
L'esperienza clinica con il FVIII
ricombinante da linea cellulare umana nei
PUPs:
**risultati preliminari dallo studio
NuProtect (GENA 05)**

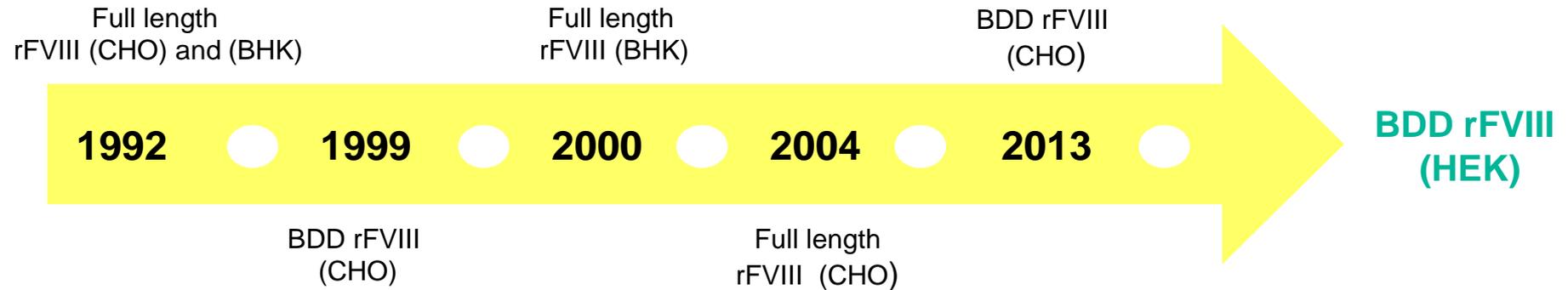
Maria Messina

Centro di Riferimento Regionale per le malattie emorragiche e trombotiche
ereditarie in età pediatrica

Ospedale Infantile Regina Margherita
Torino

Abano Terme, 12 novembre 2016

rFVIII autorizzati in UE



**rFVIII
prodotto
in cellule
umane**

- Realizzare una molecola con tutte le proprietà funzionali del FVIII wild-type (ad es. garantire il legame al vWF);
- Maggiore tollerabilità;
- Complessiva riduzione del problema dell'immunogenicità;
- Alto profilo di sicurezza.

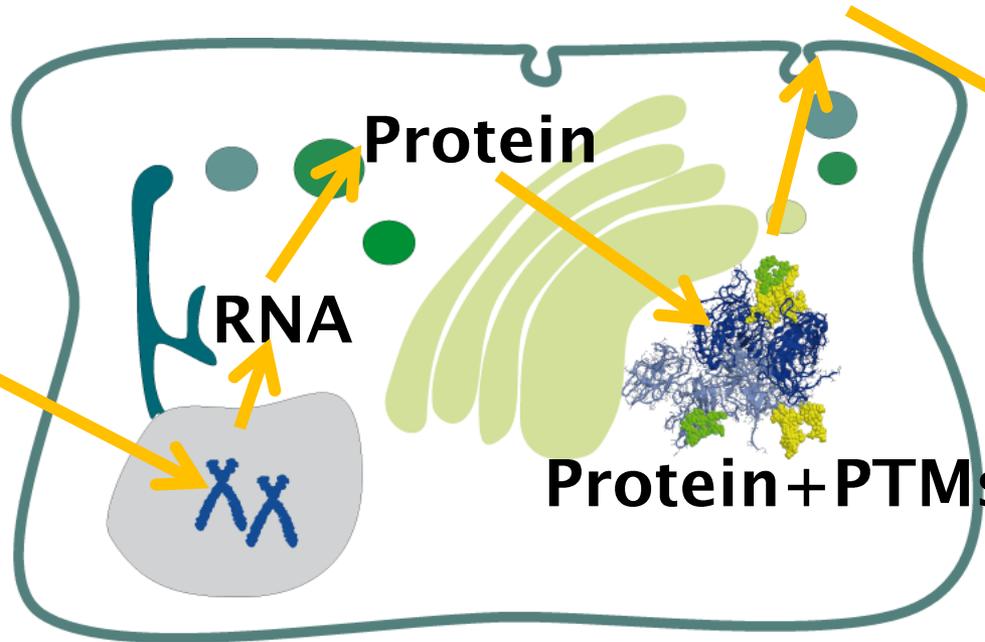
Espressione di proteine ricombinanti

DNA



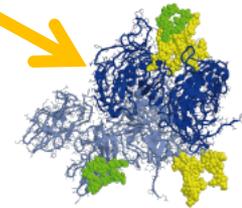
Informazioni sulla proteina

Cell



Meccanismi specifici per
Inserire le PTM

Product

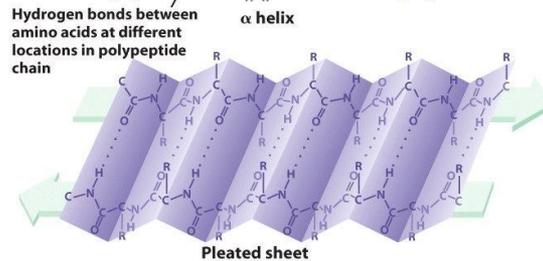
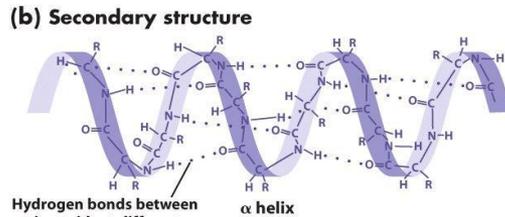
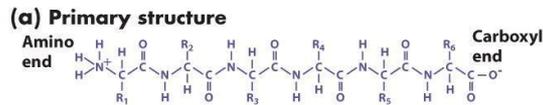


Determinato dal DNA
e
da 'meccanismi PTM'
specifici per ogni
tipo di cellula

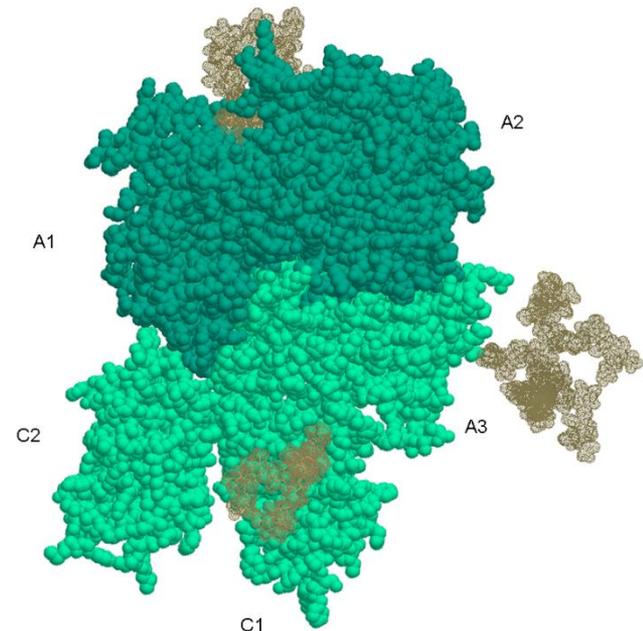
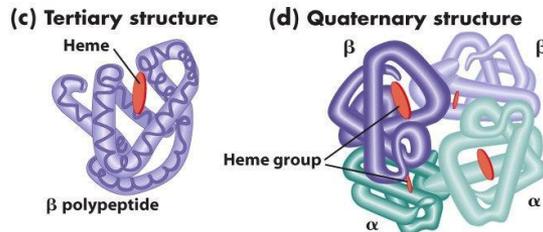
Espressione di proteine ricombinanti

La struttura e la funzione di una proteina sono determinate dalla sua sequenza amminoacidica, dal corretto ripiegamento e dalle opportune modificazioni post-traduzionali.

DNA



DNA/
Cell



FVIII tridimensionale

Modifiche post-traduzionali (PTM) delle proteine

- Le PTM sono le modifiche di natura biochimica che una proteina subisce dopo la sua traduzione da sequenza nucleotidica a sequenza amminoacidica;
- Tutte le proteine plasmatiche subiscono PTM;
- Le PTM sono specifiche per ogni specie;
- Sistemi di espressione differenti (ad es. linee cellulari umane o di criceto) producono PTM diverse per la stessa sequenza proteica;

Esempio: Le glicosidasi e glicosiltransferasi presenti nelle diverse cellule produrranno specifiche funzionalità di glicosilazione tipiche per ogni sistema cellulare.

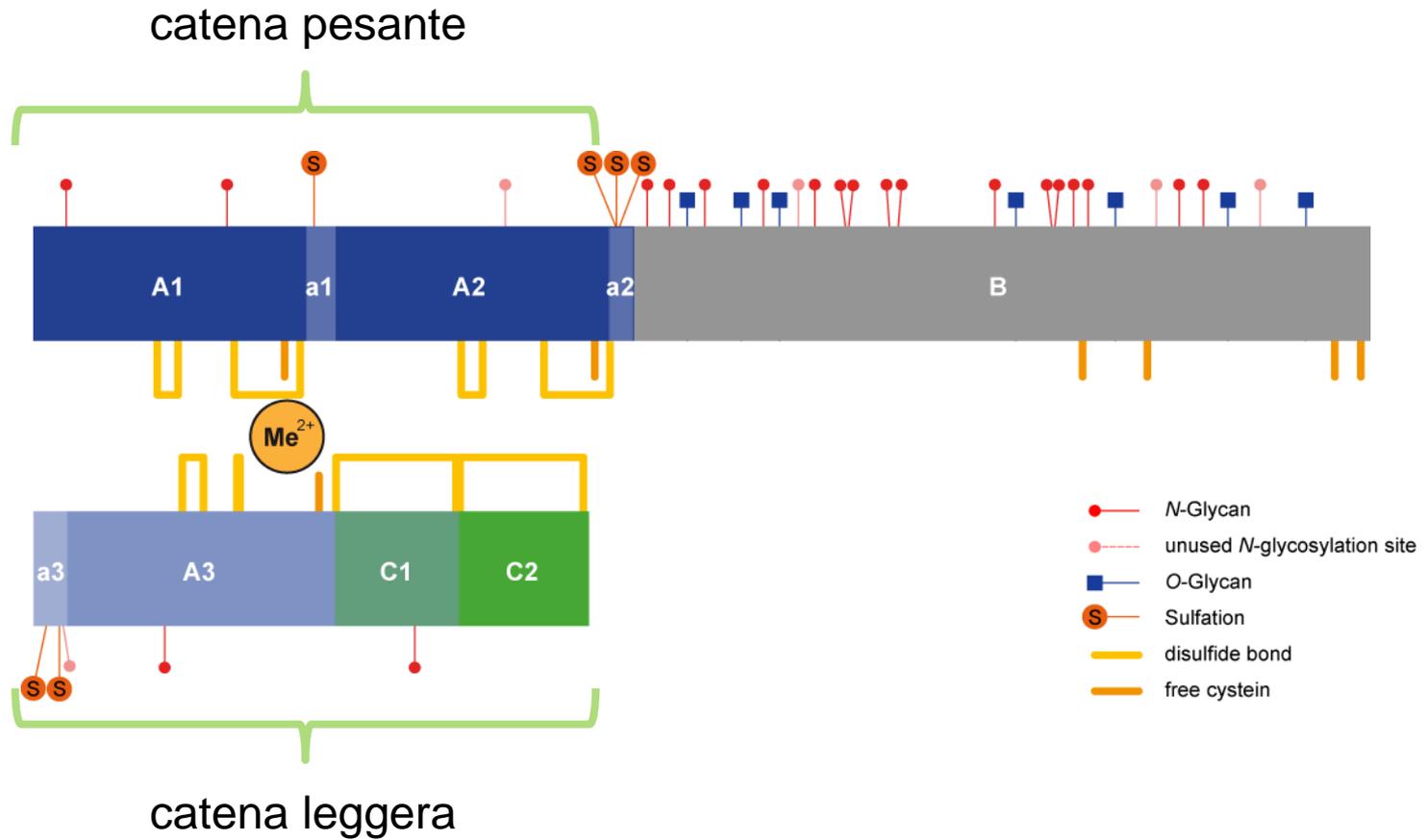
TIPI di PTM

FVIII

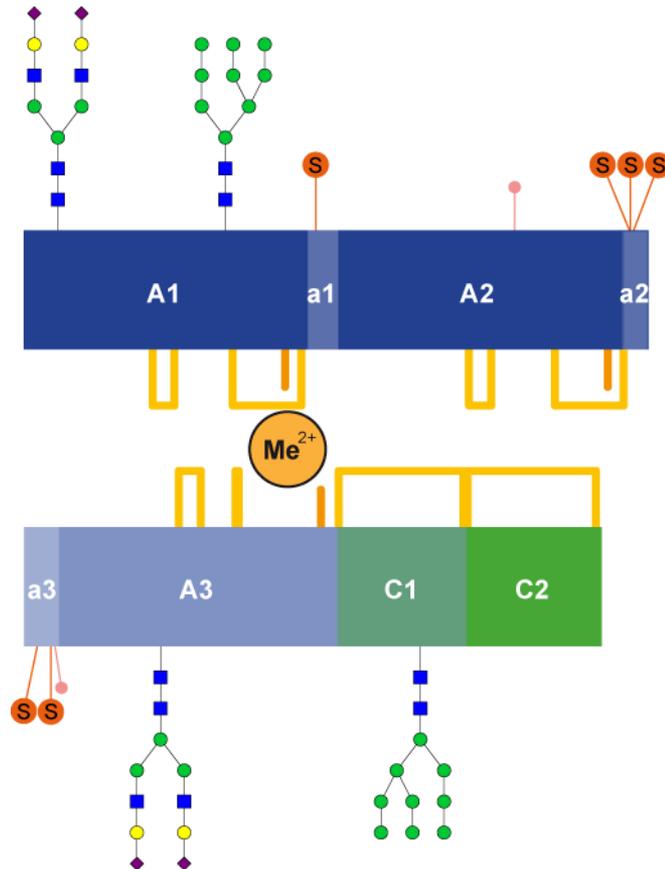


- Solfatazione
- Glicosilazione
- Fosforilazione
- Acetilazione
- Alchilazione
- Alfa-amidazione
- Isoprenilazione
- Gamma-carbossilazione
- Ubiquitinazione
- Sumoilazione
- ISGylation
- L'ancora GPI

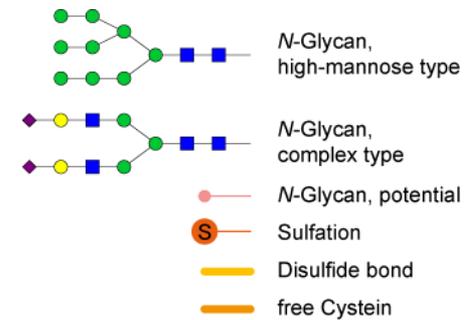
STRUTTURA DEL FVIII



STRUTTURA DEL FVIII BDD



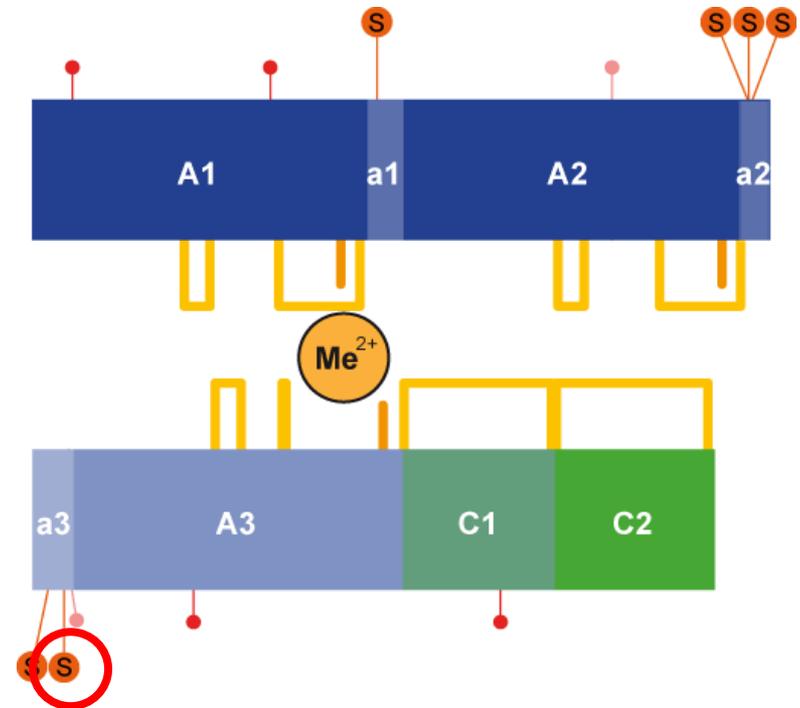
Solfatazione
6 siti a livello
di TYR



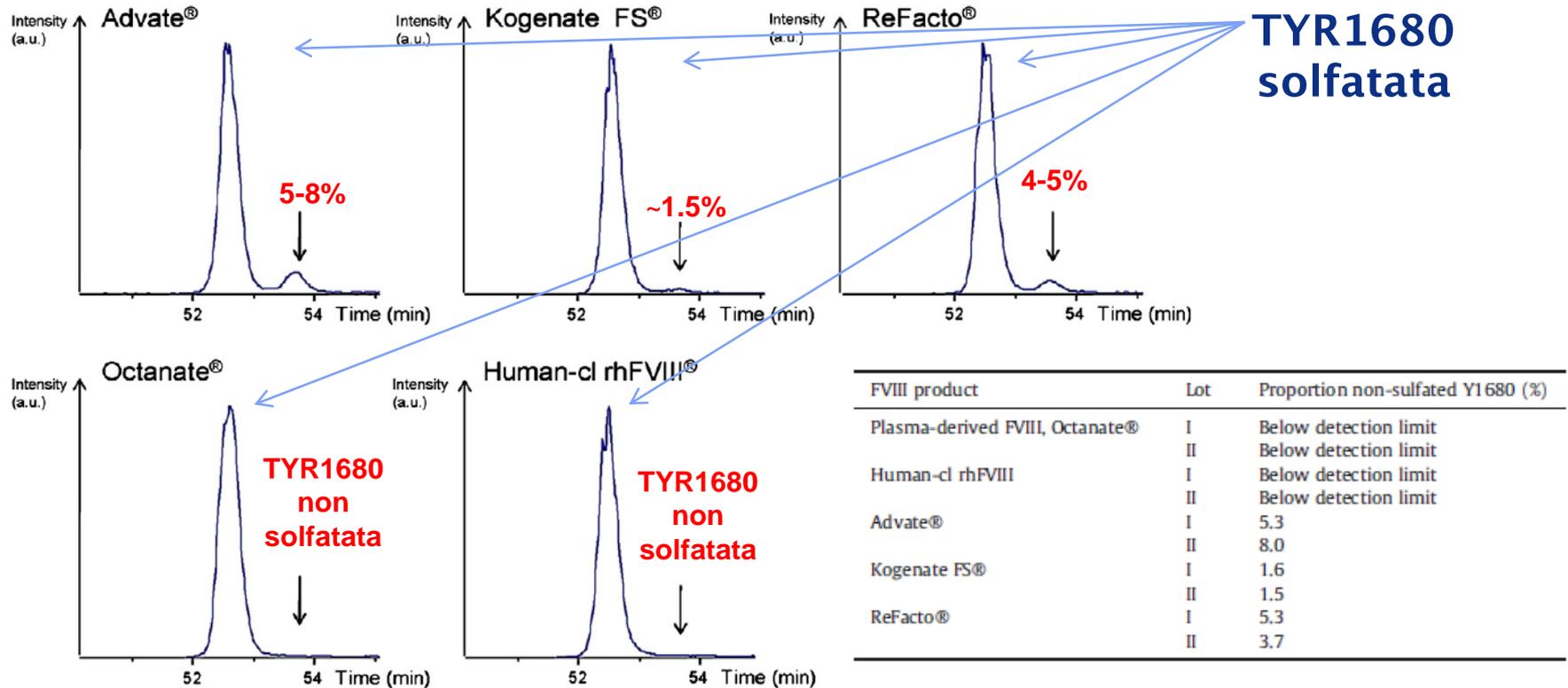
Glicosilazione
4 siti a livello di
ASP

SOLFATAZIONE

- Per una piena attività del FVIII è necessaria la solfatazione della tirosina in tutti i sei siti;
- In assenza di solfatazione a livello della **tirosina 1680**, il FVIII ha un'affinità per il VWF ridotta di 5 volte;
- Gli altri siti di solfatazione della tirosina all'interno del FVIII sono richiesti per un'interazione ottimale con la trombina.



SOLFATAZIONE IN TYR 1680



Cromatogrammi di ioni estratti

IMPATTO DEL LEGAME DEL FVIII AL vWF

Legame e up-take del FVIII da parte delle cellule dendritiche

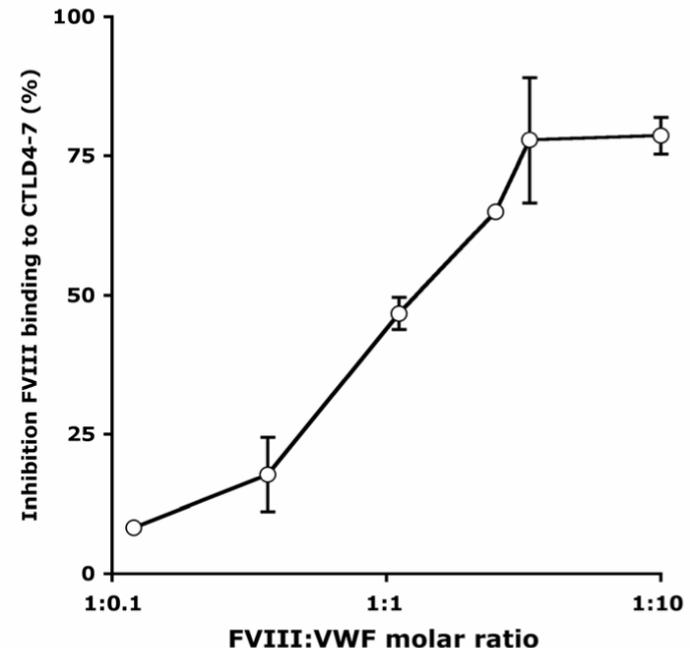
L'interazione tra FVIII e CD206 viene bloccata dal vWF, suggerendo che in condizioni fisiologiche, l'up-take mannosio-dipendente del FVIII viene smorzato dal vWF.



Il vWF è un **“immunochaperon” endogeno** che smorza l'immunogenicità mannosio-dipendente intrinseca del FVIII.

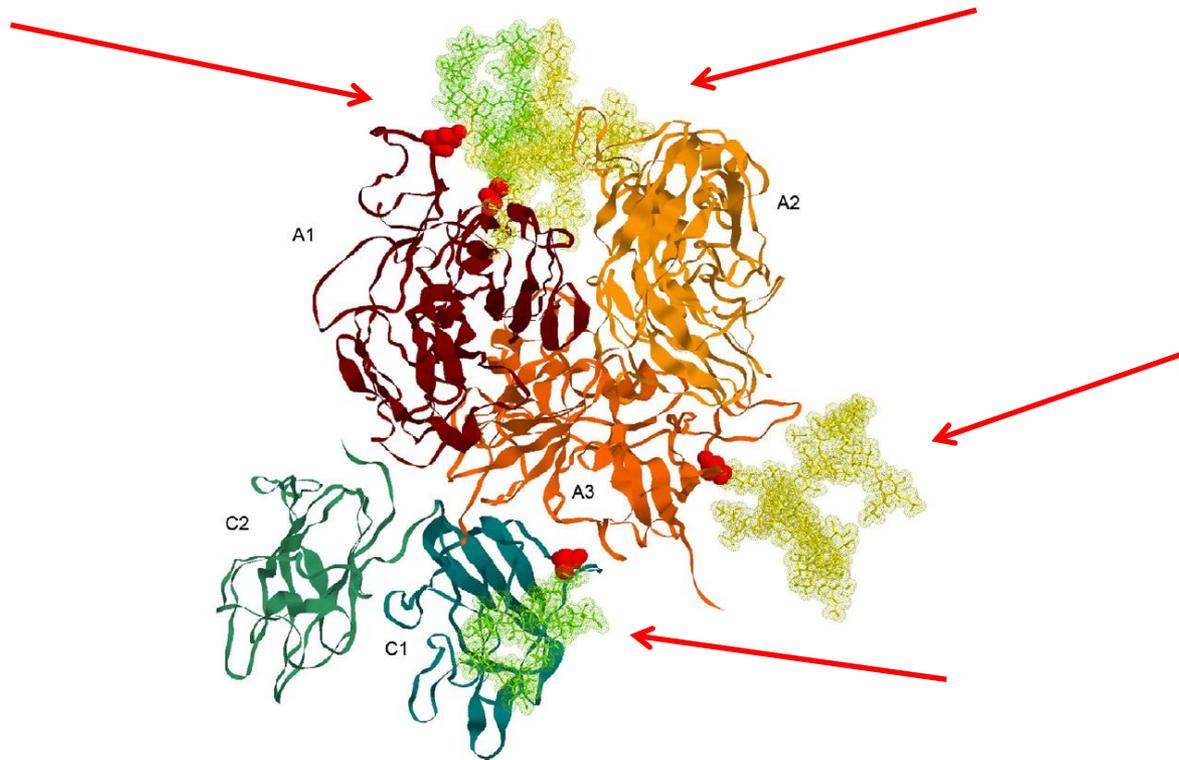


IMMUNOGENICITA'



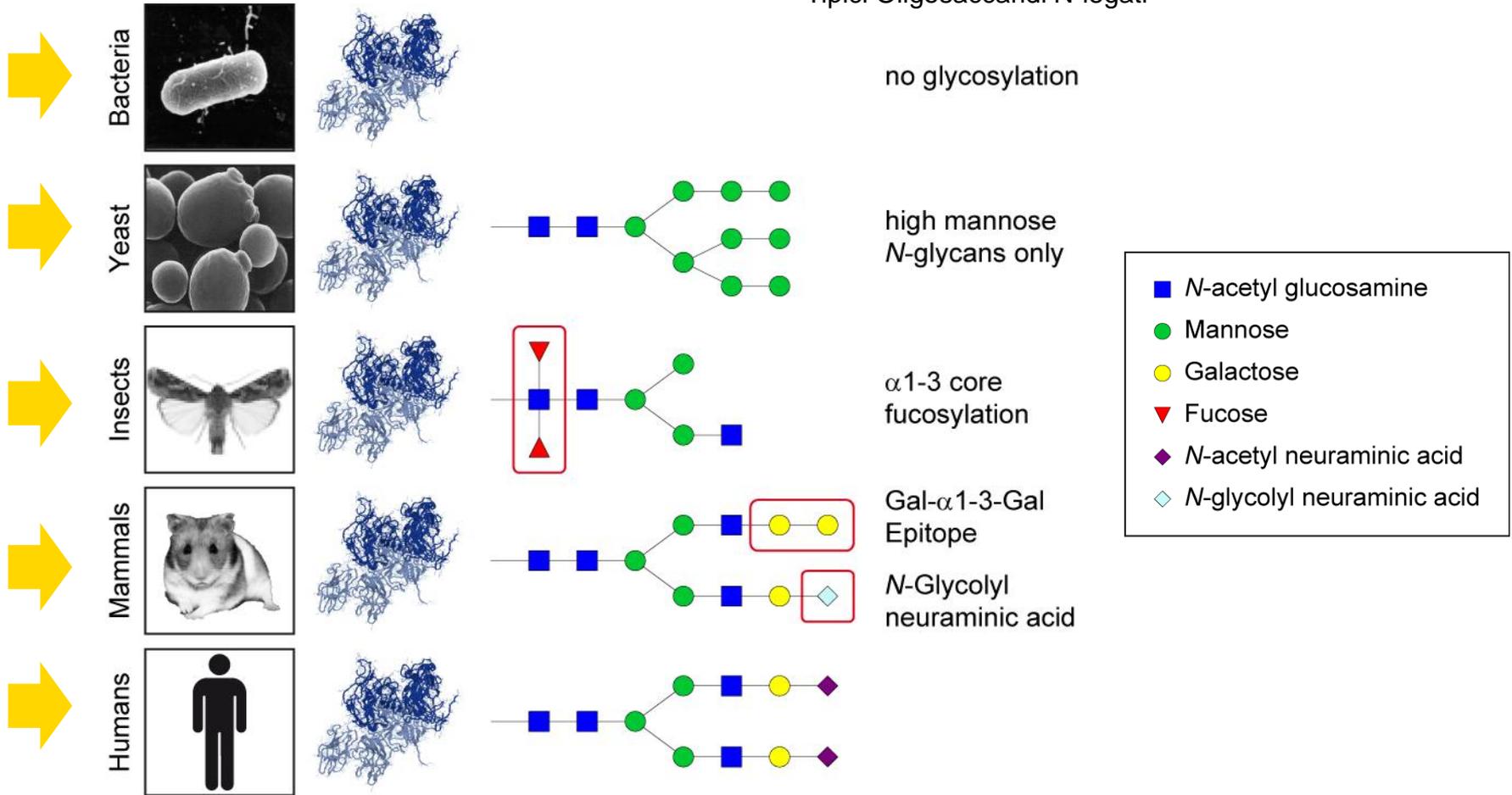
GLICOSILAZIONE

Struttura macromolecolare tridimensionale di una molecola di FVIII umano privo di dominio B evidenzia quattro catene di N-glicani in corrispondenza di ASP.



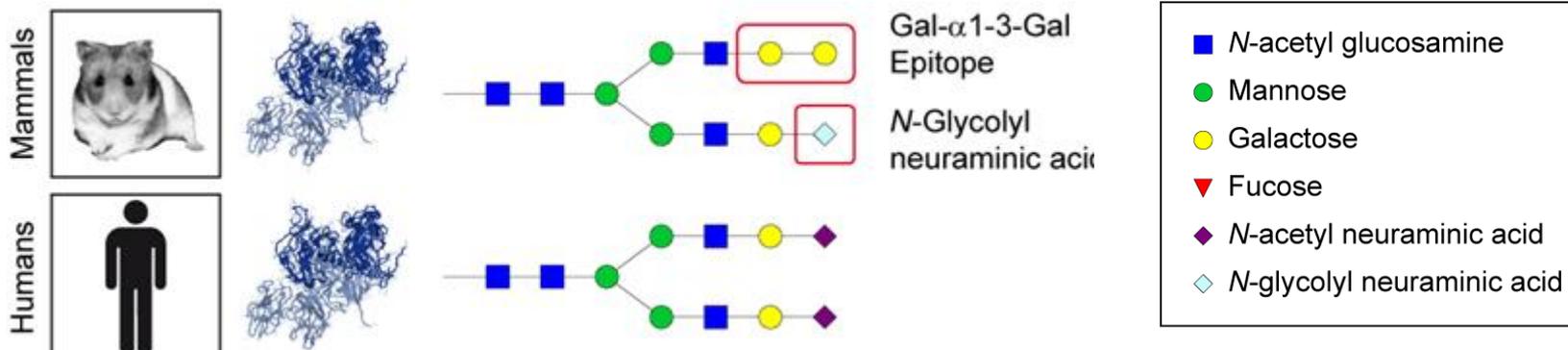
N-glicosilazione in diversi sistemi di espressione

Tipici Oligosaccaridi N-legati



N-GLICOSILAZIONE - EPITOPOLI ANTIGENICI

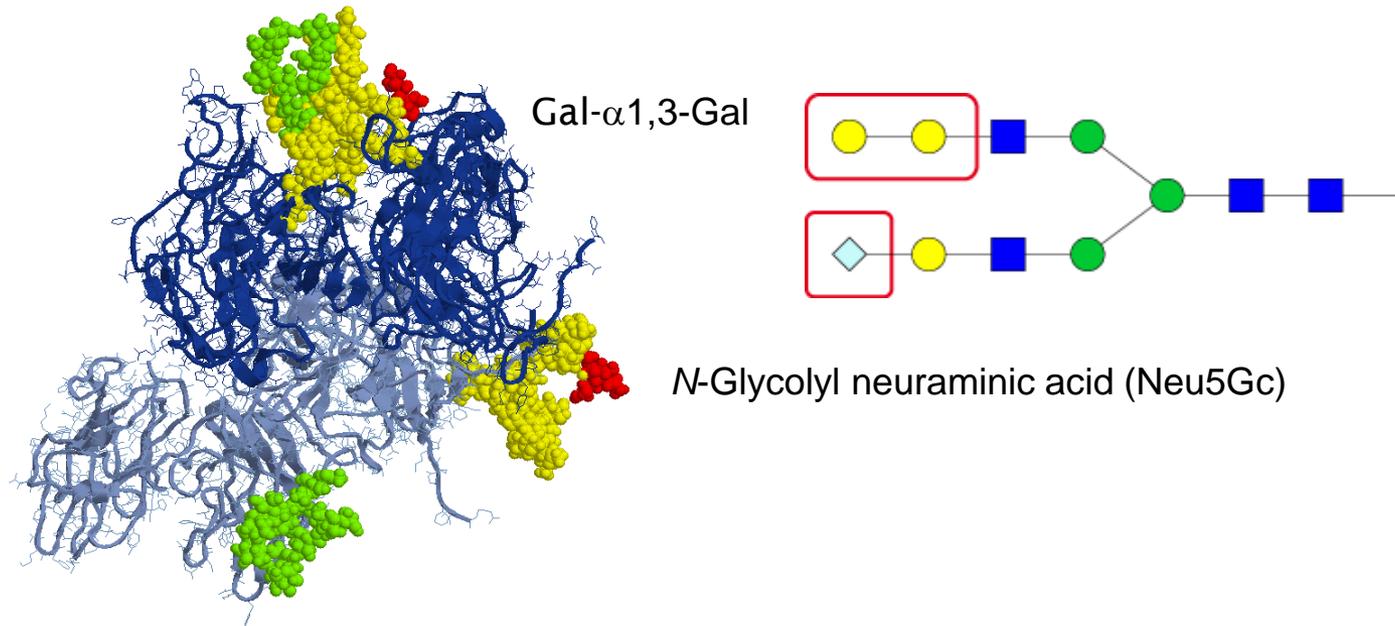
Galattosio- α 1,3-Galattosio Acido N-glicolilneuraminico



Presenti in rFVIII espressi da cellule di mammifero (CHO e BHK)

Assenti su rhFVIII espresso nella linea cellulare umana

N-GLICOSILAZIONE – EPITOPOLI ANTIGENICI



Product	Gal- α 1-3-Gal	Neu5Gc
Human-cl rhFVIII from HEK293F cells	Not found	Not found
rhFVIII from CHO cells	Not found	Present (0.5%) ¹
rhFVIII from BHK cells	Present (3%) ²	Not found

¹ Molar ratio (%) of N-glycolyl neuraminic acid of total sialic acids (statistically present on roughly 15% of all FVIII molecules).

² Molar ratio (%) of N-linked sugar chains containing the Gal- α 1-3-Gal epitope (statistically present on roughly 60 % of all FVIII molecules)

NuProtect (GENA-05)

**Immunogenicità, Efficacia e Sicurezza del trattamento con
Nuwiq.[®]
nei pazienti non precedentemente trattati (PUPs) affetti da
emofilia A grave**

Coordinatore dello studio

Raina J Liesner

Great Ormond Street Hospital for Children,
NHS Trust Haemophilia Centre
Great Ormond Street, London WC1N 3JH
Regno Unito



GENA-05 : Disegno dello studio e tempistiche

- **Studio di fase III, prospettico, multicentro, multinazionale, non controllato, in aperto**
 - **100 PUPs con emofilia A grave (FVIII:C <1%)**
 - **38 centri in 17 Paesi nel mondo**
 - I pazienti restano nello studio per **100 EDs**
 - La partecipazione massima allo studio è di 5 anni
-
- Avvio del processo di autorizzazione: Q4 2012
 - **Inizio arruolamento: Q1 2013**
 - **Fine arruolamento: Giugno 2016**
 - Previsione di completamento studio: **Q4 2018**

GENA-05 : Obiettivi Studio

1 Valutare l'**immunogenicità** di Nuwiq.[®] su 100 PUPs

2a

Valutare l'**efficacia** di Nuwiq.[®]
- nel corso del trattamento di profilassi
- durante il trattamento delle emorragie
- nella profilassi chirurgica

2b

Valutare la **sicurezza e tollerabilità** di Nuwiq.[®]

3

Valutazione **di un modello di HTA (Health Economy Assessment)** con parametri indicativi per l' utilizzo di risorse

GENA-05 : Opzioni di Trattamento

- Prophylactic treatment

Recommended dose	Start	Frequency of treatment	Frequency or dose adjustments
20–50 IU FVIII/kg BW	With the first bleed	Depends on the patient’s clinical situation	At investigator’s discretion

- On-demand treatment

	Minor hemorrhage	Moderate to major hemorrhage	Major to life-threatening hemorrhage
Recommended dose	20–30 IU FVIII/kg BW	30–40 IU FVIII/kg BW	40–60 IU FVIII/kg BW
Frequency	Every 8–24 h until bleed is resolved	Every 6–24 h until bleed is resolved	Repeat dose of 20–50 IU/kg BW every 6–12 h until bleed is resolved

GENA-05 : Disegno dello Studio

100 ED / max 5 anni

Immunogenicità	Analisi di mutazione genica
----------------	-----------------------------

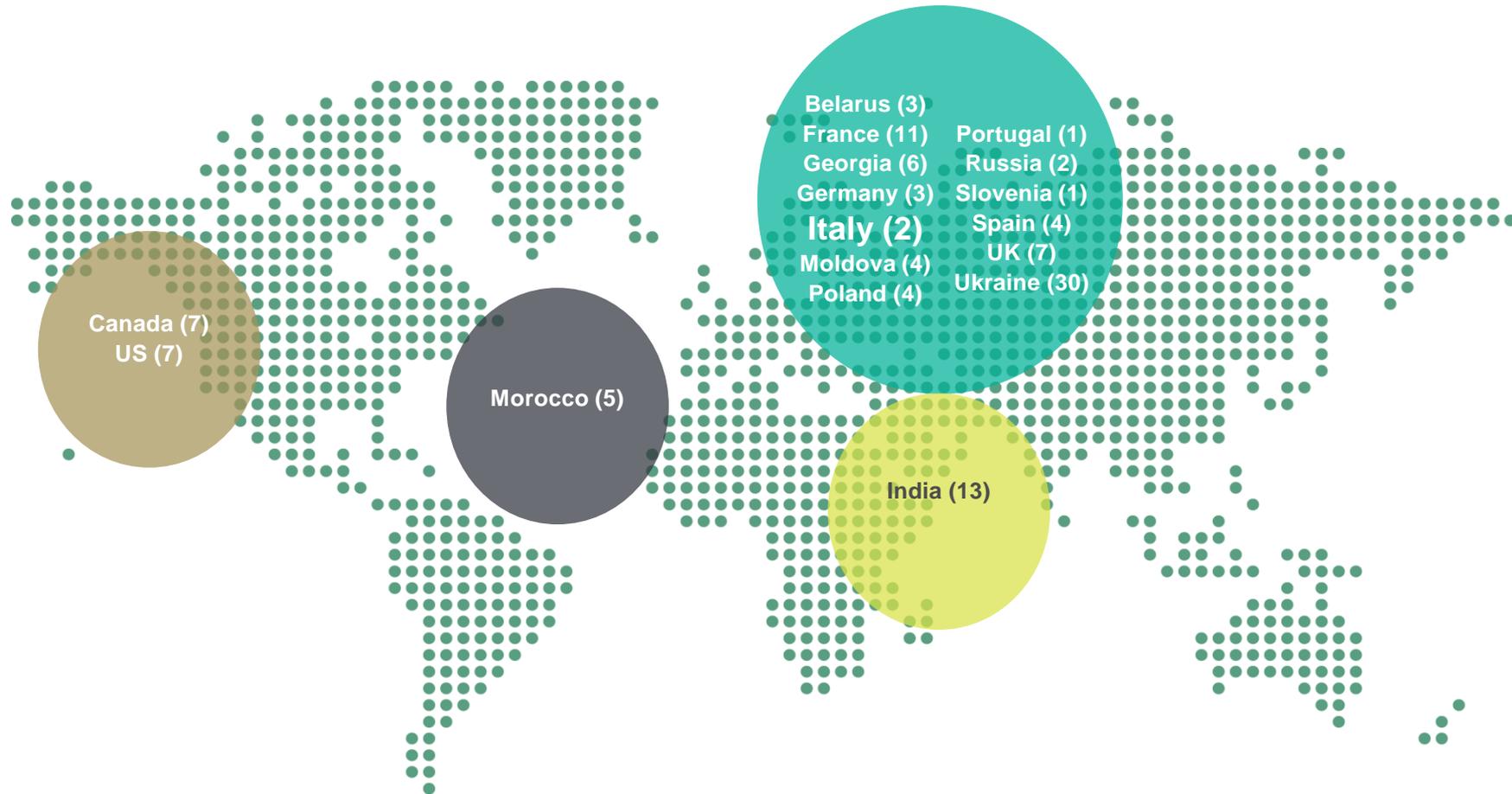
<ul style="list-style-type: none">▪ Inibitori (Nijmegen modificato) e anticorpi (ELISA)<ul style="list-style-type: none">- allo screening- ogni 3-4 ED fino a 20 ED- ogni 10-12 ED fino a 100 ED- ogni 3 mesi fino al completamento dello	<ul style="list-style-type: none">▪ In qualunque momento nel corso dello studio
--	---

Indagini opzionali/Studi secondari: identificare marcatori predittivi di sviluppo degli inibitori per individuare i soggetti a rischio di formazione degli inibitori

Indagini / Studi secondari	
<ul style="list-style-type: none">▪ Valutazione del recovery	<ul style="list-style-type: none">▪ Mappatura epitopi
<ul style="list-style-type: none">▪ Immunogenotipizzazione	<ul style="list-style-type: none">▪ Profilo di espressione RNA
<ul style="list-style-type: none">▪ Immunogenicità in vitro	

GENA-05: 38 Centri in 17 Paesi dai 4 continenti

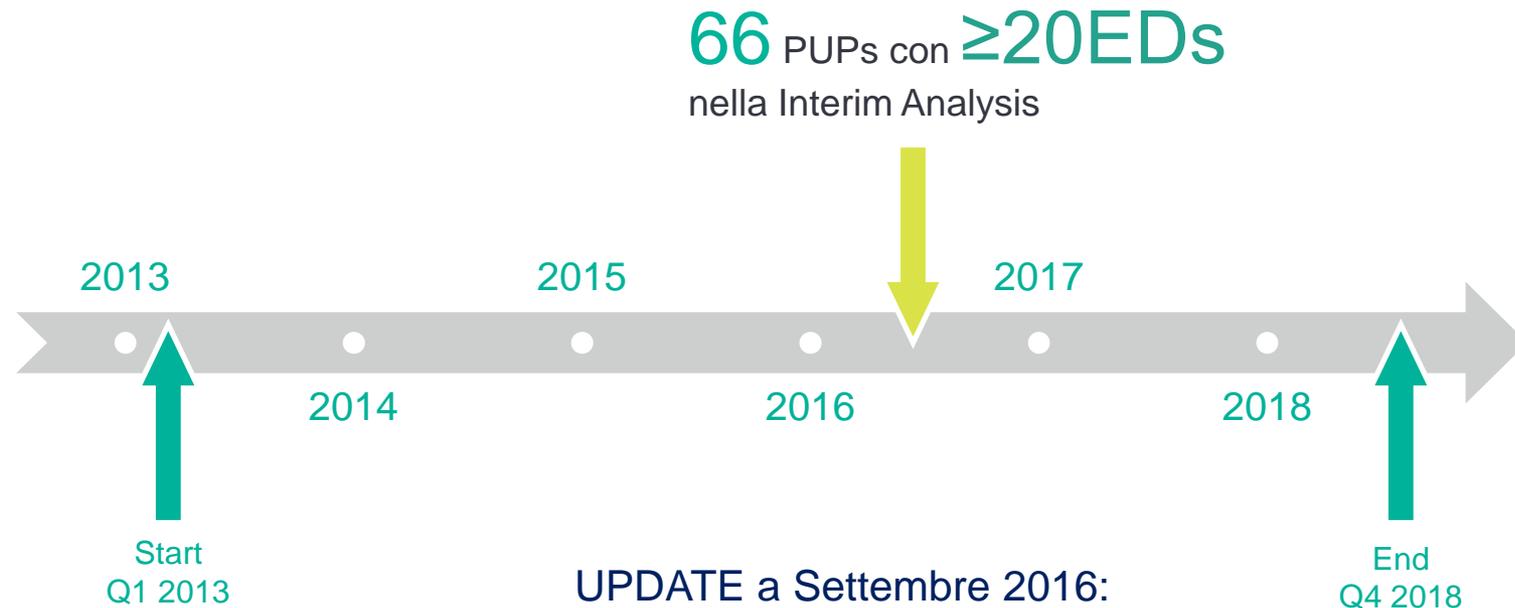
Arruolamento completato (N = 110)



Status a giugno 2016

GENA-05: Status Interim Analysis

Nella prima **Interim Analysis** (condotta a Maggio 2016) sono stati inclusi i dati provenienti da **66 PUPs con ≥ 20 EDs** (tempo in cui compaiono la maggior parte degli inibitori)



- ✓ Arruolamento **completato: 110 pazienti arruolati** a Giugno 2016
- ✓ **105 pazienti** trattati almeno una volta **di cui 80** si trovano **in profilassi**
- ✓ **83 pazienti** hanno superato i **20 EDs**, di cui **70** hanno superato i **50 EDs**
- ✓ **44 pazienti** hanno **completato lo studio** in accordo al protocollo

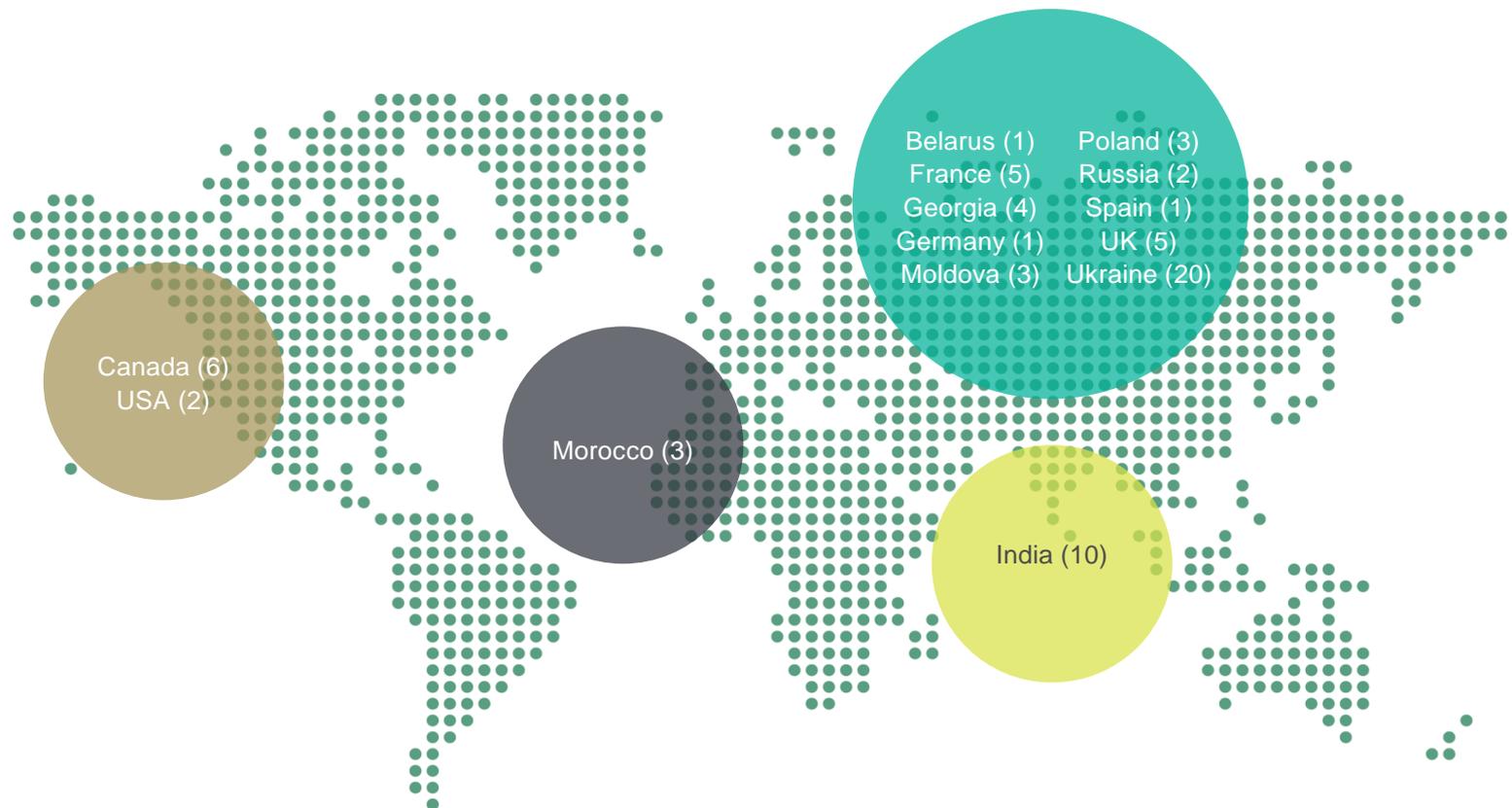
A young child with light hair, wearing a blue and white striped polo shirt and blue pants, is walking on a grassy field. The child is looking towards the camera with a neutral expression. The background consists of a line of green trees under a bright sky. The image is framed by a semi-circular cutout.

**Esperienza con NUWIQ® (Human-cl rhFVIII)
in PUPs**

**66 pazienti con ≥ 20 EDs
Valutati nell' Interim Analysis**

GENA-05: 66 pazienti con ≥ 20 EDs nella Interim Analysis

26 Centri in 14 Paesi dai 4 Continenti



Status a maggio 2016

GENA-05: Caratteristiche Pazienti in studio

NuProtect – GENA-05	
NUWIQ® (rFVIII from human cell line)	
N = 66 con ≥ 20 EDs	
nella interim analysis	
Age at first treatment, months	
Median (range)	13.0 (3–135)
Mean ± SD	20.9 ± 22.0
Race, N (%)	
Caucasian	62 (93.9)
White	51 (77.3)
Asian	11 (16.7)
Non Caucasian	1 (1.5)
American Indian or Alaska Native	1 (1.5)
Black	–
Other	3 (4.5)†
Family history of hemophilia A, N (%)	22 (33.3)
Family history of inhibitors, N (%)	4 (6.1)
Previous treatment, yes, N (%)	–

GENA-05: Regime di trattamento

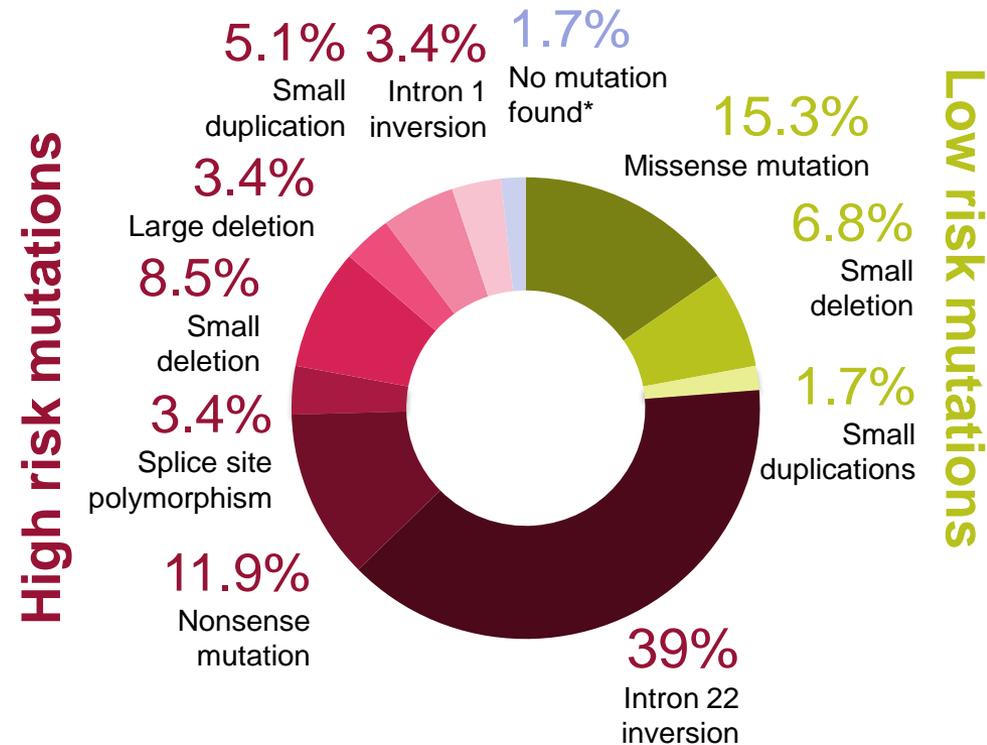
NuProtect – GENA-05	
NUWIQ® (rFVIII from human cell line) N = 66 con ≥ 20 EDs nella interim analysis	
Treatment regimen, N (%)	
On-demand	13 (19.7)
Prophylaxis	45 (68.2)**
Standard (3x/week)	3 (4.5)
Every other day	4 (6.1)
2x/week	13 (19.7)
1x/week (EDs 4–13), 2x/week	8 (12.1)
Modified (1x/week)	16 (24.2)
Combination*	8 (12.1)
On-demand (3–12 EDs), 2x/week	3 (4.5)
On-demand (2–11 EDs), 1x/week	5 (7.6)

* Combination of on-demand and prophylaxis regimens.

GENA-05: *F8* gene mutation analysis (1/ 2)

Pazienti con ≥ 20 EDs nella Interim Analysis (dati disponibili per 59 patients)

- **75.9%** (44/58) of PUPs had **high risk** *F8* gene mutations
- 24.1% (14/58) of PUPs had low risk *F8* gene mutations
- **81.0%** (47/58) of PUPs had **null mutations**
- 19.0% (11/58) of PUPs had non-null mutations



* For 1 PUP no *F8* gene mutation was found.

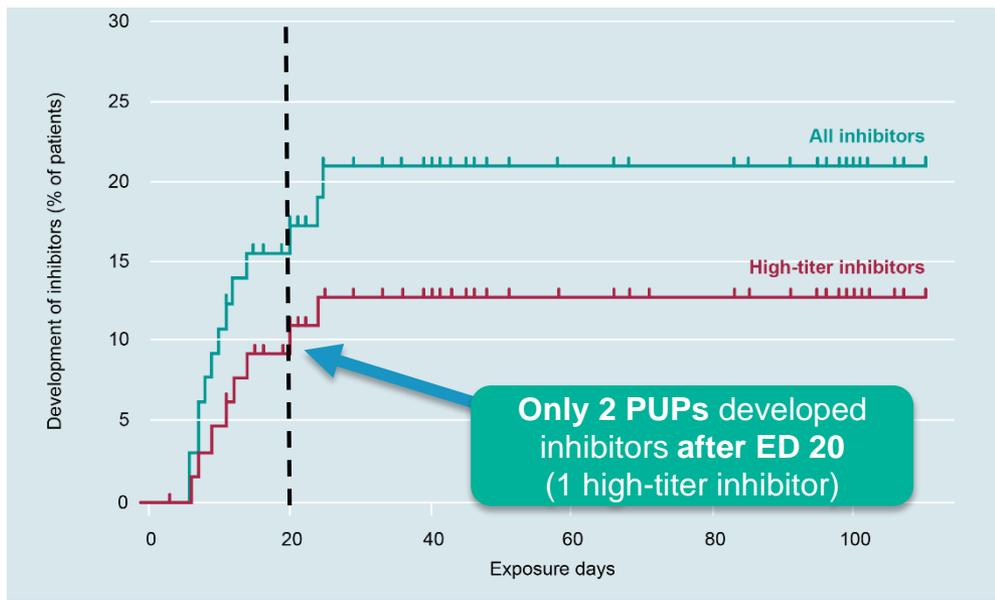
F8 gene mutation analysis was performed by Profs. J. Oldenburg and A. Pavlova in Bonn, Germany.

GENA-05: Incidenza cumulativa di sviluppo inibitori

66 pazienti con ≥ 20 EDs nella interim analysis

Peak inhibitor titer
All inhibitors
median (range)
7.1 (0.8–822)

Peak inhibitor titer
High-titer inhibitors
median (range)
66.9 (7–822.4)



20.8%
(95% CI: 10.68–30.95)
 (13/66)
All inhibitors

12.8%
(95% CI: 4.49–21.15)
 (8/66)
High-titer

No. at risk	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
All inhibitors	66	59	50	40	37	29	27	25	24	22	13	2										
High-titer inhibitors	66	62	54	44	41	33	31	29	28	26	16	3										

Developed at a median
10 EDs (range: 6–25)

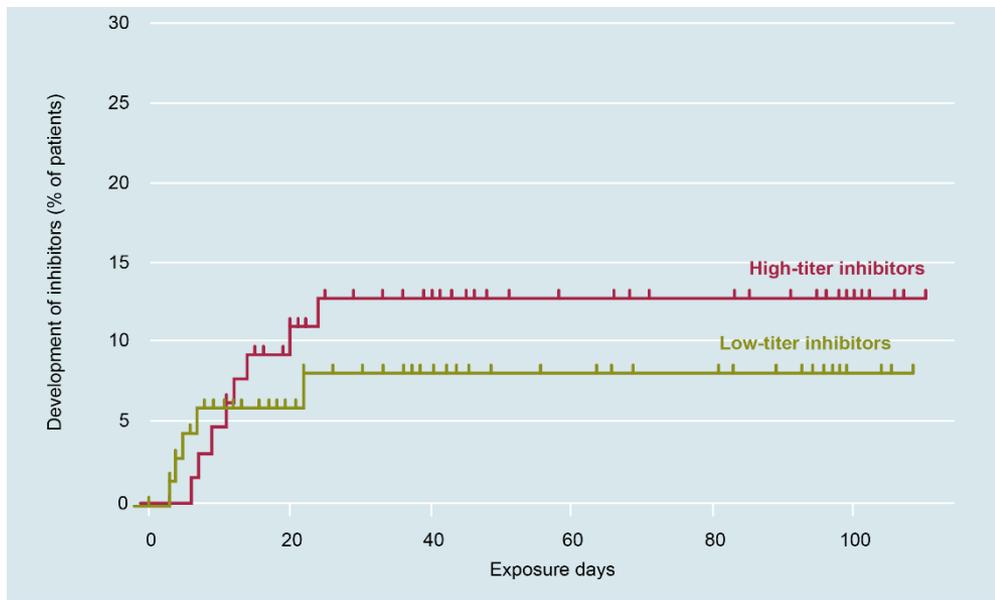
Developed at a median
11.5 EDs (range: 6–24)

GENA-05: Incidenza cumulativa di sviluppo inibitori

66 pazienti con ≥ 20 EDs nella interim analysis

Peak inhibitor titer
High-titer inhibitors
median (range)
66.9 (7–822)

Peak inhibitor titer
Low-titer inhibitors
median (range)
2.3 (0.8–4.3)



12.8%
(95% CI: 4.49–21.15)
(8/66)

High-titer

8.4%
(CI 95% 1.28–15.59)
(5/66)

Low-titer

80% (4 of 5)
 low-titer inhibitors
 were transient

No. at risk	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
High-titer inhibitors	66	62	54	44	41	33	31	29	28	26	16	3										
Low-titer inhibitors	66	59	50	40	37	29	27	25	24	22	13	2										

Developed at a median
8 ED (range: 6–25)

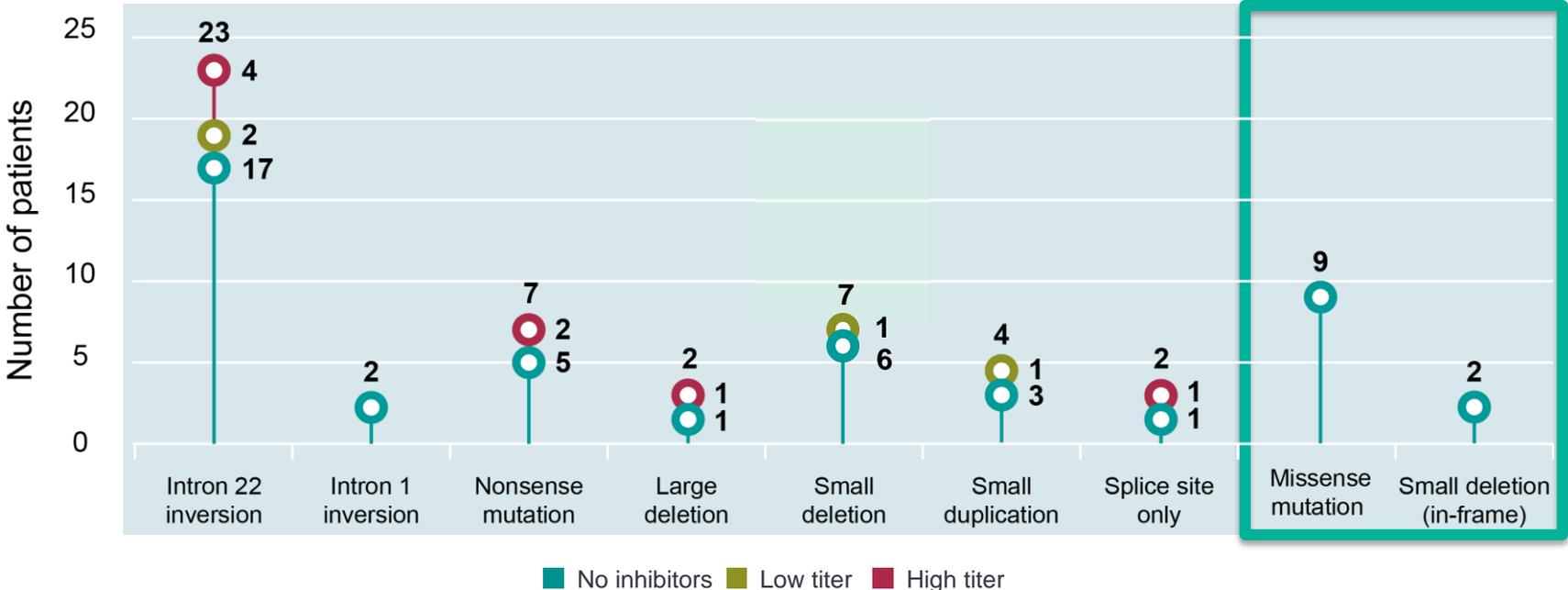
Developed at a median
11.5 EDs (range: 6–24)

GENA-05: F8 gene mutations

Pazienti con ≥ 20 EDs nella interim analysis

92.3% (12/13) of PUPs with inhibitors had **null mutations**

0% of PUPs with inhibitors had **non-null mutations**



F8 gene mutation determination in progress for **59 patients, 8 with high-titer inhibitors and 5 with low-titer inhibitors** (for one patient with a low-titer inhibitor no mutation was found).
F8 gene mutation analysis was performed by Profs. J. Oldenburg and A. Pavlova in Bonn, Germany.

GENA-05: Conclusioni

- **NuProtect (GENA-05)**, è uno **studio di fase III**, prospettico, multicentro, multinazionale, non controllato, in aperto che sta investigando **NUWIQ[®]**, un **FVIII ricombinante di 4th generazione¹ ottenuto da linea cellulare umana, nei PUPs**
- Nella prima Interim Analysis (Maggio 2016) sono stati analizzati i dati di **66 PUPs con ≥ 20 EDs**
- **12.8%** è l'**incidenza cumulative di inibitori ad alto titolo ottenuta con NUWIQ[®]**, al momento dell'Interim Analysis (8/66 PUPs)
- gli inibitori ad alto titolo sono comparsi con una **mediana di 11.5 ED**
- **81%** dei pazienti hanno una mutazione genica altamente correlata ad un **umentato rischio di sviluppo inibitori** (es.: null mutations)
- **44 pazienti hanno completato lo studio** in accordo al protocollo

1. FDA memorandum (STN 125555\0), 9 October 2014.

GRAZIE PER L'ATTENZIONE



GENA-05: Sicurezza e tollerabilità

Reazioni Avverse

	MedDRA-LLT	Relation to Study Drug	Severity	Serious	Seriousness Criteria	Outcome
Patient 1	Fever	Probable	Mild	N	–	recovered
Patient 2	Allergy*	Possible	Mild	N	–	recovered
Patient 3	Skin rash	Probable	Mild	Y	hospitalization required or prolonged	recovered

* Tre eventi singoli