

# Gensko zdravljenje hemofilije: ključna načela



# Vsebina

- 04** Genska medicina
- 06** Načela genskega zdravljenja
- 08** Kako se uporablja gensko zdravljenje?
- 10** Zakaj je hemofilija dober kandidat za gensko zdravljenje?
- 12** Vektorji genskega zdravljenja
- 14** Razmisleki o izbiri kapside in transgena
- 15** Razmisleki o učinkoviti transdukciji
- 16** Razmisleki o stabilni ekspresiji gena
- 17** Razmisleki o prihodnosti
- 18** Literatura

# Genska medicina

Obstajajo trije različni pristopi h genski medicini. Na široko jih lahko opišemo kot gensko zdravljenje, gensko urejanje in epigenetiko.<sup>1-4</sup>

## Gensko zdravljenje

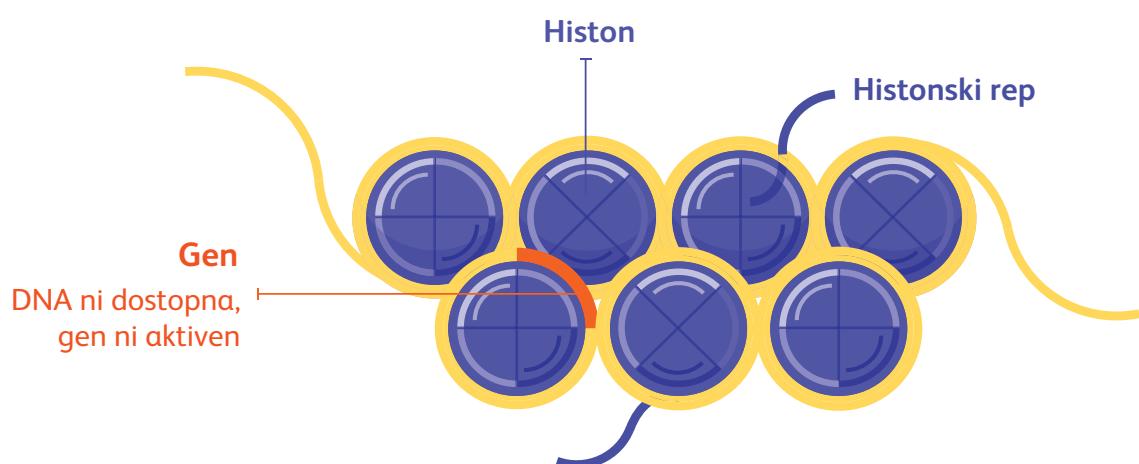
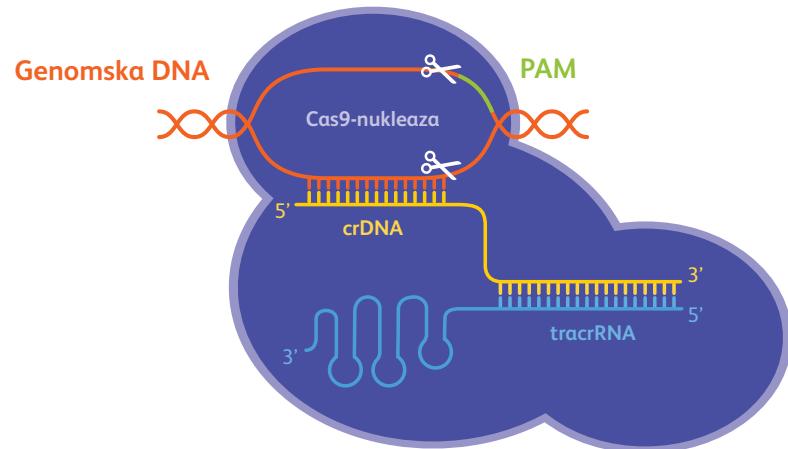
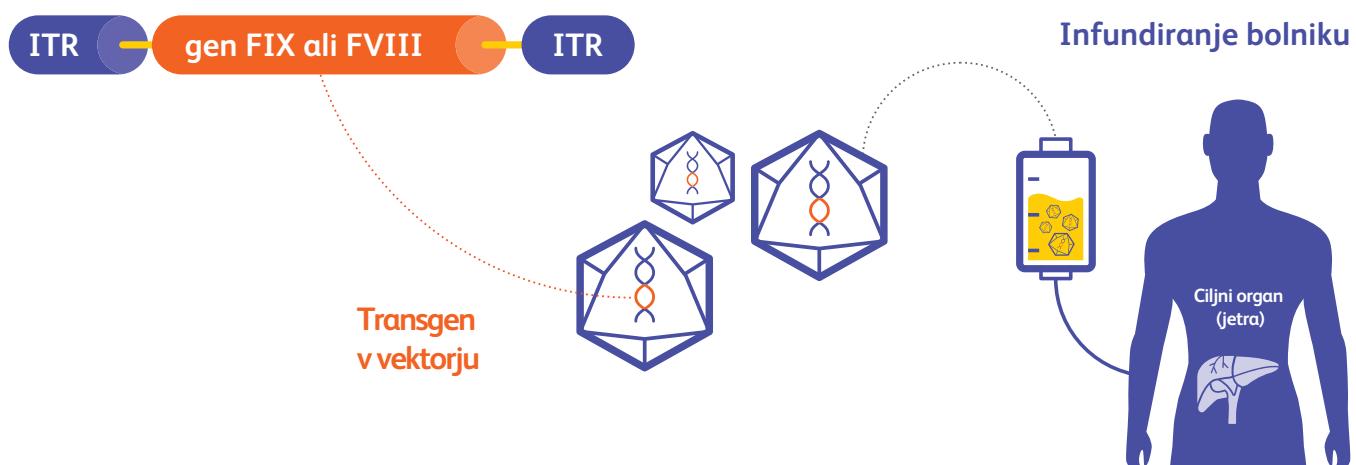
- Pri genskem zdravljenju se v bolnika vnese delajoč gen.<sup>1</sup>
- Uporablja se lahko *in vivo* ali *ex vivo*.<sup>1</sup>

## Gensko urejanje

- Gensko urejanje spremeni bolnikovo DNA s trajnim dodatkom, odstranitvijo ali spremembo gena.<sup>2</sup>
- Za natančne spremembe DNA se uporabljajo za mesto specifične, ciljno usmerjene nukleaze.<sup>2</sup>

## Epigenetika

- Epigenetski načini spremenijo ekspresijo gena, ne da bi trajno spremenili genetski kod celice.<sup>3</sup>
- Med epigenetskimi prilagoditvami so spremembe histonov in metilacija DNA.<sup>4</sup>

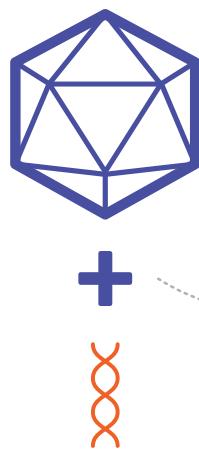


# Načela genskega zdravljenja

## Kaj je gensko zdravljenje?

### Kapsida

- > Kapsida je beljakovinski plašč virusa, ki varuje genetski material in medsebojno deluje z okoljem gostitelja.<sup>5</sup>



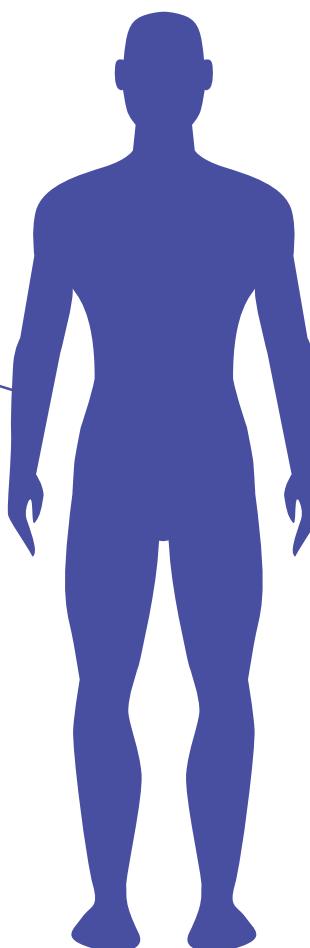
### Transgen

- > Transgen je zunanje zaporedje DNA, ki se vnese v genom gostitelja (npr. gen F8 ali F9).<sup>1</sup>

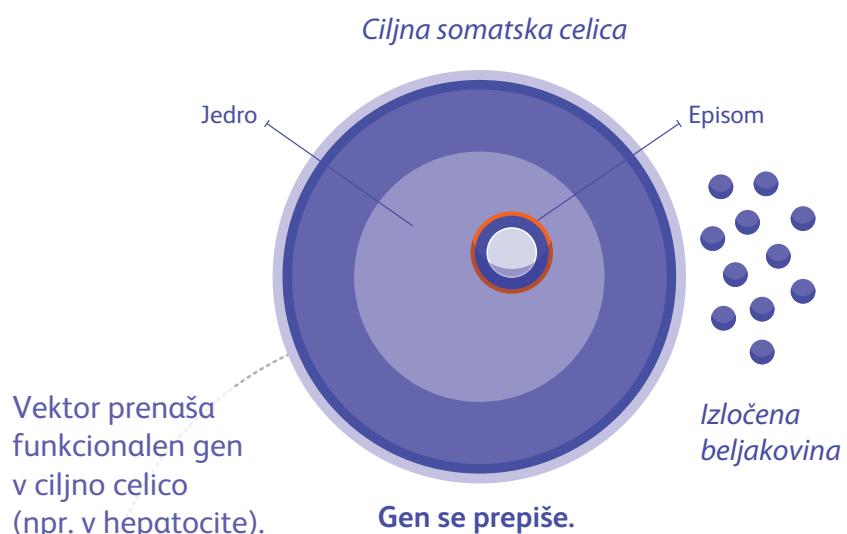
### Gen, inkapsuliran v vektorju

- > Uspeh genskega zdravljenja je odvisen od učinkovitih nosilcev prenosa genov, imenovanih "vektorji".<sup>6</sup>
- > Vektor je transgen, inkapsuliran v kapsidi. Vektorji temeljijo na virusni osnovi, vendar niso virusi.<sup>7</sup>
- > Trenutno sta predmet raziskav dve glavni vrsti vektorjev:<sup>1,7</sup>
  - Retrovirusi (vključno z Lentivirusi),
  - AAV (adenoasociirani virus).
- > **AAV je vektor izbora za gensko zdravljenje hemofilije.**<sup>8</sup>

### Prenos gena z intravensko infuzijo



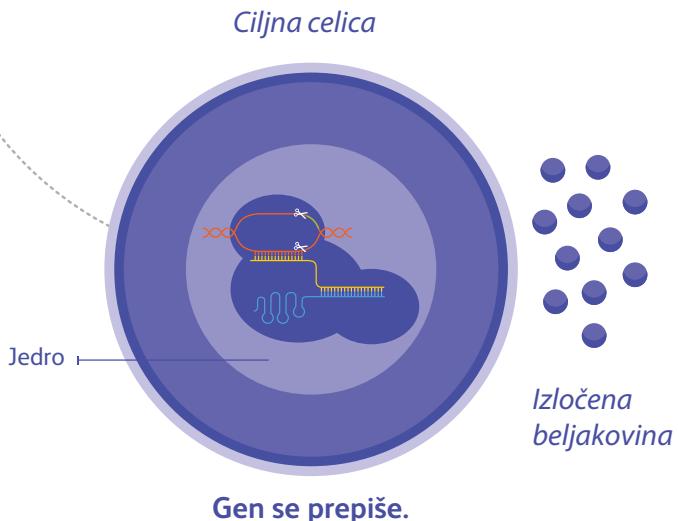
## Gensko zdravljenje



**Gensko zdravljenje:** Dodatek funkcionalnega gena, ki ne prehaja na hčerinske celice.

- Transgen obstaja kot episom<sup>8</sup> (del DNA, ki lahko obstaja in se podvaja samostojno ali v jedrni citoplazmi) in nadomesti ali dopolni okvarjeni gen.<sup>8,9</sup>  
Po vstopu v celico episom obstaja v jedrni citoplazmi<sup>9,10</sup>
  - DNA se pretežno ne integrira.<sup>6,9</sup>

## Gensko urejanje



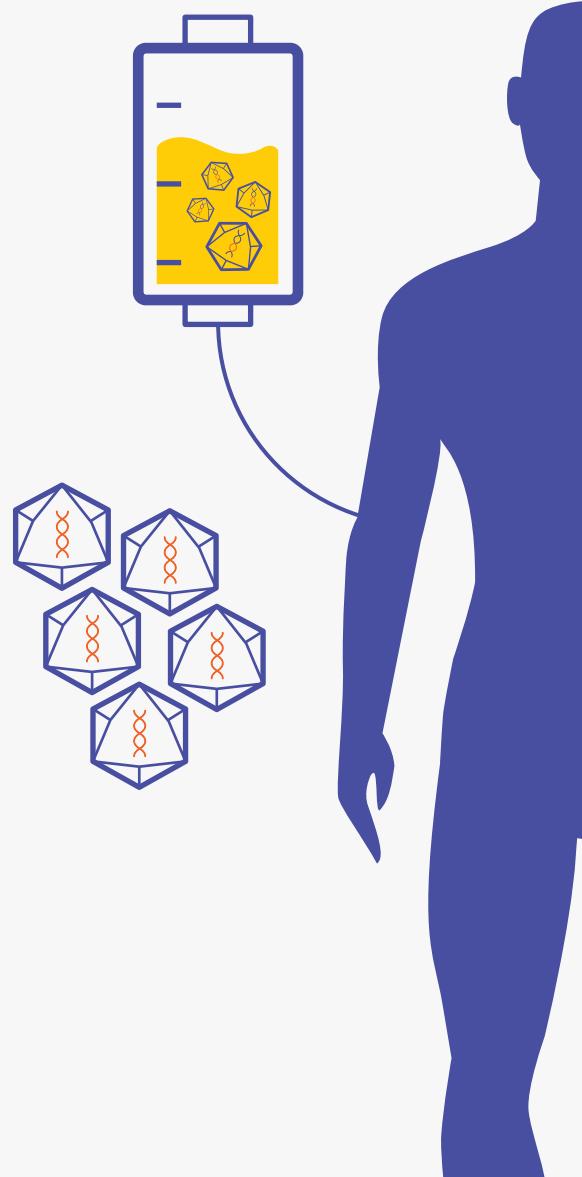
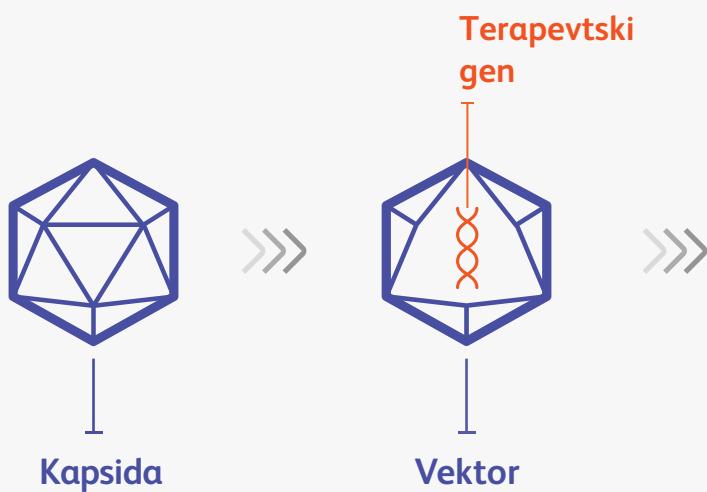
**Gensko urejanje:** Trajna odstranitev, sprememba ali dodatek gena.<sup>2</sup>

- DNA organizma se spremeni z dodatkom, odstranitvijo ali spremembijo genskega materiala na natančnih mestih v genomu.<sup>2</sup>

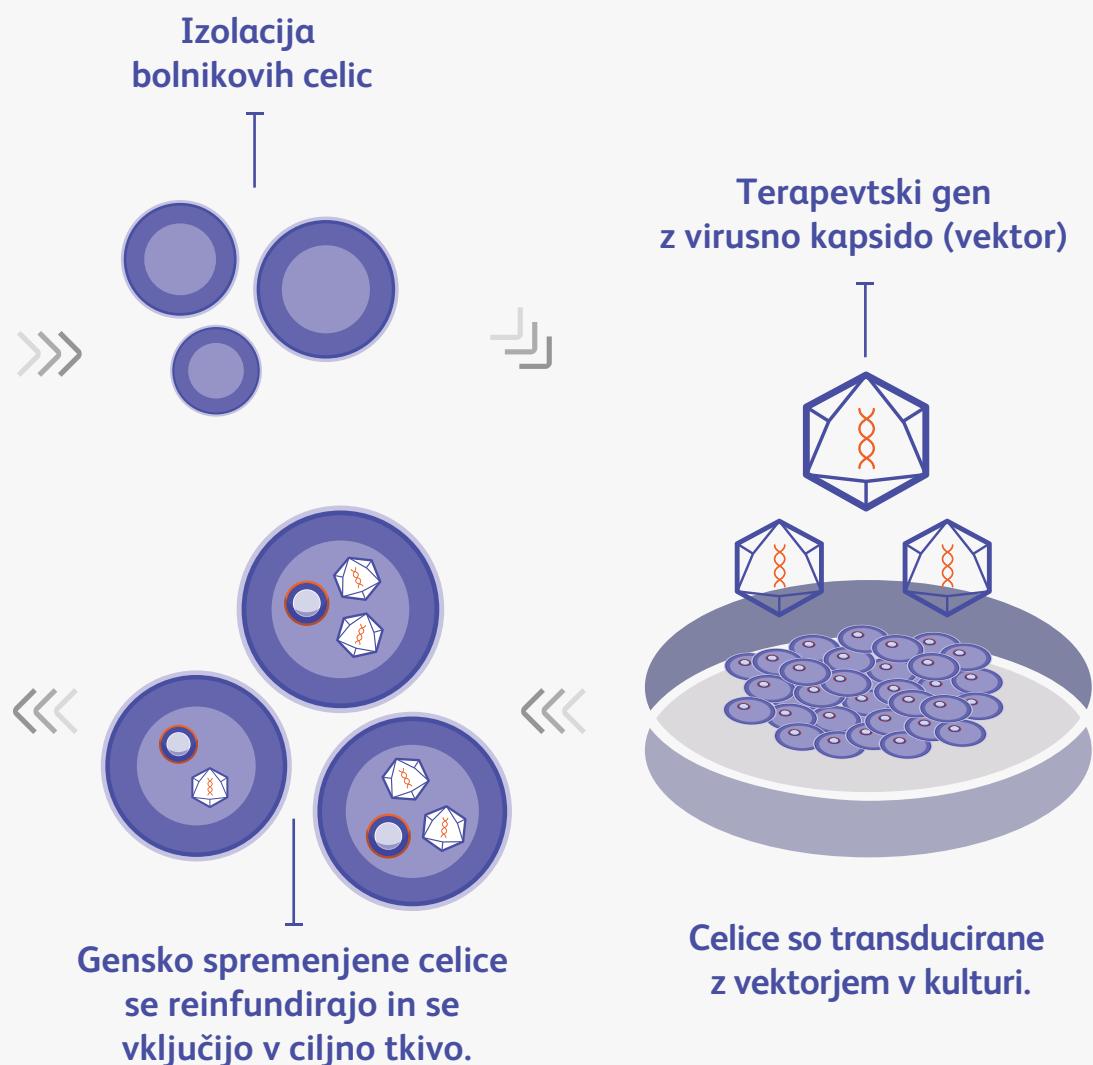
# Kako se uporablja gensko zdravljenje?

## > *In vivo*<sup>1</sup>

- › Vektor nosi terapevtski gen, dostavljen neposredno v bolnikovo telo.
- › Transdukcija dolgožive vrste celic, pri čemer integracija ni nujno potrebna.



## > *Ex vivo*<sup>1,11</sup>



# Zakaj je hemofilija dober kandidat za gensko zdravljenje?



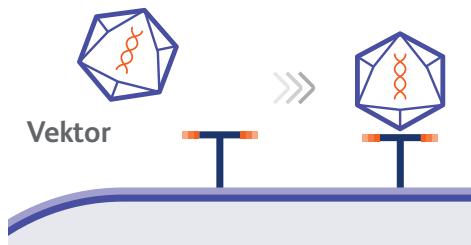
- Hemofilija A in B sta dobro opredeljeni bolezni. Vsaka od njiju je posledica mutacije enega samega gena (*F8* ali *F9*), zaradi česar primanjuje ene same beljakovine (FVIII oziroma FIX).<sup>6</sup>
  - Za terapevtski učinek morda ne bo potrebna popolna normalizacija ekspresije FVIII/FIX, saj lahko že majhno povečanje ravni faktorja v obtoku spremeni fenotip krvavitve.<sup>6</sup>
  - Klinična praksa kaže, da imajo ravni koagulacijskih faktorjev široko terapevtsko okno.<sup>6</sup>
  - Za določitev terapevtskega opazovanega dogodka (raven faktorja v plazmi) so na voljo validirani laboratorijski testi.<sup>6</sup>
  - Zaporedji genov *F9* in prilagojenega *F8* so na voljo<sup>12</sup> za vstavitev v vektorje AAV, ki delujejo kot dostavljalci genov.<sup>13</sup>
- 
- Vektorji AAV lahko nosijo DNA do največje velikosti ~5 kb.<sup>11</sup>
- Gen *F9* je razmeroma majhen (1,6 kb).<sup>14</sup>
- Gen *F8* ima 7 kb – preveč za vstavitev v vektor AAV.<sup>11</sup>
- Odstranitev domene B gena *F8* zmanjša njegovo velikost na ~ 4,4 kb – tako postane dovolj majhen za vektorje genskega zdravljenja.<sup>11</sup>

**V zgodnjih raziskavah genskega zdravljenja hemofilije B, v katerih niso uporabljali FIX Padua, je infuzija enega samega odmerka povzročila dolgotrajno terapevtsko ekspresijo faktorja, povezano z zmanjšanjem števila krvavitev in letne rabe koncentrata FIX. Te zgodnje raziskave so razkrile tudi izzive, povezane z imunskim odzivom.<sup>15</sup>**

# Vektorji genskega zdravljenja

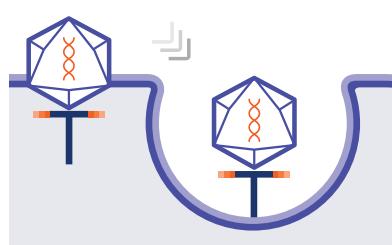
## Kako AAV dostavi transgen v ciljno tkivo?

### Vezava na receptor



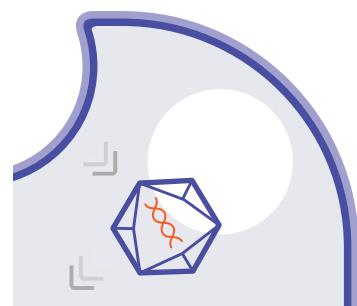
1. Vektor se veže ali pritrdi na receptorje na površini ciljne celice gostitelja.<sup>16,17</sup>
2. Obstajajo številni serotipi AAV. Vsak serotip ima beljakovine, ki se vežejo na površinske receptorje specifičnih vrst celic.<sup>18</sup> Tiste s specifičnostjo za ciljne organe je mogoče uporabiti za pomoč pri uspešni dostavi transgena.

### Endocitoza



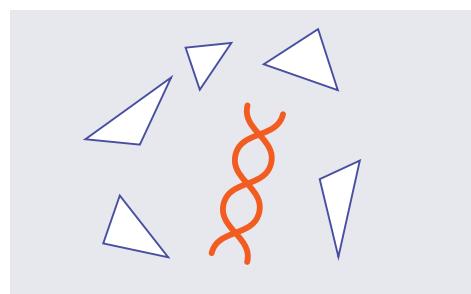
3. Vektor z endocitozo pride v ciljno celico.<sup>16,17</sup>

### Endosomski pobeg



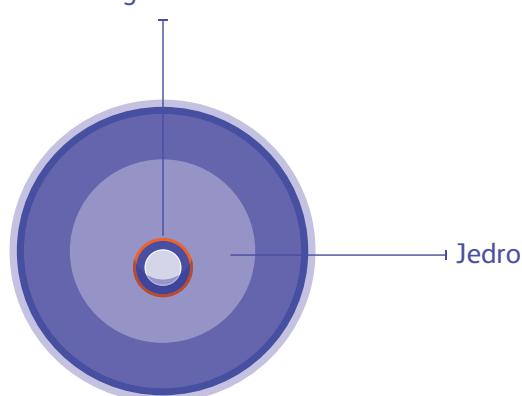
4. Vektor je premeščen od zgodnjega do poznega endosoma ter dostavljen v celično jedro.<sup>17</sup>

### Slačenje



5. Slačenje: V jedru se kapsida odstrani in sprosti genski material (transgen).<sup>16,17</sup>

### Episomski genom



6. Transgen se kopira in prepiše.<sup>17</sup> Transgen se večinoma ohrani episomsko kot konkatemer DNA (molekula DNA, sestavljena iz več kopij istega genoma, povezanih v tandem) in se pretežno ne integrira.<sup>9</sup>



## Zakaj je AAV vektor izbora za gensko zdravljenje hemofilije?

- **Ni patogen:** povezan ni z nobeno znano bolezni pri človeku.<sup>19</sup>
- **Ima okvarjeno replikacijo:** rekombinantni vektorji AAV imajo odstranjeno virusno kodno zaporedje in ohranljeno le tisto DNA, ki omogoča vstavitev terapevtskega gena v virusno kapsido, zato se vektor v bolnikovem telesu ne more podvojevati (replicirati).<sup>19</sup>
- **Se pretežno ne integrira:**<sup>19</sup> transgen v veliki meri ostaja zunaj gostiteljske kromosomske DNA in je v obliki episomov prisoten v jedru transduciranih celic.<sup>9</sup>
- **Ima zmožnost za vzpostavitev dolgotrajne ekspresije transgena:**<sup>15</sup> čeprav se ekspresija izgublja z vsako celično delitvijo, se lahko ohrani v pomitotičnih tkivih, kot so jetra.<sup>20</sup>
- **Uporabiti je mogoče specifične serotype, da je zagotovljena usmeritev do jeter:** kapsidne beljakovine lahko vodijo transgen do ciljne celice/organa.<sup>1</sup>

# Razmisleki o izbiri kapside in transgena

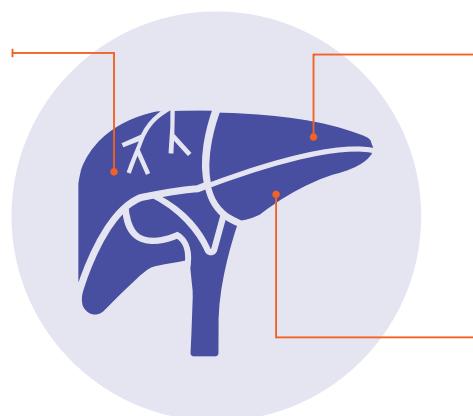
## Kako lahko optimiziramo vektor AAV?

- > Z okrepitevijo različnih značilnosti s pripravo vektorjev, ki vsebujejo domene iz različnih serotipov AAV.<sup>1,2</sup>
  - Ti "hibridni" vektorji so zasnovani za učinkovitejšo in bolj specifično dostavo v ciljne celice ali tkivo.<sup>17,18</sup>
- > Z izbiro vektorja z ustreznim tropizmom – za hemofilijo mora to biti tropizem za hepatocite.<sup>21</sup>

## Zakaj so jetra cilj za gensko zdravljenje hemofilije?

FVIII in FIX naravno nastajata v jetrih.<sup>10,22</sup>

- > FVIII naravno nastaja v endotelijskih celicah jetrnih sinusoidov.<sup>10,22</sup>
- > FIX naravno nastaja v hepatocitih.<sup>10,22</sup>



Postmitotični hepatociti živijo dolgo.<sup>22</sup>

Specifični serotipi AAV lahko podpirajo transdukcijo jetrnih celic (npr. AAV2, AAV5, AAV8 ali AAV9).<sup>1</sup>

## Kako lahko optimiziramo transgen?

- > Z uporabo genskih različic z visokospecifično aktivnostjo (npr. FIX Padua).<sup>21,22</sup>
- > S pripravo transgena za optimizacijo njegove velikosti (da ustreza omejitvam vstavitvene zmogljivosti) – npr. z uporabo FVIII z odstranjeno domeno B.<sup>22</sup>
- > Za povečanje ekspresije gena je mogoče uporabiti optimizacijo kodona in promotorja.<sup>22</sup>

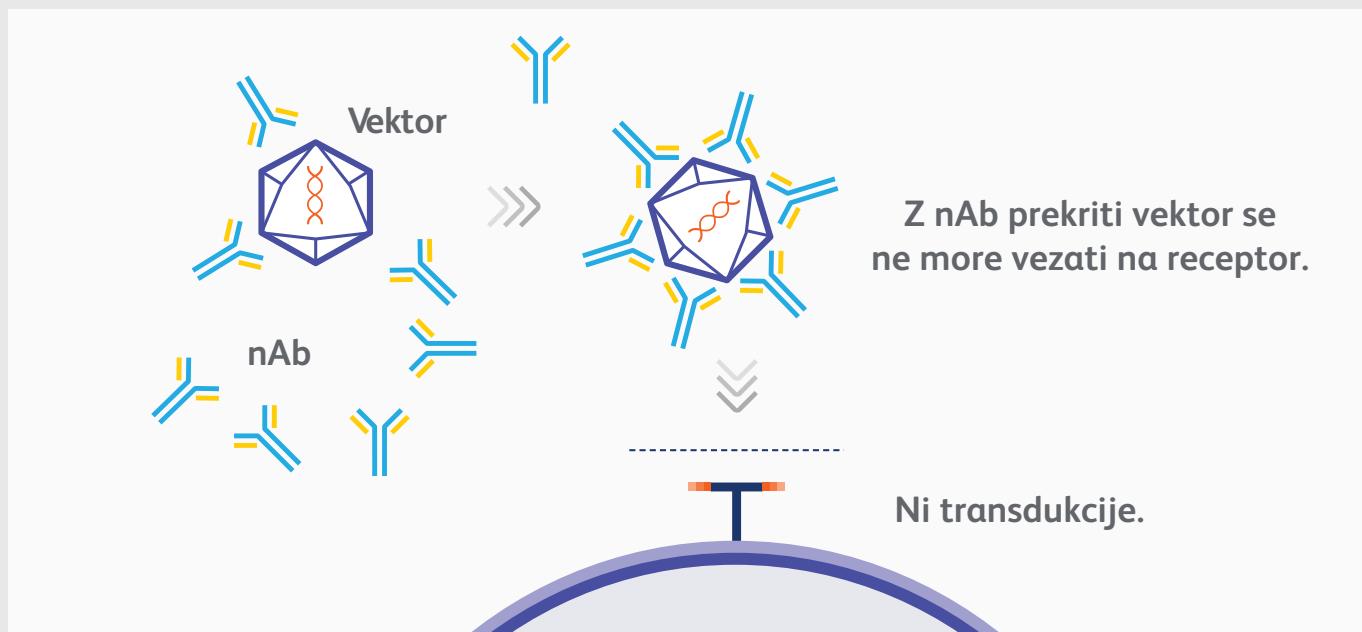
# Razmisleki o učinkoviti transdukciiji

## Zakaj je imunost pri genskem zdravljenju pomemben izziv?

- > Nekateri ljudje imajo že obstoječa protitelesa<sup>9</sup> proti AAV zaradi prestane okužbe oziroma izpostavljenosti divjemu tipu AAV.\*
- > Imunski sistem lahko sestavine vektorja in transgen obravnava kot "tujek", kar povzroči imunski odziv.<sup>8,20,23</sup>

## Kakšen je vpliv že obstoječe imunosti na gensko zdravljenje?

- > Že obstoječa specifična protitelesa proti AAV so lahko posledica predhodnih okužb z AAV<sup>19,24</sup> in so lahko nevtralizirajoča (nAb) ali nenevtralizirajoča.<sup>24</sup>
- > nAb se lahko vežejo na kapside in preprečijo transdukcijo.<sup>20,25</sup>
- > Ker lahko vsak imunski odziv na vektor vpliva na pričakovani terapevtski učinek, so v številna zgodnja preskušanja genskega zdravljenja vključevali le seronegativne bolnike.<sup>19,20</sup>



\*Ocene prevalence se za vsak serotip AAV razlikujejo glede na raziskavo. Odvisne so tudi od mejne vrednosti titra za opredelitev seropozitivnosti in od preizkusa, uporabljenega v raziskavi – preizkusi za merjenje nAb še niso standardizirani.<sup>26</sup>



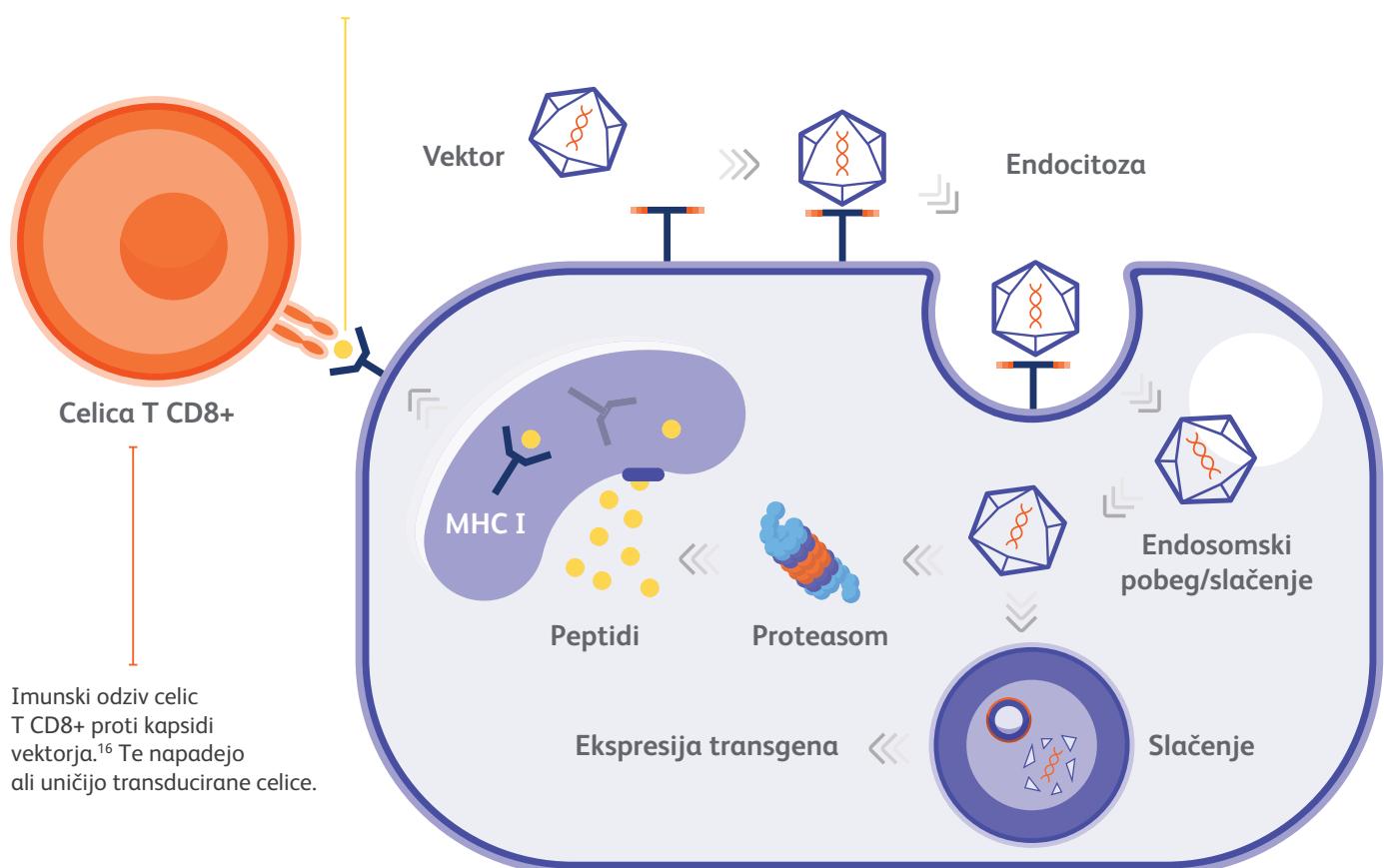
Po dajanju genskega zdravljenja z uporabo trenutnih načinov se pojavi močan humorálni imunski odziv, ki blokira nadaljnjo dostavo AAV z istim serotipom – infundiranje AAV je zato trenutno omejeno na en sam odmerek.<sup>23</sup>

# Razmisleki o stabilni ekspresiji gena

Kakšen je vpliv celičnega imunskega odziva?

Aktivirane celice T lahko uničijo transducirane hepatocite in tako povzročijo izgubo ekspresije gena.<sup>27</sup>

Epitopi (kratke verige aminokislin) kapside so na transduciranih celicah po zdravljenju prisotni le kratek čas.<sup>16,27</sup>



Imunski odziv celic T CD8+ proti kapsidi vektorja.<sup>16</sup> Te napadejo ali uničijo transducirane celice.

# Razmisleki o prihodnosti

## Kaj bi lahko prinesla prihodnost?

### Primernost bolnikov in pričakovanja glede zdravljenja

- > Upoštevati je treba opaženo interindividualno variabilnost med bolniki pri doseganju in vzdrževanju dolgoročne ravni ekspresije, saj vsi bolniki ne dosežejo enakega porasta ravni faktorja.<sup>15,28</sup>
- > Pediatrični bolniki trenutno niso primerni za gensko zdravljenje hemofilije, ker je otroštvo obdobje hitre delitve hepatocitov.<sup>20</sup> Episomska DNA se pretežno ne integrira in se navsezadnje sčasoma razredči, ko gre transducirana celica skozi ponavljajoče se cikle replikacij. Hitrost upadanja transgenske ekspresije je odvisna od hitrosti delitve celic.<sup>9</sup>
- > Trenutno je zaradi imunskega odziva mogoče gensko zdravljenje izvesti le enkrat<sup>29</sup> – bolnike je treba seznaniti s to omejitvijo.
- > Upoštevati je treba bolnikova pričakovanja glede genskega zdravljenja in njegovih izidov:
  - Pobuda COREHem je ugotovila pričakovanja glede genskega zdravljenja med različnimi deležniki, vključno s pogostostjo krvavitev, trajanjem ekspresije, ravnjo aktivnosti faktorja in kroničnimi bolečinami.<sup>30</sup>

### Dolgoročna učinkovitost in varnost

- > Kot področje raziskovanja je klinično gensko zdravljenje še vedno v zgodnji fazi.
- > Vzpostaviti bo treba dolgotrajno spremljanje in postmarketinški nadzor zdravil za gensko zdravljenje.<sup>31</sup>

### Proizvodnja v velikem obsegu

- > Razviti je treba tehnologije za proizvodnjo v velikem obsegu, skladno z veljavno dobro proizvodno prakso (cGMP), za pridobivanje potrebnih količin prečiščenih vektorjev.<sup>32</sup>

### Dostop do zdravljenja

- > V teku je delo za oblikovanje modelov "stroškov" genskega zdravljenja pri hemofiliji.<sup>20</sup>

\*Med deležniki so bili bolniki, zdravniki, raziskovalci, regulatorji, raziskovalne agencije, ocenjevalci zdravstvene tehnologije, plačniki in razvijalci zdravil.<sup>30</sup>

# Literatura

- 1 Kumar SR, et al. Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2016;3:16034.
- 2 Cox DBT, et al. Therapeutic Genome Editing: Prospects and Challenges. *Nat Med* 2015;12(2):121-131.
- 3 Lomberk GA, et al. The promise of epigenomic therapeutics in pancreatic cancer. *Epigenomics* 2016;8(6):831-842.
- 4 Cheng X. Structural and Functional Coordination of DNA and Histone Methylation. *Cold Spring Hard Perspect Biol* 2014;6:1-23.
- 5 Kantor B, et al. Methods for Gene Transfer to the Central Nervous System. *Adv Genet* 2014;87:125-197.
- 6 Lheriteau E, et al. Haemophilia gene therapy: Progress and challenges. *Blood Rev* 2015;29(5):321-328.
- 7 Thomas CE, et al. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003;4:346-358.
- 8 George LA. Hemophilia gene therapy comes of age. *Blood Adv* 2017;1(26):2591-2599.
- 9 Naso MF, et al. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *Biodrugs* 2017;31:317-334.
- 10 Evens H, et al. Haemophilia gene therapy: From trailblazer to gamechanger. *Haemophilia* 2018;24(6):50-59.
- 11 High KA, Roncarolo MG. Gene Therapy. *N Engl J Med* 2019;381:455-264.
- 12 Ohmori T, et al. New approaches to gene and cell therapy for hemophilia. *J Thromb Haemos* 2015;13(1):S133-S142.
- 13 Fisher KJ, et al. Transduction with Recombinant Adeno-Associated Virus for Gene Therapy Is Limited by Leading-Strand Synthesis. *J Virol* 1996;70(1):520-532.
- 14 Doshi BS, Arruda VR. Gene therapy for hemophilia: what does the future hold?. *Ther Adv Hematol* 2018;9(9):273-293.
- 15 Nathwani AC, et al. Long-Term Safety and Efficacy of Factor IX Gene Therapy in Hemophilia B. *N Engl J Med* 2014;371(21):1994-2004.
- 16 Colella P, et al. Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy. *Mol Ther Methods* 2018;8:87-104.
- 17 Choi VW, et al. AAV Hybrid Serotypes: Improved Vectors for Gene Delivery. *Curr Gene Ther* 2005;5(3):299-310.
- 18 Wu Z, et al. Adeno-associated Virus Serotypes: Vector Toolkit for Human Gene Therapy. *Mol Ther* 2006;14(3):316-327.
- 19 Mingozi F, High KA. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* 2013;122(1):23-36.
- 20 Baruteau J, et al. Gene therapy for monogenic liver diseases: clinical successes, current challenges and future prospects. *J Inherit Metab Dis* 2017;40(4):497-517.
- 21 Mingozi F, et al. Improved Hepatic Gene Transfer by Using an Adeno-Associated Virus Serotype 5 Vector. *J Virol* 2002;76(20):10497-10502.
- 22 VandenDriessche T, Chuah MK. Hemophilia Gene Therapy: Ready for Prime Time?. *Hum Gene Ther* 2016;28(11):1013-1023.
- 23 Kattenhorn LM, et al. Adeno-Associated Virus Gene Therapy for Liver Disease. *Hum Gene Ther* 2016;27(12):947-961.
- 24 Scallan CD, et al. Human immunoglobulin inhibits liver transduction by AAV vectors at low AAV2 neutralizing titers in SCID mice. *Blood* 2006;107(5):1810-1817.
- 25 Rapti K, et al. Neutralizing Antibodies Against AAV Serotypes 1, 2, 6, and 9 in Sera of Commonly Used Animal Models. *Mol Ther* 2012;20(1):73-83.
- 26 Louis Jeune V, et al. Pre-existing Anti-Adeno-Associated Virus Antibodies as a Challenge in AAV Gene Therapy. *Hum Gene Ther Methods* 2013;24:59-67.
- 27 Kotterman MA, Schaffer DV. Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat Rev Genet* 2014;15(7):445-451.
- 28 George LA, et al. Hemophilia B Gene Therapy with a High-Specific-Activity Factor IX Variant. *N Engl J Med* 2017;377(23):2215-2227.
- 29 Bessis N, et al. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Therapy* 2004;11:S10-S17.
- 30 Iorio A, et al. Core outcome set for gene therapy in haemophilia: Results of the coreHEM multistakeholder project. *Haemophilia* 2018;24:e167-e172.
- 31 European Medicines Agency. Guidelines on safety and efficacy follow-up and risk management of Advanced Therapy Medicinal Products: [www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2018/02/WC500242959.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2018/02/WC500242959.pdf) (Dostopano: junij 2020).
- 32 Grieger JC, et al. Production of Recombinant Adeno-associated Virus Vectors Using Suspension HEK293 Cells and Continuous Harvest of Vector from the Culture Media for GMP FIX and FLT1 Clinical Vector. *Mol Ther* 2016;24(2):287-297.





Pfizer Luxembourg SARL, GRAND DUCHY OF LUXEMBOURG,  
51, Avenue J.F. Kennedy, L – 1855,  
Pfizer, podružnica Ljubljana, Letališka cesta 29a, 1000 Ljubljana

PFI-75-20  
November 2020