

Barbara Konkle: Soy Barbara Konkle. Soy profesora de medicina en la Universidad de Washington y directora científica de Bloodworks Northwest, donde también soy codirectora del Centro de Trastornos Hemorrágicos de Washington. Hoy voy a hablar de la terapia génica y la hemofilia y específicamente de la terapia génica con vectores virales adeno-asociados o AAV y su aplicación en hemofilia.

El objetivo de aprendizaje es identificar las características clave de los ensayos clínicos actuales en la terapia génica tanto para la hemofilia A como para la hemofilia B. Si pensamos en la terapia génica, es bastante simple. Tenemos un gen que se inserta en el vector AAV, y luego se inyecta periféricamente. Debido tanto al vector como a los potenciadores del promotor, que discutiremos más adelante...

...se dirige al hígado, que es la célula blanco de la que hablaremos. El AAV es esencialmente extra-cromosómico, y entonces se produce la proteína. Si bien se entiende lo que sucede en la célula blanco, todavía hay mucho que es como una caja negra y que necesitamos entender más. Han habido un número increíble de modelos animales utilizando terapia génica y ahora más de 200 ensayos humanos en diferentes enfermedades...

...usando la terapia génica basada en AAV realizados en los últimos 30 años. Así que específicamente sobre el virus AAV, en la parte superior se muestra la cepa silvestre del virus. Contiene un gen rep y un gen cap que se eliminan para el vector. El AAV silvestre es un miembro de la familia de los parvovirus, que consiste de ADN de cadena sencilla de 4.7-kb.

Su replicación es deficiente, por lo que requiere un virus ayudante. De ahí viene su nombre porque se encontró como contaminante de un cultivo de adenovirus, pero no tiene nada que ver con los adenovirus, aparte de haber sido descubierto de esa manera. No es patógeno, e infecta naturalmente a los humanos. En el caso de los vectores AAV, carecen de capacidad para la replicación.

Ellos, como veremos en una diapositiva posterior, son vectores tanto naturales como de bioingeniería. La cápside viral gobierna donde se dirige el vector, el tropismo a los tejidos. Se ha documentado que tiene expresión prolongada en células post-mitóticas, que no predominantemente no se integra y muy importante, hasta la fecha, ha mostrado un buen perfil de seguridad en modelos animales y en ensayos con humanos. Como se ha señalado anteriormente, estamos expuestos al AAV.

Alrededor del 30 al 50% de la población tiene anticuerpos contra el AAV. Más comúnmente al serotipo AAV2. Hay un buen estudio en el que se tomaron muestras de 62 niños a lo largo del tiempo como parte del

seguimiento de hemofilia en el que se examinó el desarrollo de la seropositividad para AAV en las primeras etapas de la vida.

Como se muestra en el gráfico de la derecha, puede verse que estos niños se expusieron al AAV, más comúnmente al AAV2. Este estudio examinó específicamente AAV2, AAV5 y AAV8. Para poder utilizar estos vectores para hemofilia, se ha trabajado a lo largo de los años con el fin de mejorar su expresión. Inicialmente se pensaba que la respuesta inmunológica a la cápside pudiera disminuirse eliminando las cápsides vacías...

...lo que suena como una buena idea y probablemente lo sea, aunque no está claro si eso ha modulado la respuesta inmune en general. Se han utilizado diferentes serotipos de AAV. Inicialmente se utilizó el AAV2 y luego otros, con menos seropositividad en la población, así como un tropismo hacia tejidos variable. Se han optimizado elementos del promotor y elementos reguladores específicos de hígado con el fin de asegurar su tropismo hepático.

En la figura se muestra un promotor de citomegalovirus (CMV), pero se usan otros promotores. Los científicos también optimizan el codón para aumentar el factor VIII y el factor IX. Y dos modificaciones que realmente son ahora uniformes, 1 para el Factor VIII es usar un Factor VIII con eliminación del dominio B para permitir que sea de un tamaño que pueda ser insertado en el AAV.

Y luego la variante de Padua en el Factor IX, este cambio de 1 aminoácido fue descubierta en una familia en Padua, Italia, que tenía niveles muy altos de actividad del Factor IX. Y como veremos, al insertar este cambio en el casete del Factor IX podemos aumentar notablemente la actividad específica del Factor IX.

Así que el primer ensayo mediado por el AAV en hemofilia fue en realidad con inyecciones intramusculares. Esto se hizo en el Hospital Infantil de Filadelfia, y no se obtuvo realmente una expresión sistémica. Pero es interesante que cuando mas tarde volvieron a hacer la biopsia muscular había expresión génica persistente del factor IX. La primera infusión hepática fue con un constructo de AAV2-Factor IX y se muestra en el gráfico de la derecha, tomada del manuscrito.

En dosis altas, el Factor IX incrementó inicialmente como se muestra en la línea roja a cerca del 12%, lo cual fue increíblemente emocionante. Pero luego hubo un aumento en las enzimas del hígado, en la ALT (o TGP) notablemente, y eso se asoció con una disminución en la expresión del Factor IX. Esto fue muy sorprendente, en parte porque los estudios se basaron en modelos en perros.



Y esto no ocurrió en los perros, mostrando que las personas no son perros, pero aún así, fue un hallazgo sorprendente. Posteriormente, se hizo una infusión a un paciente que tenía anticuerpos preexistentes contra el AAV2, y no mostró una respuesta, presumiblemente debido a eso, y luego se hizo una infusión a otro sujeto para comprender mejor la respuesta inmunológica.

De nuevo hubo un incremento en las pruebas de función hepática, pero no se expresó el Factor IX. La primera expresión a largo plazo es la del estudio de St. Jude/UCL, y la que se muestra a la derecha es de su publicación. En el primer seguimiento, ahora tenemos a los individuos con el seguimiento más largo, de hasta 8 años, y siguen mostrando expresión. Aquí se muestra en líneas doradas los niveles de factor y las flechas azules de arriba son infusiones de factor.

Así que se puede ver el factor subiendo y bajando con la infusión, pero luego la expresión del factor es realmente estable al incrementar la dosis con niveles alrededor del 2 al 6%, los cuales persisten. Una cosa importante que aprendimos en este ensayo es que cuando hubo un aumento en la ALT como se muestra con la flecha verde, y se puede ver en el paciente 5 cómo hubo un fuerte aumento, e instituyeron tratamiento con prednisona.

Demostraron que podían mantener la actividad del factor mediante la institución de la terapia con prednisona. Este es un enfoque que se utiliza en todos los ensayos de terapia génica de hoy en día. Así que aquí hay una tabla de ensayos seleccionados en curso fase 1/2 y fase 3. Puede que quede algo pendiente aquí. ya que no pretende ser exhaustivo, sino ilustrar dónde está el campo.

También es un campo que se mueve rápidamente, por lo que estos por naturaleza pueden estar desactualizados. Se muestran primero el de la hemofilia A, y luego los 3 de hemofilia B con sus patrocinadores y diferentes nombres. Los vectores, como notarán, tienen diferentes serotipos, también hay algunos vectores diseñados, el Spark 100, el AAVhu37 y el Ultragenyx.

Las células que se utilizan para la fabricación provienen de insectos o mamíferos. El valor del insecto es que pueden producir más, pero hay una modificación diferente post-translacional. No sabemos en este momento, si esto hace una diferencia. Y luego en la siguiente columna está la fase del ensayo. Así que el BioMarin es el más adelantado. En fase 3, se aplicaron 2 dosis y éstos son genomas de vectores por kilogramo.

Aunque el reclutamiento ha sido realmente a las dosis más altas, en los estudios Fase 1/2 hay una escalada de dosis para determinar la dosis a utilizar en la Fase 3. El Spark, Fase 1/2, de Factor VIII está ahora en fase de observación que se realiza durante al menos 6 meses para que el paciente



anote o ponga en su diario electrónico su régimen de tratamiento y cualquier sangrado...

...de modo que una vez que reciban la terapia génica, los resultados puedan ser comparados con los del paciente antes de la terapia génica con sus propios datos. Para la hemofilia B, hay 2 ensayos en fase 3. El de Pfizer como fase 3 de lo que fue la fase 1/2 del ensayo Spark, luego hay un ensayo uniQure también en fase 3.

Y antes está el ensayo de Freeline. Entonces, ¿qué nos dicen los resultados de los estudios a la fecha? Algunos de los resultados publicados o presentados de algunos de los ensayos ilustrarán el estado de las cosas. Entonces, este es el ensayo del factor IX Padua de AAV, AMT-061 y este ensayo comenzó...

...mostrado a la izquierda, el AMT-060 fue el primero en términos de Fase 1/2, y alcanzaron un Factor IX de alrededor 7.5%. Lo cual, cuando yo empecé en la hemofilia era inaudito, incluso después de haber empezado con la hemofilia; ya sabes, pensamos que si nosotros, en el campo de la terapia génica, si pudiéramos llevar a los pacientes justo a un rango moderado con solo hacerlo, eso sería un éxito. Y realmente ha sido un éxito.

Si miramos los ensayos en los que hay niveles persistentes del 6%, esos pacientes no se están infundiendo y no están sangrando. Pero sabemos por ensayos más recientes que podemos alcanzar niveles más altos. Y lo que hicieron fue tomar su vector y agregar la variante Padua e infundirlo en 3 sujetos y los resultados de hasta 36 semanas se muestran aquí, En realidad se han presentado seguimiento mas largos en el congreso ASH.

En estos 3 participantes, la media de actividad del Factor IX a las 36 semanas fue del 45%. Lo interesante de este ensayo es que no requirieron inmunosupresión, y que los pacientes fueron seropositivos a bajo título para el AAV5, lo que plantea la pregunta de si los pacientes pueden ser infundidos con algunos vectores si hay evidencia de respuesta de anticuerpos.

Y éste estudio está en fase 3 a esta dosis. Esto muestra la actualización de 2 años del estudio AAV-Factor IX Padua Spark-9001 que muestra expresión hasta los 29 meses. Muestra cierta variabilidad y expresión, pero todos los niveles que tendrían un impacto clínico significativo han demostrado eliminar realmente la necesidad de la infusión del factor y las hemorragias.

Este BMN 270 era la fase 1/2, que ahora está en fase 3 a esta dosis, por lo que 6 por 10 a la13 genomas vectoriales por kilogramo. Y estos son los resultados de 3 años con el ensayo cromogénico. Inicialmente con este vector, hubo resultados bien dentro del rango normal del Factor VIII que han disminuido un poco con el tiempo.



Pero aún así, con un rango medio alrededor de 40%, lo cual es ciertamente notable. Y creo que tendremos que ver porque este ensayo es el más adelantado. Tendremos que ver si esto es lo que veremos para las otras pruebas de Factor VIII, realmente no lo sabemos en este momento. Otro ensayo de terapia génica de Factor VIII es el ensayo Alta. Y esta es una actualización de los resultados que fueron presentados en la reciente reunión de ASH.

Esta es la fase 1/2. Y verán que en la parte superior, estos son sujetos que fueron dosificados del 2 al 12^{vo}. Pero la cohorte de dosis más alta es de 3 por 10 a la 13. Hay un efecto de la dosis. Y luego pueden ver en el panel de la izquierda la actividad del Factor VIII en un gráfico lineal, que separa bien los resultados.

Y luego la escala logarítmica, demostrando que los pacientes de la cohorte de alta dosis alcanzan niveles en el rango normal. De nuevo, esto es temprano y por lo tanto tendremos que continuar siguiendo estos temas a lo largo del tiempo. Y este Factor VIII se utilizará en un ensayo de fase 3 que está siendo realizado por Pfizer. Así que en general, hay algunas cosas realmente positivas con la terapia génica del AAV pero continuamos con algunas dificultades y preguntas.

Así que, uno de los problemas es la elegibilidad limitada del paciente. Así que los sujetos actuales no pueden tener antecedentes de inhibidores. Aunque tengo que decir que hay un número de estudios que se están desarrollando para ver los inhibidores. Así que es probable que esto no sea cierto en el futuro. Son hombres adultos. Para el factor VIII generalmente, requieren menos del 1%...

...aunque esto se está volviendo un poco más indulgente, y para factor IX es menor o igual al 2%. Los pacientes que tienen anticuerpos preexistentes al vector AAV están excluidos. uniQure en su ensayo de hemofilia B tienen una positividad a títulos bajos al vector. Y así, si eso tiene que ver con un título o si tiene que ver con el serotipo creo que no lo entendemos completamente.

Así que los futuros pacientes son aquellos con inhibidores actuales o pasados, y he oído que Spark tiene un ensayo y que hay otras compañías que están trabajando en protocolos para ensayos. El anticuerpo anti-AAV preexistente es un problema y excluye a varios pacientes, hemofilia menos severa, adolescentes. El problema con el AAV es que no se integra, pero también que se localiza en el hígado y se perderá en un hígado en crecimiento.

Y eso fue ciertamente en este punto una limitación en los niños pequeños y no sabemos a medida que bajemos la edad en que punto perdería su eficacia. Hay mujeres con hemofilia severa, y eso también se está



flexibilizando un poco en términos de algunos protocolos que aceptan a las mujeres en los estudios. Y luego los pacientes que pierden la expresión o estaban en las primeras fases de estudio y no obtuvieron un resultado; tampoco hay una respuesta para ellos en términos de la terapia de AAV.

Y no hay otros enfoques para la terapia génica en hemofilia que estén en la mismas fases. Entonces, ¿cuáles son los riesgos? Tenemos una muy buena terapia para la hemofilia ahora. Así que, cuando consideramos a nuestros pacientes tenemos que estar seguros de que los beneficios son mayores que el riesgo. Así que tenemos algunos riesgos conocidos.

Y uno es la toxicidad hepática a corto plazo que se observa en algunos pacientes en prácticamente todos los ensayos. Y esto ha respondido en general a los cursos cortos de esteroides. Pero a partir de varios ensayos, sabemos que algunos pacientes han requerido un tratamiento más largo de inmunosupresión y eso plantea interrogantes sobre la toxicidad. Además, los pacientes desarrollarán anticuerpos anti-AAV si se exponen al virus, lo que, en este punto, impedirá que reciban dosis adicionales.

Y también sabemos que, en general, se ha observado realmente una amplia expresión interindividual, variabilidad y expresión, que se explica en parte por la respuesta inmune de las células T anticápside. Pero sabemos que vemos pacientes que están perdiendo la respuesta o tienen una respuesta disminuida, o que no tienen evidencia de esto. Y hay diferentes teorías de por qué puede ser así, pero creo que en momento, realmente no lo entendemos.

Así que también existen desconocidos. No sabemos si habrá toxicidad hepática a largo plazo. No tenemos pruebas de eso por ahora, pero es algo a lo que será muy importante darle seguimiento. El AAV, como mencioné, tiene una tasa de integración muy baja. Sin embargo, estamos dando 10 a la 13 genomas virales por kilogramo, por lo que se convierte en un número real.

Creo que podemos estar tranquilos por el gran número de pacientes que han recibido AAV en múltiples ensayos para diferentes enfermedades, pero esto es algo que tendremos que vigilar de cerca. No hay pruebas de transferencia en la línea germinal. Los modelos animales no lo apoyan. En los estudios con humanos, se ha detectado el vector transitoriamente en el semen, pero no hay pruebas de que esté en el esperma. Así que eso es tranquilizador.

En resumen, la terapia génica mediada por el AAV ha tenido éxito en términos de aumento de los niveles de factor VIII y factor IX en pacientes con hemofilia. Y en todos los diferentes niveles que se han alcanzado, se ha disminuido notablemente el uso del factor y se han reducido las hemorragias. Hasta la fecha, en hemofilia y otros ensayos con AAV, parece tener un perfil



de seguridad muy bueno. Sin embargo, debemos estar atentos en nuestro seguimiento a largo plazo para buscar cualquier señal de seguridad.

También necesitamos datos de eficacia a largo plazo para comprender si esta expresión será transitoria a lo largo de los años porque sabemos que podemos ver la expresión durante años. ¿Durará esto? ¿Desaparecerá? Realmente sólo necesitamos datos a largo plazo sobre esto. Y posteriormente modificaciones del enfoque con el AAV y el uso de otros vectores para poder tratar una población de hemofilia más amplia, incluyendo niños pequeños.

Gracias.

