

# Nowe cząsteczki w leczeniu hemofilii i innych pokrewnych skaz krwotocznych w świetle wybranych doniesień, przedstawionych w czasie 53. Kongresu *American Society of Hematology (ASH)*

Stany Zjednoczone, San Diego, 10–13 grudnia 2011 roku

New molecules in treatment of haemophilia and allied disorders presented during 53<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American Society of Hematology (ASH), USA, San Diego, December 10–13, 2011

Magdalena Łętowska

Instytut Hematologii i Transfuzjologii

Obrady kongresowe rozpoczęły się 10 grudnia i były poprzedzone sesjami satelitarnymi i szkoleniowymi. Jak co roku program Kongresu składał się ze:

- specjalnych wykładów, sesji i sympozjów,
- sesji edukacyjnych,
- sesji naukowych,
- sesji poświęconych ustnym prezentacjom,
- spotkań z ekspertami,
- sesji plakatowych.

W niniejszym opracowaniu przedstawiono streszczenia wybranych prac prezentowanych w czasie ustnych i plakatowych sesji, poświęconych badaniom nad nowymi białkami. Być może w przyszłości białka te znajdą kliniczne zastosowanie w leczeniu chorych z niedoborami czynników krzepnięcia.

Geny pochodzenia zwierzęcego lub roślinnego mogą w komórkach bakterii lub innych organizmów podlegać ekspresji i produkować w znacznych ilościach różnego rodzaju białka enzymatyczne i hormony.

Autonomicznie replikujący się nośnik klonowanego genu daje możliwość podniesienia ilości kopii danego genu (dawki genu) oraz regulacji jego ekspresji, a ponadto ułatwia jego modyfikacje genetycz-

ne. W efekcie następuje nadprodukcja białka. Zazwyczaj wektory ekspresyjne wykorzystuje się do nadprodukcji białek w odpowiednio dobranym pod względem cech genetycznych szczepie gospodarza. Zapewnia on właściwą kontrolę ekspresji genu. Wektor funkcjonujący w specyficznym gospodarzu stanowi łączny system ekspresyjny. Powszechnie wykorzystywanie systemów ekspresyjnych przyczyniło się do znacznego podniesienia poziomu produkcji białek i wydajności technik związanych z ich izolowaniem i oczyszczaniem. Konsekwencją tego jest istotne przyspieszenie badań nad właściwościami białek i ich rolą.

## Nowe cząsteczki czynnika VIII

### Białka fuzyjne

Rekombinowany czynnik VIII Fc (rFVIII Fc) składa się z cząsteczki rFVIII pozbawionej domeny B (BBD) genetycznie połączonej z domeną Fc ludzkiej immunoglobuliny G1 (IgG1). Przed sekrecją cząsteczki z komórek HEK 293 (*human embryonic kidney*), większość cząsteczek rFVIII Fc jest poddana procesowi uzyskania ciężkiej cząsteczki FVIII (HC) i lekkiej cząsteczki (LC + Fc). W ukła-

dzie krążenia rFVIII<sup>FC</sup> występuje w kompleksie z VWF. Spontaniczna dysocjacja cząsteczek HC i LC+Fc, powodująca spadek aktywności cząsteczki w osoczu następuje w czasie przechowywania leku. Autorzy tej pracy opisali właściwości jednołańcuchowej izoformy rFVIII<sup>FC</sup> (SC rFVIII<sup>FC</sup>). Białko to otrzymano z rFVIII<sup>FC</sup>, który zawiera część cząsteczek w postaci izoformy niepoddanej zmianom. W porównaniu z rFVIII<sup>FC</sup>, SC rFVIII<sup>FC</sup> charakteryzuje podobna aktywność badana metodą chromogenną, ale o 60% niższa w badaniu metodą jednostopniową (aPTT). Podobne obniżenie aktywności obserwowano w teście generacji trombiny (TGA). Pełną aktywność SC rFVIII<sup>FC</sup> autorzy obserwowali przy braku vWF. Mogłoby to sugerować, że uwolnienie od vWF może być opóźnione w wyniku wiązania kowalentnego kwaśnego regionu a3 HC po wycięciu Arg 1680 w cząsteczce SC rFVIII<sup>FC</sup>, w porównaniu z usunięciem a3 i dysocjacją całej cząsteczki rFVIII. Opóźniona dysocjacja z vWF może tłumaczyć obniżenie aktywności SC rFVIII<sup>FC</sup> w badaniu metodą jednostopniową i TGA, a pełną aktywność w dwustopniowej metodzie chromogennej. Obniżenie aktywności w obecności vWF potwierdzono w badaniu zmodyfikowaną metodą chromogenną ze zmniejszoną ilością trombiny jako aktywatora FVIII.

Właściwości SC rFVIII<sup>FC</sup> *in vivo* oceniano w porównaniu z rFVIII<sup>FC</sup>, przeprowadzając badania na zwierzętach (myszy HemA, model TVT — *tail vein transection*). Stwierdzono podobną skuteczność obu leków przy zastosowaniu różnych dawek (4,6 mg/kg; 1,38 mg/kg i 0,46 mg/kg) mimo wyraźnie obniżonej aktywności w teście aPTT. W związku z tym opóźniona aktywacja cząsteczki SC rFVIII<sup>FC</sup> w obecności vWF w badaniach *in vitro*, wydaje się nie mieć wpływu na działanie *in vivo*. Będą prowadzone dalsze badania w celu wykazania większej stabilności tego białka fuzyjnego.

Yang Buye i wsp. A novel single chain recombinant factor VIII Fc fusion protein is active in vitro and fully efficacious in in vivo Hema Mouse bleeding model. Abstract 1192

### Cząsteczki czynnika VIII o przedłużonym działaniu

Jedną z metod przedłużenia działania leku jest pegylacja jego cząsteczki. Taką cząsteczką jest BAX 855, pełnej długości rekombinowany FVIII zmodyfikowany poprzez dodanie glikolu polietylenowego (PEG), otrzymany z hodowli CHO, bez dodania w procesie produkcyjnym białek pochodzenia ludzkiego. Wiadomo że każda modyfikacja chemiczna może prowadzić do zmiany immunogenności białka. Autorzy przedstawili wyniki badań przedklinicznych nad wpływem na układ immunologiczny PEGylo-

nego FVIII (BAX 855) w porównaniu z ADVATE, niemodyfikowaną, długołańcuchową cząsteczką FVIII, stosowaną obecnie u chorych na hemofilię A.

Ocenę potencjalnego wpływu BAX 855 i ADVATE na ludzki wrodzony układ odpornościowy badano na podstawie ich możliwych zdolności uwalniania prozapalnych cytokin: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$  (badanie *in vitro* ludzkiej krwi pełnej) oraz potencjalnej aktywacji składników układu dopełniacza (badanie *in vitro* w osoczu ludzkim).

Ocena potencjalnego wpływu BAX 855 i ADVATE na adaptacyjny układ odpornościowy była oparta na badaniu możliwości wytworzenia przeciwciał na trzech hemofilowych mysich modelach i u makaków jawańskich. Myszy z hemofilią wykazujące ekspresję ludzkiego F8 cDNA wykazują immunologiczną tolerancję w stosunku do ludzkiego FVIII i produkują przeciwciała do ludzkiego FVIII tylko wówczas, gdy ich układ immunologiczny jest upośledzony.

Autorzy wykazali w badaniu, że BAX 855 i ADVATE powodowały uwalnianie prozapalnych cytokin w stopniu nieznacznym, podobnie jak w przypadku grupy kontrolnej, w której podawano bufor. Równie niewielką aktywację składników układu dopełniacza powodowało podawanie BAX 855 i ADVATE, a stopień tej aktywacji nie różnił się od działania buforu podawanego w grupie kontrolnej w badaniach *in vitro* osocza ludzkiego.

Autorzy obserwowali podobną częstość występowania przeciwciał przeciwko BAX 855 i ADVATE we wszystkich mysich modelach. Dodatkowo, u myszy z hemofilią, wykazujących ekspresję ludzkiego F8 cDNA zachowana była immunotolerancja. Autorzy nie obserwowali także różnic w mianie przeciwciał u makaków jawańskich leczonych BAX 855 i ADVATE.

We wnioskach autorzy podkreślili podobny profil immunogenności BAX 855 i ADVATE w badaniach porównawczych przeprowadzonych *in vitro* i *in vivo*, jak również wyrazili przypuszczenie, że BAX 855 powinien być równie bezpieczny jak ADVATE.

Frank M. Horling i wsp. Preclinical immunogenicity assessment of Baxter's longer-acting FVIII candidate BAX 855 using novel preclinical models. Abstract 3323

Leczenie profilaktyczne u chorych z hemofilią A wymaga częstego wstrzykiwania koncentratu czynnika VIII (do kilku razy w tygodniu). Valentino i wsp. przedstawili wyniki badania na modelu mysim porównującego właściwości biologiczne chemicznie modyfikowanej cząsteczki leku ADVATE, który jest rekombinowanym koncentratem czynnika VIII trzeciej generacji (SC rFVIII<sup>FC</sup>) stosowa-

nym obecnie u chorych. Obydwa leki podawano myszom dożylnie w dawce 280 j/kg w określonym czasie przed uszkodzeniem stawu, który miał wywołać wylew. Po trzech dniach sakryfikowano zwierzęta i oceniano obecność krwi w stawie. SC rFVIII<sup>Fc</sup> i rFVIII okazały się równie skuteczne oceniając TBS (*total body score*). SC rFVIII<sup>Fc</sup> było skuteczniejsze w zapobieganiu wylewom do stawów jeśli podano go po 72 h (17% myszy otrzymujących profilaktycznie CM rFVIII *v.* 100% myszy otrzymujących profilaktycznie rFVIII).

Leonard A. Valentino i wsp. *The biological efficacy profile of a chemically modified recombinant factor VIII molecule. Abstract 3324*

### Rekombinowany czynnik VIII otrzymany z ludzkich linii komórkowych

Od kilku lat trwają prace nad pierwszym rekombinowanym czynnikiem VIII produkowanym przez ludzkie komórki. Knaub i wsp. przedstawili wyniki prospektywnego, randomizowanego, otwartego, krzyżowego, wieloośrodkowego badania fazy II, w którym porównano parametry farmakokinetyki (PK, *pharmacokinetics*) rekombinowanego czynnika VIII pozbawionego domeny B (BDD, *B domain deleted*), syntetyzowanego przez ludzkie embrionalne komórki nerkowe (HEK, *human embryonic kidney* 293F) i Kogenate FS, stosowanego rutynowo rekombinowanego czynnika VIII drugiej generacji. W produkcji *Human-cl rhFVIII* (human-cell line recombinant FVIII) zastosowano dwie metody inaktywacji i usuwania wirusów: metodę rozpuszczalnik/detergent i nanofiltrację (filtrację przy użyciu filtrów Planova).

Badanie przeprowadzono w 10 ośrodkach Stanów Zjednoczonych AP i Europy. Badaną grupę stanowiło 22 pacjentów z ciężką postacią hemofilii A, w wieku 12–65 (śr. 39,6 ± 14,1), którzy minimum po 96 h okresie wypłukania otrzymywali jeden z leków w dawce 50 j/m/kg mc. Aktywność FVIII badano dwoma metodami: chromogenną i jednostopniową. Po zakończeniu badań PK pacjenci otrzymywali przynajmniej przez 6 miesięcy *human-cl rhFVIII* w celu oceny skuteczności i bezpieczeństwa leczenia na żądanie.

W wyniku przeprowadzonych badań autorzy stwierdzili, że w badaniach farmakokinetycznych *human-cl rhFVIII* i Kogenate FS wykazały podobne właściwości farmakokinetyczne. W czasie leczenia pacjentów wykazano jego skuteczność (do leczenia 96,3% epizodów krwawień wystarczyło podanie 1–2 dawek leku). Skuteczność leczenia oceniono jako bardzo dobrą w przypadku 59,4% epizodów krwawień, dobrą odpowiedź — w przypadku 34,4%; Lek okazał się także bezpieczny, a po jego stosowaniu nie wystąpiły działania niepożądane.

Sigurd Knaub i wsp. *A prospective, multi-center, randomized clinical trial to compare the pharmacokinetic properties of Human-cl rhFVIII, a new human-cell line derived recombinant Factor VIII expressed in baby hamster kidney cells. Abstract 3309 (s. 1423)*

### Rekombinowany czynnik von Willebranda

Czynnik von Willebranda występuje w postaci multimetrów o ciężarze cząsteczkowym od 600 do 20 000 kDa. Stężenie wielkocząsteczkowych multimetrów (UHMW, *ultra high molecular weight*) vWF we krwi jest niskie, ponieważ zaraz po uwolnieniu ich do krążenia ulegają cięciu przez metaloproteinazę ADAMTS 13. Rekombinowany vWF produkowany metodami inżynierii genetycznej w hodowlach komórek jajnika chomika chińskiego (CHO) zawiera dużą ilość UHMW multimetrów, podobnie do ludzkiego AWF składowanego w ciałkach Weibel-Palada w komórkach śródbłonna naczyniowego.

Autorzy przedstawili wyniki badań przedklinicznych, w których oceniali *ex vivo* cięcie przez ADAMTS 13 po podaniu dożylnym UHMW multimetrów rvWF. Przeprowadzone wcześniej badania *in vitro* i badania na modelach zwierzęcych (króliki, makaki jawańskie) wykazały, że 15 min po podaniu rvWF wykrywano fragmenty charakterystyczne dla cięć ADAMTS 13 (*immunoblotting*).

Pojawienie się w krążeniu określonej długości fragmentów cięcia i zmniejszenie liczby UHMW multimetrów rvWF świadczyło o ich pocięciu przez endogenną metaloproteinazę ADAMTS 13. Ten efekt był „gatunkowo zależny”, to znaczy obserwowano tylko niewielkie cięcia łańcuchów mysich.

Zakończone ostatnio badania kliniczne fazy I wykazały, że podawany dożylnie pacjentom z ciężką postacią vWD (choroby von Willebranda) rvWF w dawce od 7,5 do 50 vWF:RCo j/kg masy ciała podlegał w krążeniu szybkiemu działaniu ADAMTS 13. Działanie to wykazano, przeprowadzając analizę multimetrów; w analizowanym materiale nie stwierdzono obecności UHMW multimetrów rvWF, nie obserwowano także powikłań zakrzepowo-zatorowych w badanej grupie pacjentów.

Katalin Varadi i wsp. *In vivo of recombinant vWF upon intravenous administration in preclinical and clinical settings. Abstract 1222*

### Hamowanie działania TFPI

Obecnie trwają prace nad białkami, które poprzez hamowanie inhibitora drogi krzepnięcia zależnej od czynnika tkankowego (TFPI, *tissue factor pathway inhibitor*) mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu hemofilii. Jednym z takich białek jest aptamer ARC19499 (BAX 499), który „utrudnia” blokowanie przez TFPI zarówno czynnika Xa, jak

i kompleksu czynnik tkankowy/czynnik VIIa. W badaniach przeprowadzonych *in vitro* osocza hemofilowego obserwowano poprawę procesu generacji trombiny i parametrów krzepnięcia. W badaniach z udziałem makaków jawańskich z zespołem podobnym do hemofilii A przeprowadzonych *ex vivo* wykazano poprawę parametrów układu krzepnięcia (tromboelastometria i badania czasu krwawienia) po podaniu BAX 499 A.

W celu zrozumienia mechanizmu w jakim BAX 499 hamuje działanie TFPI, Waters i wsp. przeprowadzili badania określające miejsce wiązania BAX 499 z TFPI i porównali aktywność BAX 499 w stosunku do specyficznej domeny przeciwciał anty-TFPI. Aptamer mocno wiązał się z pełno cząsteczkowym TFPI, gorzej z cząsteczką pozbawioną fragmentu w regionie C końcowym cząsteczki, bardzo słabo z cząsteczką zawierającą tylko domeny K3 (Kunitz 3) i regionu C końcowego, natomiast w ogóle nie wiązał się z cząsteczką TFPI zawierającą tylko domenę 1 i Kunitza (K1 i K2).

Wiązanie znakowanego aptameru z TFPI badano metodą *ELISA* i metodą *dot blot*. W obydwu badaniach przeciwciała przeciw domenom K1 i K3

wykazywały działanie kompetycyjne z aptamerem, przeciwciała przeciw domenie regionu C końcowego — częściowo kompetycyjne, natomiast przeciwciała przeciw domenie K2 nie konkurowały z aptamerem o miejsce wiązania. Wyniki tych badań sugerują, że epitop wiążący BAX 499 obejmuje całą cząsteczkę białka, ze szczególnym uwzględnieniem domen: K1, K3 i regionu końcowego C.

Badania aktywności wykazały, że profil hamowania BAX 499 jest podobny do tego jaki wykazują przeciwciała anty-TFPI, które wiążą się z domenami K1, K3 i regionu końcowego C. W badaniu mierzącym aktywność anty-Xa TFPI, przeciwciała anty-K2 w pełni hamują TFPI i przywracają aktywność FXa. W przeciwieństwie do tego, BAX 499 i przeciwciała anty-K1, anty-K3 i przeciwko domenie regionu C-końcowego nie blokują w pełni TFPI i powodują tylko częściowe przywrócenie aktywności FXa. Wyniki badań nad wiązaniem aptameru do TFPI w obecności FXa sugerują, że aptamer i białko mogą równocześnie wiązać się z TFPI.

*Emily K. Waters. Investigation into the mechanism of action and binding site of BAX 499, an aptamer against Tissue Factor Pathway Inhibitor. Abstract 1214*