

Glenn Pierce: Merhaba, ismim Glenn Pierce. Dünya Hemofili Federasyonu'nun başkan yardımcısıyım ve hemofili için kullanılan gen terapisine uzun süredir devam eden bir ilgi ve bağlılık duyuyorum. Bugün, hemofili tedavisi için gen terapisinde kullanılan diğer stratejiler ve hedefler hakkında konuşuyor olacağız. Hedeflerimiz konuşma boyunca adeno ilişkili virüs dışında diğer yaklaşımları ve adeno ilişkili virüsün bazı avantaj ve dezavantajlarını incelemektir.

Gen terapisi kavramsal başlangıcına 50 yıl önce Ted Friedmann tarafından Science dergisi için yazılmış olan, insan hastalıkları için gen terapisinin nasıl olacağı hakkında bir makaleyle sahip oldu. O zamanlar, DNA ve RNA fonksiyonları yeni anlaşılıyordu. Ted Friedmann, bizim bugün gen düzenleme hakkında soruyor olduğumuz, zorlu bilimsel ve etiksel problemler sorusunu ortaya attı.

Şu anda ise neredeyse 50 yıl ilerideyiz ve hemofili gen terapisinde neden AAV vektör kullanıldığını soruyoruz. Cevap kısaca, işe yarıyor olmaları. Ancak bu, başarısızlıkların yaşandığı 25-30 yıllık bir süreç sonucunda ortaya çıktı. Bu noktaya ulaştığımızda, faktör VIII ve faktör IX eksiklikleri olan hemofili hastalarına terapötik fayda sağlamaya yönelik en uygun yaklaşımdır.

Genel olarak, iyi bir güvenlik siciline sahipler ve farklı hastalık aşamalarında ve klinik deneylerde kullanıldılar. İnsanların belki de yarısına kadarının farklı AAV serotiplerine önceden mevcut bağışıklığı olduğu gerçeği, tepkilerin değişkenliği ve dayanıklılığı dâhil olmak üzere tartışacağımız birçok konu var. Serotipler, birbiriyle yakından ilişkili olan fakat vücuttaki farklı dokuları enfekte edebilecek kadar da primer AAV'den farklılaşarak gelişmiş olan...

...AAV partikülleridir. Gen terapisi için AAV serotiplerinin birçoğunu kullandık ve hepsi, birçok insanın önceden virüse maruz kaldığına ve antikor yanıtları oluşturduğuna dair kanıtlar taşıyordu, ki bu durum pozitif olan insanlarda kullanılmasına engel oluyordu. AAV uygulanmadan önce gördüğümüz bu bağışıklık tepkisi, AAV verildikten sonra önemli ölçüde artar, tekrar bir doz verilmesini engeller.

AAV gen terapisini uygulaması sonucunda çok yüksek antikor titreleri oluşur. AAV, insanları enfekte edebilen en küçük virüslerden biridir ve buna bağlı olarak AAV genlerini çıkardıktan sonra bile fazla yer yoktur. Örneğin B domain'i silinmiş faktör VIII geni, AAV içine ancak sığar. Yani boyut kısıtlamaları da var. AAV, iyi tanımlanmamış ve iyi çalışılmamış olan bir miktar rastgele entegrasyon yapabilir ve...

...uzun süreli güvenlik konusunu gündeme getirir. AAV hakkındaki son endişe, hastalara trilyonlarca viral genom uygulamamıza rağmen sonuç olarak bunun çok az bir fraksiyonunun salgılanan ve terapi için faydalı olan proteini üretmesidir. Bununla birlikte, AAV, bize hemofilide terapötik bir etki sağlayan, çalışan bir virüs vektörüdür.



AAV vektörlerini iyileştirmeye yönelik çözümler nelerdir? AAV kullanımının etrafında gerçekleşen tüm olaylara baktığımızda, pek çok çözümün önerildiğini fakat çoğunun test dahi edilmediğini görüyoruz. Bu, sadece klinik deneylerin faz 3'e doğru ilerlemesinde değil, aynı zamanda AAV vektörlerinde, transdüksiyon verimliliğinde ve benzerlerinde gelişme gösterebilecek yeni denemeler yapılmasında da önemli bir bileşendir. Tüm bu potansiyel...

...çözümler araştırılıyor ancak 2020 veya 2021 gibi erken bir tarihte onaylanabilecek olan bu ilk nesil AAV gen terapisine girecekleri hızda değil. Eğer hepatositlerin AAV vektör transdüksiyonuna bakarsak, bu çizime baktığımızda 1 numarada, önceden mevcut doğal enfeksiyondan ötürü AAV'nin...

...hedef hücreye ulaşmasını bile önleyecek antikorların olup olmadığını görebiliyoruz. Yani, hiçbir gen terapisi etkinliği gerçekleşmeyecek. Antikorların yokluğunda, 2 numarada, AAV spesifik hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanabilir ve normal reseptör transsitoz mekanizmaları yoluyla endositozlanabilir. Hücre içine girdiğinde, doğuştan gelen bir bağışıklık ile karşılaşabilir, çünkü sonuçta, hücrelerimiz bizi viral enfeksiyonlara karşı savunmak için tasarlanmıştır.

Bunlar, terapi olarak kullanıldığında olabilecekler. Ancak, yeterli bir miktarda virüs (bu mekanizmalardan) kaçabilir ve kılıfları soyulabilir (uncoat). Sitoplazmada, DNA nükleusa girer ve nihayetinde, konakçı makineyi sonradan salgılanabilen proteine dönüştürmek için kullanılan stabil, kapalı döngüler olan epizomlar oluşturur. Kapsidin kendisi...

...endoplazmik retikulum içine girer veya majör histokompatibilite sınıf I antijenleriyle karşılaşır. Bunlardan bazıları, özellikle kapsid peptidlerine bağlanabilirler ve bu durumda spesifik anti kapsid sitotoksik CD8 T hücrelerini stimüle edebilecekleri hücre yüzeyinde dağılırlar. Bu, transgeni içeren hücrenin tahribatına neden olabilir. Bu nedenle biz...

...hücre içerisinde meydana gelen tüm bu karmaşık adımların bir fonksiyonu olan verimlilik, değişkenlik ve dayanıklılık konularıyla uğraşyoruz. Önceden mevcut bağışıklık hakkında ne yapabiliriz? Bazı gruplar hayvan modellerinde immünoadsorbsiyonu inceliyor. Bu, anti AAV titreleri yüksek olan bir hastadan immünooglobulin, yani IgG, adsorbe edebilen bir protein G veya protein A kolonu gibi bir kolonun...

...kullanılmasını içerir. Bu geçici bir etki. Çok uzun sürmez ama yeteri kadar uzun sürebilir ve titreleri, AAV uygulanabilecek ve transgeni hedef genlere aktaracak yeterlilikte düşürebilir. IgG'nin çıkarılmasının etkilerini inceleme çalışmaları devam etmektedir, çünkü birçok hastada, hepatosit hedeflemesine olanak sağlamak için önemli miktarda IgG'nin...

...alınması gerekir. Sonrasında AAV aktarımından sonra intraselüler toksisite sorunu var. Bazı hastalarda karaciğer transaminazında elevasyonlar görüldüğünün farkına vardık. Geçicidirler, çoğu durumda çok yüksek değildirlere, çoğunlukla normalin 1,5 veya 2 katı üstünde olurlar. Buna rağmen,



karaciğer transaminaz elevasyonunun hepatosit ölümü belirtisi olması nedeniyle endişeye sebebiyet verirler.

Karaciğer enzim elevasyonunun olası nedenleri nelerdir? 3 hipotez vardır ve hastaların hepatositine etkisi olan bunlardan biri veya daha fazlası olabilir. Öncelikle, bu yüklü miktarda AAV kapsidinin degradasyonu. Çok fazla kapsid hücre içine girer çünkü damar içine çok fazla verilir. Hücrenin, bu kapsidi sindirmesi gerekir. Onu oluşturan amino asitlerine degrade etmek...

...zorundadır. Hücrenin bunu yapabilmesi için önemli miktarda enerji gerekir. Sonrasında, az önce bahsettiğim sitotoksik T hücresi sorunu var. Üçüncü olasılık ise katlanmamış protein yanıtı olarak bilinen şeydir. Bu daha çok faktör VIII'e özgüdür. Birkaç yıldan beri yerleşik olan düşünce, hücrelerin faktör VIII proteini üretmesinin çok zor olmasıdır. Kompleks bir proteindir, vücuttaki en büyüklerinden biridir.

B domain'i silinmiş faktör VIII kullanıyor olsak bile, hücre kültürlerinde, hücrelerin üretmesinin çok zor olduğu ve bu hücrelerin içinde toksisiteye sebep olabileceği görülüyor. Bu toksisite, hücre ölümüyle de sonuçlanabilir ve elbette, faktör VIII protein ekspresyonu kaybına neden olabilir. Bunlar, araştırma yapılması gereken alanlardır fakat bu soruların cevaplarından bazılarını ulaştırmamıza ve sonrasında bu potansiyel sorunlara potansiyel çözümler geliştirmemize...

...yardımcı olmak için yeterince çalışma yapılmamıştır. Bu, sol üstteki tabloda, karaciğerde transaminaz elevasyonunun bir örneğini göstermektedir. Bu, hücrelerin ölümüne ve tahribatına neden olan AAV kapsidine özgü CD8 sitotoksik T hücre cevabı ile çakışır. Altta ise, transdüksiyon ve transgen ekspresyonuna tepki olarak meydana gelebilecek...

...çeşitli bağışıklık yanıtlarını görüyoruz. Gördüklerimiz, transgeni içeren hepatositlere saldırabilen CD8 T hücreleridir. Ayrıca CD4 T hücrelerinin, yani yardımcı hücrelerin de aktive edilebildiğini görüyoruz. Bunlar, daha sonraki tekrar uygulamayı önleyen AAV kapsidine önemli bir antikor tepkisi üretmede önemlidir. Kapsid, sitotoksik T hücreleri ve katlanmamış protein yanıtı gibi 3 kritik konu...

...üzerine araştırma yapmak için neredeyse hiç çaba gösterilmiyor. **Tekil Hastalarda** ve hasta gruplarında bunu daha iyi tanımlamak için bahsedilen alanlarda çok daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. AAV'nin alternatifleri nelerdir? Hem viral hem de non-viral alternatiflerle birçok çalışma yapıldı. Hemofili için kullanılan en gelişmiş virüsler lentivirüslerdir.

Lentivirüsler HIV'den elde edilir. Çok sayıda HIV geni eksiktir ve AAV'de olduğu gibi, faktör VIII veya faktör IX geni eklenebilir. Hematopoetik kök hücreleriyle ex vivo ve spesifik olarak hepatositleri hedef alarak in vivo çalışmalar, büyük hayvanlar dâhil olmak üzere birkaç preklinik modelde faktör IX ve faktör VIII'in lentiviral aktarımı kullanılarak yapılmıştır.

Virüsleri hiç kullanmamanın ideal durum olduğu farklı bir yaklaşım vardır. Lipid nanoparçacıklar, DNA gibi nükleik asitleri aktarmak için 30 yıldan fazla



süredir araştırılıyor. AAV'nin ne kadar verimsiz olduğundan bahsettim. Bunlar genleri hücrelere yerleştirmede daha da verimsizdir. Bununla birlikte, bu lipid nanoparçacıklara bağışıklık yanıtları üretilmez dolayısıyla enjeksiyonların tekrarı mümkün olabilir.

Eğer hasta yeterince yüksek bir faktör VIII veya faktör IX seviyesine sahip değilse, terapötik olan bu tür bir seviyeyi üretmek için bunu tekrar tekrar verebilir. Ciddi anlamda gen terapisinin geleceği olan bir başka yaklaşım, gen düzenlemeyi kapsar. Geni doğrudan, mevcut bir genin yerine geçebilmesini sağlayacak kromozomlara eklemeyi kapsar. Hemofili durumunda, mutlaka bunu yapması gerekmez. Sadece kromozomun içine eklenebilir.

Bazı hemofili hastalarında, eğer spesifik bir gen değişimi varsa, endojenöz geni bile onarabilir. Gen düzenleme, daha önce de dediğim gibi gen terapisinin geleceğini temsil eder çünkü bir fenotipin kalıcı olarak düzenlenmesine olanak sağlar. Kromozomlara girdikten sonra, hücre ömrü süresince protein ekspresyonu yapmaya devam edecektir. Eğer hücre bölünürse, her iki yavru hücrede de bulunacaktır. İnsan klinik deneylerine hazır olmayabilir fakat...

...hemofili için prelinik modeller üzerinde incelenmekte olan cazip bir yaklaşımdır. Son yaklaşım ise hücre terapisi. Hücre terapisinde, hem kök hücreleri hem de hepatositleri içeren birkaç farklı hücre türü, faktör VIII ve faktör IX genlerini hemofili hastalarına doğrudan aktarmak için kullanılmıştır. Bu slayt nükleik asitleri aktaran lipid nanoparçacıklarının bir şemasını göstermektedir.

Buradaki çalışmalar çoğunlukla inhibitör RNA'ları gibi küçük RNA molekülleriyle yapılır. Ancak potansiyel olarak genler de bu lipid nanoparçacıklara dâhil edilebilir. Hücreler için onları non-toksik hâle getirmek ve örneğin hepatositi hedef almalarına olanak sağlamak için birçok çalışma yapılmıştır. Bu alanda çalışmalarımızı ilerletmeyi sabırsızlıkla bekliyoruz. Henüz klinik deneylere tam olarak hazır değil fakat o yolda ilerliyoruz.

Bunlar kullanılarak yapılan gen ekspresyonu verimliliğini arttırmanın yollarını bulmalıyız. Viral vektör aktarıma kıyasla birçok avantaj sunarlar. Lentiviral ve adeno ilişkili virüs, yani AAV vektörleri arasındaki temel farklılık nedir? Lentiviral ve AAV vektörleri arasındaki temel farklılıklar bu tabloda gösterilmiştir. Farklı familyalardan gelirler. 1 durumda, lentivirüsler gibi lipid bir kılıfla sarılırlar.

Bir başka durumda ise, hücre yüzeylerindeki reseptörlerle etkileşime girebilecek proteinleri gösterecek şekilde kılıfsız hâdedirler. Lentivirüsün paketleme kapasitesi adeno ilişkili virüsün iki katıdır. Bahsettiğim gibi, lentivirüs konak DNA'ya entegre olurken AAV çoğunlukla bunu yapmaz. Büyük ölçüde ekstrakromozomal kalır. Her ikisi de hem bölünen hem de bölünmeyen hücrelere transdüksiyon yapar.

Bahsettiğim gibi, lentivirüs kalıcı bir düzeltme yaparken, epizomlar hâlinde bulunan AAV ise hücre bölünmesiyle kaybolabilir. Gen transferinin lentiviral yoluyla ve AAV vektörüyle yapılmasının karşılaştırılmasına baktığımızda, çok



benzer olduklarını görürüz. Her iki durumda da spesifik reseptörler aracılığıyla hücrelere girebilen bir virüstür. Her iki durumda da, DNA, veya lentivirüslerde RNA konak mekanizmayı...

...faydalı hâle getirdikleri ortam olan nükleusa girmelidir. Lentivirüs, RNA'dan DNA yapmak için konak mekanizmaları kullanır ve bu DNA'yı kromozoma entegre eder. AAV, tek sarmallı DNA'yı almak, onu çift sarmallı DNA'ya dönüştürmek, RNA'nın daha sonra protein üretmek için kopyalanabileceği bir DNA epizomu veya dairesel bir DNA parçası oluşturmak için konak mekanizmaları kullanır.

Dolayısıyla her iki yaklaşım da işe yarayabilir, en azından hayvanlarda ve AAV kullanıldığında insanlarda terapötik seviyelerde faktör VIII sağlanabilir. Hemofili tedavisinde gen düzenleme, in vivo veya ex vivo'da kullanılan yaklaşımları içeriyor. Gen düzenlemeye daha yakından bakalım. Teknolojide geçtiğimiz 5 ila 8 yıl arasında yerleşmiş ve oldukça yeni bir teknik olan gen düzenlemeyle...

...DNA'mızı açabilen ve yeni genin yerleşebilmesine olanak sağlayan özel bakteriyel enzimlerle kromozomlara doğrudan yeni bir gen ekleyebiliyoruz. Bu kromozom içerisinde kalıcı bir düzeltme sağlar. Eğer CRISPR-Cas9 gibi özel gen düzenleme yöntemlerine bakacak olursak, bu durumda görebileceğimiz şey, 2019'un Temmuz ayında gerçekleşen ISTH buluşmasında Alan Brooks tarafından...

...gösterilmiş bir sunumun özet hâlidir; konağın, bu durumda hepatositlerin, DNA'sını keserek, B domain'i silinmiş faktör VIII genini hepatositlerin kromozomları içine yerleştirebildiğini ve mRNA, yani haberci RNA ve faktör VIII üretebildiğini gösterir. Bu hayvan modeller üzerinde gerçekleştirildi ve faktör VIII seviyelerinin terapötik aralıkta olduğunu gösterdi.

Eğer şimdi hücre terapisi yaklaşımlarına dönersek, birkaç grup faktör VIII veya faktör IX genleri aktarımı için kök hücrelerinin yanı sıra olgun hepatositleri de kullandı. Bu durumda, çizimde gösterildiği gibi, faktör VIII geni lentiviral vektöre koyuluyor. Lentivirüs vektörü, konaktan alınan mezankimal kök hücrelerini transdüksiyon edebilir.

Ve bu mezankimal kök hücreler, hepatositlerin yanı sıra, kemik iliğinin hücreleri de dâhil birkaç farklı hücre tipine farklılaşmaya indüklenebilir. Ve böylece farklılaştırılmış hücre türleri içerisinde potansiyel olarak faktör VIII yapımı gerçekleştirilebilir. Bu ologöz yolla yapılabilir, kök hücreler hastadan alınır ve ex vivo manipüle edilerek daha sonra faktör VIII ile birlikte, faktör VIII proteini salgılayabilecekleri hastaya geri verilir.

Bu daha önce hayvanlar üzerinde yapıldı ve aslında insanlar üzerinde de gerçekleşti ancak tamamen başarılı şekilde değil, neredeyse 20 yıl önce Roth ve çalışma arkadaşlarından, cilt biyopsisinden fibroblastları çıkartabildiklerini, bunları in vitro büyüttüklerini, faktör VIII genine eklediklerini ve periton boşluğuna tekrar implantasyon yaptıklarını gösteren bir makale ortaya çıktı. Sirkülasyonda kısa bir süreliğine bir miktar faktör VIII aktivitesi...



...gördüklerini düşünmüşlerdi ancak bunun hastalar için terapötik faydalarını takip etme noktasına gelmediler. Şimdi bahsedeceğim yaklaşımda, endotel hücreler faktör VIII ekprese edebilir. Karaciğerin sinüzoidal endotelial hücreleri, faktör VIII'i ekprese edebilen doğal bir hücre türüdür. Ve otologöz kök hücreleri, hastanın dolaşımından indüklenmiş pluripotansiyel kök hücrelerden çekilebilir.

Bir lentiviral vektör kullanılarak faktör VIII geni transdüksiyon yapılır. Bu hücreler daha sonra endotelial hücrelere farklılaştırılabilir, hastaya geri verilebilir ve hemofilik fenotipi kurtarabilir. Bunların kavramsal faydaları oldukça açık, oldukça basit. Bunları uygulamaya indirgediğimizde veya uygulamaya indirgemeye çalıştığımızda çok daha zorlu hâle geliyorlar. Ancak yine de, bu hayvanlar üzerinde gerçekleştirildi ve hayvanlar bu hücrelere sahip olduklarında faktör VIII'in terapötik seviyelerini sağladılar.

Ve son bir deneyler dizisinde, hepatosit benzeri hücreler indüklenmiş pluripotansiyel kök hücrelerden üretilebildi. Ve buradaki yaklaşım, hastalardan periferik kan mononükleer hücreler almak, onları transkripsiyon faktörlerini kullanarak tekrar programlamak, potansiyel olarak küçük molekülleri eindüklenmiş pluripotansiyel kök hücrelere, faktör IX geni içerisine koymak için gen düzenlemesini gerçekleştirmek...

...farklılaşmayı hepatosit benzeri hücrelere yönlendirmek, ve daha sonra bunları karaciğerde yaşamaları için hastaya tekrar implantasyon yapmak veya periton boşluğunda yaşamaları ve önemli miktarlarda faktör IX üretmeleri olurdu. Bunlar fareler üzerinde tamamlandı. Ve hücre terapisindeki bütün bu yaklaşımlarla, hayvan modellerinde görülen bazı mantıklı sonuçlar elde ettik ve esas soru bu transdüksiyonun insanlı klinik çalışmalarda kullanılıp kullanılmayacağıdır.

Bu noktada, kısa vade içerisinde herhangi bir insanlı klinik çalışma planlanmadı. Daha fazla çalışma yapılması gerekiyor. İnsanlarda lentivirüs terapisi içerisinde hematopoetik kök hücrelerle açık bir IND geliştirildi. Özellikle trombositlerde faktör VIII geni ekspresyonunu içeriyor. Yani, lenti faktör VIII ile kök hücrelerine girmek, bunları transdüksiyon etmek, onların çeşitli hücre türlerine...

...farklılaşmalarını sağlamak, ancak faktör VIII'in olgun trombositler içerisinde üretilmesine izin veren bir faktör VIII promotörü koymak. Bu yaklaşım birkaç hayvan model üzerinde gösterildi ve şu anda açık bir IND'ye sahip. Ne yazık ki, bu tür bir yaklaşımla, transdüksiyon edilen düzeltilmiş gen hücrelerinin geri girebilmesi ve bir niş oluşturması için kemik iliğinde bir alan açılması gerekir.

Ve bu, büsulfan gibi sitotoksik bir maddenin kemik iliğinin bir kısmını yok etmek için kullanılması gerektiği anlamına gelir. Risk fayda oranı bağlamında bazı endişeler var ve bu yüzden bu işlemin çok dikkatli ve yavaş bir şekilde planlanması ve hastanın kemik iliğinin ablasyonundan herhangi bir zarar doğmamasını sağlamak gerekir. AAV'ye geri dönersek ve bazı eksikliklerine bakacak olursak, vektör geliştirmelerine ihtiyacı olduğunu belirtmişim...



...AAV tedavisinin etkinliğini, değişkenliğini ve dayanıklılığını büyük ölçüde ele alması gereken geliştirmeler. Genlerin alternatif yollarla aktarımından, lipid nanoparçacıklar ve yeni geliştirilen lentivirüsler gibi AAV olmayan aktarımlardan bahsettim. Ve en azından lentivirüsler için, kısa zaman içerisinde klinik deneylerde yer almalılar. Ve daha sonra ise elimizde gen terapisi ve gen düzenlemesi ile birleştirilmiş hücre terapisi var, ve öyle görünüyor ki...

...yeni faktörler sağlamakta ve yeni hücrenel faktörlerin faktör VIII veya faktör IX üretiminde oldukça etkili olabilir ancak daha prelinik modellerden klinik konseptlere geçiş yapılamadı. Dinledięiniz için teşekkür ederim.

