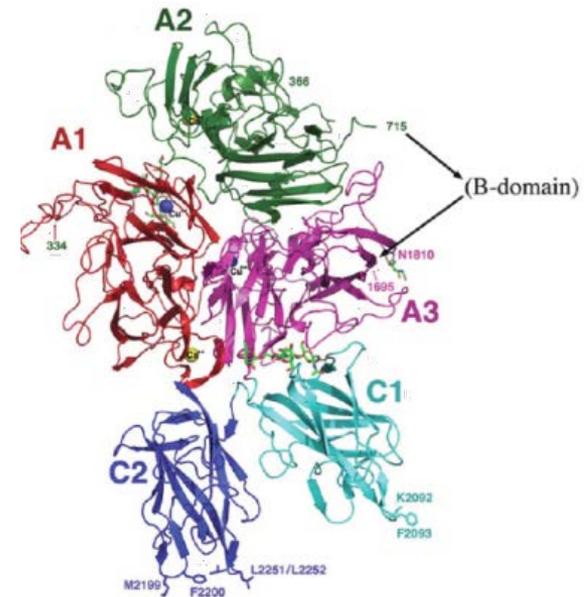
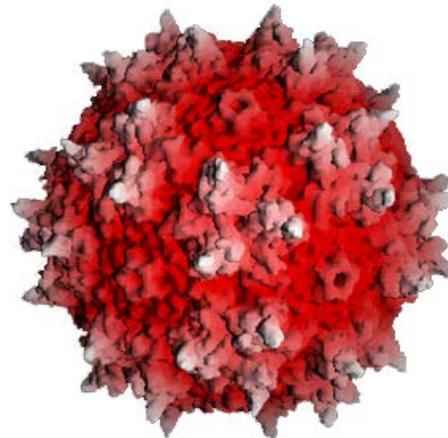
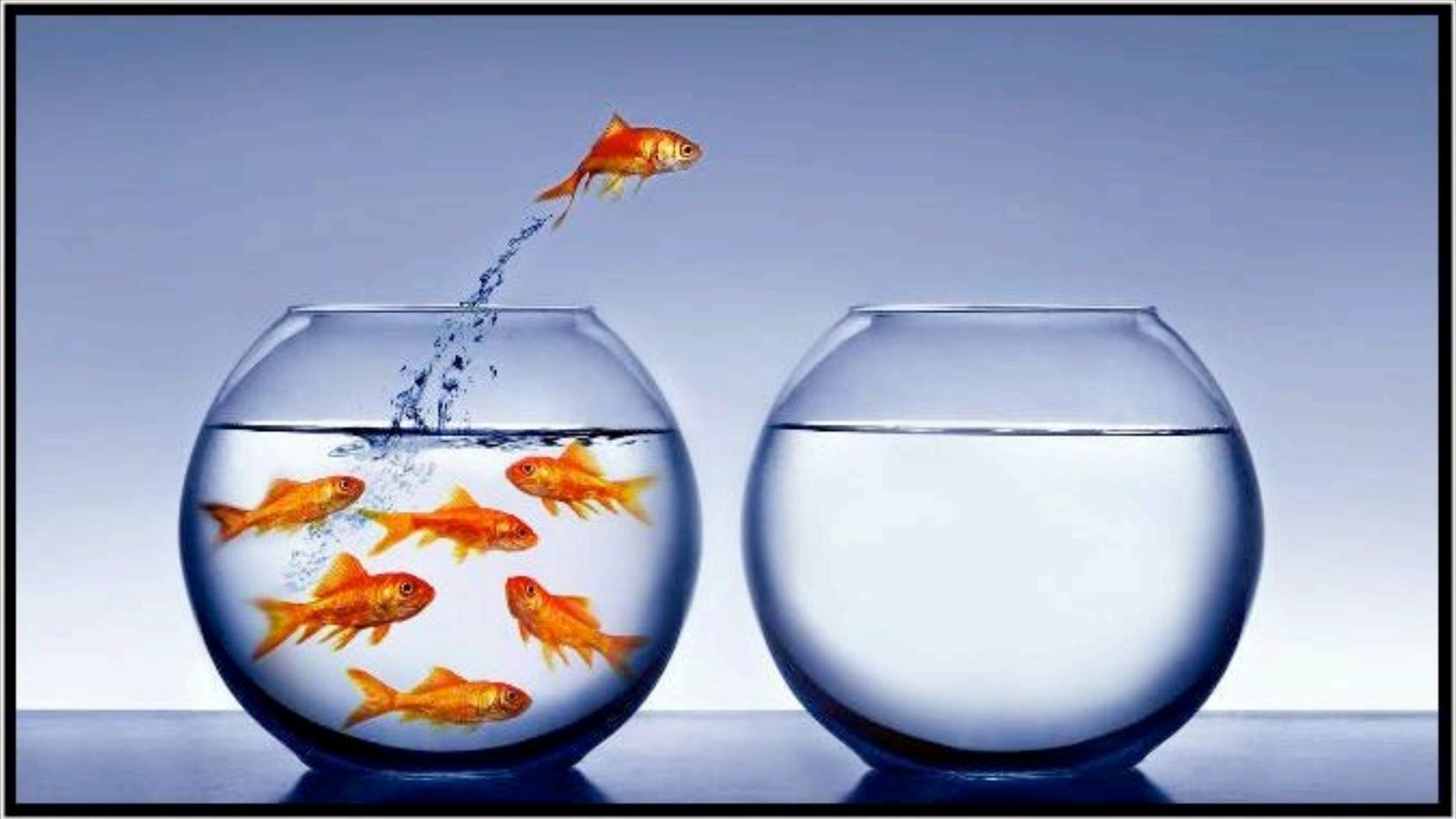


Sessió 5.

Teràpia gènica en hemofília.

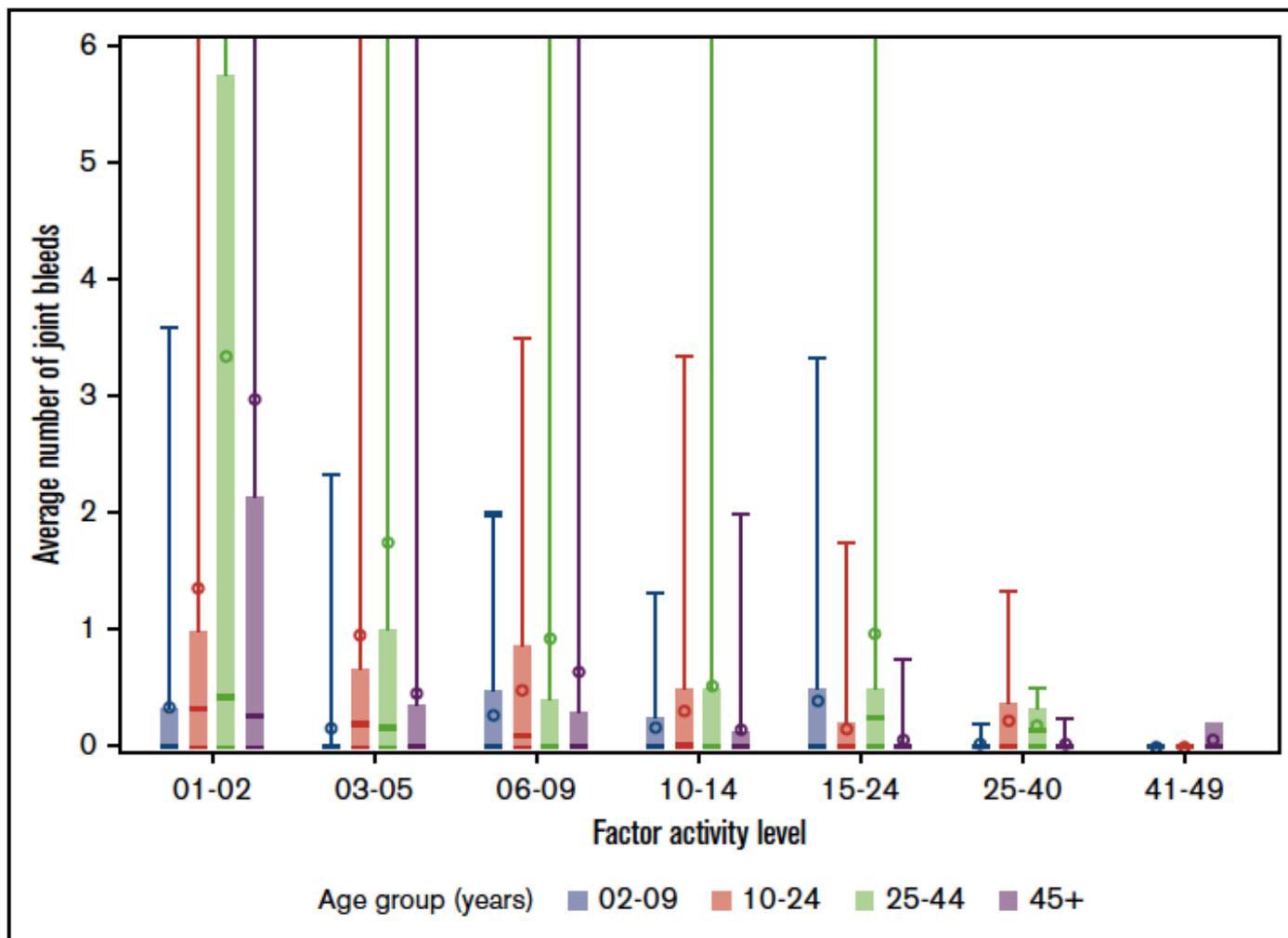
María Eva Mingot Castellano, PhD.
Servicio de Hematología
Hospital Regional Universitario de Málaga





Los grandes cambios siempre
vienen acompañados de
una fuerte sacudida. No es el fin del mundo.
Es el inicio de uno nuevo.

Niveles FVIII circulantes y clínica



Niveles FVIII circulantes y clínica

mate hemosiderin in joints [15]. Despite the limited indirect evidence for joint microbleeding, it would be reasonable to assume the MIFFS in hemophilia subjects were related to bleeding if MIFFS were unique to hemophilia. They are not.

- Degeneración discal 37% personas 20 años sanas.
- Degeneración discal 96% personas 80 años “sanas”.
- En gente sana MIFFS se asocia a sinovitis, lesión condral y ósea.

**En sujetos con hemofilia estas lesiones articulares en localizaciones sin hemartros confirmados,
¿son por la hemofilia o parte del proceso del envejecimiento general?**

Niveles FVIII circulantes y clínica

→ CÁLCULO DE DOSIS

Nivel valle (%) por encima del nivel basal

10,0

Dosis (UI)

1425

Vida media del FVIII (horas)
14,7

Ver

1 semana

2 semanas

Intervalo de dosis (horas)

24

48

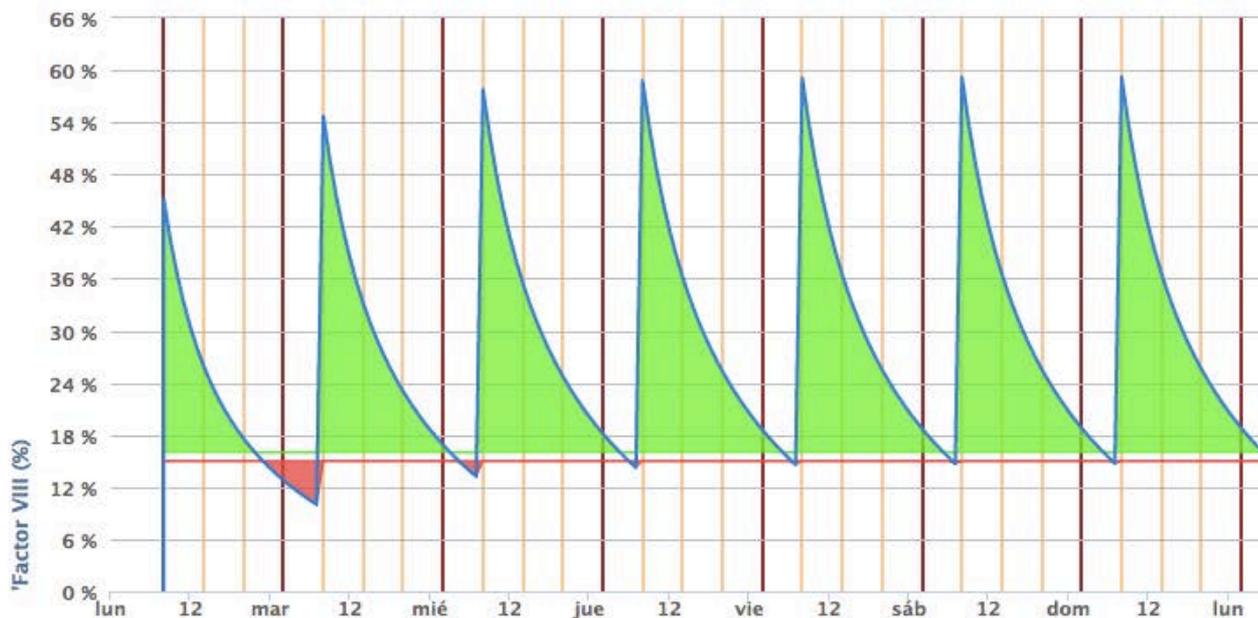
72

Personalizado

Cálculo de dosis - ADVATE

Tiempo por encima del nivel de FVIII (%) establecido

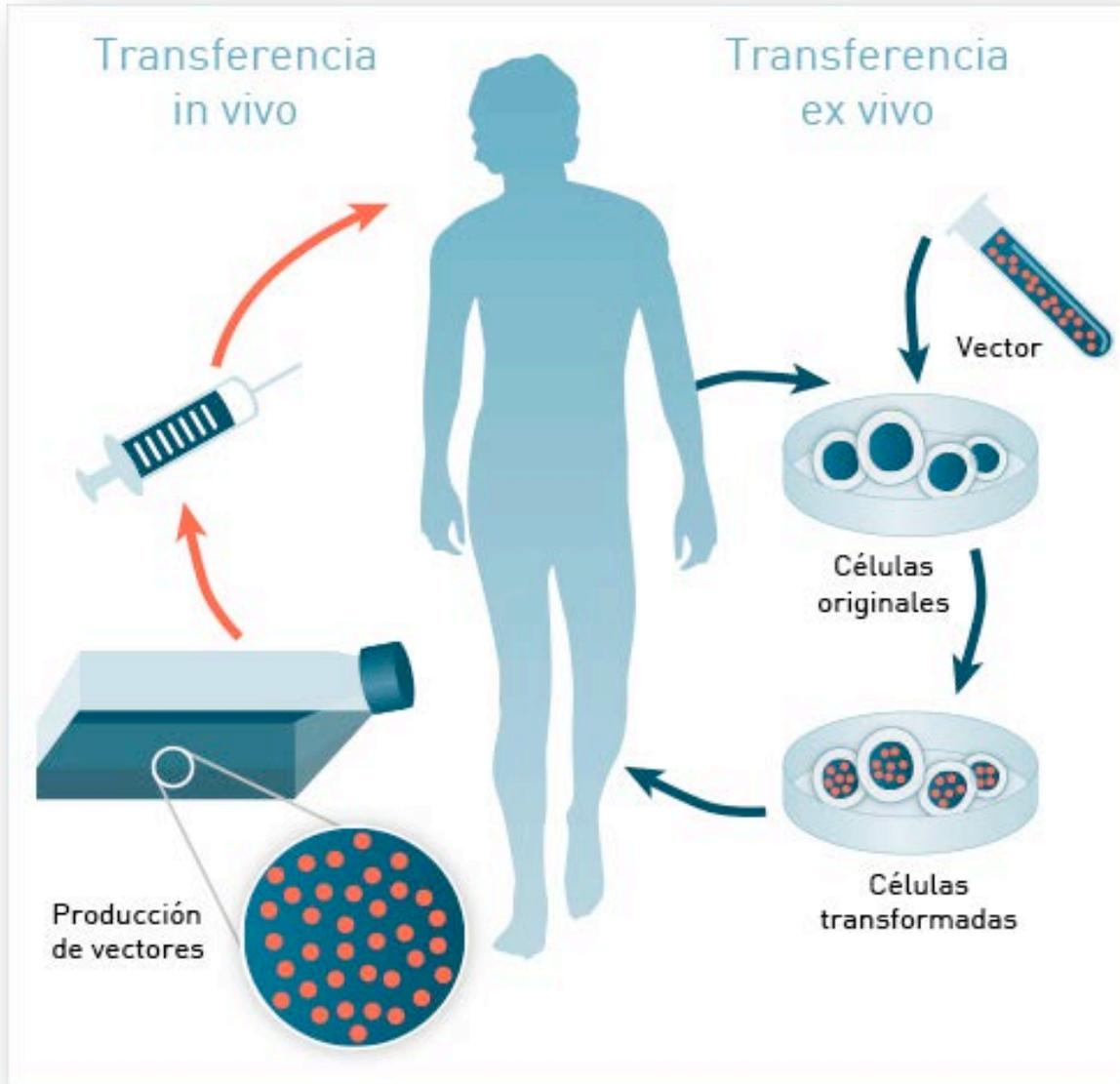
16



Tiempo por debajo del nivel de FVIII (%) establecido

15

Terapia Génica: Una posible opción



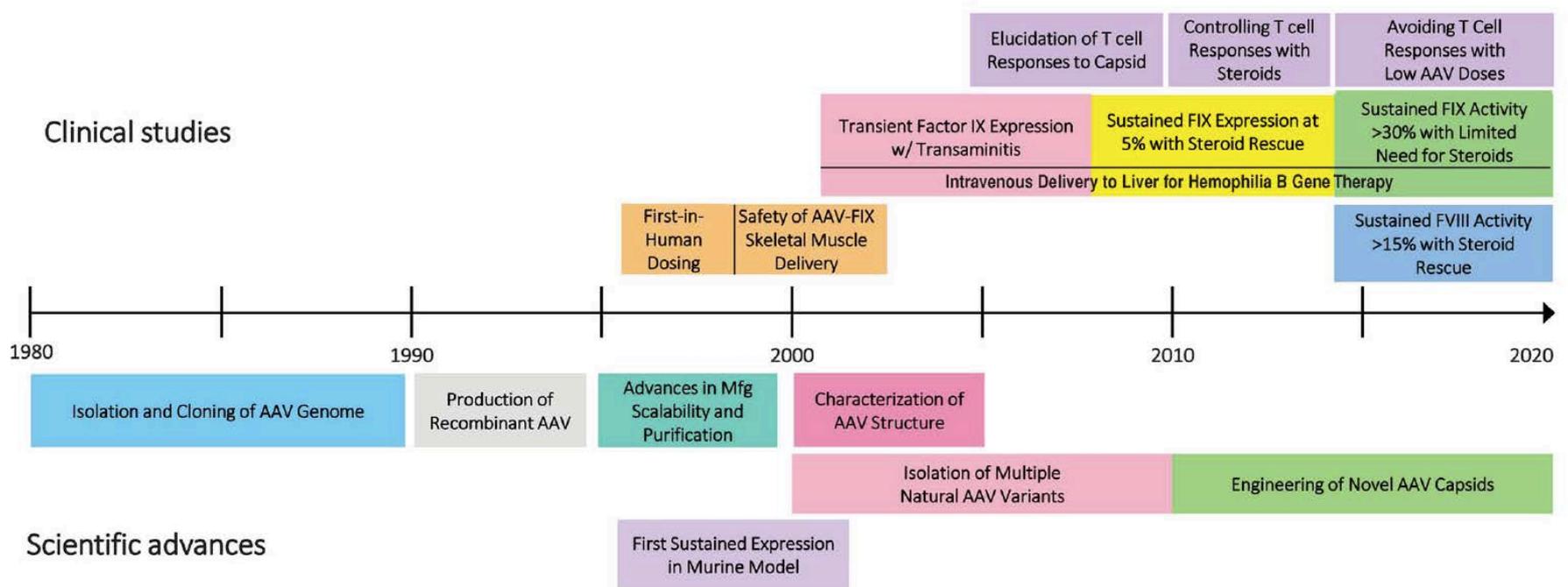
- Dosis única.
- Expresión de proteína en rango terapéutico.
- Larga eficacia.

Terapia Génica: Una posible opción en Hemofilia

- Enfermedad **monogénica**.
- **No necesita control** estricto de la **expresión** de la proteína.
- **Pequeños aumentos** del FVIII o FIX (2ng/ml de FVIII incrementa la actividad 1%) **mejora la clínica**.
- La **medición del FVIII o FIX** es cuantitativa y las técnicas están **validadas y generalizadas** en los laboratorios clínicos de rutina.



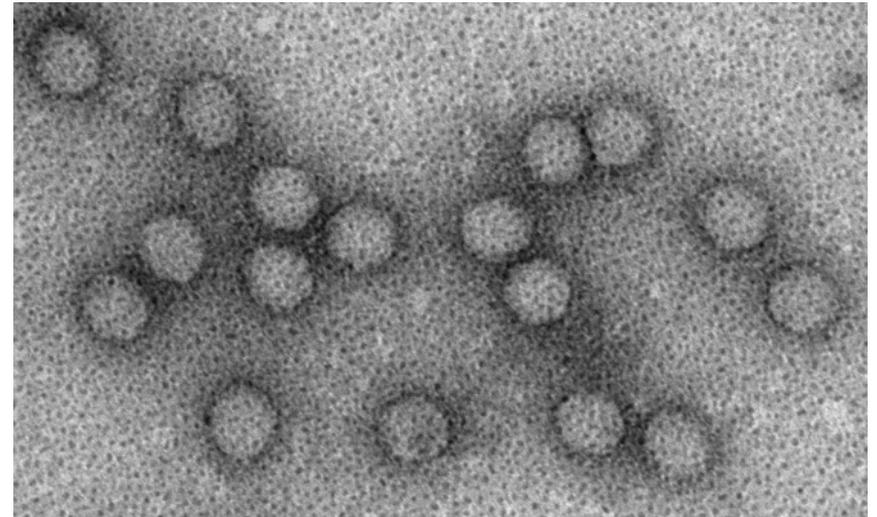
Terapia Génica: Recorrido



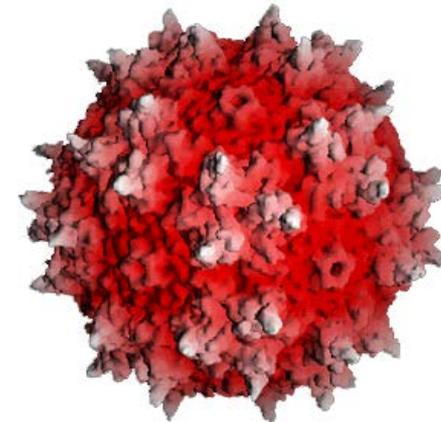
Terapia Génica: Vector AAV

- **Virus “naturales”:**
 - No envueltos, cadena única de ADN.
 - Partículas 25 nm.
 - Existen múltiples serotipos (AAV2, AAV5, AAV8 etc)
 - No patogénicos.
- **El AAV se modifica para actuar como vehículo del ADN que se quiere transferir:**
 - No se replica con facilidad.
 - No se integra (episoma extracromosómico en el núcleo)
 - Buen perfil de seguridad
 - Tropicismo hepático

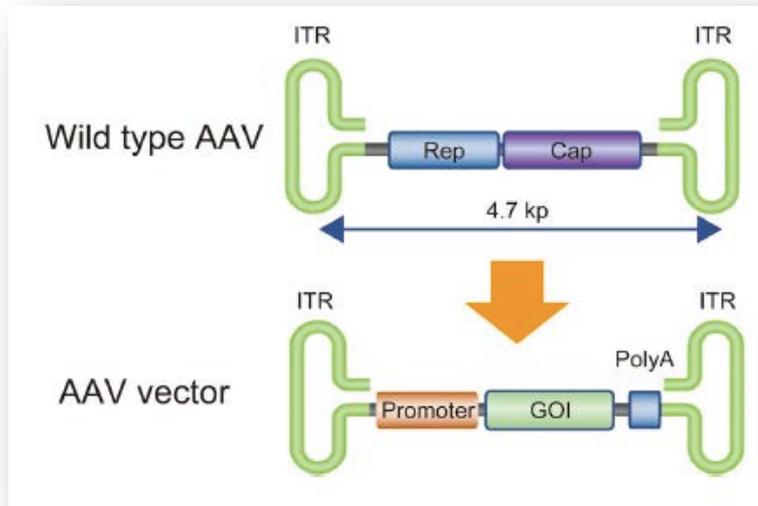
Imagen microscopía electrónica de AAV



Esquema Partícula de AAV



Terapia Génica: Vector tipo AAV



Cassette

AAV.ss-Promotor- FVIII gen-codon

Adeno-associated viral vector

ss: Single-stranded DNA vector design
Facilita el empaquetamiento del Gen Factor

Promotores que incrementan la expresión
en una única célula diana

codon optimized FVIII transgene
Aumenta la expresión y reduce
inmunogenicidad

FVIII o FIX gen (4,5 Kb HA,
HB genes ganancia de
función)

Terapia Génica: Vector Tipo AAV

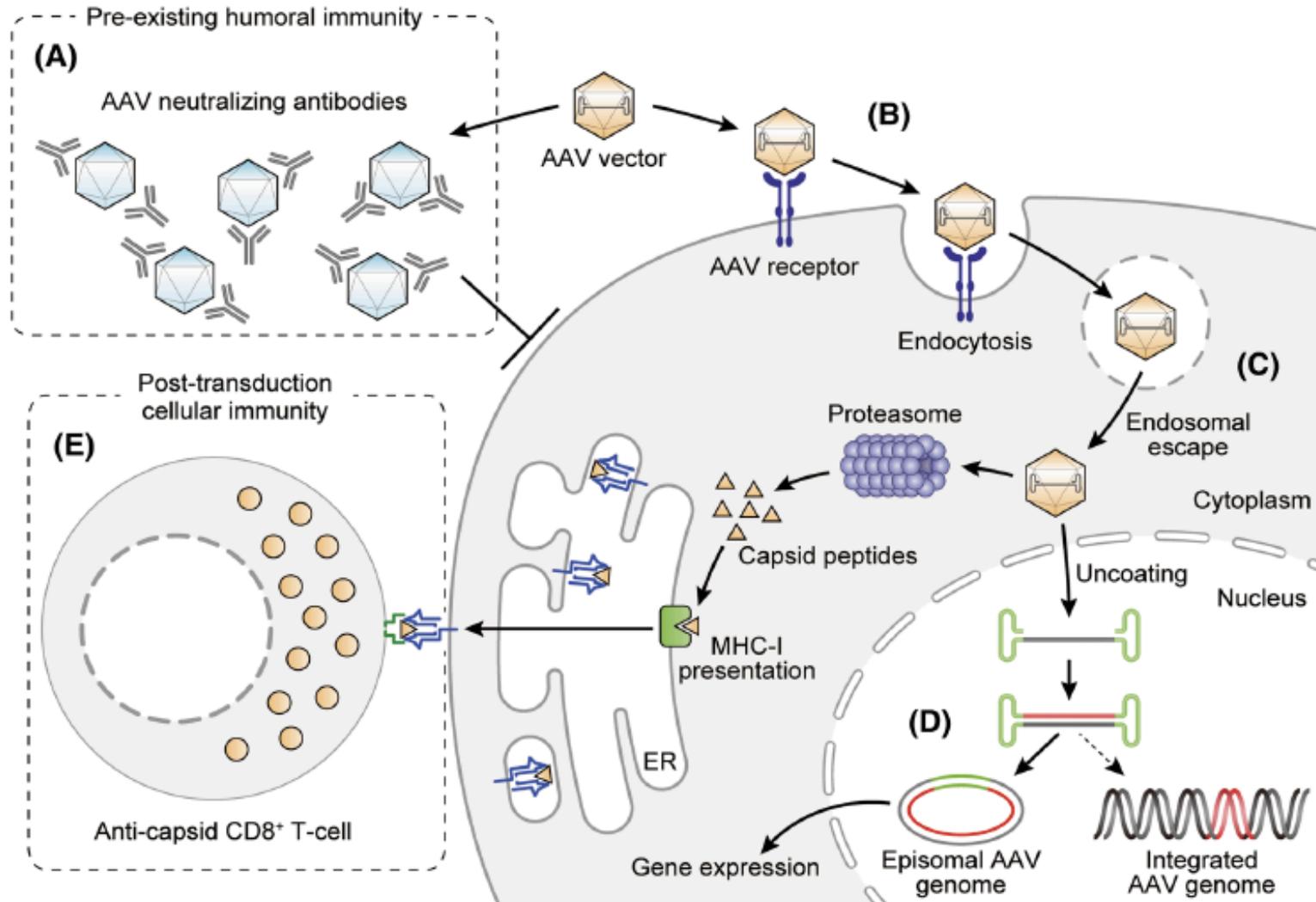
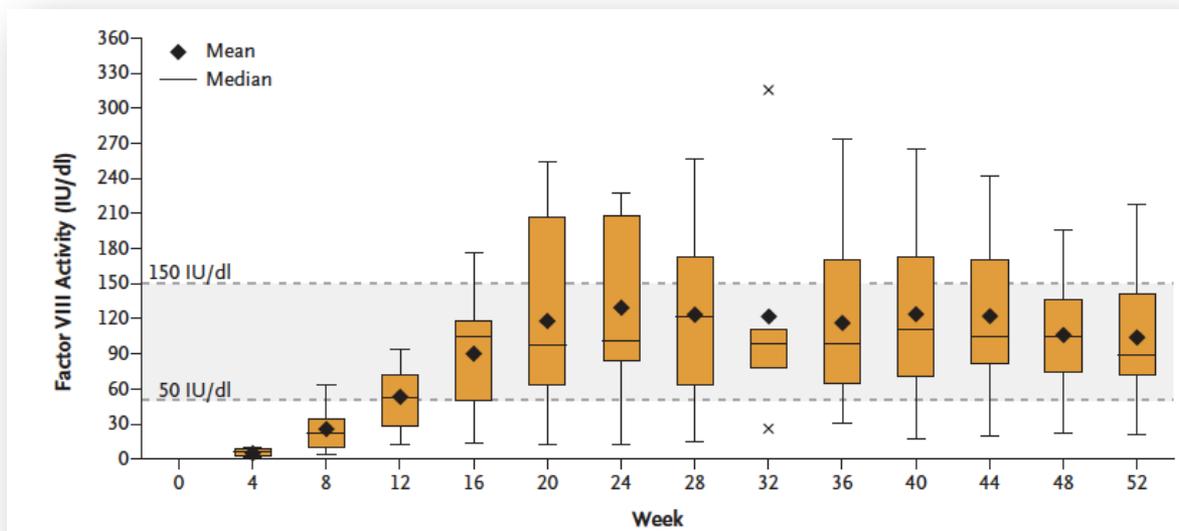


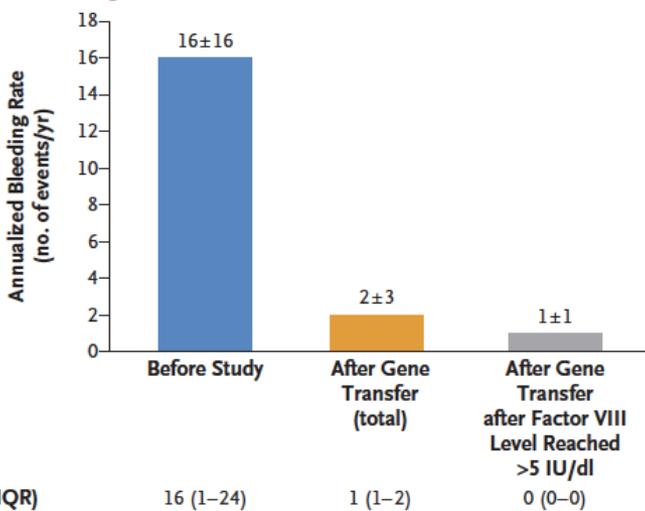
Table 1. Summary of active gene therapy clinical trials for hemophilia registered on ClinicalTrials.gov

NCT Number	Status	Interventions	Sponsor/Collaborators
Hemophilia A active gene therapy clinical trials			
NCT03370172	Recruiting	BAX 888, AAV8-co-BDD-F8	Baxalta now part of Shire/Shire
NCT02576795	Active, not recruiting	BMN 270, AAV5-co-BDD-F8	BioMarin Pharmaceutical
NCT03370913	Recruiting	Valoctocogene Roxaparvovec (BMN 270)	BMN 270, AAV5 4-6x10¹³ vg/kg
NCT03392974	Recruiting	Valoctocogene Roxaparvovec (BMN 270)	BioMarin Pharmaceutical
NCT03520712	Enrolling by invitation	Valoctocogene Roxaparvovec (BMN 270)	BioMarin Pharmaceutical
NCT03061201	Recruiting	SB-525, AAV6-co-BDD-F8	Sangamo Therapeutics
NCT03003533	Recruiting	SPK-8011, LK03-co-BDD-F8	University College, London/medical Research Council
NCT03432520	Not yet recruiting	SPK-8011, LK03-co-BDD-F8	
NCT03001830	Recruiting	AAV2/8-HLP-FVIII-V3	
NCT03217032	Not yet recruiting	YUVA-GT-F801- Lentiviral vector F8 HSC	
Hemophilia B active gene therapy clinical trials			
NCT03217032	Not yet recruiting	YUVA-GT-F901, Lentiviral vector F9 HSC	Shenzhen Geno-Immune Medical Institute
NCT01687608	Active, not recruiting	AskBio009, AAV8-coF9-Padua	Baxalta now part of Shire/Shire
NCT02695160	Recruiting	SB-FIX, AAV6-zinc-finger nuclease Alb locus and AAV6-F9 donor template	Sangamo Therapeutics
NCT00515710	Active, not recruiting	AAV2-FIX16	Spark Therapeutics/Children's Hospital of Philadelphia/The Hemophilia Center of Western Pennsylvania/Royal Prince Alfred Hospital, Sydney, Australia
NCT02484092	Active, not recruiting	SPK-9001, mutant AAV8-coF9-Padua	Spark, AAV8 FIX Padua 5x10¹¹vg/kg
NCT03307980	Recruiting	SPK-9001, mutant AAV8-coF9-Padua	
NCT00979238	Active, not recruiting	scAAV2/8-LP1-hFIXco	
			St. Jude, scAAV2/8-LP1-hFIXco vector
NCT02396342	Active, not recruiting	AAV5-hFIX (AMT-060)	inc./Children's hospital of Philadelphia
NCT03489291	Recruiting	AAV5-hFIXco-Padua (AMT-061)	UniQure Biopharma B.V.
NCT03369444	Recruiting	FLT180a	UniQure Biopharma B.V. University College, London

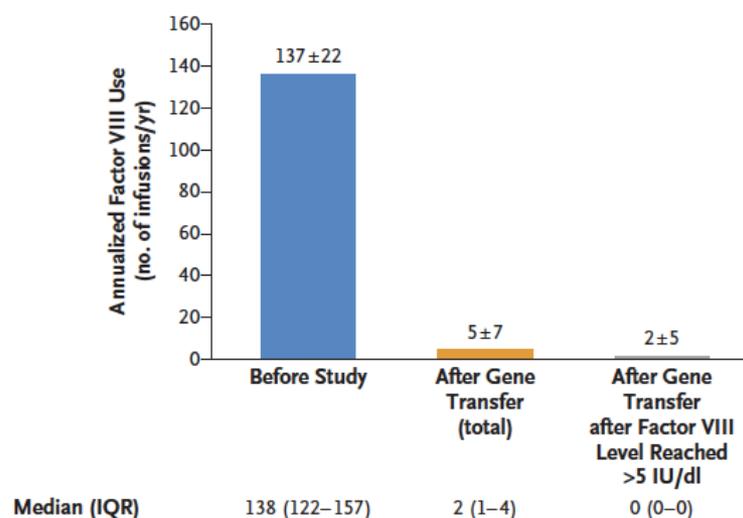
Terapia Génica: Hemofilia A



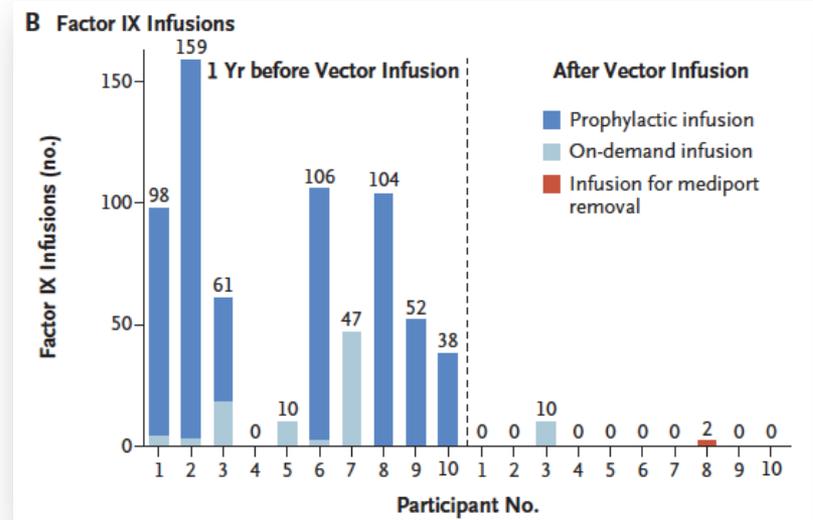
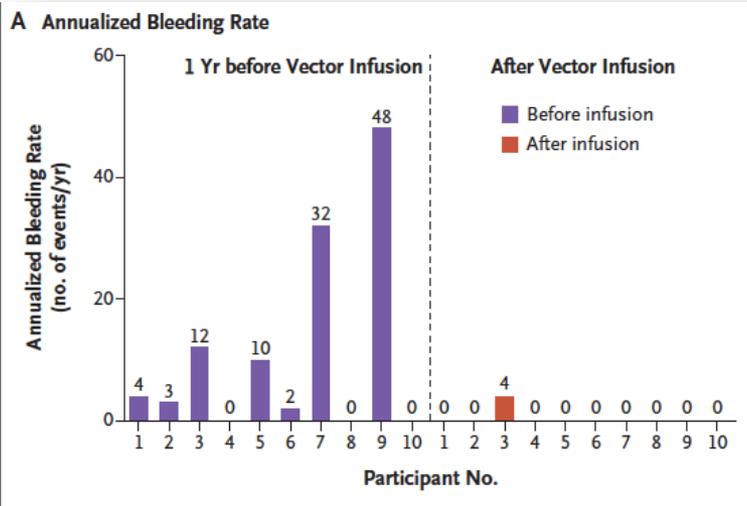
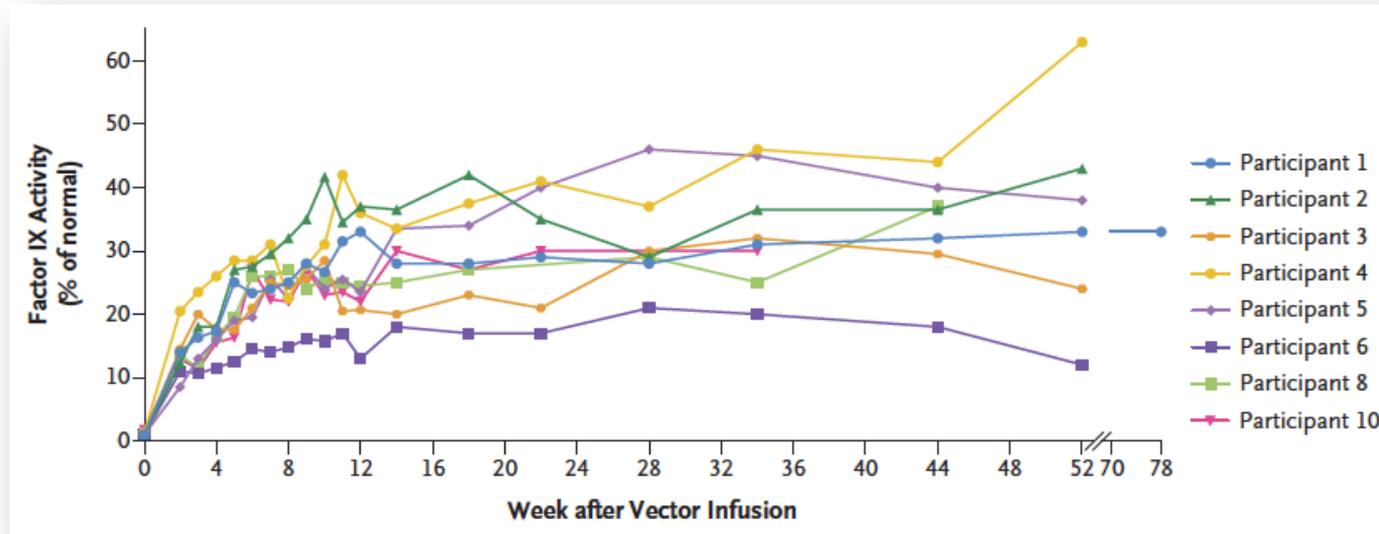
A Annualized Bleeding Rate



B Annualized Factor VIII Use



Terapia Génica: Hemofilia B

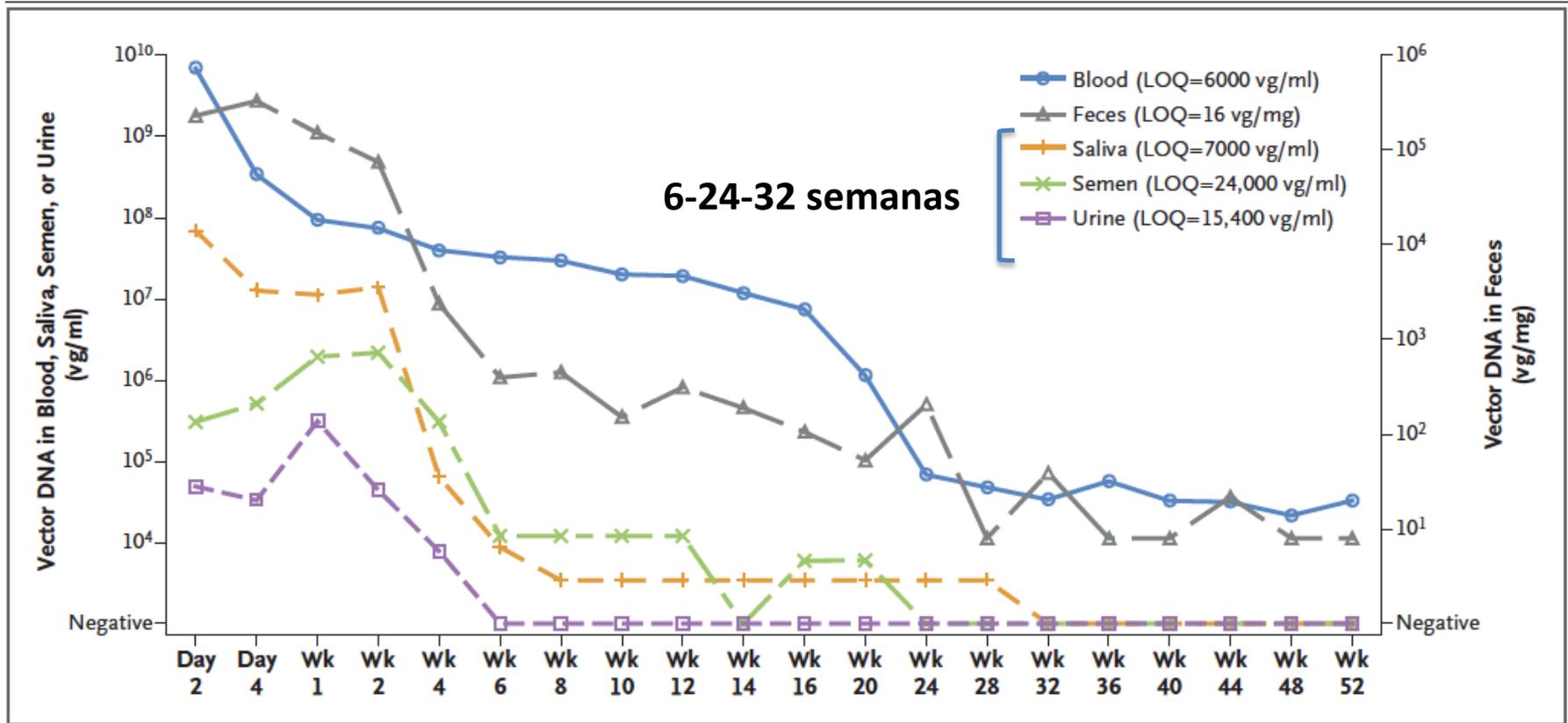


Terapia Génica: Resultados en eficacia

Niveles Factor: Dosis altas	Nathwani 2014 FIX (n:10)	George 2017 FIX (n:10)	Miesbach 2018 FIX (n:10)	Rangarajan 2017 FVIII (n:9)
Pico (%)	10.1	60	12,3	237
Minimo (%)	1.1	10	1,3	19
Tasa anual Sangrado (TAS)				
TAS previa	16	11	3	16
TAS post	1,0	0,4	0,9	1,0
TAS reducción	94%	96%	70%	94%
Factor utilizado				
Reducción consumo de factor	>90%	>90%	>90%	>90%

1. Nathwani et al. *N Engl J Med*.2014;371(21):1994-2004.
2. George et al. *N Engl J Med* 2017;377:2215-27.
3. Miesbach et al. *Blood*. 2018;131(9):1022-1031.
4. Rangarajan et al. *N Engl J Med* 2017;377:2519-30.

Terapia Génica: Eliminación vector según fluidos



Terapia Génica: Complicaciones inmunogénicas

Inmunidad humoral: Generación anticuerpos

- **Anticuerpos neutralizantes de AAV por exposición previa:**
 - No llega a transfectarse la células huesped
- **Anticuerpos neutralizantes de AAV postratamiento.**
 - Impide nueva infusión con el mismo vecto

Serotipo	Prevalencia
AAV1	40%
AAV2	29%
AAV5	36%
AAV8	33%
AAV9	37%

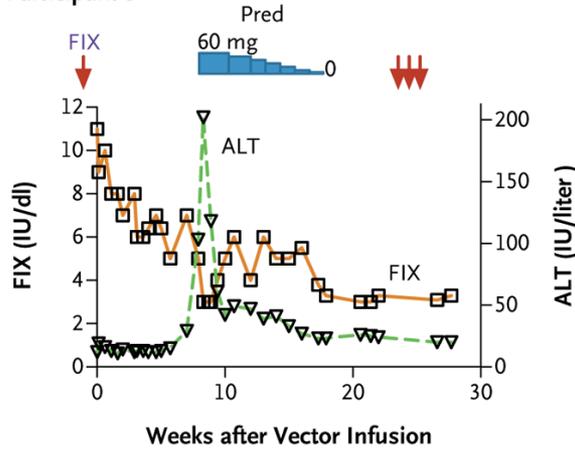
Inmunidad celular: Citotoxicidad linfocitos T

- CD8+ T-cells identifican la células infectadas que expresan peptidos de la cápside viral:
 - Elimina las células transfectadas y con ello la producción de factor:Transaminasitis.



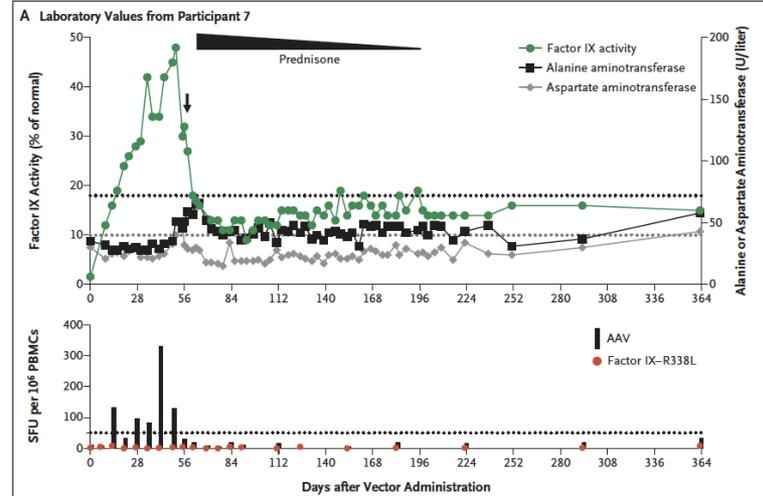
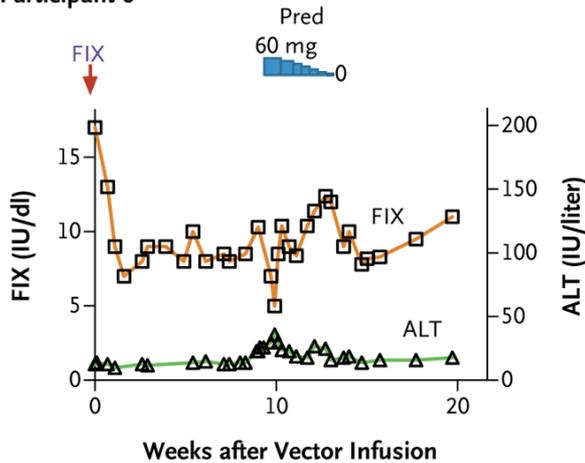
Terapia Génica: Complicaciones inmunogénicas

E Participant 5

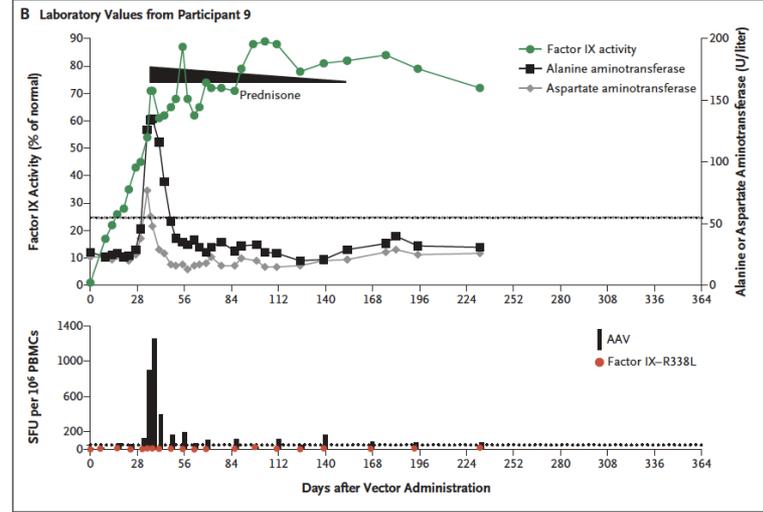


1

F Participant 6



2



1. *Nathwani et al. N Engl J Med. 2011 December; 365(25): 2357–2365.*
2. *George et al. N Engl J Med 2017; 377: 2215–27.*

Terapia Génica: Complicaciones inmunogénicas

	Nathwani 2014 FIX (n:10)	George 2017 FIX (n:10)	Miesbach 2018 FIX (n:10)	Rangarajan 2017 FVIII (n:9)
Grado de severidad:				
1	5	5	3	
2	0	1	0	
3	0	0	0	NA
4	1	0	0	
Elevación ALT	4	1	1	7

1. *Nathwani et al. N Engl J Med. 2014;371(21):1994-2004.*
2. *George et al. N Engl J Med 2017;377:2215-27.*
3. *Miesbach et al. Blood. 2018;131(9):1022-1031.*
4. *Rangarajan et al. N Engl J Med 2017;377:2519-30.*

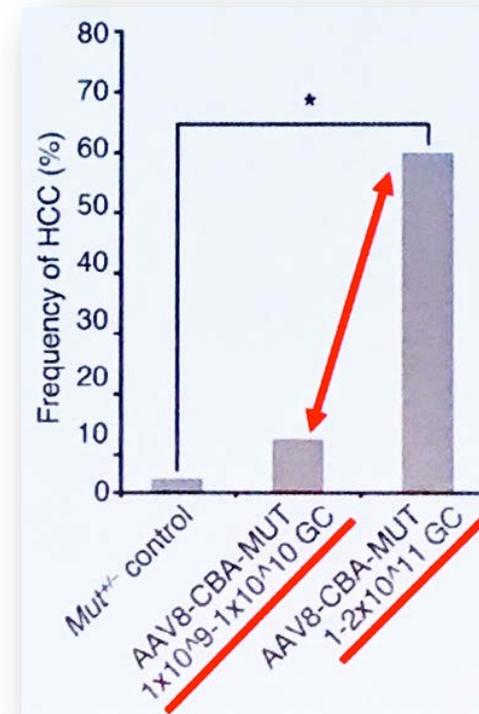
Terapia Génica: Complicaciones no inmunogenicas

Mutagénesis^{1,2}:

- El riesgo es bajo por ser genomas episomales.
- Pero, se ha detectado AAV integrado en células Hepatocarcinoma.

Estrés en hepatocitos inducido por FVIII^{3,4}:

- Sobreexpresión FVIII en hepatocito, defecto secreción, acúmulo en retículo endoplásmico.
- Se buscan genes de moléculas de FVIII de fácil secreción (FVIII-V3)



1. Chandler et al. *J Clin Invest.* 2015;125(2):870-880.
2. Colella et al. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017;8:87-104.
3. Lange et al. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016;3:16064.
4. Zolotukhin et al. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016;3:16063.

Terapia Génica: Complicaciones no inmunogenicas

VARIABILIDAD EN LA MEDICIÓN DE FACTOR CIRCULANTE SEGÚN MÉTODO

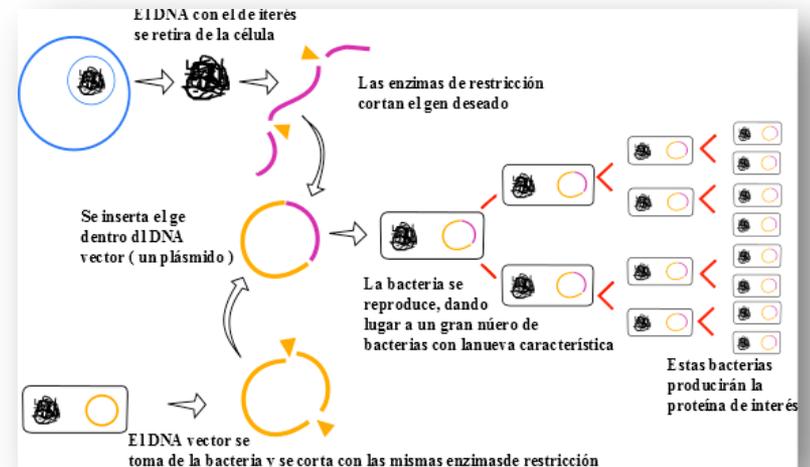
Variaciones importantes según métodos cromogénicos y coagulativos y entre reactivos

¿Dominio B depleccionado?

¿proteína modificada por otras estructuras asociadas?

EPISOMA: DURACIÓN APROXIMADA 10 AÑOS*

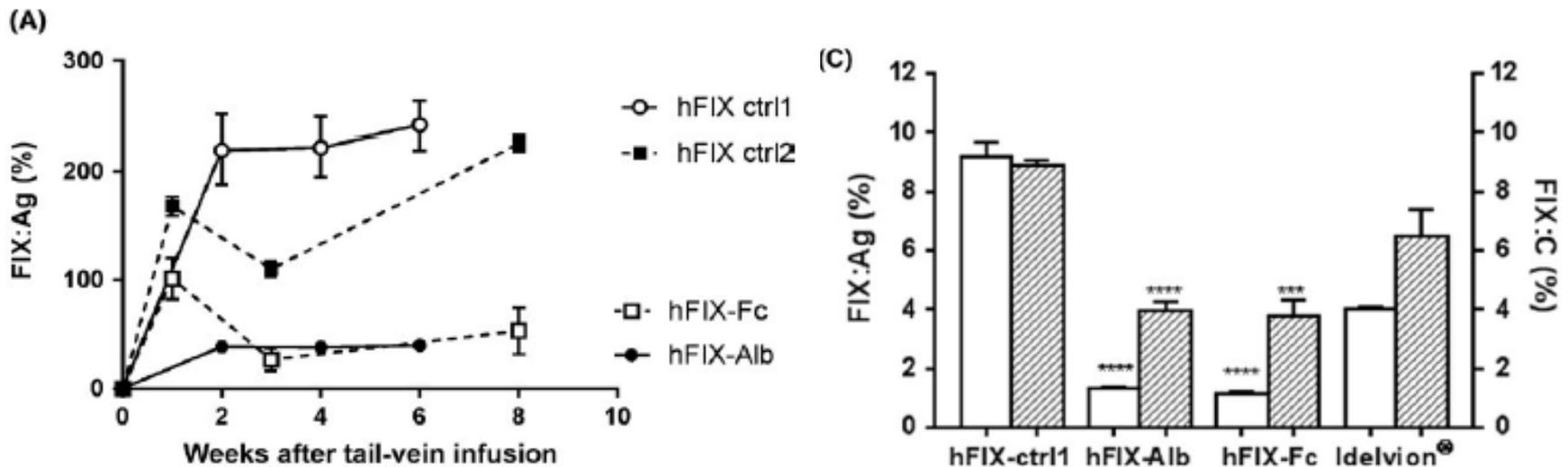
- AAV tropismo por células quiescentes (hepatocitos, neuronas, miocitos, etc).
- Poca mutagénesis por queda en posición episomal.
- Con cada división celular se pierden DNA proviral.
- Se estima duración AAV trasducción en 10 años.



* Lheriteau et al. *Blood Reviews* 2015; 29: 321–328.

Líneas Futuras: Usar FVIII modificados (long acting)

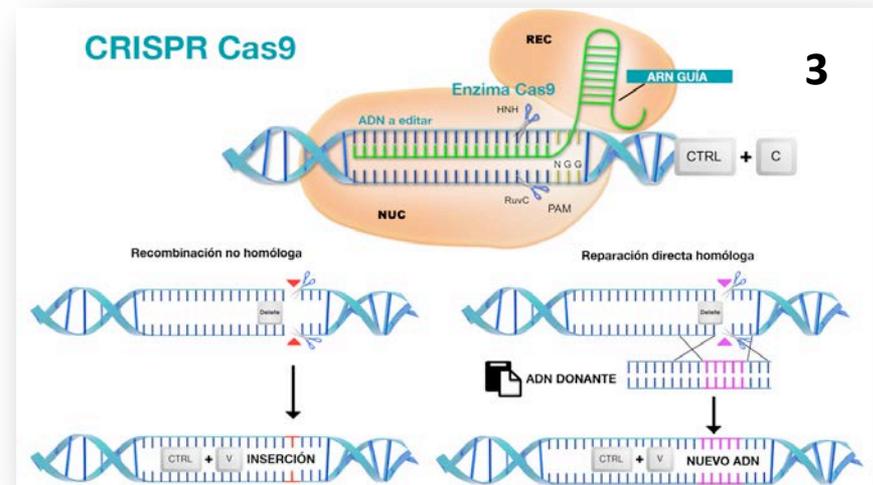
Menor expresión por defecto de secreción los long acting
Igual capacidad hemostática



Líneas Futuras: Edición génica y Target integration

Edición génica y Target integration¹

- Corrección de un defecto o integración de un gen usando.
- Nuclease-targeted double-strand DNA breaks o reparación por homología directa.
- **Hemofilia:**
 - Hay fallos de corte e integración en secuencias de diferentes vías enzimáticas.
 - Hemofilia B: Usando AAV6 con zinc-finger nucleasas y locus de la albúmina.
 - No datos en humanos, en animal 7-20%².

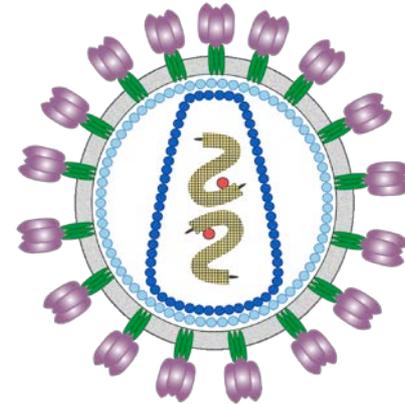


1. Park et al. *Hum Genet.* 2016;135(9):977-981.
2. Barzel et al. *Nature.* 2015;517(7534):360-364.
3. Wang et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 3035;

Líneas Futuras: Edición génica y Target integration

LENTIVIRUS^{1,2,3}

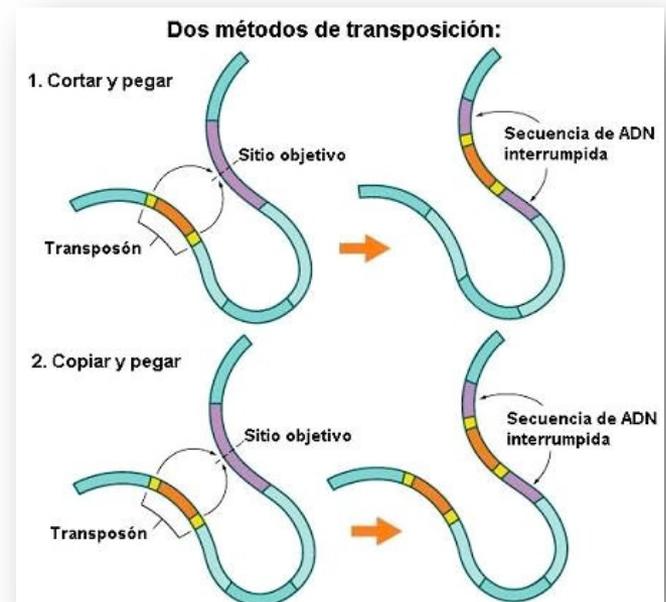
- Retrovirus.
- Ex vivo, células quiescentes.
- Ejemplo: Células T con receptores quiméricos, hemofilia células progenitoras.
- <https://www.bioverativ.com/research-pipeline/our-pipeline.aspx>



VECTORES NO VIRALES^{1,4,5}:

- Ácidos nucleicos puros.
- Métodos hidrodinámicos lo introducen en célula diana (transposones, nanopartículas).
- Problema: Capacidad de llegar a tejidos no diana.

1. Ohmori et al. *Int J Hematol*. 2018 Aug 6. doi: 10.1007/s12185-018-2513-4. [Epub ahead of print]
2. Lytle et al. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2016; 3: 15056.
3. McGarrity et al. *J Gene Med* 2013; 15: 78–82.
4. Matsui et al. *PLoS One*. 2014;9:e104957.
5. Ramaswamy et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114:E1941-e50.



Líneas Futuras: Mecanismos evitar Ac frente a AAV

Rapamicina Anti-CD20 Terapia génica

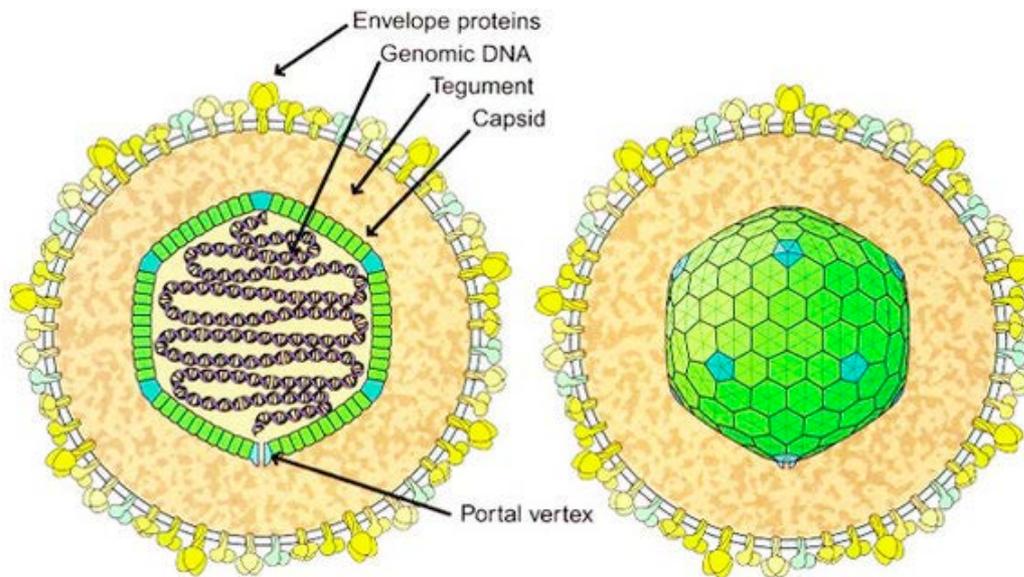
- **Rapamicina** induce muerte celular de LT CD4 efectores y afecta escasamente a los LT reguladores.
- **Anticuerpos monoclonales frente a CD20** bloquean inmunidad humoral
- Combinación: AntiCD20+rapamicina, **bloquea efecto inmunidad sobre AAV.**

1. Park et al. Hum Genet. 2016;135(9):977-981.
2. Barzel et al. Nature. 2015;517(7534):360-364.

Líneas Futuras: Mecanismos evitar Ac frente a AAV

Mecanismos no inmunosupresores: Administrar “Decoy Capsids”

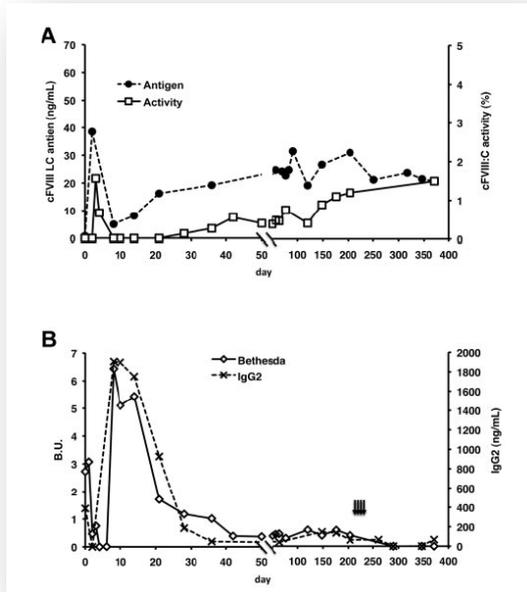
- Administra vectores sin genoma.
- Satura los anticuerpos anti AAV circulanés



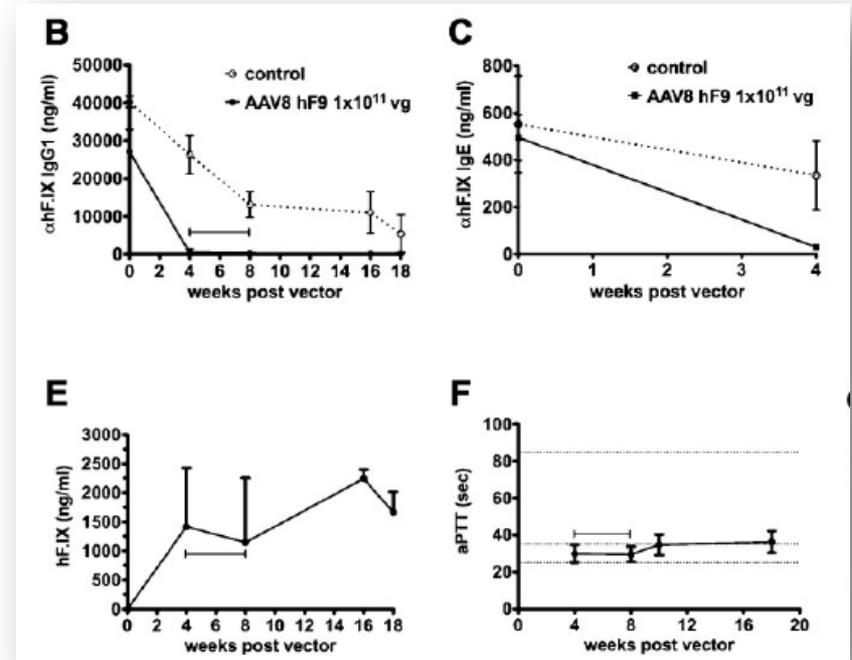
Líneas Futuras: Terapia génica si Ac frente vector

Terapia Génica con AAV evitar inhibidor en modelo murino:

- Desarrollo de inhibidores.
- Producir ITI en sujetos con inhibidor



Hemofilia A¹



Hemofilia B²

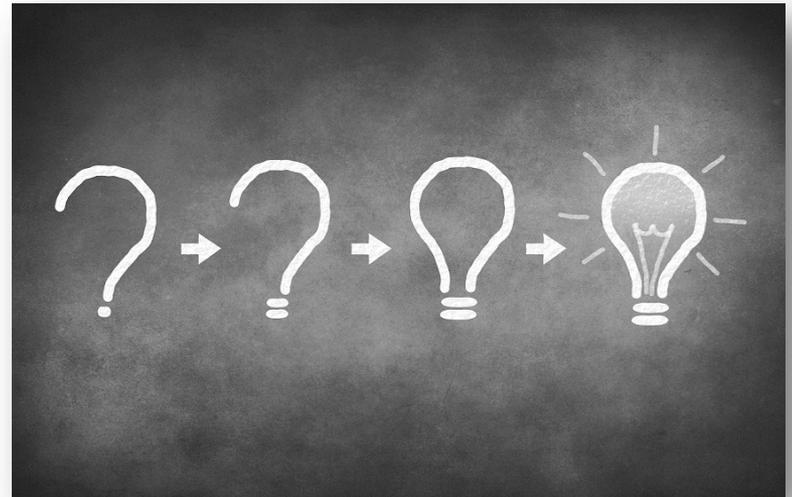
Lo mucho que nos queda por saber...

¿que sabemos?

- La terapia génica es curativa al menos 2-7 años.
- Hay gran variabilidad en la respuesta.
- Hepatotoxicidad de corta duración por tres mecanismos (LT, estrés, inmunidad innata).
- La presencia de Ac frente a AAV limita el tratamiento por ahora.

¿qué no sabemos?

- Consecuencias de integración en el genoma.
- Posible mutagénesis y oncogénesis.
- Trascendencia de la producción de factor en otros tejidos.
- Dinámica (perdida) episoma.
- Como evitar Ac AAV y favorecer segundas infusiones.
- Cuanto durará la respuesta.
- Efecto en pacientes VHC y VIH.
- Efectos secundarios a largo plazo.



Lo mucho que nos queda por saber...

Key Points

- Gene therapy is cost-effective in severe hemophilia A compared with standard factor VIII prophylaxis.
- Over a 10-year time horizon, gene therapy cost \$1M and resulted in 8.33 QALYs gained, whereas prophylaxis cost \$1.7M and resulted in 6.62 QALYs

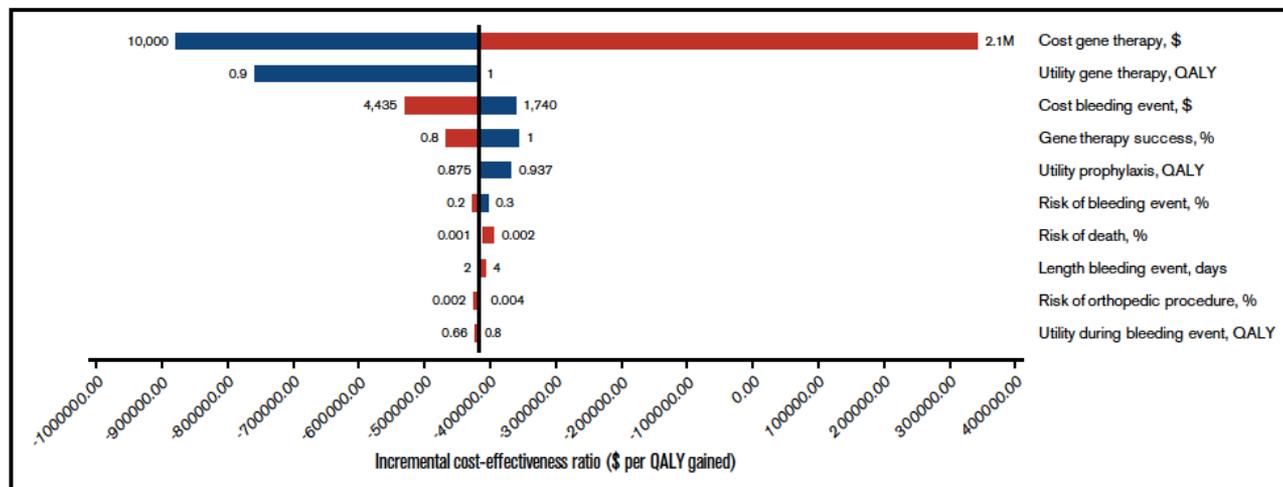


Table 2. Base-case sensitivity analysis

Variables	Prophylaxis	Gene therapy	Difference
Total cost	\$1 693 630	\$1 022 249	\$671 381
Effectiveness, QALYs	6.62	8.33	-1.71
Incremental cost-effectiveness ratio, \$/QALY	Dominated	Dominant	

Cost and QALYs are discounted at 3% per year.



Equipo