

Barbara Konkle: Ben Barbara Konkle. Washington Üniversitesi'nde çalışan bir klinik tıp profesörüyüm ve aynı zamanda Kanama Bozuklukları bölümünün eş direktörü olduğum Bloodworks Northwest'in Bilim Dairesi Başkanıyım. Bugün gen terapisi, hemofili ve özellikle Adeno İlişkili Viral veya AAV Vektör Gen Terapisi ve bunun hemofili tedavisinde uygulanışı hakkında konuşacağım.

Öğrenme hedefleri, hem hemofili A hem de hemofili B için gen terapisi uygulamasında düzenlenen klinik deneylerinin temel özelliklerini belirlemektir. Gen terapisini düşündüğümüzde oldukça basit olduğunu görüyoruz. AAV vektörün içine koyulan bir gen, daha sonra periferel olarak enjekte ediliyor. Ve daha sonra bahsedeceğimiz vektör ve promotör hızlandırıcılar nedeniyle...

...yine daha sonra bahsedeceğimiz hedef hücre olan karaciğere yöneliyor. AAV temelinde kromozom dışıdır ve protein daha sonra üretiliyor. Hedef hücrede ne gerçekleştiğini bilsek de, bizim için hâlâ bir kara kutu olan ve daha fazlasını idrak etmemiz gereken birçok bilinmez var. Gen terapisinde çok fazla sayıda hayvan modeller kullanıldı ve şu anda farklı hastalıklar için 200'ü aşkın insan deneyi...

...geçtiğimiz 30 yıl içerisinde yürütülen AAV temelli gen terapisini kullanıyor. Yani özel olarak yukarıda gösterilmiş olan virüs, doğal fenotip virüstür. Vektör için rep ve cap genleri çıkarılmıştır. Doğal (yabanıl) AAV parvo virüs ailesinin bir üyesidir. 4.7-kb monokataner bir DNA genomuna sahip.

Replikasyonu yeterli olmadığı için yardımcı bir virüse ihtiyacı var. Ve aslında ismini alış hikâyesi de buradan gelmektedir, adenovirüs kültürünün bir kontaminantı olarak keşfedilmesi dışında adenovirüs ile başka hiçbir bağlantısı bulunmamaktadır. Virüs nonpatojenik ve doğal olarak insanlara enfekte oluyor. AAV vektörlerinin replikasyonu yetersiz.

Bir sonraki slaytta göreceğimiz üzere, hem doğal olarak oluşan hem de biyomühendislik ile üretilen vektörler var. Viral kapsid, vektörün gittiği yeri, doku tropizmini yönetir. Vektörün uzun süreli ekspresyona ve post-mitotik hücrelere sahip olduğu, genelde entegre olmadığı, ve burası oldukça önemli, bugüne kadar hayvan modellerinde ve insan deneylerinde iyi bir güvenlik profiline sahip olduğu belgelendi. Daha önce belirtildiği gibi, AAV'ye maruz kalıyoruz.

Popülasyonun %30 ila %50'si AAV antikorlarına sahip. Ve en yaygın olarak AAV2 serotipi karşıtı olana. Hemofili eklem bilimsel çalışmasının bir parçası olarak, zaman içerisinde 62 erkek çocuktan toplanan ve hayatın erken dönemlerinde AAV seropozitifliğinin gelişimine bakılan güzel bir çalışma vardı.

Ve sağda bulunan grafikte gösterildiği gibi, bu erkek çocukların AAV'ye maruz kaldığını görüyorsunuz. Bu çalışmada özellikle AAV2, AAV5 ve AAV8



üzerinde duruldu ve en yaygın olarak AAV2'ye maruz kalındığını görebiliyoruz. Bu vektörleri hemofili tedavisinde kullanmak için yıllar içerisinde ekspresyonu geliştirmek için çalışmalar yapıldı. Başlangıçta, kapsidlere verilen bağışıklık yanıtının boş kapsidlerin çıkarılmasıyla azaltılabileceği endişesi vardı...

...kulağa iyi bir fikir gibi gelen ve muhtemelen de öyle olan bu düşüncenin genel bağışıklık yanıtını modüle edip etmediği netleşmedi. Farklı AAV serotiplerinin kullanımları var. Başlangıçta AAV2, daha sonra ise diğerleri kullanıldı, ortada daha az seropozitifliği ve popülasyon olmasının yanı sıra değişen doku tropizmi için kullanımı var. Karaciğere özgü promotörlerin ve karaciğere hedeflendiğinden emin olmak için regülatör elementlerin optimizasyonunda kullanımı var.

Şekilde bir CMV promotörü gösteriliyor fakat diğer promotörler kullanılıyor. Bilim insanları ayrıca Faktör VIII ve Faktör IX'u arttırmak için kodonu optimize ediyor. Ve şu anda tek bir örnek olan 2 modifikasyon bulunuyor, bunlardan Faktör VIII için olan 1'i; AAV'ye sokulabilecek bir boyut olmasını sağlamak için B domain'i silinmiş Faktör VIII'i kullanmaktır.

Ve bir diğeri de Faktör IX'daki Padua değişkeni, bu 1 amino asit değişikliği çok yüksek Faktör IX etkinlik seviyelerine sahip Padua, İtalya'da yaşayan bir aile tarafından keşfedildi. Etkinlik seviyelerinin yüksek olmasının nedeni bu 1 değişkendi. Ve böylece, göreceğimiz gibi, Faktör IX kaset taşıyıcısına enjekte ederek Faktör IX'un spesifik aktivitesini belirgin şekilde artırabiliriz.

Hemofili üzerindeki ilk AAV aracılı çalışma aslında kas içi enjeksiyonlardı. Bu, Philadelphia Çocuk Hastanesi'nde gerçekleştirildi. Ve gerçekten sistemik bir ekspresyon yoktu. Fakat ilginçtir ki, geri dönüp kasa biyopsi yaptıklarında, kalıcı Faktör IX gen ekspresyonu bulundu. İlk karaciğer infüzyonu bir AAV2-Faktör IX yapısı ile gerçekleştirildi ve sağda bulunan grafikte (yayından alınmıştır) gösteriliyor.

Ve yüksek doz kullanıldığında, Faktör IX başlangıçta gösterildiği kırmızı çizgiden yaklaşık %12 civarında arttı ve bu inanılmaz derecede heyecan vericiydi. Fakat daha sonra özellikle ALT'de, karaciğer enzimlerinde artış oldu ve bu Faktör IX ekspresyonu azalmasıyla ilişkilendirildi. Ve bu oldukça şaşırtıcıydı, zira çalışmalar köpek modellere dayanıyordu.

Ve bu köpeklerde gerçekleşmediği için, insanlarla köpeklerin bir olmadığını gösteriyordu ancak yine de keşfedilmesi şaşırtıcı olan bir durumdu. Daha sonra, önceden mevcut AAV2 antikorlarına sahip bir hastaya infüzyon uygulandı ve hasta muhtemelen bu sebeple herhangi bir yanıt göstermedi ve bağışıklık yanıtını daha iyi anlayabilmek için tekrar başka bir hastaya infüzyon uygulandı.



Ve yine, karaciğer fonksiyon testlerinde artış varken, Faktör IX ekspresyonu yoktu. İlk uzun vadeli ekspresyon St. Jude/UCL çalışmasında elde edildi ve sağda gösterilen grafik onların yayımlarından alındı. Sahip olduğumuz ilk hasta takibi 8 yıla kadar çıkıyor ve bireyler ekspresyon göstermeye devam ediyor. Altın renkli çizgiler faktör seviyelerini, yukarıda bulunan mavi oklar ise faktör infüzyonlarını gösteriyor.

Faktörün infüzyonla beraber yukarı ve aşağı bir yol izlediğini fakat daha sonra dozun %2'den %6'ya yükseltildiğinde faktör ekspresyonunun stabil kaldığını ve bunu devam ettirdiğini görebilirsiniz. Bu deneyde öğrendiğimiz önemli bir nokta ise, hasta 5'te görebileceğiniz ve yeşil ok ile gösterildiği üzere ALT'de keskin bir artış olduğunda prednizon terapi uygulanmış olması.

Ve bu şekilde prednizon tedavisi yoluyla faktör aktivitesinin korunabildiği gösterildi. Ve bu yaklaşım bugün bütün gen terapisi deneylerinde kullanılıyor. Devam etmekte olan Faz 1/2 ve Faz 3 deneylerinden oluşturulmuş bir tablo görüyoruz. Kapsanmayan bazı şeyler olabilir. Eksiksiz olması için değil, alanın nerede olduğunu gösterebilmek amacıyla oluşturuldular.

Ayrıca bunlar hızla ilerleyen bir alana ait olduğu için, güncelliklerini yitirmiş olabilirler. İlk gösterilen hemofili A ve daha sonraki 3'ü sponsorlarıyla ve farklı isimleriyle hemofili B. Vektörler, fark edeceğimiz gibi farklı serotiplere sahip ayrıca Spark 100, AAVhu37 ve Ultragenyx gibi mühendislikle üretilmiş bazı vektörler var.

Üretimde kullanılan hücreler böceklerden ya da memelilerden alınıyor. Böceğin önemi, onların daha fazla üretebilmesi ancak ortada farklı bir post-translasyonel modifikasyon söz konusu. Bu noktada, bu durumun bir değişiklik yapıp yapmadığını bilmiyoruz. Bir sonraki sütunda deneyin aşaması gösteriliyor. Aralarında en çok ilerleme kaydeden, BioMarin. Faz 3'te, kilogram başına 2 doz vektör genomu veriliyor.

Her ne kadar çalışma yüksek dozla başlasa da Faz 1/2'de, Faz 3'te kullanılacak dozu belirlemek için artan bir dozlama yapılır. Spark, Faz 1/2, Faktör VIII güncel olarak en az 6 ay boyunca, tedavi rejimi ve herhangi bir kanamayı hastanın elektronik günlüğüne not etmek veya eklemek amacıyla uygulanmakta olan bir gözlem aşamasındadır...

...böylece gen terapisi uygulandığında hastanın kendi verileri, gen terapisinden önceki verileriyle karşılaştırılabilir. Hemofili B'de Faz 3'te olan 2 deney bulunmakta. Faz 1/2'deki Spark deneyinin Faz 3'teki versiyonu Pfizer ve sonra yine Faz 3'te uniQure'un bir deneyi var.

Ve öncesindeyse Freeline çalışması var. Çalışma sonuçları bize bugüne kadar ne anlattı? Birkaç deneyin yayımlanmış veya paylaşılmış



sonuçlarından bazıları, durumların nasıl olduğunu gösterecektir. AAV Faktör IX Padua, AMT-061 deneyini görüyoruz ve bu deneyde...

...şekilde gösterilen sol taraftaki AMT-060 Faz 1/2 özelinde bir ilkti ve %7,5 civarında bir Faktör IX seviyesine ulaşıldı. Hemofili alanında çalışmaya ilk başladığımda bu çok inanılmaz bir şeydi hatta hemofili alanında çalışmalar yaparken, gen terapisiyle hastaların durumunu hafifletebilirsek, bunun bir başarı olacağını düşünüyorduk. Ve bu gerçekten bir başarıydı.

Eğer %6'lık seviyelerin devam ettiği deneylere bakacak olursak, bu hastaların infüze edilmediğini ve kanamadıklarını görüyoruz. Ancak daha yeni deneylerin daha yüksek seviyelere ulaşabildiğini biliyoruz. Yaptıklarını anlatacak olursak, vektörlerini aldılar, Padua varyantını eklediler ve 3 deneye infüze ettiler, burada 36 hafta süresince alınan sonuçlar görülüyor ve ilerleyen zamanlarda ASH'de veriler sunmaya devam ettiler.

Ve bu 3 denekte, 36 hafta boyunca ortalama Faktör IX aktivitesi %45'ti. Bu deneydeki ilginç noktaysa immünsüpresyona ihtiyaç duymamalarıydı. Ve hastaların titre edilen AAV5 seropozitiflikleri düşüktü, bu da antikor tepkisine dair deliller varsa, hastalara bazı vektörlerin infüze edilip edilmeyeceği sorusunu gündeme getiriyor.

Ve bu çalışma Faz 3'te bu dozda. 29 aya kadar süren ekspresyonun görüldüğü AAV Faktör IX Padua Spark-9001 çalışmasının 2 yıldaki gelişimi burada görülüyor. Biraz değişkenlik ve ekspresyon gösteriyor, ama bütün ekspresyon düzeyleri klinik olarak anlamlı etkiler yaratıyor, gerçekten kanamayı önlediği ve faktör infüzyonu ihtiyacını ortadan kaldırdığı gösterilmiş.

Bu BMN 270 Faz 1/2'ydi, şu anda kilogram başına 6×10^{13} vektör genomu dozunun kullanıldığı Faz 3'e geçti. Ve bunlar kromojenik ölçümlerden elde edilen 3 yıllık sonuçlar. Başlangıçta bu vektör uygulamasında, Faktör VIII normal aralığı süresince bazı tutarsızlıklar vardı, fakat bunlar zamanla azaldı.

Ama yine de, ortanca aralığın 40 olması, gerçekten olağanüstü bir durum. Ve bu, en çok ilerleme kaydeden deney olduğu için ne olacağını görmek için sabretmemiz gerektiğini düşünüyorum. Diğer Faktör VIII deneylerinde nasıl gelişmeler yaşanacağını göreceğiz ve şu anda bunlarla ilgili bir çıkarım yapamıyoruz. Bir diğer Faktör VIII gen terapisi deneyi ise Alta deneyi. Ve bunlar, yakın zamanda gerçekleşmiş ASH toplantısında sunulmuş güncel sonuçlar.

Bu Faz 1/2. Ve en üst kısımda gördüğünüz üzere, bunlar 2^{12} 'lik doz verilen deneklerdi. Fakat bir topluluğa verilen en yüksek doz 3×10^{13} 'tü. Bir doz etkisi var. Ve sol tarafta sonuçların kolayca anlaşılabilirdiği lineer bir grafikte Faktör VIII aktivitesini görebilirsiniz.



Ve logaritmik ölçüm grafiğindeyse, yüksek doz verilen kohortta yer alan hastaların normal aralıklardaki seviyelere ulaştığı gösteriliyor. Tekrardan söylemekte fayda var, bu çok yeni ve denekleri zaman ilerledikçe gözlemlemeye devam etmemiz gerekiyor. Ve bu Faktör VIII, Pfizer tarafından yürütülen Faz 3 deneyinde kullanılacak. Yani özetle, AAV gen terapisiyle ilgili bazı olumlu şeyler de var, bazı zorluklar ve bilinmeyenler de var.

Sorunlardan biri, hastaların uygunluğunun sınırlı olması. Güncel olarak kabul edilen deneklerin, geçmişte asla inhibitör geliştirmemiş olması gerek. Yine de inhibitörleri incelemek için birçok çalışma yapıldığını söylemem gerek. Yani gelecekte büyük ihtimalle bu engel aşılacak. Onlar, yetişkin erkekler. Genel olarak Faktör VIII için, %1'den daha azına ve...

...Faktör IX içinse, %2 veya daha azına ihtiyaç duyarlar. Önceden mevcut AAV karşıtı antikor geliştirmiş hastalar dâhil değildir. uniQure tarafından yapılan hemofili B çalışmasında titre edilmiş vektör pozitivitesi düşüktür. Ve tarafsız olarak konuşmak gerekirse, bunun titreyle mi ya da serotiple mi alakalı olduğunu tam olarak anlamadığımızı düşünüyorum.

Gelecekteki hasta hedefleri, inhibitöre sahip veya önceden inhibitör geliştirmiş hastalar ve Spark'ın bir çalışmasının olduğu ve çalışma için protokoller üzerine çalışan diğer şirketler olduğunun duyumunu aldım. Önceden mevcut AAV karşıtı antikor, sorun teşkil ediyor ve daha az şiddetli hemofiliye sahip hastalar ve gençler gibi birçok hastanın tedavisine engel oluyor. AAV'nin entegre olmayan bir yapıya sahip olması ve büyüyen bir karaciğerde kaybolacak olması bir sorun teşkil ediyor.

Şu anda bu durum küçük çocuklarla sınırlı ve etkinliğini kaç yaşın altına düştüğünde kaybedeceğini bilmiyoruz. Şiddetli hemofili hastası olan kadınlar var ve bazı protokollerde kadınların da dâhil edilmesiyle bu durum esneklik kazanmaktadır. Ve ekspresyonunu kaybeden veya çalışmanın erken aşamalarında bir sonuç elde edemeyen hastalar için AAV terapisinde bir yanıt bulunmuyor.

Ve gen terapisi ve hemofili için bu aşamaya gelmiş başka bir yaklaşım yok. Peki riskler neler? Şu anda hemofili için gerçekten iyi bir terapiye sahibiz. Bunu hastalarımıza uygulamayı göz önüne alırken, hastaya olan faydaların risklerden daha yüksek olduğuna emin olmalıyız. Terapi bazı bilinen risklere sahip.

Bunlardan biri, neredeyse tüm çalışmalarda ve bazı hastalarda görülen kısa vadeli karaciğer toksisitesi. Ve bu genel olarak kısa süreli steroidlere yanıt verdi. Ancak bazı çalışmalarda, birkaç hastanın daha uzun süreli immünsüpresyon tedavisine ihtiyaç duyduğunu biliyoruz ve bu da toksisite sorununu gündeme getiriyor. Hastalar eğer virüse maruz kalırlarsa anti-AAV antikorları üreteceklerdir ve bu noktada ek doz almalarını engelleyecektir.



Ayrıca biliyoruz ki ortada, kısmen anti-kapsid T hücre bağışıklık yanıtıyla açıklanabilen geniş bir bireyler arası ekspresyon, değişkenlik ve ekspresyon (ekspresyon değişkenliği) var. Ancak bu kanıtlara sahip olmayan ve bağışıklık sistemleri yanıt vermeyi reddeden veya azalan hastalar da olduğunu biliyoruz. Bunun neden olabileceğine dair farklı teoriler var ancak bu noktada bunları idrak edemiyoruz.

Bunlar da bilinmeyenler kategorisine giriyor. Ortada uzun vadeli bir karaciğer toksisitesi olup olmayacağını bilmiyoruz. Şu anda buna dair bir kanıtımız yok fakat bu takip edilmesi gereken çok önemli bir nokta haline gelecek. AAV, bahsettiğim gibi, çok düşük bir entegrasyon oranına sahip. Ancak kilogram başına 10^{13} viral genom vermekteyiz, bu da gerçek bir sayı ortaya koyuyor.

Farklı hastalıklar için birden çok çalışmada AAV ile tedavi edilen çok sayıda hasta olduğunu bilmenin iç rahatlatıcı olduğunu düşünüyorum fakat bu yine de yakından izlememiz gereken bir süreç. Germ hattı transferine dair bir kanıt yok. Hayvan modelleri bunu desteklemiyor. İnsan çalışmalarında, semende temizleyici vektör tespit edilmiştir ancak bunun spermin içerisinde bulunduğu dair bir kanıt yoktur. Bu iç rahatlatıcı.

Yani özetle, AAV aracılı gen terapisi, hemofili hastalarında Faktör VIII ve Faktör IX seviyelerini artırmada başarılı olmuştur. Ve elde edilen tüm farklı seviyelerde, faktör kullanımını ve kanamaları önemli ölçüde azaltmıştır. Hemofili ve diğer AAV çalışmalarının bugüne kadar çok iyi bir güvenlik profiline sahip olduğu görülmektedir. Ancak, güvenlik uyarılarına bakarak bu konunun uzun vadeli takibine önem vermeliyiz.

Ayrıca, bu ekspresyonun yıllar içerisinde geçici olup olmayacağını anlamak için uzun vadeli etkinlik verilerine ihtiyacımız var çünkü bu noktada ekspresyonun yıllarca devam ettiğini görebiliyoruz. Bu devam edecek mi? Yoksa geçici bir süreç mi? Bu konu hakkında uzun vadeli verilere ihtiyacımız var. Daha sonra AAV yaklaşımında farklı modifikasyonlar ve diğer vektörlerin kullanımıyla, küçük çocukları da kapsayan daha geniş bir hemofili hasta popülasyonunu tedavi edebiliriz.

Teşekkür ederim.

