacientes con inhibidores no están incluidos en los ensayos. Incluso los pacientes que no tienen inhibidores por el momento, pero que tienen antecedentes de haberlos tenido, no han sido tratados todavía. Es probable que los pacientes que actualmente no tienen inhibidores, pero que han tenido inhibidores en el pasado...





...se incluyan eventualmente en algunos de los próximos ensayos para la hemofilia. Sin embargo, es alentador que los estudios en animales hayan demostrado la inducción de tolerancia después de la terapia génica e incluso la desaparición o eliminación de los inhibidores preexistentes al factor IX o al factor VIII. Así que tal vez el riesgo de los inhibidores después de la terapia génica es menor de lo que se esperaría en el contexto de la terapia de sustitución de proteínas.

Sin embargo, esto aún debe ser investigado más a fondo. Entonces, ¿cuál es el riesgo del desarrollo de inhibidores después de la terapia génica? Bueno, con base en los ensayos actuales, no podemos abordar realmente este aspecto, ya que todos los pacientes han sido escogidos por ausencia de inhibidores. Pero como mencioné anteriormente, los estudios preclínicos sugieren que tal vez el riesgo de desarrollar inhibidores puede ser menor después de la terapia génica. ¿Podemos finalmente tratar a los niños con terapia génica, idealmente antes de la aparición de la enfermedad articular?

Bueno, si decide hacer eso, necesitaríamos ya sea un factor de integración, Sin embargo esto plantea preocupaciones asociadas con el riesgo de integración genómica aleatoria, o tal vez la edición de genes donde podemos modificar el genoma en un lugar muy específico. Otra opción es poder readministrar los vectores del AAV. Pero para lograrlo, necesitamos enfoques adicionales para deshacernos de los anticuerpos que...

...se evoquen al inyectar el vector AAV. Aunque tal vez sea cuestión de tiempo una vez más antes de que los estudios preclínicos señalen la forma de cómo podemos traducir estos hallazgos a la clínica. Así que, en conclusión, la buena noticia es que se lograron obtener niveles estables del factor IX y el factor VIII después de la terapia génica. El nivel más alto de actividad del factor IX hasta ahora es de 30% a 40%.

La expresión a largo plazo sugiere al menos 8 años de expresión en el rango del 2% al 5% en uno de los ensayos mencionados. Y sería, por supuesto, muy interesante ver cómo este nivel de 30% a 40% evoluciona con el tiempo en estas últimas cohortes de pacientes. En el caso del factor VIII, los niveles rondan el 50%, 2 años después de la terapia génica. Estos incrementos en los niveles del factor IX y el factor VIII son consistentes con una corrección significativa del fenotipo hemorrágico...

...y una interrupción de la profilaxis. Hay disminución en el uso de factor y no se presenta desarrollo de inhibidores al factor IX o factor VIII. La evidencia en los modelos preclínicos sugiere incluso una tolerancia inmune al factor VIII o al factor IX, lo cual es muy alentador. En la actualidad la terapia génica no es una solución mágica. Hay algunas incógnitas y parámetros que debemos considerar.



Hay problemas de seguridad a corto plazo, respuesta inmunológica contra el vector y las células modificadas genéticamente, toxicidad hepática que justifica el uso de corticosteroides, problemas de seguridad a largo plazo y variaciones entre pacientes. Así que todavía contamos con tener un poco de suerte. Algunos pacientes pueden tener niveles normales, otros pueden tener niveles inferiores al 10%. Y no entendemos bien cuál es la razón de esta variación entre pacientes.

Ahora, la moraleja de la historia es que debemos ser cautelosamente optimistas. Y me gusta parafrasear a Winston Churchill en este sentido. "Ahora bien, este no es el final. Ni siquiera es el principio del final. Pero es, tal vez, el final del principio." Muchas gracias.

