

# Wybrane zagadnienia dotyczące problemów leczenia hemofilii w świetle danych przedstawionych w czasie konferencji *Managing Haemophilia for Life — terapia genowa* Windsor, 16–18 listopada 2012 roku

Magdalena Łętowska

Instytut Hematologii i Transfuzjologii

*J. Transf. Med.* 2013; 6: 30–31

W końcu lat dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia i na początku obecnego wieku opublikowano pierwsze prace dotyczące terapii genowej hemofilii A i B u myszy i psów z hemofilią. Do mięśni szkieletowych tych zwierząt wprowadzano gen czynnika IX, z rekombinowanym adenowirusem (rAAV) jako nośnikiem genu i uzyskano korektę fenotypu hemofilowego. W 2000 roku Kay i wsp. z Uniwersytetu Stanforda i Uniwersytetu Pensylwanii opublikowali dane dotyczące pierwszych trzech dorosłych pacjentów z hemofilią B z badanej grupy 8 chorych, którym domięśniowo wprowadzono gen czynnika IX (wektor — rAAV) w dawce eskalującej. Dawka inicjująca wynosiła  $2 \times 10^{11}$  vg/kg. Nie stwierdzono ani przeniesienia sekwencji wektora do komórek rozrodczych, ani wytworzenia przeciwciał przeciwko czynnikowi IX. Natomiast metodą PCR (*polymerase chain reaction*) i *Southern-blot* wykryto sekwencje wirusa w mięśniach [1].

Dane dotyczące wszystkich 8 chorych przedstawiono w kolejnej publikacji, która ukazała się w *Blood* w 2003 roku [2]. Pacjentom z ciężką postacią hemofilii B (czynnik IX < 1%) i z mutacjami typu *missense* autorzy podawali domięśniowo wektor rAAV kodujący ludzki czynnik IX (AAV-FIX) w dawkach od  $2 \times 10^{11}$  vg/kg do  $1,8 \times 10^{12}$  vg/kg. W ciągu 40 miesięcy obserwacji nie wykryto przeciwciał do czynnika IX, nie wykryto wektora w spermie, nie stwierdzono również miejscowych ani ogólnych objawów toksyczności. W biopsjach mięśni

pobranych z miejsc wkłucia w okresie od 2 do 10 miesięcy od podania wektora stwierdzono transfer genu i jego ekspresję. Badania biopsji wykonano metodami: PCR, *Southern blot* i immunohistochemicznymi. Chociaż nie osiągnięto zadawalającego efektu klinicznego: u 6 chorych poziom czynnika IX był poniżej 1%, zaś u 2 chorych osiągnął poziom pomiędzy 1% i 2%, jednak autorzy podkreślili duże znaczenie tego badania. Jego wynik wykazał, że transdukcja AAV w mięśniu szkieletowym przebiega podobnie u ludzi i u zwierząt, jak również dał podstawę do kontynuowania badań nad terapią genową u chorych na hemofilię, a zwłaszcza badań nad podawaniem wektora do naczyń wątrobowych.

W 2006 roku Manno i High i wsp. opublikowały wyniki badania 1/2 fazy, w którym 7 pacjentom z hemofilią B podano do tętnicy wątrobowej wektor rAAV2 kodujący ludzki czynnik IX (rAAV2-FIX) w dawce eskalującej do  $2,0 \times 10^{12}$  vg/kg [3]. Nie obserwowano żadnych objawów toksycznego działania wektora ani jego obecności w nasieniu. U dwóch pacjentów, którzy otrzymali największą dawkę, obserwowano przejściowy wzrost stężenia czynnika IX we krwi maksymalnie do 11% i 3%, utrzymujący się do 8 tygodni od leczenia. Równocześnie, wraz ze spadkiem stężenia czynnika IX we krwi, obserwowano przejściowy wzrost transaminaz. We wnioskach autorki podkreśliły, że ich zdaniem brak długotrwałego efektu klinicznego jest spowodowany raczej immunologicznym uszkodze-

**Adres do korespondencji:** prof. dr hab. n. med. Magdalena Łętowska, IHiT, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa, e-mail: letowska@ihit.waw.pl

niem transdukowanych hepatocytów przez kapsyd AAV niż przez antygen czynnika IX.

Doświadczenia zespołu High [3] doprowadziły do wysunięcia następujących wniosków:

- wektor powinien charakteryzować się większą siłą,
- wektor powinien być pozbawiony immunogenności, jaką charakteryzował się AAV2.

Badania nad terapią genową chorych na hemofilię B, prowadzone w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej i w Anglii, doprowadziły do dobrych wyników leczenia pierwszej grupy chorych. W 2011 roku w *New England Journal of Medicine* ukazała się praca przedstawiająca wyniki zastosowania terapii genowej u 6 chorych z ciężką postacią hemofilii B [4, 5]. Nośnikiem transgenu (*scAAV2/8-LP1-hFIXco*) był adenowirus AAV8. Chorych, którym wektor podano dożylnie w pojedynczej dawce, podzielono na trzy grupy po 2 pacjentów. W pierwszej grupie podano dawkę  $2,0 \times 10^{11}$  vg/kg, w drugiej  $6,0 \times 10^{11}$  vg/kg, zaś w trzeciej  $2,0 \times 10^{12}$  vg/kg. Nie stosowano żadnych leków immunosupresyjnych. Okres obserwacji wynosił od 6 do 16 miesięcy. U wszystkich 6 pacjentów stwierdzono wzrost aktywności czynnika IX od 2 do 11%. U 4/6 pacjentów zaprzestano profilaktycznego podawania czynnika IX i nie obserwowano samoistnych wylewów, u pozostałych 2 pacjentów zwiększyły się odstępy między podaniami koncentratu czynnika IX. U 2 pacjentów, którzy otrzymali największą dawkę wektora obserwowano przejściowy wzrost transaminazy alaninowej, który uległ normalizacji po zastosowaniu kortykosteroidów.

Aktualizację prowadzonych obserwacji przedstawił dr Amit Nathwani w czasie swojego wykładu w listopadzie 2012 roku podczas konferencji *Managing Haemophilia for Life*. Dane z tych obserwacji były następujące:

- okres obserwacji **Pacjenta 1** wynosi 24 miesiące, aktywność czynnika IX utrzymuje się na poziomie 2% i zużycie koncentratu czynnika IX zmniejszyło się o 77%;
- leczenie **Pacjenta 2 i 3** okazało się nieskuteczne;
- **pacjent 4** pozostaje > 25 miesięcy bez leczenia profilaktycznego koncentratami czynnika IX i stężenie endogennego czynnika utrzymuje się na poziomie 2%;

- u **Pacjenta 5** zużycie koncentratów czynnika IX zmniejszyło się o 85% i pozostaje on bez leczenia profilaktycznego powyżej 24 miesięcy;
- stężenie czynnika IX u **Pacjenta 6** utrzymuje się na poziomie 5%, a zużycie koncentratów czynników krzepnięcia zmniejszyło się o 100%.

Uzyskane wyniki leczenia dały podstawę do zastosowania terapii genowej u kolejnych trzech pacjentów z hemofilią B. Podobnie jak ich poprzednicy wszyscy trzej pacjenci, otrzymali dożylnie, *F9*, którego nośnikiem był AAV8. Dawka wynosiła  $2,0 \times 10^{12}$  vg/kg. U **Pacjenta 7** obserwowano przejściowy wzrost transaminazy alaninowej wymagający leczenia kortykosteroidami; pacjent ten pozostaje w obserwacji 7 miesięcy i nie wymaga leczenia profilaktycznego. **Pacjenci 8 i 9** nie wymagali ani stosowania kortykosteroidów, ani profilaktycznego podawania koncentratów czynników krzepnięcia.

Prace nad terapią genową w hemofilii trwają nadal i dotyczą nie tylko niedoboru czynnika IX, ale także czynnika VIII, którego *F8* jest znacznie dłuższy niż *F9*, w związku z czym bardzo trudno poddaje się klonowaniu. W badania te zaangażowane są zarówno ośrodki naukowe, czego przykładem jest *Children's Hospital of Pennsylvania*, jak i firmy biotechnologiczne takie jak Asclepius BioPharmaceutical Inc.

Olbrzymi postęp w leczeniu pacjentów z chorobami genetycznymi możliwy jest właśnie dzięki takiej współpracy pomiędzy ośrodkami leczącymi a firmami biotechnologicznymi.

## Piśmiennictwo

1. Kay M.A., Manno C.S., Ragni M.V. i wsp. Evidence for gene transfer expression of Factor IX in haemophilia B patients treated with AAV vector. *Nat. Genet.* 2000; 24: 257–261.
2. Manno C.S., Chew A.J., Hutchinson S.H. i wsp. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe haemophilia. *Blood* 2003; 101: 2963–2972.
3. Manno C.S., Arruda V.R., Pierce G.F. i wsp. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nature Med.* 2006; 12: 342–347.
4. Nathwani A.C., Tuddenham E.G.D., Rangarajan S. i wsp. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365: 2357–2365.
5. Roberts D.J. Genes for old: successful gene therapy for haemophilia B. *Transf. Med.* 2012; 22: 3–4.