

Table ronde :  
Recherche clinique et thérapie génique

Réunion MHEMO – 4 juin 2019

Sandra Le Quellec, MD, PhD

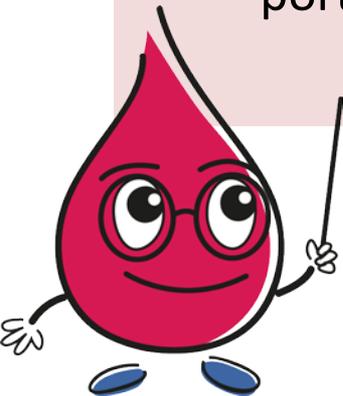
# Définitions

- Recherche clinique :

« La recherche clinique comprend l'ensemble des études scientifiques qui sont réalisées sur la personne **humaine**, en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales. »

- Thérapie génique:

« Méthode thérapeutique utilisant les **gènes**, ou l'information dont ils sont porteurs, pour traiter une maladie génétique ou pour modifier un comportement cellulaire »



# Thérapie génique de l'hémophilie

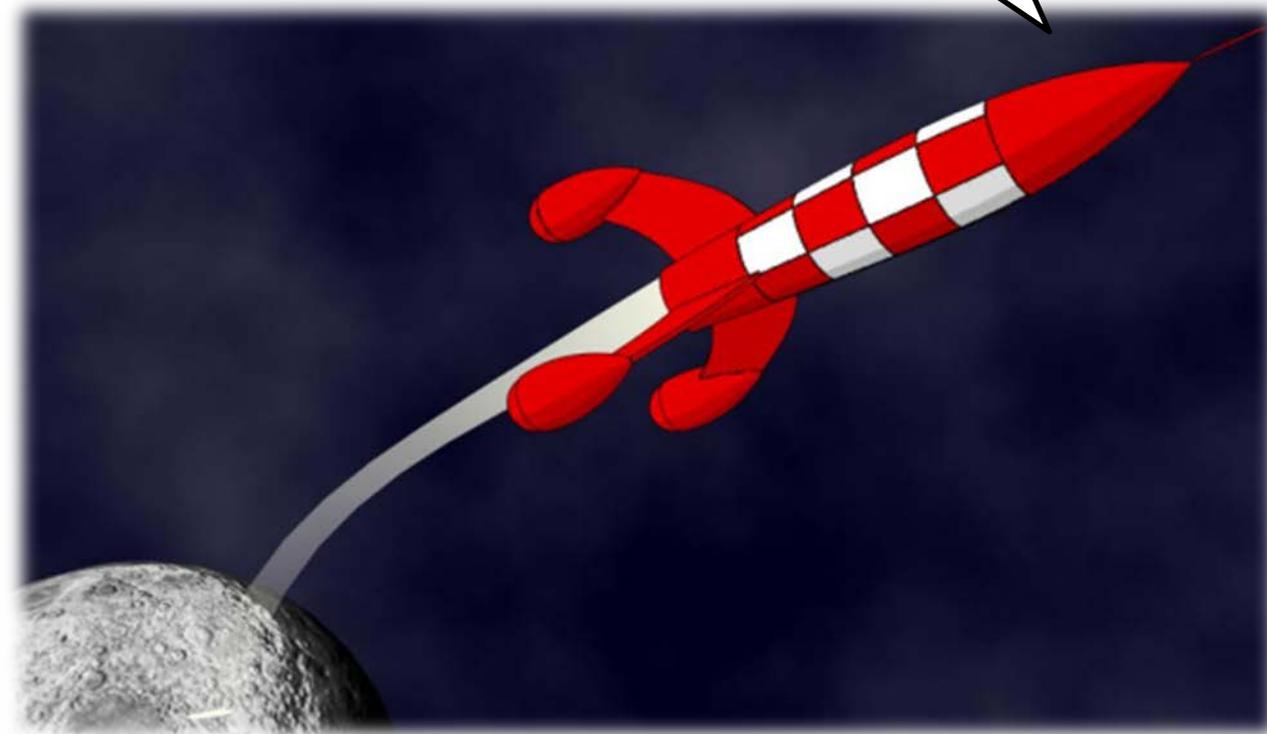
J'ai un colis pour vous!



**TARGET**



Protéines de FVIII/FIX  
fonctionnelle





# Vecteurs viraux

## Vecteurs « intégratifs »:

- rétrovirus
- lentivirus



Intégration dans l'ADN de la cellule hôte

## Vecteurs « non intégratifs »:

- adénovirus
- virus adéno-associé (AAV)



Persistence sous forme épisomale

# Question

- Combien de sérotypes naturels d'AAV sont actuellement caractérisés?

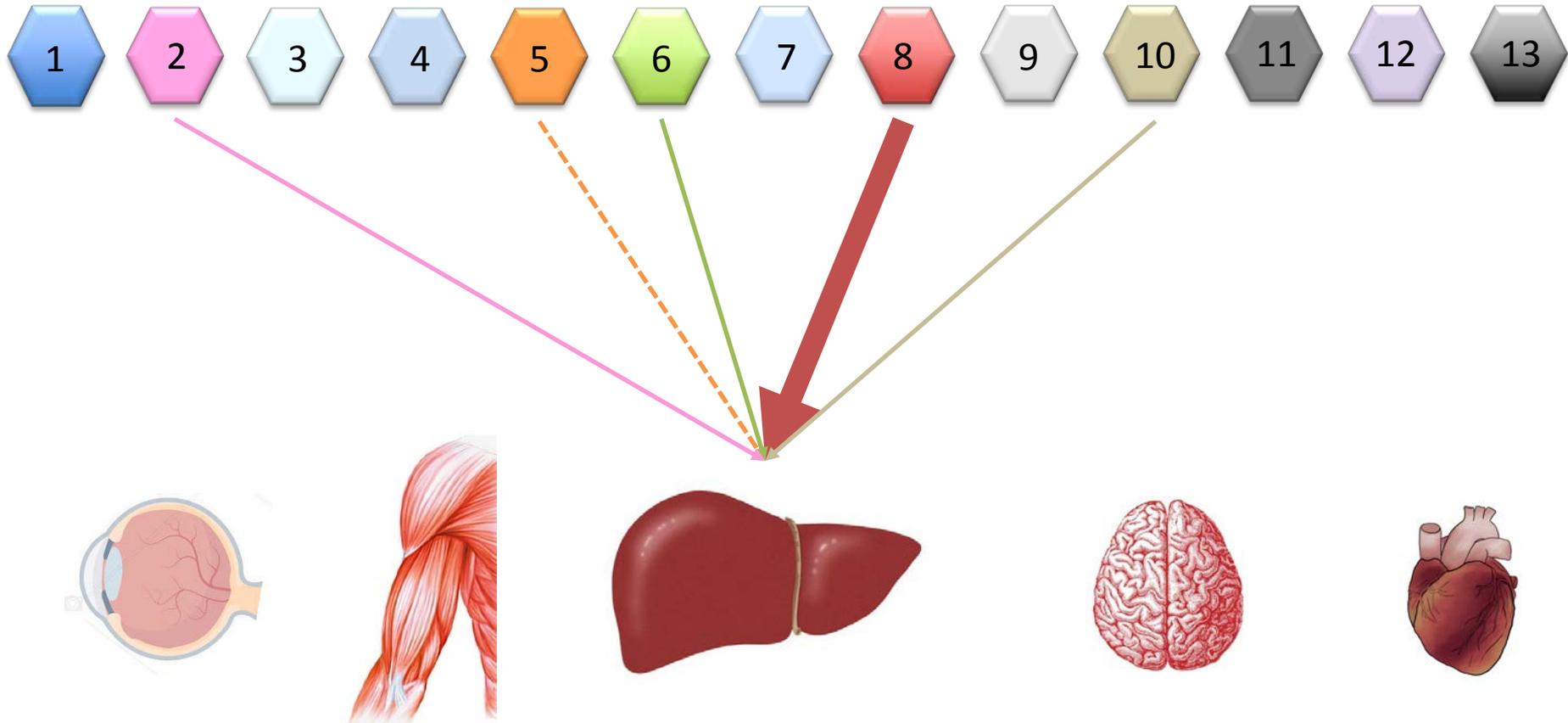
A. 3

B. 9

 C. 13

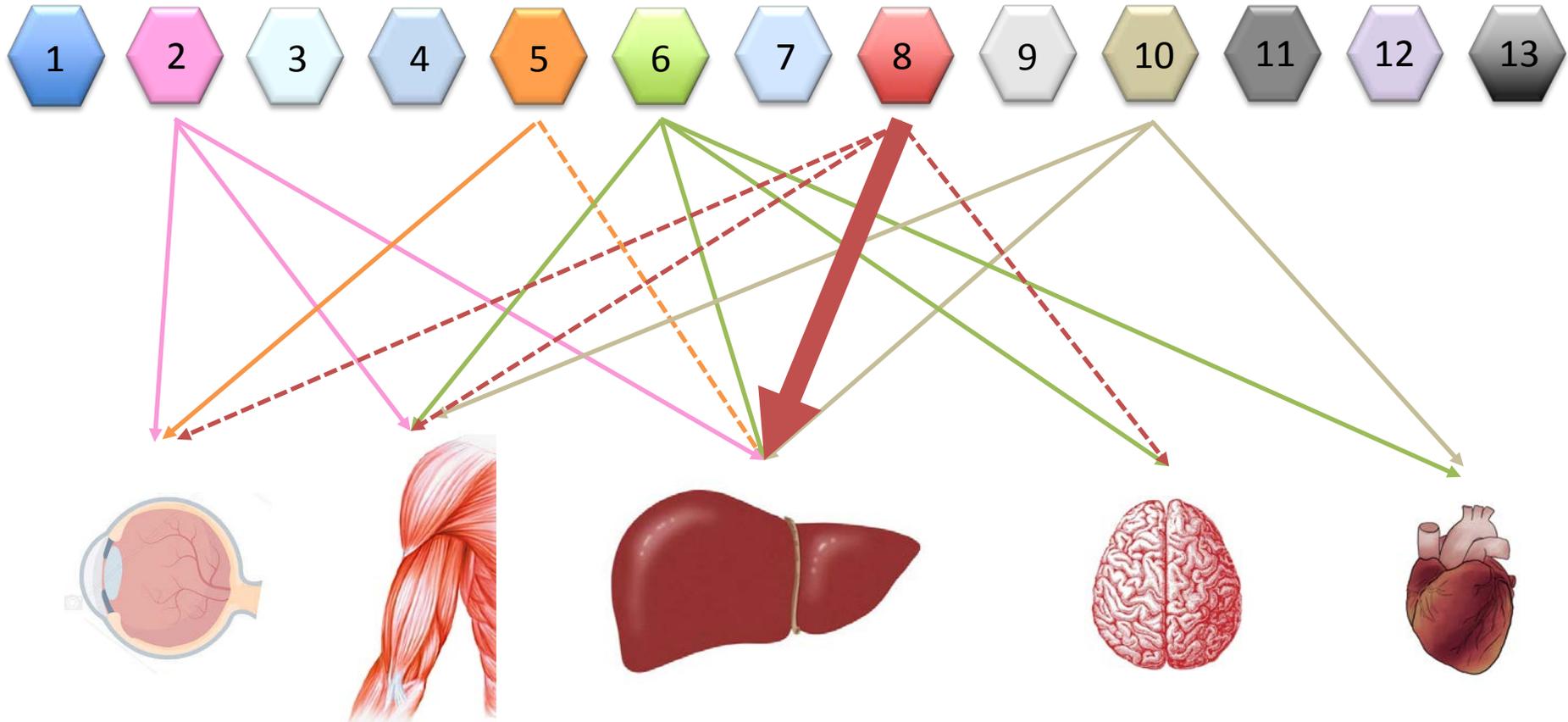
D. 27

# Différents types d'AAV



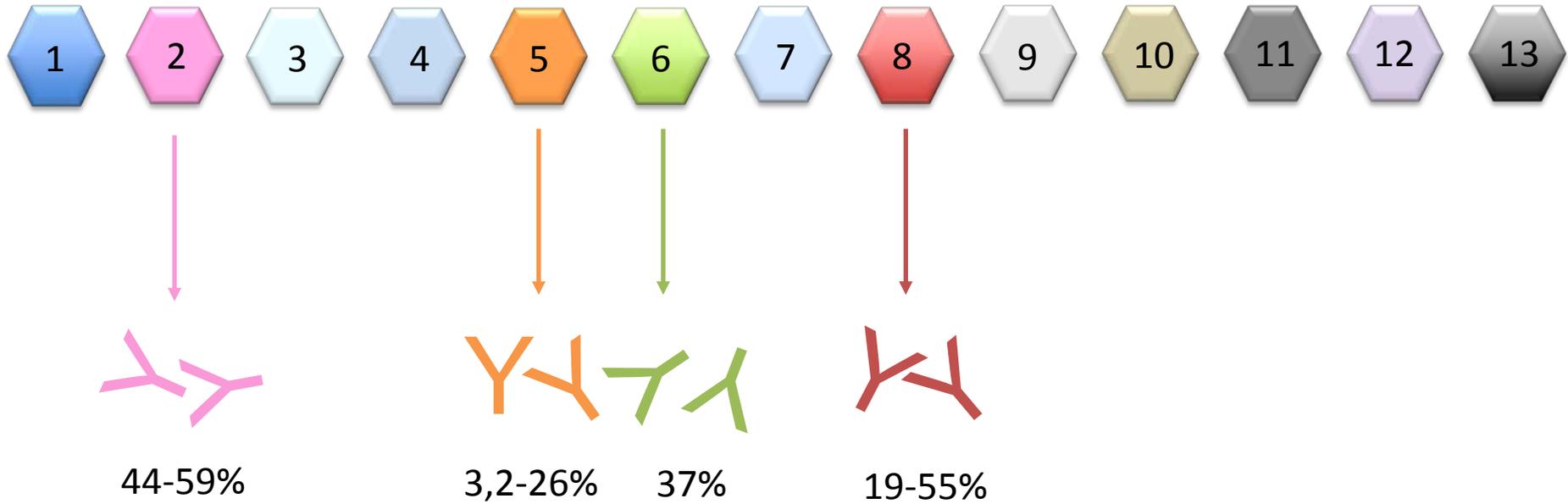
Tropisme préférentiel d'organe

# Différents types d'AAV



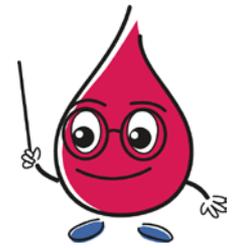
Tropisme préférentiel d'organe : mais aucune exclusivité!

# Différents types d'AAV



Séroprévalence préexistante des anticorps neutralisants (NAbs)

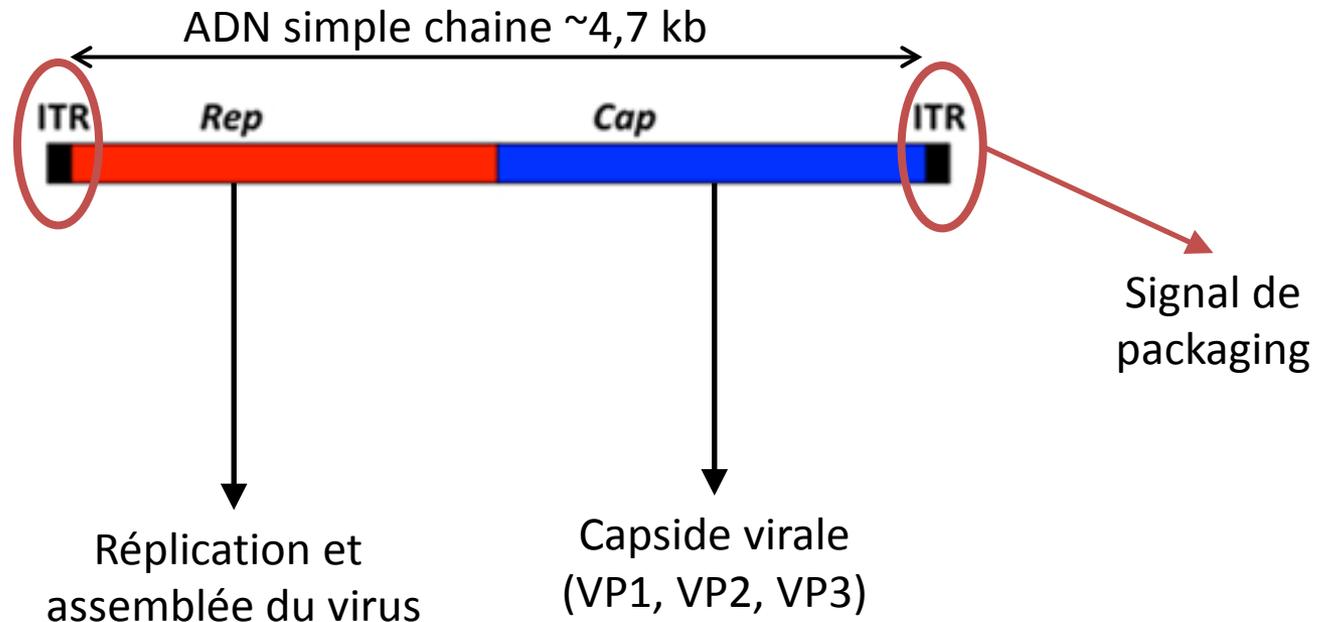
# AAV : comment c'est fait?



Virus non-enveloppé

← 25 nm →

w.t. AAV



# Vecteur AAV recombinant : comment ça se fait?

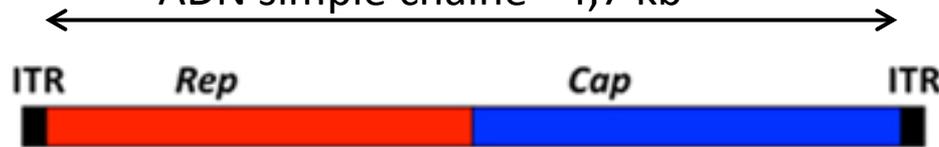
Virus non-enveloppé

← 25 nm →

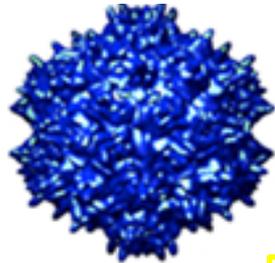
w.t. AAV



ADN simple chaîne ~4,7 kb



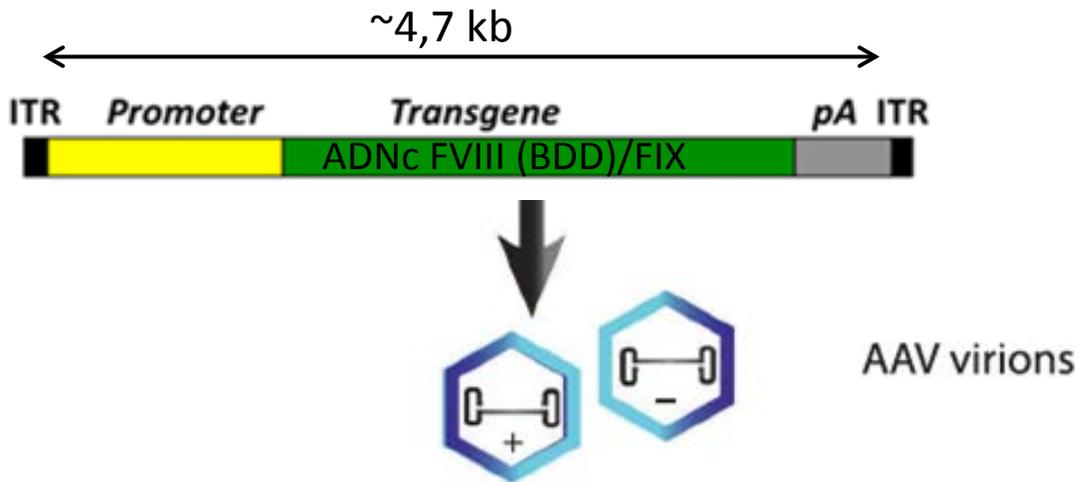
Vecteurs AAV recombinant (rAAV)



Signal de packaging

Puissance de l'expression du transgène  
Spécificité d'expression tissulaire : promoteur hépato-spécifique

# Simple chaine ou auto-complémentaire

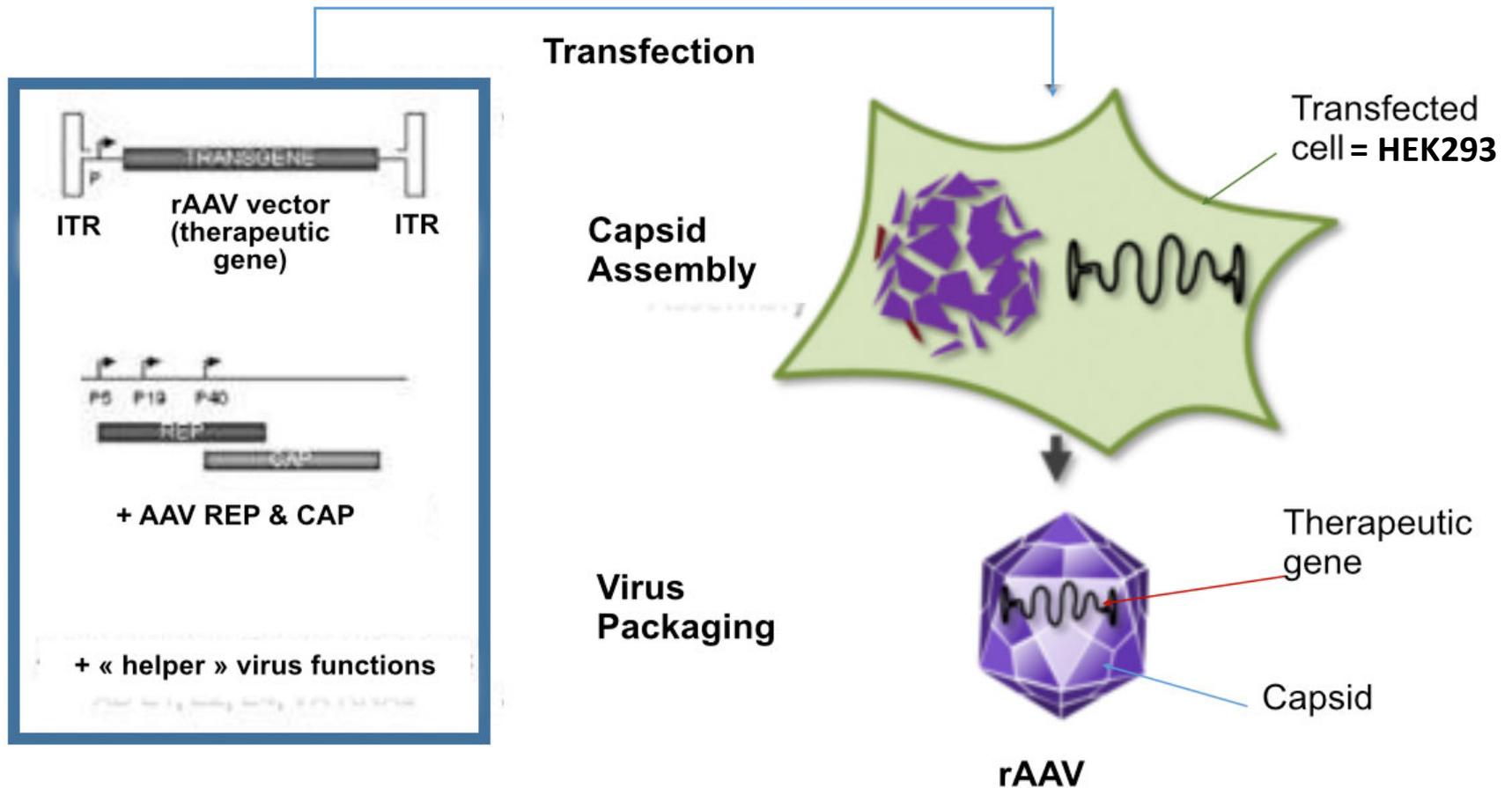


« Single-stranded » (simple chaine):

- Délai de synthèse du brin complémentaire d'ADN
- Recombinaison intermoléculaire inefficace

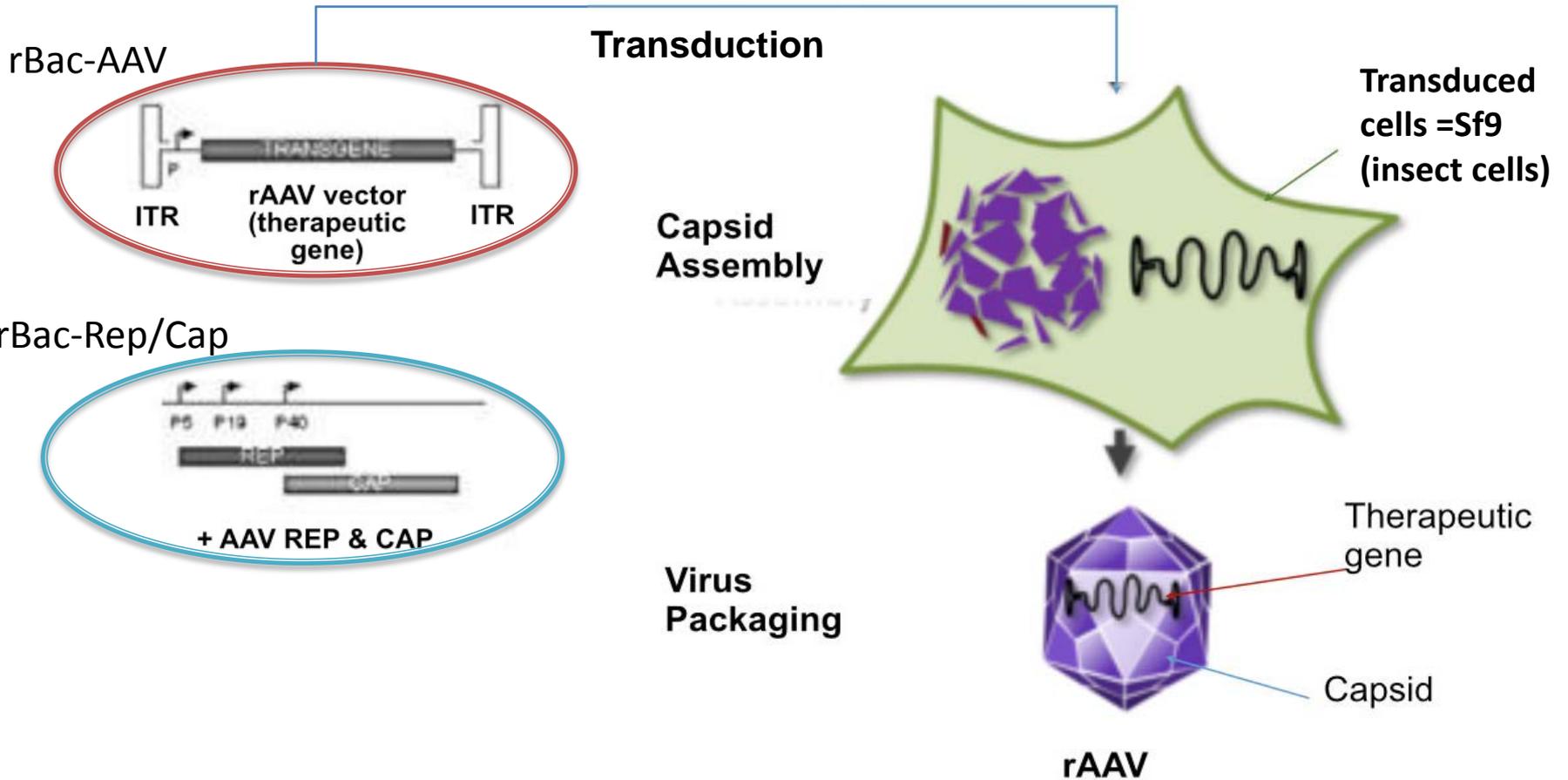
# Production d'un vecteur rAAV

Triple co-transfection de cellules HEK293T



# Production d'un vecteur rAAV

Système Baculovirus

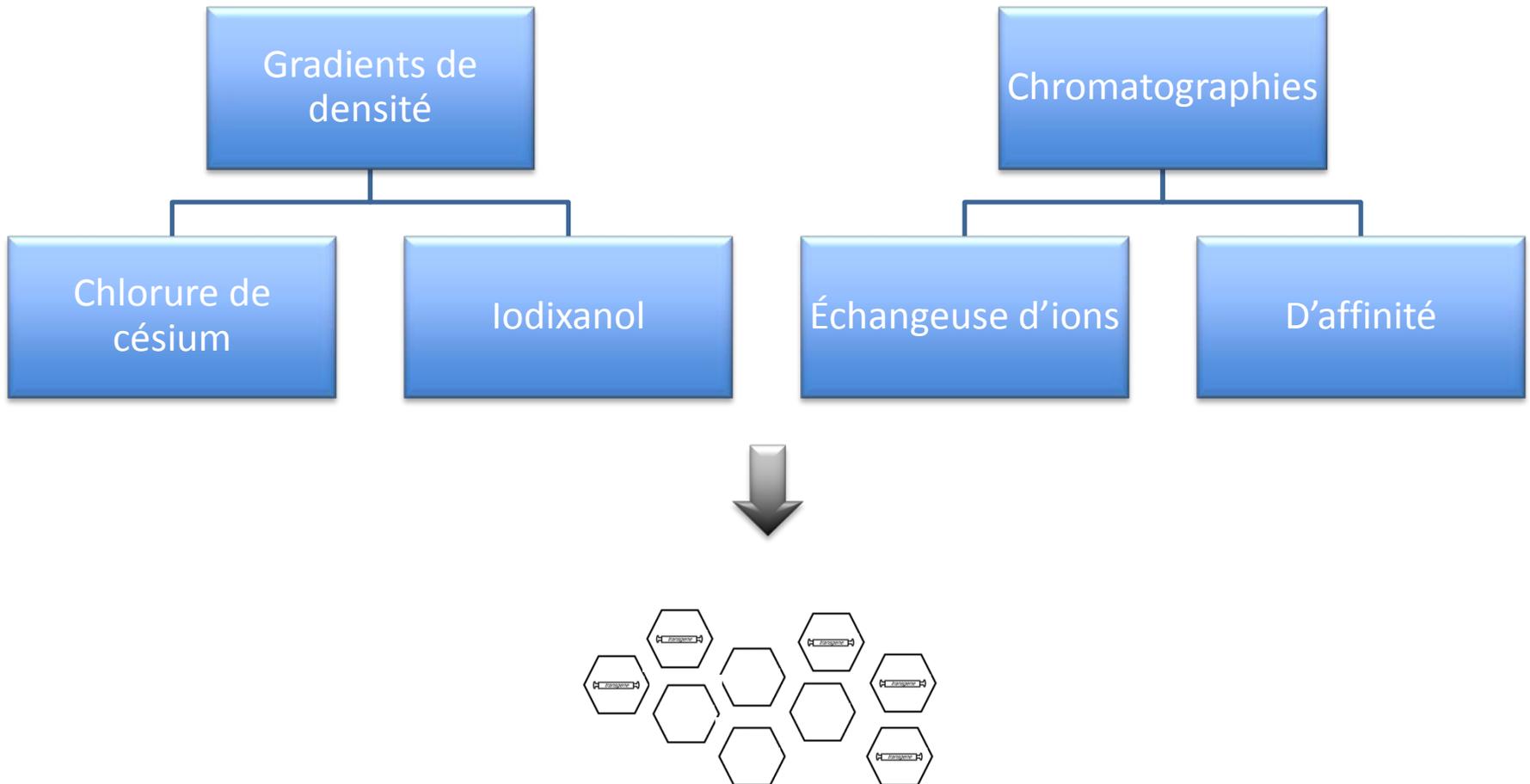


# Production d'un vecteur rAAV

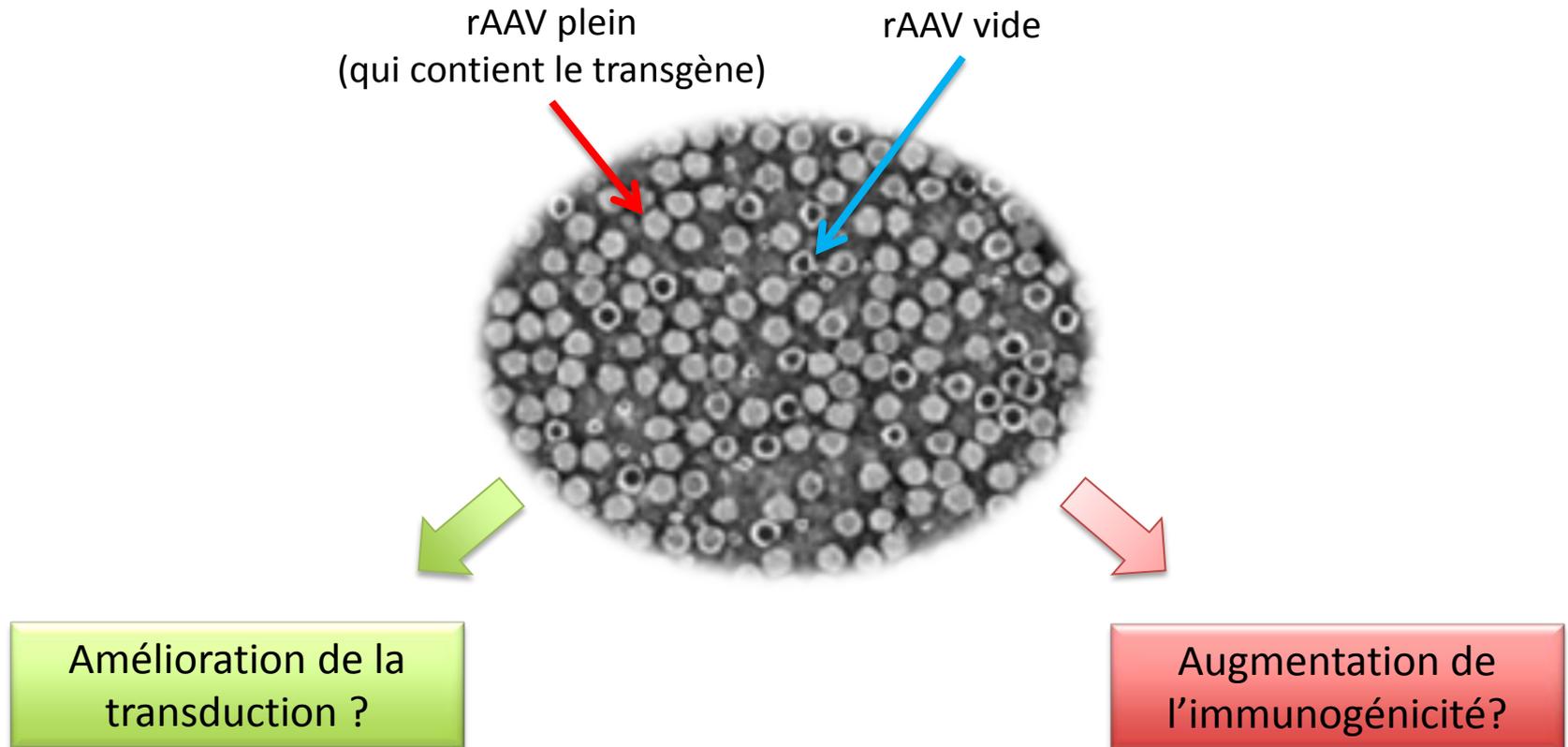
	HEK293T	Baculovirus
<b>Cellules transfectées</b>	Origine humaine	Sf9 = cellules d'insecte
<b>Efficacité de production</b>	$\sim 1 \times 10^5$ rAAV/cellule	$\sim 2 \times 10^5$ rAAV/cellule
<b>Particules</b>	1-30% de rAAV pleines	7-30% des rAAV pleines
<b>ADN contaminants</b>	$\leq 6\%$ vecteur plasmidique $\leq 0,1\%$ rep-cap $\leq 0,5\%$ génome humain	$\leq 3\%$ rBac $\leq 0,1\%$ rep-cap $\leq 0,05\%$ génome insecte
<b>Protéines contaminantes</b>	Protéines cellulaires Protéines d'adénovirus 5	Protéines cellulaires Protéines de baculovirus

# Procédés de purification des rAAV

- Divers procédés de purification :



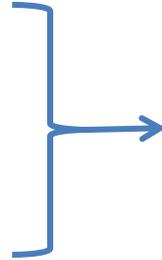
# Ratio rAAV pleines/vides : quel impact?



# Titration des rAAV

- Différentes techniques de titration des vecteurs

- qPCR
- Southern/Dot Blot
- Gel d'agarose alcalin

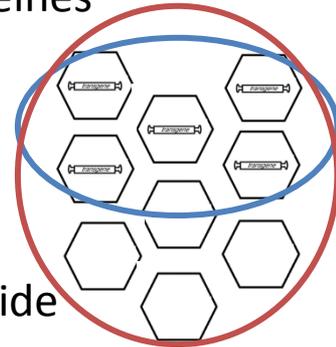


Mesure du  
« vector genome »  
=  
quantité particules rAAV pleines

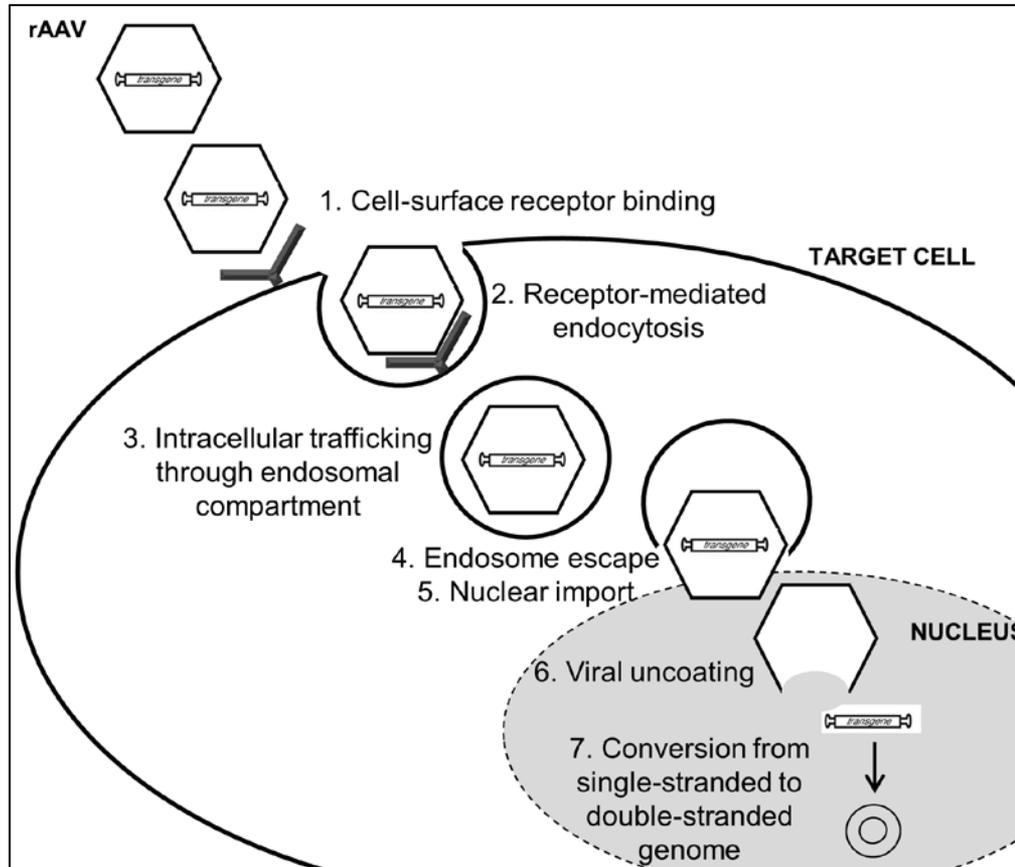
- ELISA anti-AAV



Mesure antigénique de capside  
virale  
=  
quantité de particules rAAV  
totales (pleines+vides)



# Transduction cellulaire *in vivo*



Médiée par des récepteurs cellulaires:

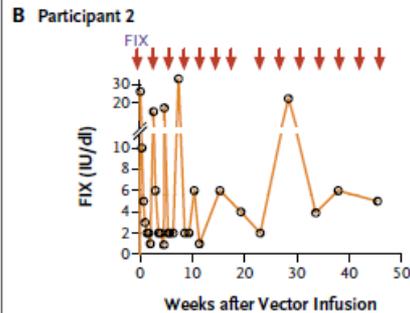
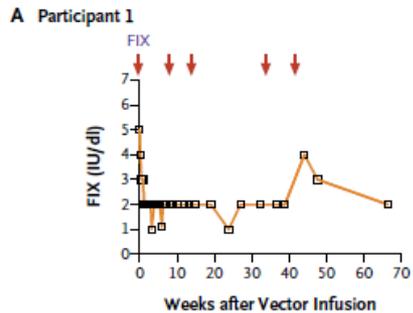
-dont certains sont inconnus

-variabilité individuelle

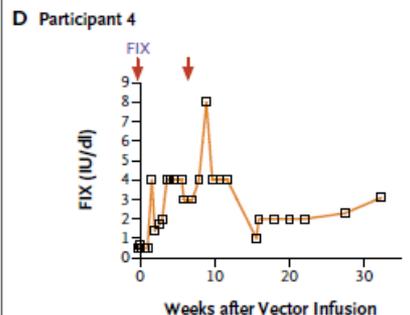
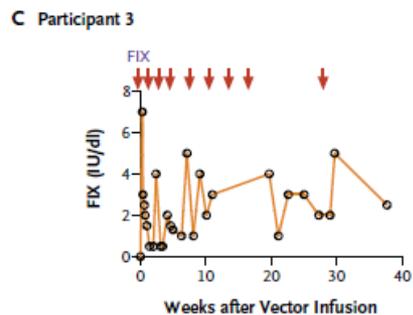
-quantité impossible à estimer

# 1<sup>er</sup> succès de thérapie génique

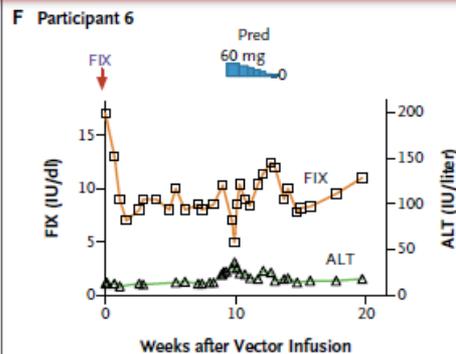
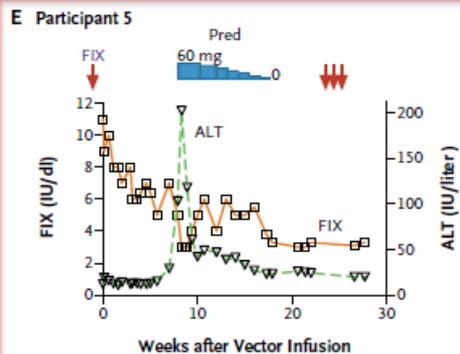
8 scAAV2/8-LP1-hFIXco → FIX



$2 \times 10^{11}$  vg/kg → FIX:C = 1,8 IU/dl



$6 \times 10^{11}$  vg/kg → FIX:C = 2,5 IU/dl



$2 \times 10^{12}$  vg/kg → FIX:C = 5,1 IU/dl

- ↑ transitoire des transaminases

# Optimisation des vecteurs AAV

Modifications des capsides



Amélioration de la  
transduction hépatique

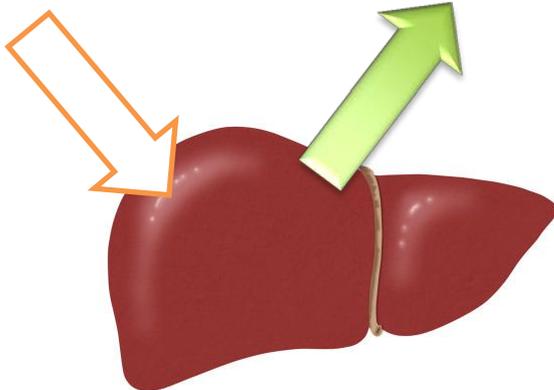
Modifications transgenes



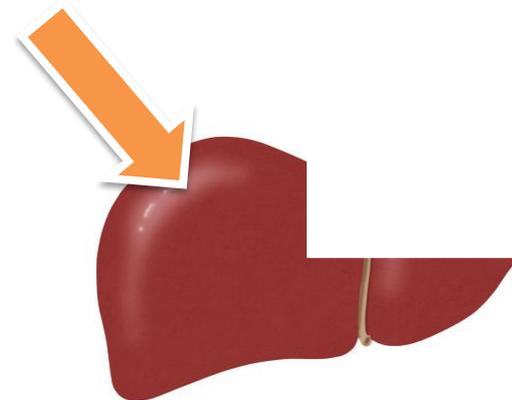
Amélioration de l'expression  
du transgène

rAAV

Protéines FVIII/FIX



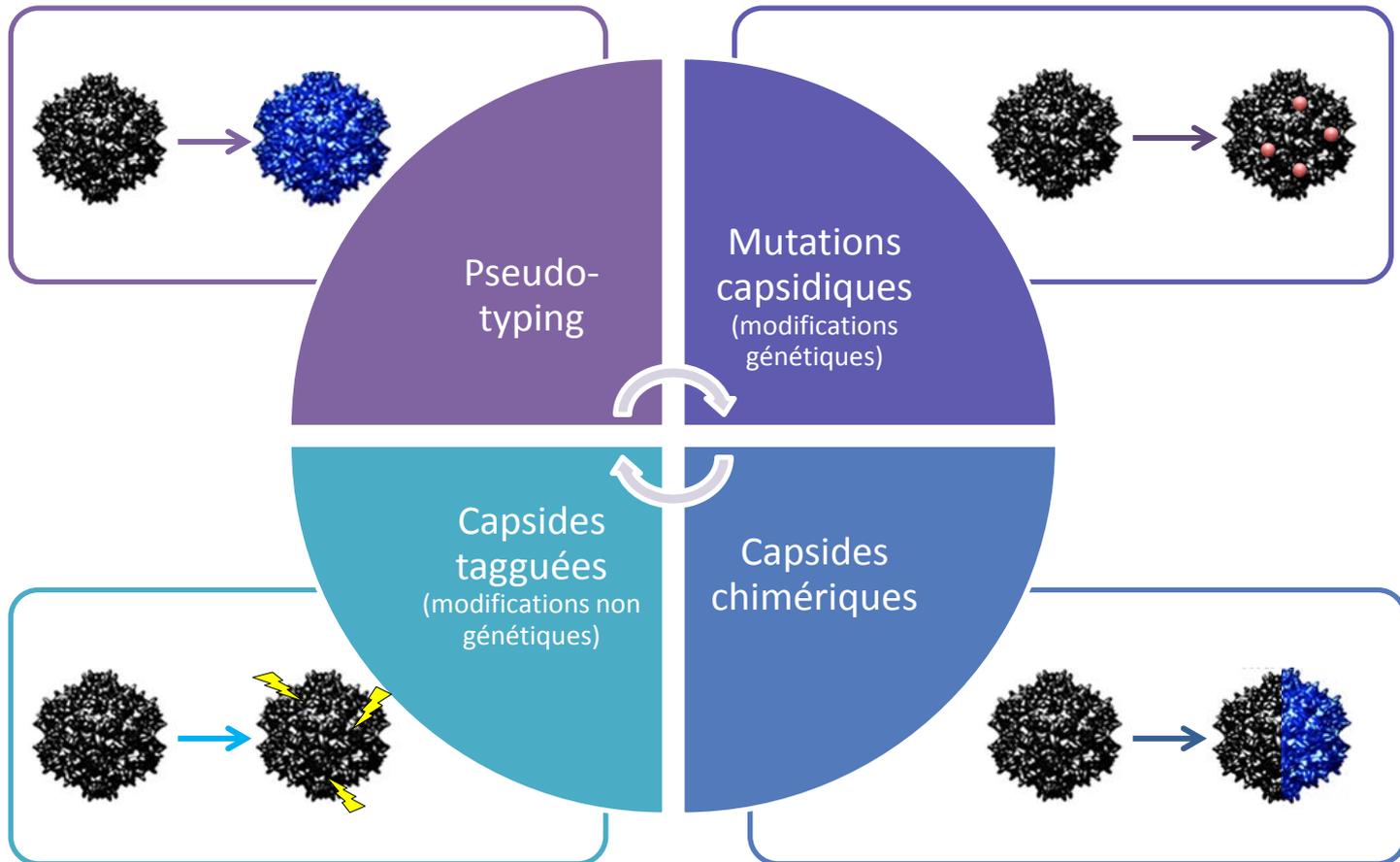
rAAV





# Modifications de capsides

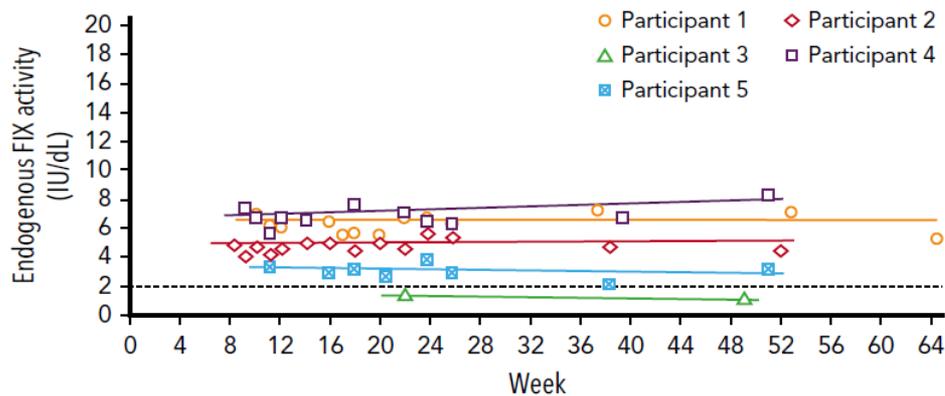
But : échapper aux anticorps neutralisants +/- de la dégradation lysosomale



# AMT-060

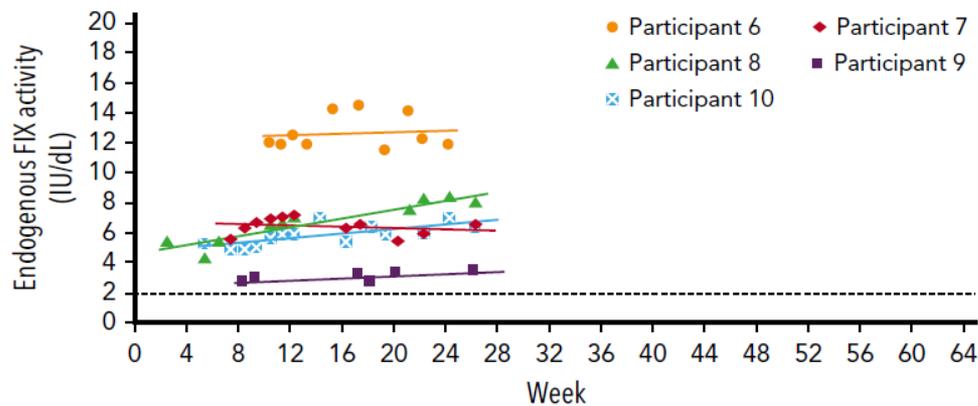
5 scAAV2/5-LP1-hFIXco → FIX

dose  $5 \times 10^{12}$  vg/kg



**FIX:C = 4,4 IU/dl**

dose  $2 \times 10^{13}$  vg/kg



**FIX:C = 6,9 IU/dl**

# Modifications des transgènes

But : augmenter l'activité plasmatique FVIII:C/FIX:C

En augmentant l'expression antigénique de FVIII/FIX

En augmentant le niveau de transcription (ADN → ARNm)

- Promoter/  
Enhancer  
- Self complementary

En augmentant la stabilité de l'ARNm

Incorporation de séquences introniques tronquées

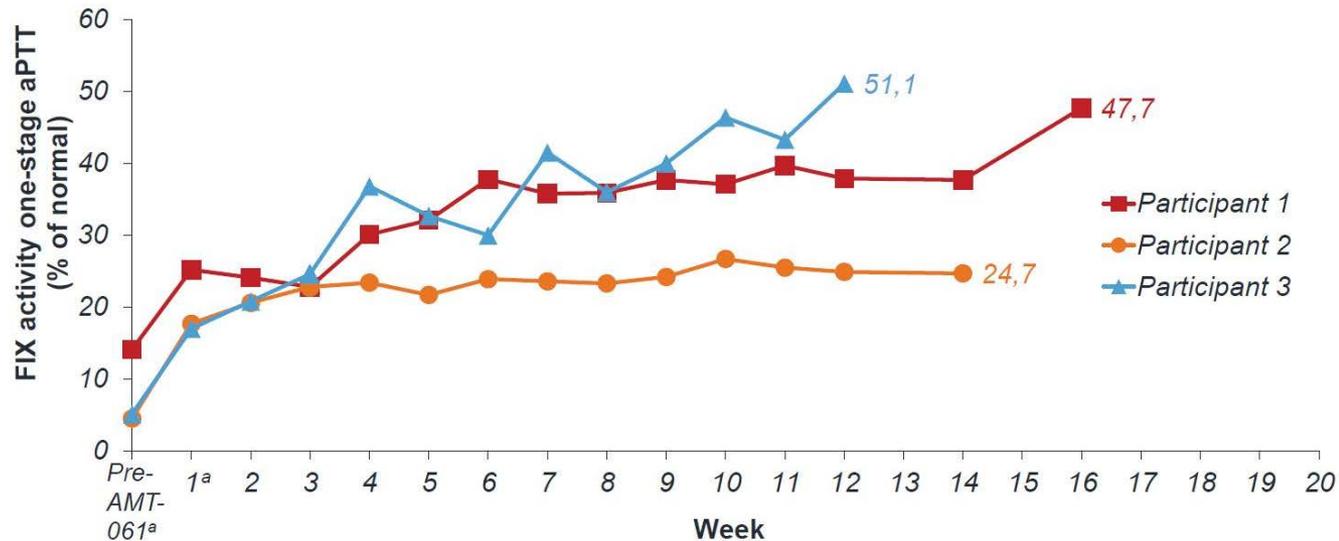
En augmentant le niveau de traduction (ARNm → protéine)

Codon-optimisation

# AMT-061

5 scAAV2/5-LP1-hFIXcoR338L → FIX Padua

dose  $2 \times 10^{13}$  vg/kg



**FIX:C = 38,0 IU/dl**  
(x 5,5 par rapport à AMT-060)

Prochaine mise à jour : ISTH Melbourne Juillet 2019



# Les « méga » vecteurs de l'hémophilie B

## SPARK-9001

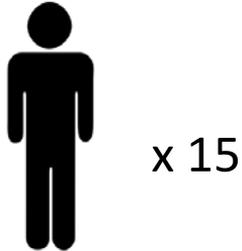


## FLT180A

ssSpark<sup>100</sup>-hAAT-hFIXcoR338L → FIX Padua

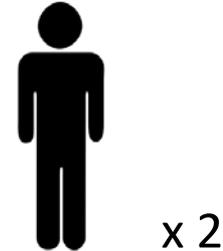
ssAAVS3-HLP-hFIXco1R338L → FIX Padua

- Dose  $5 \times 10^{11}$  vg/kg



- FIX:C = 33 IU/dl
- Suivi >52 semaines

- Doses  $4,5 \times 10^{11}$  vg/kg



- FIX:C = 50 IU/dl,
- Suivi > 24 semaines,

# Résumé thérapie génique de l'HB

Sponsor	Name	Vector	Dose (vg/kg)	FIX:C (IU/dl)	Transaminitis	Follow-up
UCL/St Jude	-	scAAV2/8-LP1-hFIXco	2x10 <sup>11</sup> 6x10 <sup>11</sup> 2x10 <sup>12</sup>	1.4-7.2	4/10	>8 years
Sparks Therapeutics (Roche)	Spk9001	ssAAV~8 <sup>(Spk 100)</sup> -hAAT-hFIXcoR338L	5x10 <sup>11</sup>	14-81	2/15	>104 weeks
uniQure	AMT-60	scAAV5-LP1-hFIXco	5x10 <sup>12</sup> 2x10 <sup>13</sup>	1.3-6.8 3.1-12.7	3/10	>52 weeks
uniQure	AMT-61	scAAV5-LP1-hFIXcoR338L	2x10 <sup>13</sup>	24.1-51.1	1/2	>12 weeks
Freeline Therapeutics	FLT180a	ssAAVS3-HLP-hFIXcoI1-R338L	4.5x10 <sup>11</sup> 1.2x10 <sup>12</sup>	>40	0/2	>14 weeks
Shire	BAX-335	scAAV8-LP1-hFIXco R338L	2x10 <sup>11</sup> 1x10 <sup>12</sup> 3x10 <sup>12</sup>	20-25 (n=1/7)	2/8	52 weeks
Dimension Therapeutics	DTX-101	ssAAVrh10-hFIXco	1.6x10 <sup>12</sup> 6x10 <sup>12</sup>	<2	5/6	≥32 weeks
Sangamo	SB-FIX	AAV2/6-ZFN1 + AAV2/6-ZFN2 +AAV2/6-F9	5x10 <sup>13</sup>	-	-	-

Prochaine mise à jour : ISTH Melbourne Juillet 2019

# Résumé thérapie génique de l'HB

## Efficacité

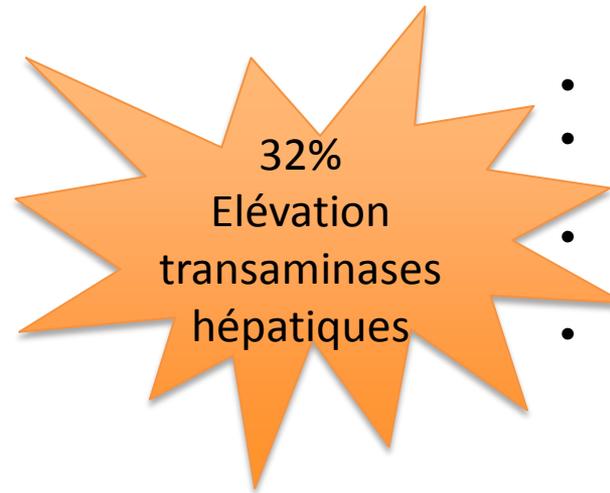
Saignements



Médicaments de FIX

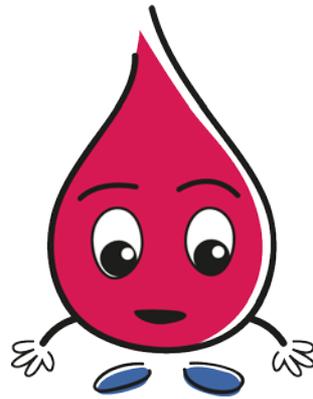


## Sécurité



- Asymptomatique
- 4 à 10 semaines après injection
- Résolutive sous corticoïdes
- +/- baisse de FIX

- Absence de développement d'anti-FIX



**ET LA THÉRAPIE GÉNIQUE DE  
L'HÉMOPHILIE A?**

# Particularité pour l'HA : le FVIII

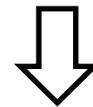
ARNm du FVIII  
(9 kb)



ADNc du FVIII  
(7,2 kb)



ADNc du FVIII-B  
domaine B délété  
(~4,2 kb)



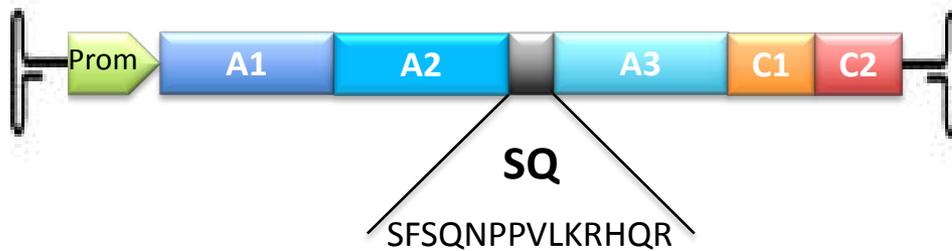
Transgène FVIII-B  
domaine B délété  
(~4,7 kb)



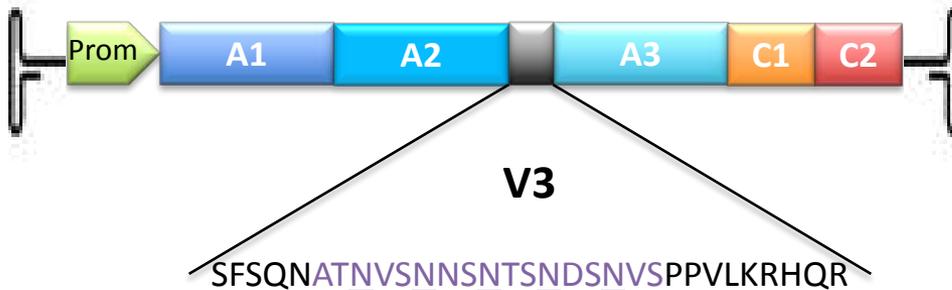
~5 kb



# Les transgènes de FVIII



- ssAAV2/5-HLP-hFVIIIco-SQ (BMN270)
- ssAAV2/LKO3-TTR-hFVIIIco-SQ (Spk-8011)
- ssAAV2/8-TTR-hFVIIIco-SQ (BAX888)
- ssAAV2/6-?-hFVIIIco-SQ (SB-525)



- ssAAV2/8-HLP-hFVIIIco-V3 (Go-8)

# Résumé thérapie génique de l'HA

Sponsor	Name	Vector	Dose (vg/kg)	FVIII:C (IU/dl)	Transaminitis	Follow-up
BioMarin	BMN 270	ssAAV5-HLP-BDD hFVIIIco-SQ	6x10 <sup>12</sup> 2x10 <sup>13</sup> 6x10 <sup>13</sup> 4x10 <sup>13</sup>	<1 2 12-273 2-45	11/15	104 weeks 52 weeks
Spark Therapeutics	Spk 8011	ssSpk <sup>200</sup> (LK03)-TTR-BDD hFVIII-SQ	5x10 <sup>11</sup> 1x10 <sup>12</sup> 2x10 <sup>12</sup>	13 15 <5-49	9/12	>78 weeks
UCL/St Jude	Go-8	ssAAV2/8-HLP-hFVIIIco-V3	6x10 <sup>11</sup> 2x10 <sup>12</sup>	7 6-69	2/3	>13 weeks
Shire	BAX-888	ssAAV2/8-TTR-BDD hFVIIIco-SQ	2x10 <sup>12</sup> * 8x10 <sup>12</sup> *	-	-	-
Sangamo Therapeutics (Pfizer)	SB-525	ssAAV2/6-BDD hFVIIIco-SQ	9x10 <sup>11</sup> 2x10 <sup>12</sup> 1x10 <sup>13</sup> 3x10 <sup>13</sup>	-	-	-

Capsides/kg

Prochaine mise à jour : ISTH Melbourne Juillet 2019

# Résumé thérapie génique de l'HA

## Efficacité

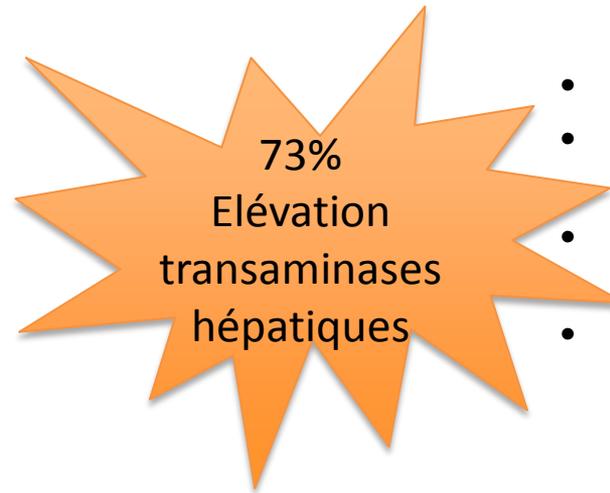
Saignements



Médicaments de FIX



## Sécurité

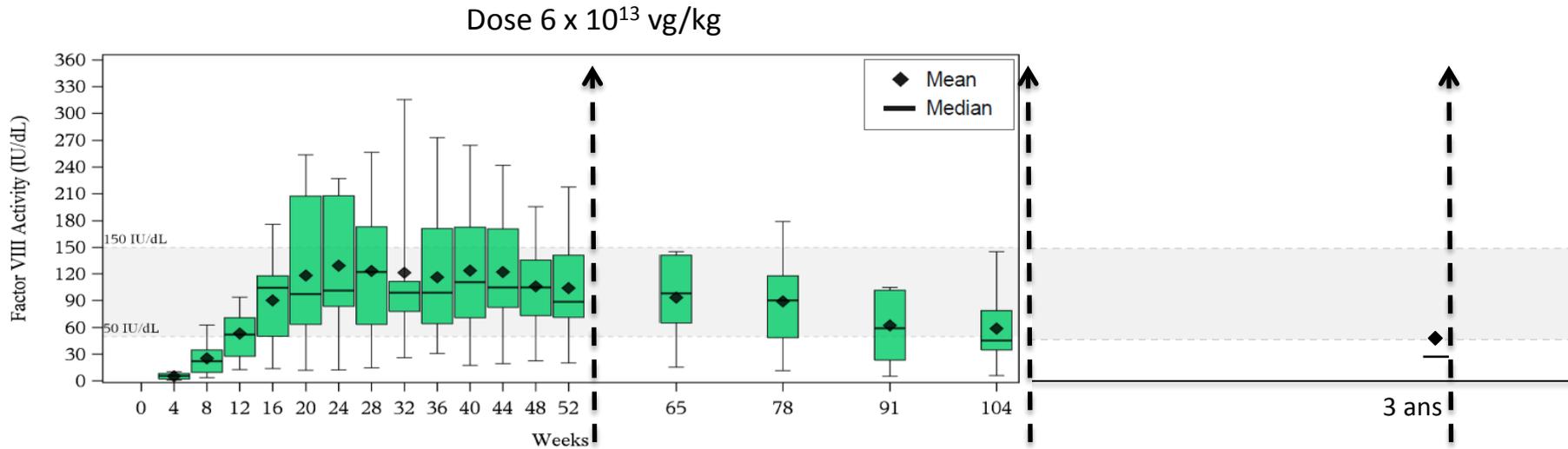


- Asymptomatique
- 4 à 10 semaines après injection
- Corticoïdes systématiques
- +/- baisse de FVIII

- Absence de développement d'anti-FVIII

# valoctocogene roxaparvovec (BMN270)

5 ssAAV2/5-HLP-hFVIIIco-SQ (BMN270)

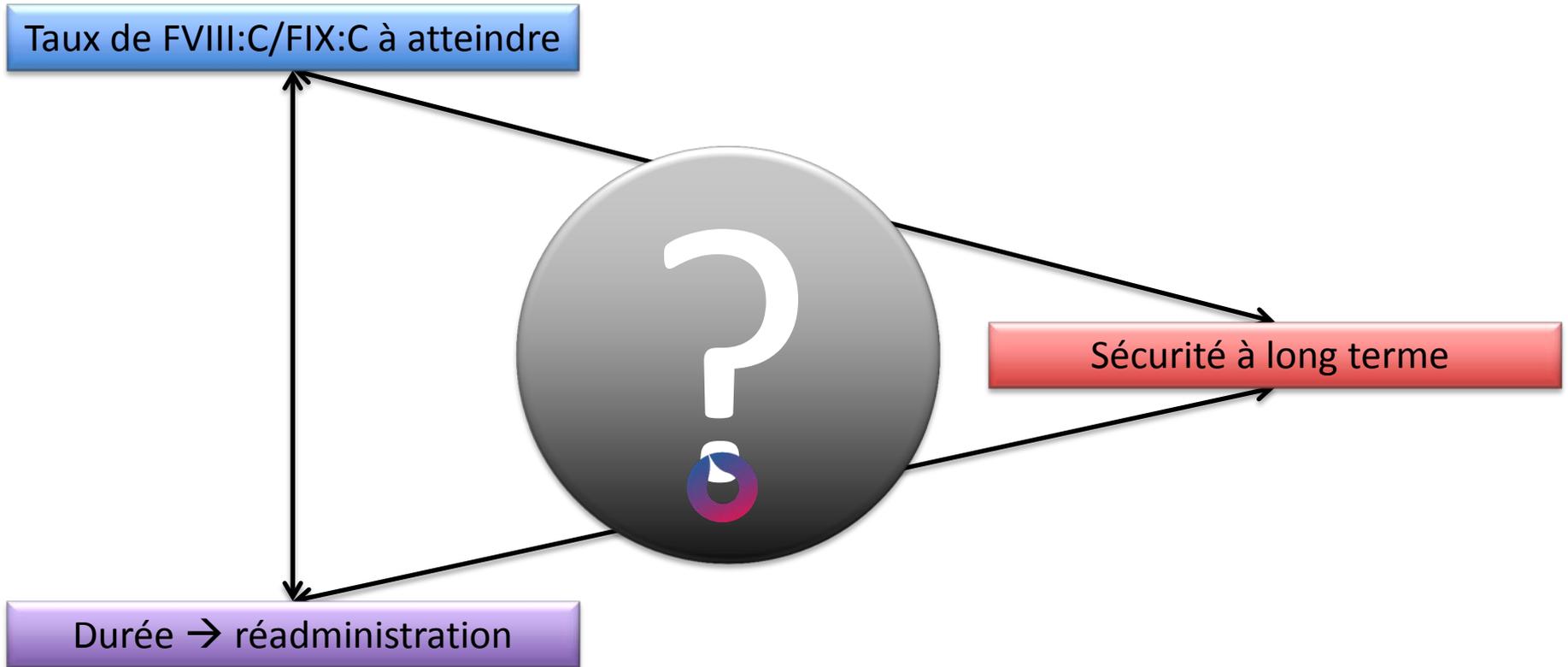


Moyenne FVIII:C (coag/chromo) 104%/64%  
Médiane FVIII:C (coag/chromo) 89%/60%

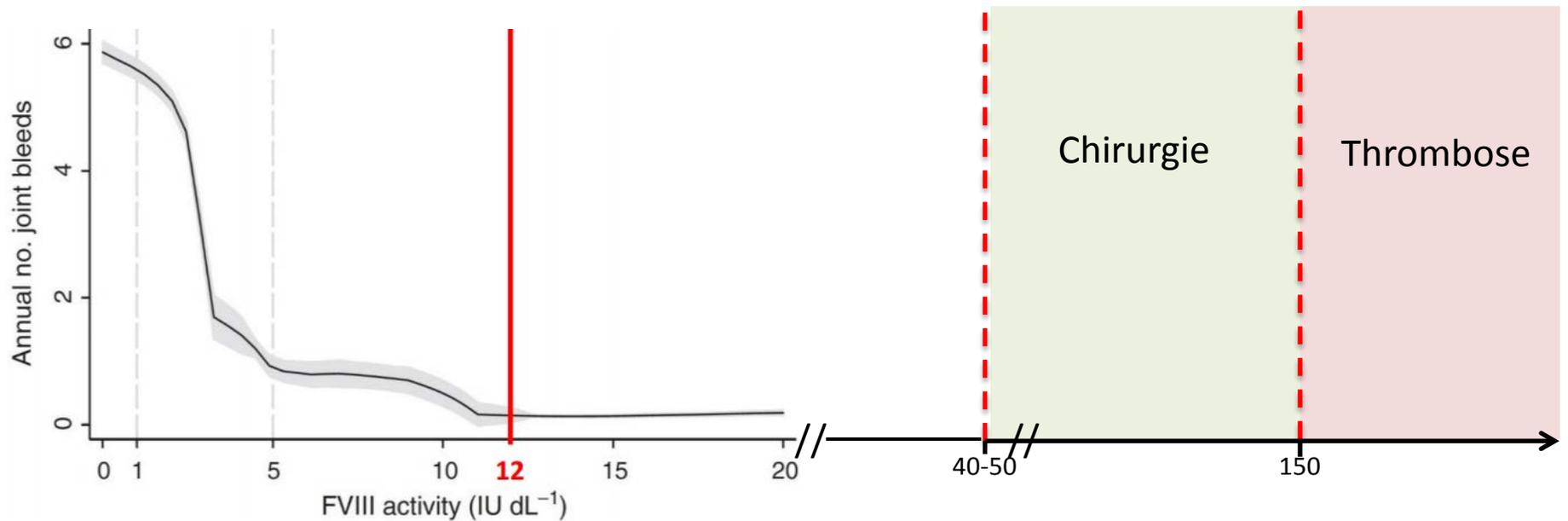
59%/36%  
46%/26%

52%/33%  
30%/20%

# Beaucoup de questions

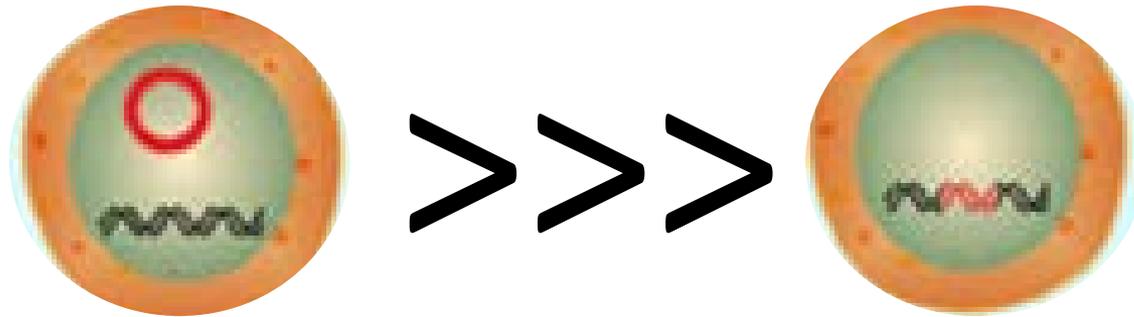


# Taux de FVIII:C / FIX:C à atteindre



# Sécurité à long terme

- AAV « non intégratif » (épisomal)



- 1-10% d'intégration (dose-dépendante)
- Localisation :
  - Spécifique: chromosome 19
  - > aléatoire

Prédisposition au carcinome hépato-cellulaire?

# Durée d'efficacité

- Ce qu'on espérerait : toute la vie après l'injection

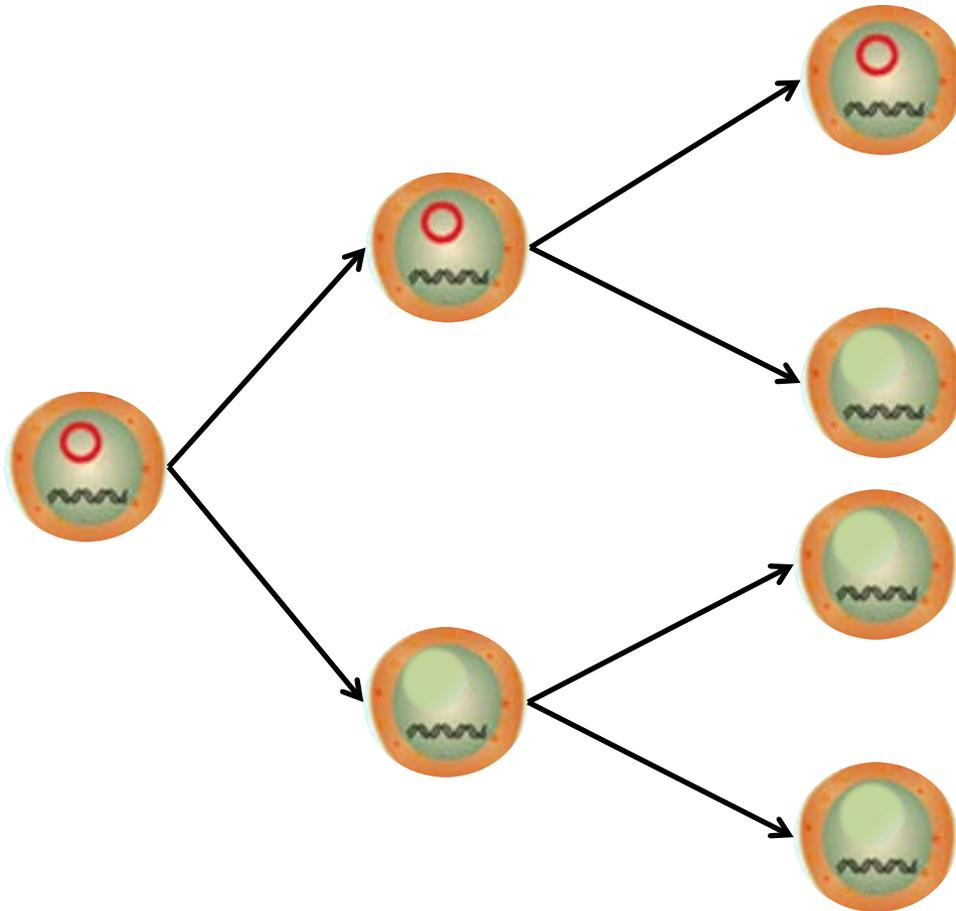


- Ce qu'on sait : durées maximum d'efficacité rapportées
  - Chez les hommes hémophiles B sévères: > 8 ans
  - Chez les animaux (chiens, primates) : > 10 ans

- Ce qui est attendu : ce que prédisent certains algorithmes
  - BioMarin BMN270 : ~ 8 ans post-injection

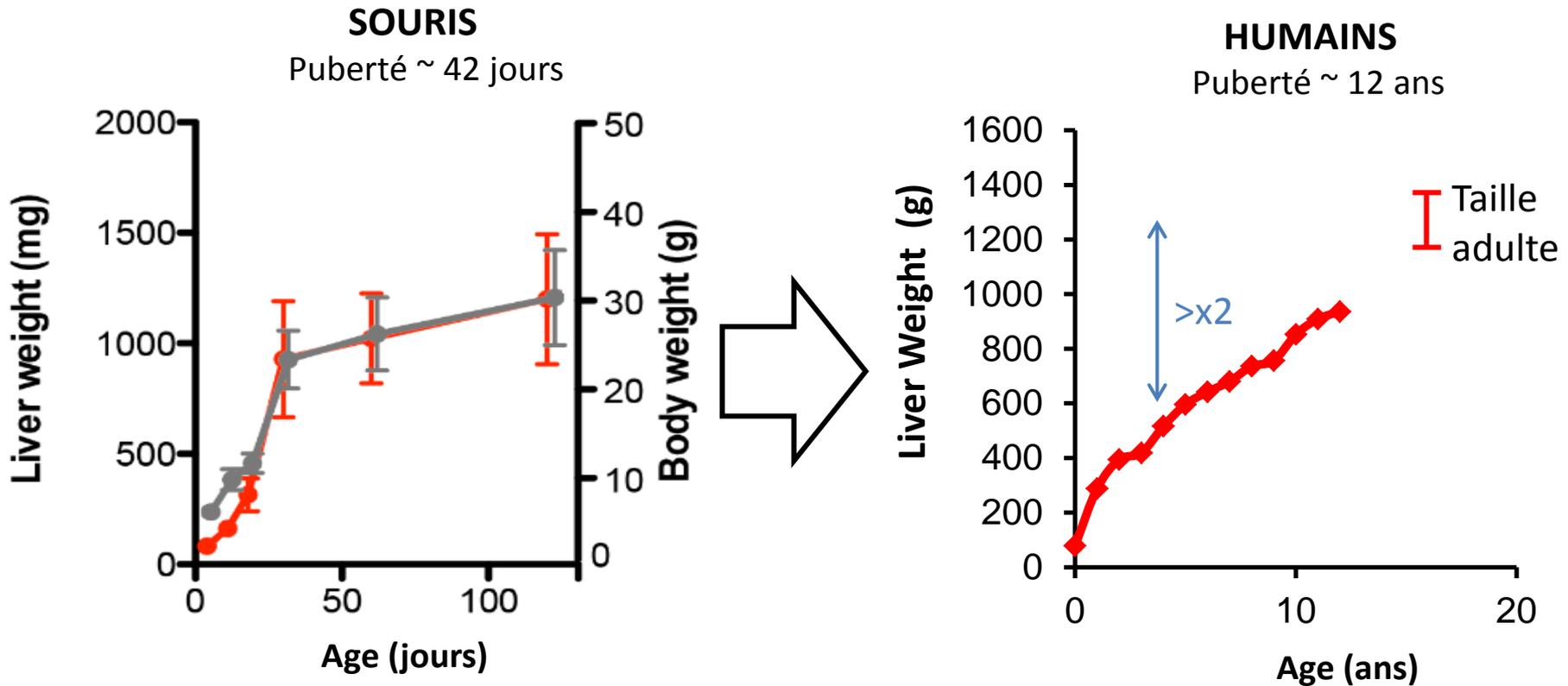
# Réadministration : pourquoi?

- AAV « non intégratif » (épisomal)



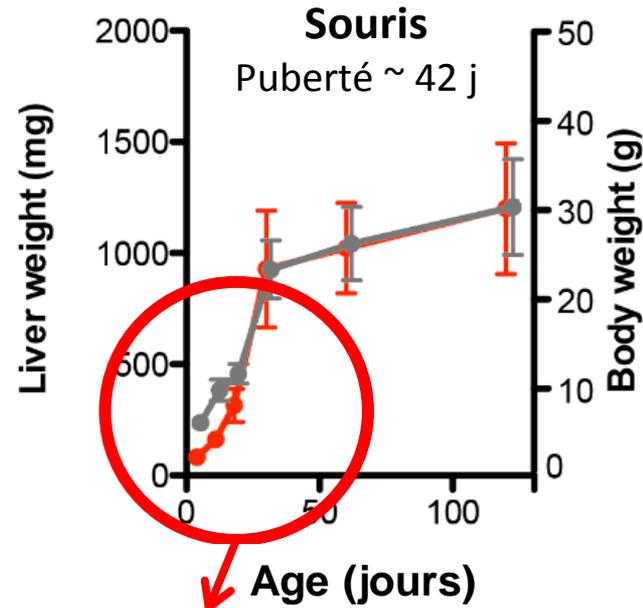
Phénomène de « dilution »  
au cours du temps

# Poids du foie en fonction de l'âge

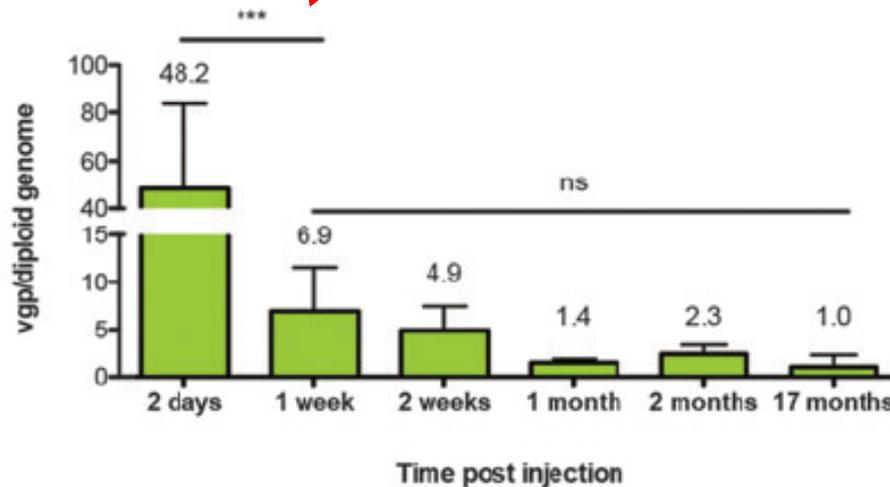


With courtesy of F. Mingozzi, Sparks Therapeutics  
Coppoletta, Am J Pathol, 1932; Garby, Am J Hum Biol, 1993

# Etudes pré cliniques en période néonatale



\*\*\*,  $p < 0.001$ ; ns, not significant



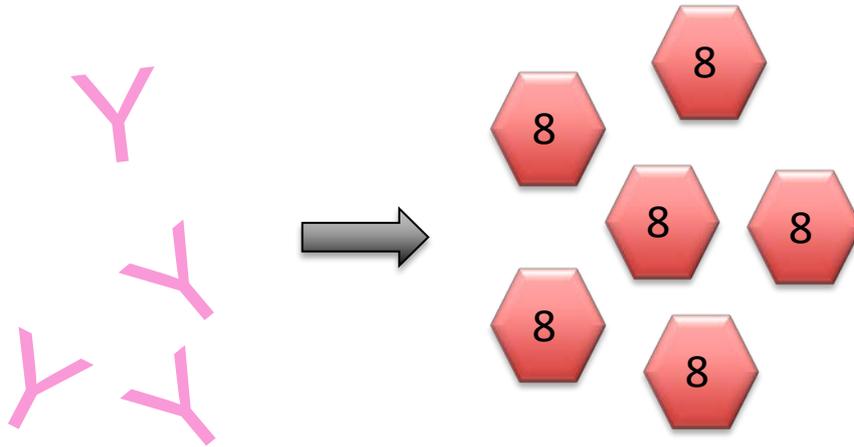
# Question

- A propos de la réadministration de vecteurs de thérapie génique:
  - A. Elle serait systématiquement possible avec un sérotype d'AAV différent de celui injecté la première fois
  - B. Elle ne sera jamais possible
  - C. Elle serait possible avec le même sérotype d'AAV que celui injecté la première fois
  - D. Elle serait éventuellement possible avec un sérotype d'AAV différent de celui injecté la première fois



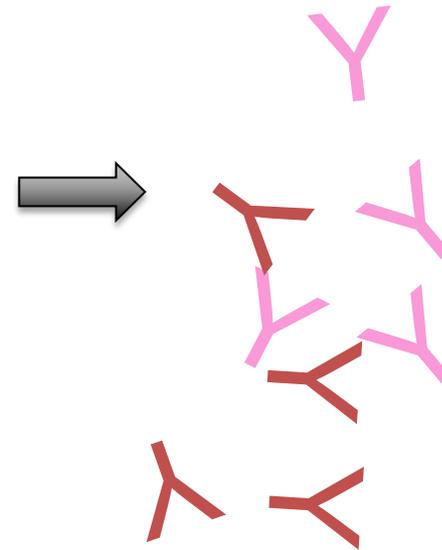
# Anticorps neutralisants

Pré-existants



*Par exemple: Anti-AAV2*

Induits par l'injection  
de vecteurs AAV

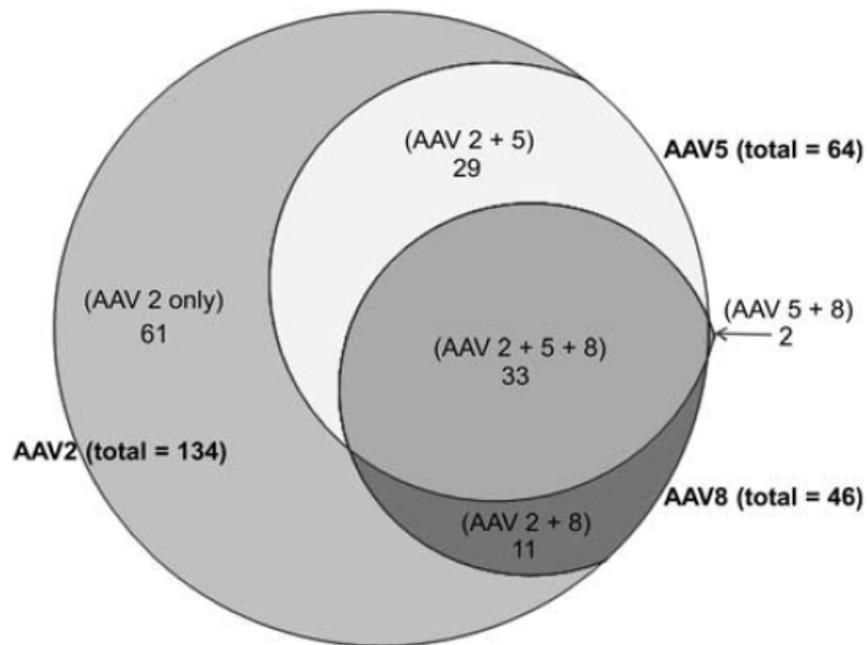


*Par exemple: Anti-AAV2 + anti-AAV8*

Persistence >8 ans

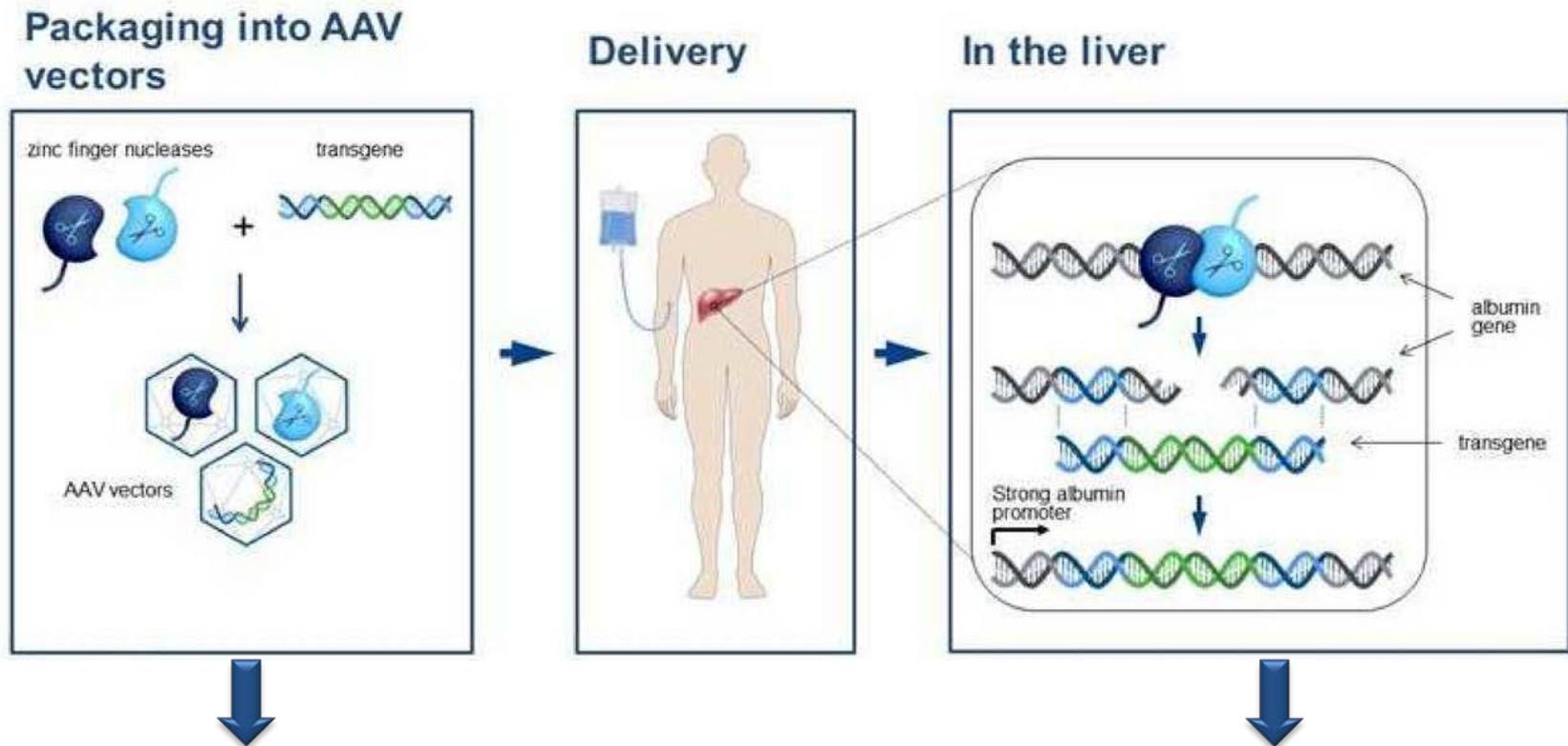
# Le pseudotyping : oui mais...

- N=66 patients hémophiles de pédiatrie,
- médiane de suivi 48 mois,
- ~ 4,5 prélèvements par patients (n=277 échantillons)



# Edition de gène

in vivo « genome editing » au niveau du locus de l'albumine:



Dose de vecteurs AAV

Expression durable  
Integration off-target?

# Critères d'inclusion

## Pour l'hémophilie A

- Homme
- > 18 ans (< 75 ans)
- HA sévère : FVIII < 1%
- >150 JCPA
- >4 (certains > 10!) épisodes hémorragiques < 12 mois

## Pour l'hémophilie B

- Homme
- > 16 ans
- HB sévère à modérément sévère : FIX  $\leq$  2%
- >50 JCPA
- >4 épisodes hémorragiques < 12 mois

Consentement éclairé signé,  
intéressé par la thérapie génique,  
qui accepte les exigences (dons de sperme, ...),  
contraception « double et fiable »!



# Critères d'exclusion

Fréquence

- ATCD inhibiteurs anti FVIII/FIX
- ATCD d'essai clinique de thérapie génique (<52 semaines)
- ~~• Présence d'anticorps neutralisants contre l'AAV à injecter~~
- Hépatite B et hépatite C active
- Traitement antiviral pour VHB, VHC en cours
- ~~• Séropositivité VIH (CD4 < 200/μl, non contrôlée par traitement)~~
- Troubles hépatiques significatifs (fibrose, cirrhose, tumeur)

UniQure/  
Biomarin

+++

UniQure

- Numération plaquettaire < seuil (150, 100, 50 G/L)
- Autres troubles de la coagulation
- Infection active, ou maladies immunitaires

++

- Chirurgie majeure prévue < 6 mois
- Réaction allergique au FVIII/FIX, voire aux corticoïdes
- ATCD de MTEV, maladie cardio vasculaire (insuffisance cardiaque, hypertension), maladie psychiatrique
- Refus de don de sperme
- IMC > 35 ou < 16

+

# Quoi de neuf ?



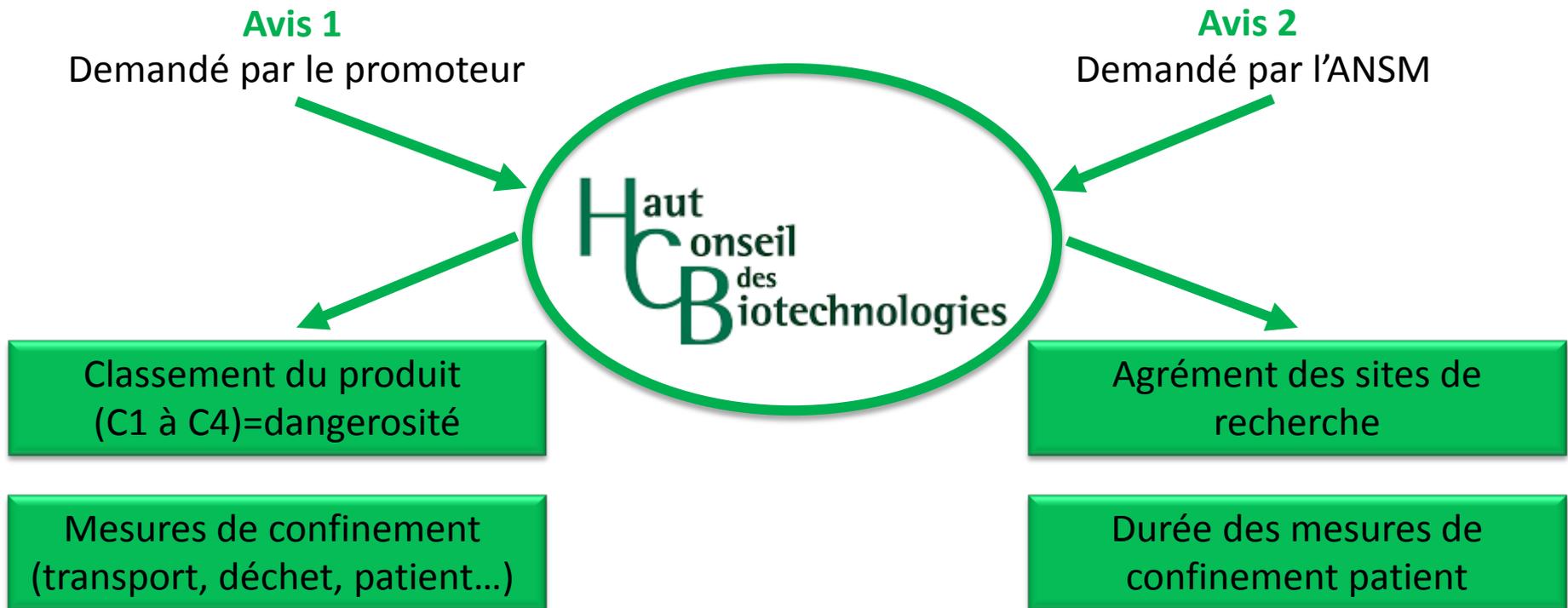
- Elargissement des possibilités d'inclusion :
  - Patients ayant des anti-AAV5 dans les essais utilisant AAV5
    - UniQure (AMT-061) : [NCT03569891](#)
    - BioMarin (BMN 270) : [NCT03520712](#)
  - Patients ayant des inhibiteurs anti-FVIII:
    - Sparks Therapeutics (Spk-8016): [NCT03734588](#)

# Question

- Quels sont les centres hospitaliers qui peuvent réaliser des essais cliniques de thérapie génique?
- A. Tous les centres hospitaliers publics
  -  B. Les centres hospitaliers répondant aux exigences des bonnes pratiques cliniques
  - C. Seulement les centres hospitalo-universitaires
  - D. Les centres hospitaliers bénéficiant d'un PSM III

# Réglementation

- Soumis au règlement européen n°1394/2007:  
Thérapie génique = **médicament de thérapie innovante (MTI)**, au titre d'OGM



# Conclusion

- Sécurité et efficacité de la thérapie génique
  - Réduction des saignements et consommation en facteurs
  - Espoir de guérison?
- Panel de choix en augmentation:
  - Diversité des vecteurs rAAV
  - Variabilité des résultats d'une étude à l'autre : prédictibilité?
- Challenges:
  - Gestion de la réponse immune et de l'élévation des enzymes hépatiques
  - Déterminer la sécurité et l'efficacité sur le long terme
    - Réinjection possible? Avec quel AAV? Pédiatrie?



Nous  
sommes  
ici!

**MERCI DE VOTRE ATTENTION**