



ASSOCIAZIONE ITALIANA CENTRI EMOFILIA

TERAPIA GENICA DELL'EMOFILIA A E B

A CURA DEL GRUPPO DI LAVORO TERAPIA GENICA DELL'AICE

EDIZIONE 2024

Presentazione

L'AICE (Associazione Italiana Centri Emofilia), ha costituito un gruppo di lavoro (GdL), coordinato da Flora Peyvandi e Giancarlo Castaman, con lo scopo di monitorare efficacia e sicurezza dei nuovi farmaci per la terapia genica dell'emofilia A e B, cui l'agenzia europea del farmaco (EMA, European Medicines Agency) ha concesso un'approvazione condizionata: *valoctocogene roxaparvovec* (Roctavian®, Biomarin) per il trattamento dei pazienti con emofilia A grave e *etranacogene dezaparvovec* (Hemgenix®, CSL Behring) per il trattamento dell'emofilia B grave e moderatamente grave (≤ 2 U/dL). Recentemente, l'Agenzia italiana per il Farmaco (AIFA) ha approvato l'utilizzo di Roctavian® anche in Italia (Gazzetta Ufficiale del 22-1-2024, Determina n.9/2024, pag.45-46). L'autorizzazione condizionata richiede che vengano raccolti ulteriori dati in studi clinici di fase 3, ancora in corso, necessari per confermarne efficacia e sicurezza e il favorevole profilo rischio-beneficio. Ciò richiede un aggiornamento continuo dei risultati dei diversi studi sperimentali in corso. Il GdL intende, quindi, informare medici e pazienti e fornire loro aggiornamenti periodici circa i risultati degli studi, su cui si è basata l'approvazione dell'EMA e, in particolare, sugli studi di fase 3 che rappresenta la fase più estesa e rigorosa del processo di sperimentazione clinica di ogni nuovo farmaco, prevedendo l'arruolamento di un maggior numero di pazienti.

In questo opuscolo, che rappresenta solo il primo di una serie che verranno prodotti in futuro si intende, dunque, fornire, in modo semplice e accurato, tutte le informazioni su cos'è e come funziona questa moderna terapia. Si sono occupati di ciò Flora Peyvandi, Giancarlo Castaman e Isabella Garagiola, alla quale si deve anche una panoramica dei risultati di efficacia e sicurezza negli studi registrativi. Discrepanze metodologiche nella valutazione dell'efficacia terapeutica sulla base di parametri di laboratorio pongono non trascurabili dubbi circa i metodi da utilizzare. La stesura di questo capitolo è stata, perciò, affidata ad Armando Tripodi, la cui competenza in merito è ben nota a livello nazionale e internazionale. Una specifica sezione, curata da Matteo Dario Nicola Di Minno e Maria Basso, entrambi riconosciuti esperti nel settore, comprende suggerimenti su come eseguire la valutazione muscoloscheletrica, soprattutto nel corso del follow-up post-terapia genica. Un capitolo è dedicato agli aspetti clinici irrisolti che rimangono al centro dell'attenzione sia dei pazienti che dei medici. Alessandro Gringeri, Corrado Lodigiani, Ezio Zanon si sono occupati di descrivere gli aspetti clinici di cui tener conto nella prospettiva di condurre un percorso di terapia genica. In questo ambito, un aspetto

estremamente rilevante è rappresentato da come evitare e gestire le possibili complicanze epatiche. Vincenzo La Mura ha redatto una proposta di raccomandazioni circa lo screening epatologico cui i candidati alla terapia genica dovrebbero essere sottoposti prima di intraprendere il relativo percorso e curato la sezione relativa alla gestione delle complicanze epatologiche. Un altro aspetto importante è rappresentato dalla gestione della terapia genica da parte dei Centri Emofilia. Annarita Tagliaferri descrive il modello Hub & Spoke, raccomandato dalla *European Association of Haemophilia and Allied Disorders* (EAHAD) e dal *European Haemophilia Consortium* (EHC), che l'AICE propone di adottare. Numerose sono, tuttavia, le informazioni da fornire ai pazienti anche relativamente agli aspetti organizzativi. Andrea Buzzi e Enrico Ferri Grazzi hanno, perciò, stilato una guida affinché i pazienti siano in grado di prendere una decisione informata e consapevole nel momento in cui gli si prospetta di intraprendere un percorso di terapia genica. L'opuscolo è anche corredato da un glossario, curato da Mirko Pinotti cui si deve anche la stesura dell'Allegato 1 in cui vengono spiegati "Concetti chiave sull'emofilia e la terapia genica". Infine, nell'Allegato 2 Vincenzo La Mura fornisce informazioni aggiuntive sull'epatotossicità.

Il lavoro ha richiesto molto tempo per renderlo accurato scientificamente e fruibile anche per i pazienti. Tutto ciò è stato reso possibile grazie alla ferma volontà e costante ispirazione di Angiola Rocino e all'eccellente ed entusiastica dedizione e competenza di tutti i coautori coinvolti, a cui sentiamo il dovere di rivolgere un ringraziamento particolare.

Flora Peyvandi e Giancarlo Castaman

.....

Desideriamo esprimere il nostro più sentito ringraziamento alla Dott.ssa Angiola Rocino, che ha creduto sin da subito in questa iniziativa e ci ha fornito il suo prezioso aiuto passo dopo passo nella realizzazione di questo libretto curato dal Gruppo di Lavoro (GdL) Terapia Genica dell'AICE.

PREFAZIONE

Ho ben poco da aggiungere a ciò che nella loro introduzione scrivono così bene Flora Peyvandi e Giancarlo Castaman. Infatti essi, che hanno avuto reali esperienze personali attraverso l'arruolamento di casi negli studi che hanno portato all'approvazione attuale della terapia genica sia nell'emofilia A che nell'emofilia B, forniscono un elenco dettagliato e comprensivo dei contributi che rendono questo sforzo di AICE un vero gioiello di completezza ed equilibrio.

A suo tempo la Presidente di AICE, Angiola Rocino, mi ha chiesto di leggerlo e quindi ho potuto apprezzare i risultati di questo contributo di tanti di voi. I vantaggi, ma anche i problemi non risolti di queste terapie, sono scritti con molta chiarezza e comprensibilità generali. L'implementazione della terapia con il sistema Hub and Spoke permette a tutti di partecipare attraverso la gestione condivisa dei casi. Spero quindi che la terapia genica rappresenti un ulteriore e reale passo avanti dei centri AICE nella collaborazione clinica e scientifica. Alla fine di questi brevi ma entusiastici miei commenti, spero proprio che il coinvolgimento di tutti costituirà un passo avanti affinché la nostra comunità di medici e assistiti possa acquisire sempre di più quella visibilità nello scenario internazionale che ultimamente si era a mio avviso un po' attenuata rispetto al passato.

Pier Mannuccio Mannucci

Sviluppo e cronologia del documento

La stesura del presente documento è stata curata dal Gruppo di Lavoro (GdL) Terapia Genica dell'AICE, presieduto da Angiola Rocino, Presidente AICE per il triennio 2020-2023, coordinato da Flora Peyvandi e Giancarlo Castaman e costituito da: Andrea Buzzi, Enrico Ferri Grazzi (rappresentanti dei pazienti), Maria Basso, Paolo Angelo Cortesi, Raimondo De Cristofaro, Giovanni Di Minno, Matteo Nicola Dario Di Minno, Isabella Garagiola, Alessandro Gringeri, Veronica Grippa, Vincenzo La Mura, Marzia Leotta, Corrado Lodigiani, Mariasanta Napolitano, Mirko Pinotti, Rita Carlotta Santoro, Paolo Simioni, Annarita Tagliaferri, Armando Tripodi e Ezio Zanon.

La versione finale è stata prodotta dallo stesso GdL, approvata dal Consiglio Direttivo dell'AICE per il triennio 2023-2026 (Presidente: R.C. Santoro; Vice-Presidente: M.E. Mancuso; Consiglieri: C. Biasoli e P. Di Gregorio; Past-president: A. Rocino; Rappresentante ISS: F. Abbonizio, Segretario M. Napolitano), dal Comitato Scientifico dell'AICE (Presidente: E. Zanon; Componenti: F. Bernardi, G. Castaman, M. D. N. Di Minno, A.C. Molinari) e pubblicata sul sito AICE in data 06.06.24

Introduzione	8
Cos'è la terapia genica	10
Esperienze di terapia genica in emofilia A e B	12
Efficacia e sicurezza negli studi clinici preregistrativi	13
Valutazione di laboratorio per la misura dei prodotti transgenici derivati dalla terapia genica dell'emofilia A e B	16
Valutazione della salute muscolo scheletrica	18
Criteri di selezione dei pazienti candidabili alla terapia genica	20
Monitoraggio prima, durante e dopo la terapia genica	21
Aspetti clinici da considerare per la terapia genica	25
Qual è l'età ideale per sottoporsi alla terapia genica?	25
I livelli di fattore nei pazienti responsivi alla terapia genica possono variare: come gestire risultati imprevedibili e come il paziente può, conseguentemente, modulare il suo livello di attività?	25
Qual è la probabilità di perdita di efficacia in un determinato periodo di tempo?	27
Quanto sono frequenti e rischiose le reazioni allergiche?	29
Qual è il rischio di epatotossicità nei pazienti con epatite cronica e/o fibrosi minima o moderata o malattia da steatosi epatica?	30
Qual è il rischio di mancata risposta alla terapia genica nei pazienti con fibrosi o steatosi epatica?	31
Quanto è elevato il rischio di carcinogenesi epatocellulare? In particolare, nei pazienti con preesistenti fattori di rischio come, ad esempio, cirrosi, fibrosi epatica avanzata, epatite B o C, malattia steatosica epatica (comunemente nota come Nonalcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD; oggi Steatotic Liver Disease, SLD), consumo alcolico cronico, steatoepatite non alcolica (comunemente nota come Nonalcoholic Steatohepatitis, NASH; oggi Metabolic Dysfunction-associated Steatotic Liver Disease, MASLD)?	31

Qual è il rischio di attivazione del sistema immunitario contro il vettore virale e come può essere gestito?	33
Qual è il rischio derivante dall'uso di steroidi in presenza di altre comorbidità?	34
Qual è il rischio di trovare/rilevare il vettore virale nel liquido seminale?	35
Il modello Hub e Spoke per la gestione della terapia genica	37
Le aspettative del paziente riguardo alla terapia genica: una guida per una decisione informata e consapevole	41
Indagare le proprie aspettative sulla terapia genica e la conoscenza delle opzioni terapeutiche attuali	41
Livello di conoscenza, criteri di eleggibilità e considerazioni pratiche	42
Criteri di inclusione ed esclusione	43
Programmi di Follow-up, esami, visite e frequenza di accessi al centro	43
In caso di adozione di un modello Hub & Spoke, quale sarebbe il Centro che eseguirà particolari test/visite/valutazioni?	45
Trattamenti farmacologici aggiuntivi che potrebbero rendersi necessari	45
Logistica del trattamento, impatto sulla vita di tutti i giorni e limitazioni imposte dalla terapia genica	46
Supporto per il paziente	47
Supporto psicologico e sociale alla decisione	47
Glossario	49
Bibliografia	55
Appendice 1 – Concetti chiave sull'emofilia e sulla terapia genica	61
Appendice 2 – Informazioni aggiuntive sull'epatotossicità	63

Introduzione

Negli ultimi dieci anni, il trattamento dell'emofilia ha visto l'introduzione di farmaci innovativi, tra cui i concentrati di fattore (F)VIII e FIX ricombinanti opportunamente modificati allo scopo di ridurre la clearance e prolungarne l'emivita in circolo [1-6]. Per i pazienti affetti da emofilia A con e senza inibitore si è reso, inoltre, disponibile emicizumab, un anticorpo monoclonale umanizzato bispecifico che, legandosi al FIX attivato e al FX mimando l'azione del FVIII attivato. Il principale vantaggio derivante dalla possibilità di utilizzo di questo farmaco è legato alla somministrazione sottocutanea ogni 7, 14, 28 giorni [7-10].

Nonostante questi progressi, il trattamento sostitutivo rimane impegnativo e non risolve completamente i bisogni dei pazienti, che continuano ad aspirare a una cura definitiva, mediante approcci di terapia genica. In questo contesto, l'introduzione di questa opzione terapeutica rappresenta, dunque, una svolta epocale. Grazie a questa prospettiva, le persone affette da emofilia potrebbero essere protette dall'insorgenza di episodi emorragici per diversi anni, in relazione al livello di fattore circolante ottenuto dopo una singola somministrazione.

L'agenzia europea del farmaco (EMA, European Medicines Agency) ha concesso l'approvazione condizionata a due farmaci di terapia genica per emofilia: *valoctocogene roxaparvovec* (Roctavian®, Biomarin) per il trattamento dei pazienti con emofilia A grave e *etranacogene dezaparvovec* (Hemgenix®, CSL Behring) per il trattamento dell'emofilia B grave e moderatamente grave (≤ 2 U/dL) [11,12]. L'autorizzazione condizionata richiede, tuttavia, che vengano raccolti ulteriori dati in studi clinici di fase 3, ancora in corso, necessari per confermarne efficacia e sicurezza e il favorevole profilo rischio-beneficio. Recentemente, l'Agenzia italiana per il Farmaco (AIFA) ha approvato l'utilizzo di Roctavian® in Italia (Gazzetta Ufficiale del 22-1-2024, Determina n.9/2024, pag.45-46).

Recentemente, l'agenzia americana del farmaco ha concesso l'approvazione ad un altro farmaco di terapia genica per il trattamento dei pazienti con emofilia B grave e moderatamente grave (≤ 2 U/dL), *fidanacogene elaparvovec* (Beqvez™, Pfizer).

In Italia, l'AICE (Associazione Italiana Centri Emofilia), ha costituito un gruppo di lavoro (GdL), con il compito di fornire un puntuale aggiornamento dei risultati dei diversi studi clinici in corso e monitorare efficacia e sicurezza di questi nuovi farmaci.

Questo documento risponde, dunque, agli scopi che l'AICE si propone: fornire, in modo semplice ma accurato, tutte le informazioni su cos'è e come funziona questa moderna

terapia, offrire una panoramica dei risultati di efficacia e sicurezza negli studi registrativi, identificare i parametri per valutarne l'efficacia, ponendo attenzione alle discrepanze metodologiche di laboratorio e alla valutazione muscoloscheletrica, proporre una raccomandazione di screening epatologico per tutelare i candidati alla terapia genica dal rischio di complicanze in questo ambito, individuare i criteri per la definizione dei Centri Hub & Spoke che dovranno occuparsi di gestire i pazienti, rispondere ai quesiti che i pazienti si pongono e pongono ai medici nel momento in cui considerano di sottoporsi a questa nuova opzione terapeutica.

Cos'è la terapia genica

La terapia genica consiste nel “trasferimento di materiale genetico all'interno di cellule, allo scopo di prevenire, curare o diagnosticare una malattia”¹, rappresentando, idealmente, l'opzione terapeutica risolutiva per le malattie genetiche. Fin dal momento in cui la terapia genica è stata riconosciuta come paradigma terapeutico, l'emofilia A e B sono state considerate candidate ideali, in quanto malattie monogeniche, con basi molecolari ben definite² e un fenotipo clinico di gravità inversamente correlato ai livelli circolanti di FVIII e FIX, con sanguinamenti, a volte anche spontanei o clinicamente inapparenti, articolari e/o muscolari per livelli circolanti di FVIII/FIX inferiori a 2 U/dl. Un loro incremento, anche modesto è, invece, in grado di migliorare significativamente il fenotipo emorragico. Altrettanto importante è la modalità di valutazione dell'efficacia della procedura, basata sulla semplice misura dei livelli di FVIII o FIX circolanti nel plasma. Per il trasferimento di nuovo materiale genetico all'interno di una cellula, gli elementi essenziali sono rappresentati dal gene da trasferire (transgene), dalla modalità di trasferimento e dall'organo bersaglio deputato alla sintesi della proteina terapeutica [13]. I tentativi più significativi per raggiungere tale obiettivo hanno impiegato vettori virali, poiché essi hanno un significativo vantaggio nell'elevare l'efficienza di trasduzione. I vettori virali si ottengono inserendo, mediante tecniche del DNA ricombinante, il gene d'interesse all'interno del capsido del vettore virale, sotto il controllo di un promotore forte, che permetta una maggiore efficienza di trascrizione. Il virus viene reso difettivo, cioè incapace di riprodursi autonomamente, per evitare la sua diffusione. Il transgene ha una localizzazione episomale, cioè entra nel nucleo della cellula, ma non si integra nel suo DNA mantenendo, sostanzialmente, una struttura circolare a sé stante. Tuttavia, in genere, i vettori virali possono trasportare molecole di DNA di dimensioni limitate, inferiore a 5 chilobasi (kb) e danno, invariabilmente, luogo a una risposta immunitaria [14]. Esiste, inoltre, anche se molto ridotta, la possibilità che essi si integrino nel DNA della cellula target, con conseguente rischio di mutagenesi inserzionale. Diversi vettori virali sono stati studiati e impiegati con successo in modelli animali di emofilia. I primi vettori impiegati derivavano da retrovirus, poi sostituiti da adenovirus fino a giungere all'attuale impiego di virus adeno-

1 Vedi le Linee Guida inerenti l'uso di prodotti di terapia genica: guida ai produttori e agli utilizzatori. Comitato Nazionale per la Biosicurezza e le Biotecnologie. Aggiornamento 18/2/2020

2 Vedi Appendice.1 - Concetti chiave sull'emofilia e sulla terapia genica

associati (AAV). Gli AAV hanno diverse caratteristiche che ne favoriscono l'impiego in questo ambito terapeutico: sono in grado di infettare le cellule del fegato in modo efficace, non sono patogeni, sono a singolo filamento e incapaci di replicarsi. Tuttavia, va considerato che gli AAV sono ubiquitari e molti pazienti (almeno 40-50%, ma in talune aree del mondo fino a 70-80%) [15] posseggono anticorpi circolanti contro diversi sierotipi di AAV, la cui presenza può compromettere la possibilità di ricevere tali terapie. I vettori virali possono trasdurre il tessuto target attraverso due metodiche diverse: la terapia genica *ex-vivo* e quella *in vivo*. I farmaci ad oggi approvati per la terapia genica in emofilia si basano su approcci *in vivo* con somministrazione del vettore virale per via endovenosa. In cui viene effettuato un prelievo di tessuto rappresentato da cellule staminali emopoietiche o mesenchimali (progenitori endoteliali) e, in questo caso, le cellule vengono trasdotte in vitro per poi essere reinserite nel paziente, con conseguente necessità di attecchimento. La terapia genica *in-vivo* si basa su una tecnica di introduzione del vettore nel tessuto target o nel sangue e il DNA terapeutico viene integrato nelle cellule in grado di produrre la proteina. I trial di terapia genica con vettori AAV attualmente in corso e i primi due farmaci di terapia genica per l'emofilia A e l'emofilia B cui l'EMA, e anche l'AIFA nel 2024 per l'emofilia A, hanno concesso l'autorizzazione all'uso nella normale pratica clinica, rispettivamente nel 2022 e 2023, utilizzano la tecnologia AAV *in-vivo* e prevedono la somministrazione endovenosa del vettore virale.

Esperienze di terapia genica in emofilia A e B

I primi studi di terapia genica, con vettori AAV, condotti in modelli animali, negli anni '90 [16-19], dimostravano che l'espressione dei transgeni FVIII e FIX poteva raggiungere livelli terapeutici, migliorando il fenotipo emorragico. Gli studi iniziali con vettori AAV, in pazienti affetti da emofilia B, sono stati condotti nei primi anni 2000 mediante la somministrazione intramuscolare del vettore [20,21]. Tuttavia, i livelli plasmatici di FIX raggiunti erano piuttosto bassi (circa 2 U/dL). In un successivo studio clinico, condotto nel 2006, la somministrazione del vettore AAV veniva effettuata mediante iniezione nella vena porta [22]. Questo approccio consentiva il trasporto del vettore nel fegato, considerato il sito naturale di espressione del FIX. In questo studio, 7 pazienti con emofilia B venivano sottoposti a iniezione di un vettore AAV2, somministrato a diversi dosaggi. Nei pazienti trattati con il dosaggio più elevato (2×10^{12} vg/kg), venivano raggiunti livelli terapeutici di FIX (12 U/dL in un paziente e 4 U/dL nell'altro) che, tuttavia, gradualmente diminuivano dopo 4 settimane dall'infusione, fino a raggiungere livelli non più misurabili a 8 settimane. Questa diminuzione del livello di attività del FIX si verificava contemporaneamente a un aumento asintomatico e transitorio delle transaminasi sieriche. Il primo studio clinico ad aver ottenuto risultati positivi con livelli di espressione del fattore a lungo termine (più di 10 anni) è stato condotto da un gruppo inglese nel 2011, utilizzando il vettore AAV2/8 [23-25]. I dieci pazienti arruolati mantenevano livelli di espressione del FIX stabili nel tempo e compatibili con la forma moderata di emofilia B (FIX 2-5 U/dL). Anche in questo studio si riscontrava, tuttavia, un aumento transitorio e asintomatico degli enzimi epatici, risoltosi in alcuni pazienti, dopo un breve ciclo di terapia steroidea. Negli studi successivi, sono stati impiegati sierotipi virali alternativi, al fine di ridurre la possibilità di una preesistente immunità contro gli AAV. Inoltre, i geni (cDNA) del FVIII e FIX erano stati "ottimizzati" per migliorarne il livello di espressione [14]. Per quanto riguarda il FVIII, veniva rimossa una parte del gene che codifica per il dominio B della molecola, onde adeguare la dimensione del transgene alla capacità di immagazzinamento del virus AAV. Per l'emofilia B, il maggiore progresso è stato ottenuto grazie alla possibilità di produrre un transgene contenente una variante genica nota come FIX Padova (R338L), in grado di aumentare i livelli di attività del FIX di 5-7 volte [26].

Efficacia e sicurezza negli studi clinici preregistrativi

I criteri utilizzati negli studi sperimentali condotti finora per valutare l'efficacia della terapia genica in emofilia includono il dosaggio dei livelli di FVIII o FIX raggiunti dopo la somministrazione, l'ABR (annualised bleeding rate), che rappresenta il numero di sanguinamenti annualizzati, la riduzione del consumo e del numero di infusioni annuo di FVIII o FIX esogeno rispetto a prima della terapia genica, e la valutazione della qualità di vita considerando, in particolare, la salute muscolo scheletrica. Il livello di espressione viene monitorato attraverso la misura dell'attività (media/mediana) coagulante di FVIII o FIX, valutata mediante metodo coagulativo one-stage (OSA, one-stage assay) e/o cromogenico (CSA, chromogenic substrate assay). Tuttavia, nei diversi studi, sono state riscontrate discrepanze tra i due metodi di misurazione, sia in emofilia A che in emofilia B. L'ABR è considerato un criterio di notevole valenza clinica che, tuttavia, misura esclusivamente gli episodi emorragici clinicamente riconoscibili e non fornisce informazioni circa quelli inapparenti, non riconosciuti dal paziente ma che potrebbero comunque innescare meccanismi di progressione in artropatia cronica. La riduzione del consumo di prodotti sostitutivi di FVIII o FIX viene calcolata in base all'uso annuale di FVIII o FIX e del numero di infusioni annuo con FVIII/FIX esogeno, rispetto a prima della terapia genica.

Tutti gli eventi avversi a breve e lungo termine registrati contribuiscono a definire la sicurezza di un farmaco. L'evento avverso più frequente, riscontrato in pazienti con emofilia A e con minor frequenza in quelli con emofilia B, è l'aumento asintomatico e transitorio dell'alanina aminotransferasi (ALT) e, in minor misura, dell'aspartato aminotransferasi (AST). Tale complicanza è stata attentamente monitorata per il rischio potenziale associato alla perdita di espressione del transgene. Per tale motivo, all'interno degli studi, è stato suggerito l'utilizzo di steroidi o altri farmaci immunosoppressori, quali tacrolimus, budesonide e micofenolato che, in genere, hanno consentito una buona risoluzione della complicanza. Attualmente, da quanto riportato nei diversi studi clinici pubblicati, non si osserva uniformità nella scelta e durata di trattamento con farmaci immunosoppressori, che vengono prescritti al momento del riscontro di un aumento degli enzimi epatici o come profilassi a partire dalla somministrazione della terapia genica. Studi che valutano l'approccio profilattico sono in corso ma i dati non sono attualmente disponibili.

Altri parametri per la valutazione della sicurezza sono: la risposta immunitaria contro componenti del vettore virale (anticorpi anti-AAV), lo sviluppo di anticorpi contro il FVIII/FIX e l'insorgenza di eventi trombotici, risultanti da una overespressione del transgene. Inoltre,

l'analisi della sicurezza si estende a un periodo a lungo termine, al fine di valutare l'eventuale comparsa di neoplasie. I vettori virali hanno, infatti, la capacità di integrarsi nel genoma della cellula ospite e, anche se tale evenienza è considerata molto improbabile e rara nel caso dei vettori AAV, vi è un potenziale rischio di sviluppo di neoplasie. Nei modelli murini, l'integrazione dei virus AAV è stata associata allo sviluppo di tumori, mentre analogo effetto non è stato osservato negli studi eseguiti in cani affetti da emofilia [27,28]. Negli studi clinici nell'uomo sono stati riportati 4 casi di neoplasia (un caso di epatocarcinoma e un carcinoma paratiroideo in due pazienti con emofilia B; un carcinoma squamoso della tonsilla e un caso di leucemia acuta linfoblastica in due pazienti con emofilia A) [29-33]. Dopo analisi molto approfondite, il loro sviluppo non è stato considerato associato al farmaco in studio.

Rimane comunque fondamentale la sorveglianza a lungo termine dei pazienti trattati con terapia genica con opportuna programmazione anche delle procedure di screening per eventuali patologie neoplastiche o autoimmuni. L'istituzione di un registro nazionale per raccogliere informazioni sull'efficacia e sicurezza della terapia genica in pazienti italiani rappresenta, perciò, un aspetto di cruciale importanza. Tale registro dovrebbe adottare criteri europei e internazionali per garantire standard elevati e consentire la condivisione di dati con altri centri a livello internazionale. Ciò consentirebbe di ottenere un ampio pool di dati, fondamentale per rispondere ai quesiti chiave sulla sicurezza a breve e lungo termine della terapia genica, oltre a favorire lo sviluppo di protocolli migliori nel campo della medicina genetica.

Tutti gli studi clinici di terapia genica in emofilia A e B in corso sono disponibili sul sito <https://clinicaltrials.gov/>. Inoltre, l'European Association for Haemophilia and Allied Disorders (EAHAD) ha creato un database³ in cui sono descritte le caratteristiche generali degli studi clinici e riportati i dati di efficacia e sicurezza di tutti gli studi clinici registrativi per la terapia genica dell'emofilia A e B. Anche il World Federation of Hemophilia ha creato un registro⁴ prospettico/osservazionale per raccogliere i dati a lungo termine sulle persone affette da emofilia che ricevono terapia genica. L'obiettivo primario è determinare la sicurezza a lungo termine, mentre gli obiettivi secondari sono determinare l'efficacia a lungo termine e la durabilità delle terapie geniche sia nei pazienti con emofilia A che in

3 Consultabile al sito: <https://www.eahad.org/introducing-our-latest-projectthe-eahad-gene-therapy-clinical-trials-database>

4 Consultabile al sito: <https://wfh.org/research-and-data-collection/gene-therapy-registry/>

quelli con emofilia B, oltre a valutare la loro qualità di vita a lungo termine dopo il trattamento con terapia genica [34].

Valutazione di laboratorio per la misura dei prodotti transgenici derivati dalla terapia genica dell'emofilia A e B

È noto che i livelli di FVIII/FIX, misurati in pazienti trattati con prodotti a emivita estesa, dipendono dal metodo usato per la misura [35,36]. Nell'ambito del dosaggio di laboratorio dei livelli di FVIII/FIX molto spesso la classe di metodi denominata *coagulante* produce risultati diversi, se paragonati a quelli misurati sullo stesso campione con metodo *cromogenico*. Le ragioni delle discrepanze sono difficili da determinare, ma è probabile che siano, almeno in parte, dovute alla modificazione strutturale che caratterizza le diverse molecole di FVIII/FIX ottenute da tecnologia ricombinante che li porta a essere diversi, rispetto a quelli *nativi*. Infatti, osservazioni sperimentali su taluni prodotti dimostrano che le discrepanze metodologiche diminuiscono fino ad azzerarsi se viene utilizzata come standard la stessa molecola utilizzata per la terapia sostitutiva [37]. Questo comportamento non è sorprendente, poiché risponde a uno dei principali requisiti del dosaggio biologico che, nella letteratura anglosassone, è noto come *like-vs-like*. Tuttavia, le discrepanze fra risultati non riguardano solo il metodo coagulante vs il cromogenico, ma anche i diversi metodi coagulanti, poiché è differente la composizione dei reagenti aPTT. Inoltre, le discrepanze non riguardano soltanto i prodotti per la terapia sostitutiva, ma anche i prodotti transgenici, derivanti dalla terapia genica e, solitamente, per entrambe le emofilie, il metodo coagulante, al contrario di quanto avviene con i prodotti ad emivita estesa, misura livelli di fattore transgenico più elevati (da 1.5 a 2 volte) rispetto al metodo cromogenico [29, 38,39]. Tuttavia, non è chiaro se questa differenza abbia rilevanza clinica. Inoltre, studi su pochi pazienti con emofilia B, dopo terapia genica con "FIX Padova", dimostrano una elevata variabilità nella misura quando il FIX è misurato con diversi metodi coagulanti del commercio [40]. Preliminarmente, i risultati clinici sembrano essere correlati con i risultati del test di coagulazione in una sola fase, rispetto al test cromogenico.

Tutta questa complessità fa prevedere che il problema delle differenze metodologiche che si riscontrano nella misura dei prodotti transgenici non sarà facilmente risolvibile e tre diverse opzioni sembrano ragionevolmente perseguibili:

1. impiegare gli stessi metodi usati negli studi registrativi
2. usare il metodo coagulante, che esiterà in livelli di fattore più elevati
3. utilizzare il metodo cromogenico che darà luogo a livelli più bassi.

La prima ipotesi, seppur ragionevole, non è di facile adozione perché gli studi registrativi hanno usato sia metodi coagulanti che cromogenici, ma come precedentemente

evidenziato, esiste una molteplicità di metodi coagulanti o cromogenici e molto spesso quelli usati negli studi registrativi non sono di facile individuazione. Oltretutto, anche se lo fossero, non sarebbero probabilmente disponibili in molti laboratori, visto che l'approvvigionamento è basato su gare di appalto non facilmente modificabili.

Secondo taluni, il metodo cromogenico, a causa dei livelli più bassi, sarebbe da preferire in quanto rappresenterebbe una scelta più conservativa, in linea con una maggiore sicurezza per il paziente. Inoltre, la scelta del metodo coagulante, a causa dei livelli più elevati, potrebbe fornire una falsa rassicurazione che, probabilmente, potrebbe non essere in linea con la realtà. Inoltre, i metodi cromogenici dovrebbero, almeno in teoria, essere gravati da una minore variabilità di composizione fra i prodotti disponibili in commercio, rispetto a quelli coagulanti.

Valutazione della salute muscolo scheletrica

L'efficacia e la sicurezza della terapia genica richiede un monitoraggio continuo e costante sia a breve che a lungo termine. Questa valutazione deve essere eseguita in modo standardizzato con metodi approvati sia a livello europeo che a livello internazionale avvalendosi di un team multidisciplinare che valuti i risultati ottenuti con questa nuova terapia.

Un buon parametro per misurare l'efficacia della terapia genica è la valutazione della funzionalità muscoloscheletrica, essendo la complicità più comune nei soggetti con emofilia.

Nel soggetto emofilico, la valutazione delle condizioni strutturali e delle capacità funzionali delle sei principali articolazioni (ginocchio, gomito, caviglia) può essere eseguita utilizzando tecniche per immagini: ecografia, risonanza magnetica (MRI) e radiografia standard (X-ray) e una scala di valutazione clinica della salute articolare, come l'*Haemophilia Joint Health Score* (HJHS) [41,42]. L'ecografia è consigliata per individuare precocemente eventuali danni articolari e sanguinamenti subclinici, nonché per evidenziare la presenza di sinovite, versamenti intra-articolari, danno cartilagineo e/o osseo. Rappresenta, inoltre, un utile strumento per valutare l'efficacia delle terapie [41].

L'impatto sulla capacità del paziente di partecipare alla vita quotidiana fisica può essere valutato utilizzando il *Functional Independence Score in Haemophilia* (FISH) e l'*Haemophilia Activities List* (HAL) [41,43,44]. Il FISH è uno strumento che misura l'indipendenza del paziente nello svolgimento delle attività della vita quotidiana, negli spostamenti e nella mobilità, come: vestirsi, sedersi, chinarsi, camminare, correre. Il questionario HAL misura l'impatto della patologia emofilica sulle abilità funzionali e sulla gestione della malattia nell'adulto. Indaga, inoltre, la capacità di usare mezzi di trasporto, di svolgere le comuni attività domestiche, fare sport, svolgere attività nel tempo libero. Inoltre, le persone con emofilia devono essere interrogate riguardo alle loro personali esperienze di dolore, individuandone le sedi e le cause, sia prima della terapia genica che dopo il trattamento. Valutazioni dell'intensità del dolore dovrebbero essere effettuate almeno ogni 12 mesi, utilizzando, preferibilmente, la *Visual Analogue Scale* (VAS) o la *Numerical Rate Scale* (NRS) [41,45]. La VAS è una scala spesso utilizzata nella ricerca epidemiologica e clinica per misurare l'intensità o la frequenza dei vari sintomi. La NRS valuta l'intensità del dolore nell'adulto includendo anche il dolore cronico. La sede, l'estensione e la sequenza del dolore, nonché la sua interferenza con attività, come la deambulazione, il sonno, le emozioni, dovrebbero essere documentate utilizzando

strumenti validati, come i questionari *Brief Pain Inventory* (BPI) e *Multidimensional Haemophilia Pain Questionnaire* (MHPQ) [46-48]. Inoltre, la valutazione dovrebbe essere personalizzata in base a quanto inizialmente riscontrato e potrebbe comprendere sia strumenti di diagnostica per immagini che test di funzionalità articolare. Nel primo anno lo screening dovrebbe essere effettuato con frequenza maggiore, ad esempio ogni 3-6 mesi.

Criteri di selezione dei pazienti candidabili alla terapia genica

L'accesso alla terapia genica si basa su specifiche caratteristiche dei pazienti. I principali criteri di eleggibilità sono i seguenti:

- emofilia A grave (FVIII:C ≤ 1 U/dL)
- emofilia B grave (FIX:C ≤ 1 U/dL) o moderatamente grave (FIX:C ≤ 2 U/dL)
- età ≥ 18 anni
- anamnesi negativa per lo sviluppo di inibitori anti-FVIII o FIX
- assenza di anticorpi rilevabili anti-virus AAV5 (solo per emofilia A)
- titolo di anticorpi anti-AAV5 inferiore a 1:678 (solo per etranacogene dezaparvovec).

Il trattamento è invece controindicato in pazienti con patologie epatiche, poiché la sicurezza e l'efficacia della terapia genica in questa tipologia di pazienti non sono state ancora valutate. Sono, pertanto, da escludere, almeno sulla base delle attuali conoscenze:

- Pazienti con compromissione epatica dovuta a:
 - o infezioni da virus epatici (HBV, HCV) acute o croniche
 - o fibrosi epatica significativa o cirrosi nota
 - o patologie epatiche con alterazioni dei valori di ALT, AST, GGT (γ -glutamilttransferasi), bilirubina totale oltre 1,25 volte il limite superiore della norma oppure INR (International Normalized Ratio) del PT $\geq 1,4$
- Pazienti con neoplasia epatica.

La terapia genica non è inoltre raccomandata in:

- pazienti con compromissione renale
- bambini e adolescenti di età < 18 anni in quanto, al momento, non approvata per pazienti in questa fascia di età
- pazienti di età > 65 anni per i quali sono disponibili solo dati limitati.

Monitoraggio prima, durante e dopo la terapia genica

Prima di intraprendere il percorso di terapia genica, il paziente dovrà ricevere tutte le informazioni relative alla terapia e avere la possibilità di discuterne dettagliatamente con lo staff medico del centro emofilia di riferimento. Inoltre, potrà considerare di rivolgersi alle associazioni dei pazienti che potranno aiutare a informarlo e sostenerlo nelle diverse tappe del percorso. Importante, in questa fase, fornirgli tutte le indicazioni per capire questa moderna e innovativa terapia e permettergli di fare una scelta consapevole e in piena autonomia. La prima tappa è una consulenza approfondita che affronti tutti gli aspetti della terapia genica. Il secondo punto è verificare l'eleggibilità del paziente, secondo i criteri descritti nel paragrafo precedente e nella Figura 1. Dopo aver firmato uno specifico consenso, dovrà quindi sottoporsi a esami specifici che comprendono:

- Dosaggio/misurazione degli anticorpi anti-AAV5
 - Se il paziente risultasse positivo per gli anticorpi anti-AAV5 a qualsiasi titolo (nel caso dell'emofilia A) o con un titolo superiore a 1:678 (nel caso dell'emofilia B), non sarà considerato eleggibile alla terapia e lo screening si interromperà.
 - Se il paziente risultasse negativo si procederà con:
 - Dosaggio/misurazione dell'attività coagulante del FVIII o FIX
 - Dosaggio/misurazione dell'inibitore anti-FVIII o anti-FIX
 - Dosaggio/misurazione di ALT, AST, GGT, bilirubina

Questi test di laboratorio dovranno essere eseguiti entro e non oltre tre mesi prima della somministrazione della terapia genica. Contemporaneamente, il paziente dovrà essere sottoposto a valutazione mediante tecniche per immagini, come: ecografia, elastografia ad ultrasuoni (fibroscan) entro 6 mesi prima della terapia genica ed, eventualmente, in casi selezionati, biopsia epatica, per valutare la salute del fegato. Il paziente che soddisfi tutti i criteri di eleggibilità, dopo aver firmato il consenso informato specifico per accettazione della terapia, dovrà essere preso in carico dal centro che somministrerà la terapia genica. Durante e immediatamente dopo l'infusione del prodotto di terapia genica, che avverrà in un ambiente controllato da uno staff dedicato (ematologo, infermiere) o prontamente reperibile (anestesista), il paziente verrà strettamente monitorato per diverse ore per valutare la comparsa di eventuali reazioni avverse. Per il farmaco *valoctocogene roxaparvovec*, durante gli studi clinici sono state osservate, in una minoranza di casi, le

seguenti reazioni avverse post-infusione: cutanee, delle mucose e delle vie respiratorie (inclusi orticaria, prurito, eruzione maculo-

Figura 1. Algoritmo del percorso di terapia genica

papulosa, starnuto, tosse, dispnea, rinorrea, lacrimazione eccessiva e formicolio in gola), sintomi gastrointestinali (incluse nausea e diarrea), alterazioni cardiovascolari (incluse aumento della pressione arteriosa, ipotensione, tachicardia e presincope) e sintomi a carico dell'apparato muscoloscheletrico (inclusi mialgia e dolore dorso-lombare) nonché piressia, fremiti di freddo e brividi. Per il farmaco *etranacogene dezaparvovec*, durante gli studi clinici sono state raramente osservate le seguenti reazioni avverse post-infusione: reazioni allergiche (ipersensibilità), reazione nel sito di infusione, capogiri, prurito oculare, arrossamento della cute (vampate), dolore nella parte superiore dell'addome, eruzione cutanea pruriginosa (orticaria), fastidio al torace e febbre. Nelle settimane e mesi successivi alla somministrazione della terapia genica, il paziente dovrà sottoporsi a controlli, inizialmente molto ravvicinati, la cui frequenza si ridurrà nel tempo. Questa valutazione comprenderà la misura dei livelli di FVIII o FIX e la verifica della sicurezza del trattamento, con particolare attenzione agli effetti sulla salute del fegato. È previsto anche un esame ortopedico per valutare lo stato delle articolazioni, avvalendosi sia di esami diagnostici per immagini che di questionari specifici di valutazione clinica. La tabella 1 riassume i test di laboratorio da eseguirsi e la tempistica di esecuzione.

Tabella 1. Monitoraggio dell'attività coagulante di FVIII o FIX e della funzionalità epatica dopo infusione di terapia genica.

Valoctocogene roxaparvovec (Roctavian®) - Emofilia A				
	Prime 26 settimane	Da 26 a 52 settimane	2° anno	Dopo 2 anni
Misurazione FVIII ALT*	Settimanale	Ogni 2 o 4 settimane	Ogni 3 mesi se FVIII:C >5 U/dL Frequenza maggiore se FVIII:C ≤5 U/dL	Ogni 6 mesi se FVIII:C >5 U/dL Frequenza maggiore se FVIII:C ≤5 U/dL
Etranacogene dezaparvovec (Hemgenix®) - Emofilia B				
	Prime 12 settimane	Da 13 a 52 settimane	2° anno	Dopo 2 anni
Misurazione FIX ALT*	Settimanale	Ogni 3 mesi	Ogni 6 mesi se FIX:C >5 U/dL Frequenza maggiore se FIX:C ≤5 U/dL	Annuale fino al 5° anno se FIX:C >5 U/dL Frequenza maggiore se FIX:C ≤5 U/dL

*Eseguire insieme monitoraggio per AST e creatinfosfochinasi (CPK). °Nel caso si verificasse un aumento degli enzimi epatici, gli esami del sangue dovranno essere più frequenti. Va eseguito anche monitoraggio per sviluppo inibitore contro FVIII o FIX mediante osservazioni cliniche e analisi di laboratorio appropriate.

Dopo il trattamento di terapia genica il paziente è tenuto a seguire specifici comportamenti. È fondamentale che, nel trattamento dell'emofilia A, si eviti il consumo di alcolici per almeno un anno. Nel caso dell'emofilia B, invece, è raccomandata una riduzione del consumo di alcol. Tuttavia, gli esperti consigliano l'astensione dall'alcol per evitare aumenti delle transaminasi che condizionerebbero l'inizio della terapia steroidea ad alte dosi. L'assunzione di alcol potrebbe compromettere la capacità del fegato di produrre il FVIII o FIX. Inoltre, i pazienti e le loro partner dovranno rinviare un'eventuale gravidanza per almeno 6 mesi se emofilici A che ricevano *valoctocogene roxaparvovec* (Roctavian®) e per almeno 12 mesi se emofilici B che ricevano *etranacogene dezaparvovec* (Hemgenix®). Si consiglia, pertanto, l'utilizzo di una contraccezione a doppia barriera, come preservativo e diaframma, al fine di prevenire il potenziale rischio teorico di trasmissione del gene del FVIII o FIX al futuro bambino, con conseguenze ancora sconosciute. Per la stessa ragione, va evitata la donazione di sperma per un periodo, rispettivamente, di 6 o 12 mesi.

Aspetti clinici da considerare per la terapia genica

La terapia genica è un approccio terapeutico complesso che presenta ancora questioni irrisolte. Le incognite rimangono al centro dell'attenzione sia dei medici che dei pazienti.

1. Qual è l'età ideale per sottoporsi alla terapia genica?

La terapia genica con AAV non è approvata per i pazienti in età pediatrica (<18 anni). Questo è dovuto al fatto che per ragioni di efficacia non sono stati ad oggi condotti studi in questa popolazione, dal momento che il gene del FVIII o del FIX, inseriti nella cellula tramite il vettore virale non si replica durante la riproduzione cellulare, particolarmente attiva in presenza di un fegato in fase di accrescimento, con conseguente perdita di efficacia della terapia [49]. I pazienti più idonei a perseguire la terapia genica sono i giovani adulti perché presentano uno stato di salute migliore rispetto ai più anziani e, quindi, un minor rischio di reazioni avverse e una generale tendenza a sottoporsi a nuovi approcci terapeutici. Tuttavia data la giovane età sono anche quelli più a rischio di potenziali effetti collaterali a lungo termine. Al contrario, i pazienti più anziani hanno più probabilità di aver contratto infezioni vitali post-trasfusionali con conseguenti problemi a livello del fegato e di avere patologie che rappresentano delle controindicazioni più o meno assolute all'assunzione di steroidi (es. diabete, ipertensione ed osteoporosi). Ciò nonostante, i pazienti più anziani potrebbero essere trattati con terapia genica, purché siano in condizioni generali di salute accettabili e i potenziali benefici superino i rischi associati alla procedura [50].

2. I livelli di fattore nei pazienti responsivi alla terapia genica possono variare: come gestire risultati imprevedibili e come il paziente può, conseguentemente, modulare il suo livello di attività?

L'efficacia e la durata della terapia genica è diversa a seconda del tipo di emofilia, del vettore e del transgene. Dopo trattamento con *valoctogene roxaparvovec*, per ciò che riguarda l'andamento nel tempo dell'attività di FVIII sono state, solitamente, osservate tre fasi: un aumento rapido nei primi 6 mesi circa, seguito da una riduzione iniziale e poi da una diminuzione più lenta [39]. Una riduzione media del 77,0% del tasso di sanguinamento annualizzato (ABR) e una riduzione del 98,2% del tasso annualizzato di utilizzo di FVIII esogeno, rispetto al basale, sono state evidenziate in 132 pazienti inseriti nel trial a 1 e 2 anni di follow-up [39,51]. L'attività media del FVIII, valutata con metodo cromogenico, nei pazienti trattati con *giroctocogene fitelparvovec* (PF-07055480 o SB-525), un'altra terapia genica per

l'emofilia A, è aumentata fino al 70,1 U/dL alla 24^a settimana post-infusione. Tuttavia, si è osservato un graduale declino di questa attività fino a 12,5 U/dL a 3 anni post-infusione, simile al trend riscontrato con *valoctogene roxaparvovec* [52,53].

I pazienti partecipanti allo studio per la valutazione del farmaco SPK-8011 hanno mostrato livelli di espressione di FVIII relativamente stabili fino a 3 anni dopo l'infusione [54]. Interessante notare che questi avevano ricevuto dosi di vettore molto più basse, rispetto ai pazienti trattati con *valoctocogene roxaparvovec* e *giroctocogene fitelparvovec* ad alte dosi, il che suggerisce che dosi elevate di vettore, e quindi alte concentrazioni di FVIII, potrebbero non essere favorevoli, con conseguente graduale declino dell'espressione di FVIII nel tempo [55].

Per quanto riguarda la terapia genica dell'emofilia B, lo studio clinico con *etranacogene dezaparvovec* ha mostrato un'attività media di FIX a 6 mesi dall'infusione di 39 U/dL, utilizzando il test coagulante one stage, e di 16,5 U/dL con test cromogenico [28]. Il livello di FIX si è mantenuto stabile all'ultima osservazione, dopo 24 mesi dall'infusione, mostrando un valore medio di 36,7 U/dL con metodo one stage [56]. Nello studio clinico con *fidanacogene elaparvovec* (SPK-9001 o PF-06838435), l'attività di FIX rimaneva stabile nel tempo. A 24 mesi post-infusione, il livello era di 25 U/dL [57].

Nel complesso, tuttavia, tutti gli studi clinici per emofilia A e per emofilia B hanno mostrato una notevole variabilità intra- e interindividuale rendendo la risposta alla terapia genica imprevedibile. Ciò comporta la necessità di un attento e continuo monitoraggio dei livelli del fattore carente.

Si raccomanda, pertanto:

- Monitoraggio trimestrale dell'attività del fattore coagulante
- Se tali livelli fossero costantemente bassi (inferiori a 3 o 5 U/dL) e/o il paziente avesse manifestato episodi di sanguinamento spontaneo ricorrenti, i medici devono prendere in considerazione il ritorno alla profilassi con concentrati di fattore o altri agenti non sostitutivi, in accordo con le attuali linee guida per la gestione dell'emofilia
- Sulla base del livello di fattore circolante rilevato e delle eventuali emorragie presentatesi, il paziente dovrà valutare attentamente di rimodulare la propria attività fisica in modo da evitare rischi di sanguinamento, come indicato dal suo medico

- In base ai livelli di attività del fattore carente, la terapia sostitutiva deve essere utilizzata in caso di procedure invasive, interventi chirurgici, traumi o emorragie, in linea con le attuali linee guida.

3. Qual è la probabilità di perdita di efficacia in un determinato periodo di tempo?

I vettori virali utilizzati nell'attuale terapia genica per emofilia non si integrano nel DNA della cellula bersaglio, e questo può causare la perdita di espressione/efficacia con il ricambio naturale degli epatociti trasdotti [58]. L'espressione transgenica dei fattori e la sua durata è molto individuale. Valutazioni periodiche sono programmate sia per emofilia A che per emofilia B per monitorare il livello di espressione del fattore. Inoltre, esiste un'eterogeneità relativa all'espressione a lungo termine dei fattori transgenici. I dati derivati da studi in animali emofilici B dimostrano un'espressione di FIX stabile e duratura fino a 8 anni [25]. I dati di espressione a lungo-termine per l'emofilia B relativi a *etranacogene dezaparvovec* mostrano un aumento dell'attività di FIX fino a un livello compatibile con emofilia lieve o quasi normale nei 18 mesi seguenti la somministrazione endovenosa del farmaco. Solo due dei 54 pazienti trattati (4%) hanno espresso valori plasmatici di FIX inferiori a 5 U/dL e hanno dovuto riprendere la profilassi con FIX [29]. È importante precisare che uno dei due pazienti aveva ricevuto solo il 10% della dose prevista, a causa di una reazione allergica manifestatasi durante l'infusione, mentre l'altro paziente presentava un titolo di anticorpi preesistenti anti-AAV5 pari a 3212 [29].

I dati sulla durata di espressione del transgene per l'emofilia A sono eterogenei. Nello studio clinico registrativo per *valoctocogene roxaparvovec* si è osservata una perdita di circa il 40% dei livelli di FVIII dal primo al secondo anno, ed una successiva progressiva riduzione durante i seguenti 6 anni di follow-up [59]. Inoltre, il 25% (33/132) dei pazienti trattati hanno raggiunto livelli inferiori a 3 U/dL dopo 3 anni dall'infusione ed un ulteriore 10% di pazienti livelli compresi tra 3 e 5 U/dL. Dopo 3 anni dall'infusione, 10 pazienti (7%) hanno dovuto riprendere un regime di profilassi, a causa della ricomparsa di eventi emorragici [39,60]. In un altro studio clinico per emofilia A (SPK-8011, *dirloctogene samoparvovec*), il livello di espressione di FVIII è rimasto abbastanza stabile dopo circa 3 anni [54]. A questo follow-up, il livello di FVIII variava da 2 a 36,9 UI/dL in 16 dei 18 partecipanti che avevano ricevuto dosi di vettore comprese tra 5×10^{11} vg/kg e 2×10^{12} vg/kg. La

Tabella 2 mostra i principali studi di terapia genica con i diversi vettori genici per l'emofilia A e B e i risultati finora disponibili.

Diversi sono i meccanismi ipotizzati per il declino dell'espressione di FVIII: immunità contro il vettore virale o contro il FVIII transgenico, silenziamento genico, alterazioni nella regolazione post-trascrizionale e senescenza o morte delle cellule trasdotte. [14].

Tabella 2. Risultati degli studi clinici di terapia genica con diversi vettori							
Studio	Fase di studio/ follow-up	Vettore	Gene	Dose (vg/kg)	No. pazienti	Attività media fattore U/dL $\pm$ SD	Ulteriore follow-up
BMN-270 [59] valoctocogene roxaparvovec	Fase 1/2 52 sett.	AAV 5	hFVIII-SQ	6×10^{12} 2×10^{13} 6×10^{13}	1 1 7	< 1 < 3 93 ± 48	6 anni, attività decescente
GENEr8-1 [61] valoctocogene roxaparvovec	Fase 3 49-52 sett.	AAV 5	hFVIII-SQ	6×10^{13}	134	41.9 (95% CI: 34.1- 49.7)	3 anni (17 paz.), attività decescente
SPK-8011*2 [62] dirloctocogene samoparvovec	Fase 1/2 mediana 36.6 mesi. (5.5-50.3)	SPK 200	hFVIII-SQ	5×10^{11} 1×10^{12} 1.5×10^{12} 2×10^{12}	2 3 4 9	5.5 (5-6) 6.66 (3-12) 4.66 (3-8) 8.14 (3-14)	Ora in fase 3 3 anni, attività stabile
UCL/St. Jude [23,24,25]	Fase 1 mediana 3.2 anni	AAV 2/8	hFIX-LP1	2×10^{11} 6×10^{11} 2×10^{12}	2 2 6	1.8 ± 0.7 2.5 ± 0.9 5.1 ± 1.7	>10 anni, attività stabile
AMT-060 [63,64] etranacogene dezaparvovec	Fase 1/2	AAV 5	hFIX-LP1	5×10^{12} 2×10^{13}	5	4.4 (95% CI: 1.5-7.3) 6.9 (95%CI: 2.6-11.3)	6 anni, attività stabile
AMT-061 [65] etranacogene dezaparvovec	Fase 2b 26 sett.	AAV 5	PdFIX-LP1	2×10^{13}	3	47 (33.2-57.0)	>3 anni attività stabile
HOPE-B [66] etranacogene dezaparvovec	Fase 3 18 mesi	AAV 5	PdFIX-LP1	2×10^{13}	54	36.9 ± 21.4	3 anni attività stabile

SPK-9011 [67] Fidanacogene elaparovvec	Fase 1/2 28–78 sett.	AAV-Spark 100	PdFIX	5×10^{11}	10	33.7 ± 18.5	5 anni, attività stabile ora in fase 3
B-AMAZE [68] verbrinacogene setparvovec	Fase 1/2 26 sett.	AAV S3	PdFIX	3.84×10^{11} 6.40×10^{11} 8.32×10^{11} 1.28×10^{12}	2 2 4 2	44–46 7–64 53–190 71–280	Follow-up per un massimo di 36 mesi

4. Quanto sono frequenti e rischiose le reazioni allergiche?

Come per qualsiasi trattamento, anche la terapia genica ha potenziali effetti collaterali. Gli studi clinici hanno mostrato che la terapia genica per l'emofilia è generalmente ben tollerata, ma sono stati segnalati casi di pazienti che hanno riportato effetti indesiderati. I più comuni sono reazioni legate all'infusione, come: mal di testa, affaticamento, nausea e malessere generale. In teoria, è possibile che una reazione di tipo allergico o di ipersensibilità⁵ sia la causa di queste reazioni. Ciò potrebbe, probabilmente dipendere dal tipo di trattamento e dalla risposta del singolo paziente. Dalla letteratura scientifica finora disponibile, si evince che effetti collaterali limitati sono stati riportati dopo infusione endovenosa di terapia genica con AAV. La somministrazione di vettori AAV induce una risposta immunitaria che porta allo sviluppo di anticorpi neutralizzanti che continueranno a essere presenti a lungo termine. I soggetti con anticorpi preesistenti anti-AAV possono essere più a rischio di reazioni correlate all'infusione [66]. Questi eventi sono stati mitigati, con successo, rallentando o sospendendo l'infusione e somministrando farmaci, come antistaminici, antipiretici o glucocorticoidi. In particolare, durante lo studio clinico con *valoctocogene roxaparvovec*, 59 soggetti su un totale di 151 (39,1%) hanno manifestato almeno una reazione associata all'infusione, quali: nausea, affaticamento, cefalea e diarrea. Dodici dei 151 soggetti (7,9%) hanno presentato reazioni correlate all'infusione con sintomi iniziali comparsi entro 6 ore dalla fine dell'infusione. Quattro di queste reazioni, riscontrate in 3 soggetti, sono state

⁵ La reazione allergica è una risposta del sistema immunitario nei confronti di una sostanza (allergene) ed è conseguenza di un fallimento nello sviluppo della tolleranza. L'allergia si sviluppa come un processo che inizia con la sensibilizzazione all'allergene e prosegue con una fase effettrice in cui compaiono i sintomi clinici.

segnalate come eventi avversi gravi (SAE): presincope, rash maculo-papulare, reazione da ipersensibilità e anafilassi. Inoltre, due soggetti hanno manifestato il SAE tra le 6 ore e le 48 ore dall'infusione: un soggetto ha manifestato una reazione di ipersensibilità e un altro febbre [70]. Negli studi clinici con *etranacogene dezaparvovec* per l'emofilia B, sette soggetti su un totale di 57 (12,3%) hanno riportato 13 reazioni avverse associate all'infusione. Queste comprendevano: vertigini, dolore addominale superiore, disturbo toracico, prurito oculare, arrossamento, cefalea, ipersensibilità, reazione nel sito di infusione, piressia, orticaria. Tutti i 13 eventi sono stati giudicati di lieve o moderata entità e la maggior parte di essi si è risolta nello stesso giorno dell'infusione [71]. È importante, tuttavia, considerare che queste osservazioni sono basate su studi clinici e potrebbero non riflettere l'esperienza real life di tutti i pazienti.

5. Qual è il rischio di epatotossicità nei pazienti con epatite cronica e/o fibrosi minima o moderata o malattia da steatosi epatica?

Attualmente, risulta impossibile definire l'epatotossicità, cioè il potenziale danno al fegato derivante dalla terapia genica nei pazienti affetti da epatite cronica e/o fibrosi minima o moderata o malattia da steatosi epatica. Ciò è dovuto all'esclusione di una parte di tali pazienti dagli studi clinici. I risultati pubblicati non forniscono, pertanto, dettagli sui parametri di fibrosi e steatosi epatica rilevati al momento dell'inclusione. Mancano, quindi, dati precisi relativi a questo sottogruppo di pazienti.

Le raccomandazioni dell'AICE, in attesa di studi disegnati *ad hoc* per valutare il rischio di epatotossicità in soggetti con questa tipologia di danno epatico (molto spesso asintomatico), sono le seguenti:

- i potenziali candidati a terapia genica, indipendentemente dai valori di transaminasi e degli indici di colestasi, dovrebbero effettuare una valutazione epatologica mirata a rilevare eventuali fattori di rischio di danno epatico cronico;
- il giudizio finale sullo stato di salute del fegato deve essere sempre formulato da un epatologo in collaborazione con l'ematologo;
- i soggetti con infezione attiva da HCV e/o HBV devono essere indirizzati a terapia antivirale prima di poter essere considerati per la terapia genica;
- i soggetti con comorbidità metaboliche che possono causare danno epatico (diabete, obesità, dislipidemia, ipertensione arteriosa) dovrebbero raggiungere

un ottimale controllo di tali malattie prima di essere considerati per la terapia genica;

- i candidati a terapia genica devono interrompere l'uso di alcol per almeno un anno dopo l'infusione ed evitare prodotti erboristici e integratori alimentari potenzialmente epatotossici;
- qualora pazienti con fibrosi minima/moderata e/o steatosi ricevessero una terapia genica, bisognerà mantenere un controllo periodico della salute del fegato con visite di follow-up che comprendano indagini di laboratorio e strumentali indicate dallo specialista epatologo in accordo con l'ematologo; dopo terapie antivirali di successo per infezione da HBV/HCV, nonostante un miglioramento dei parametri di fibrosi, determinati mediante tecniche non invasive, l'esclusione della malattia fibrotica avanzata/cirrosi è da definire in ambiente specialistico epatologico;
- in casi selezionati lo specialista epatologo in accordo con l'ematologo, considerando anche le preferenze del paziente, potrà valutare l'opportunità di eseguire una biopsia epatica.

L'AICE ritiene, pertanto, necessario, a tutela dei candidati a terapia genica, raccomandare una standardizzazione dei protocolli di screening epatologico e propone un algoritmo di screening preliminare, dettagliato nella Figura 2.

6. Qual è il rischio di mancata risposta alla terapia genica nei pazienti con fibrosi o steatosi epatica?

Gli studi clinici di fase 3 non riportano tale dato. Almeno per la fibrosi, qualora associata a cirrosi, esisterebbe la possibilità teorica che il danno epatico cronico riduca il numero di cellule che possano essere trasdotte⁶.

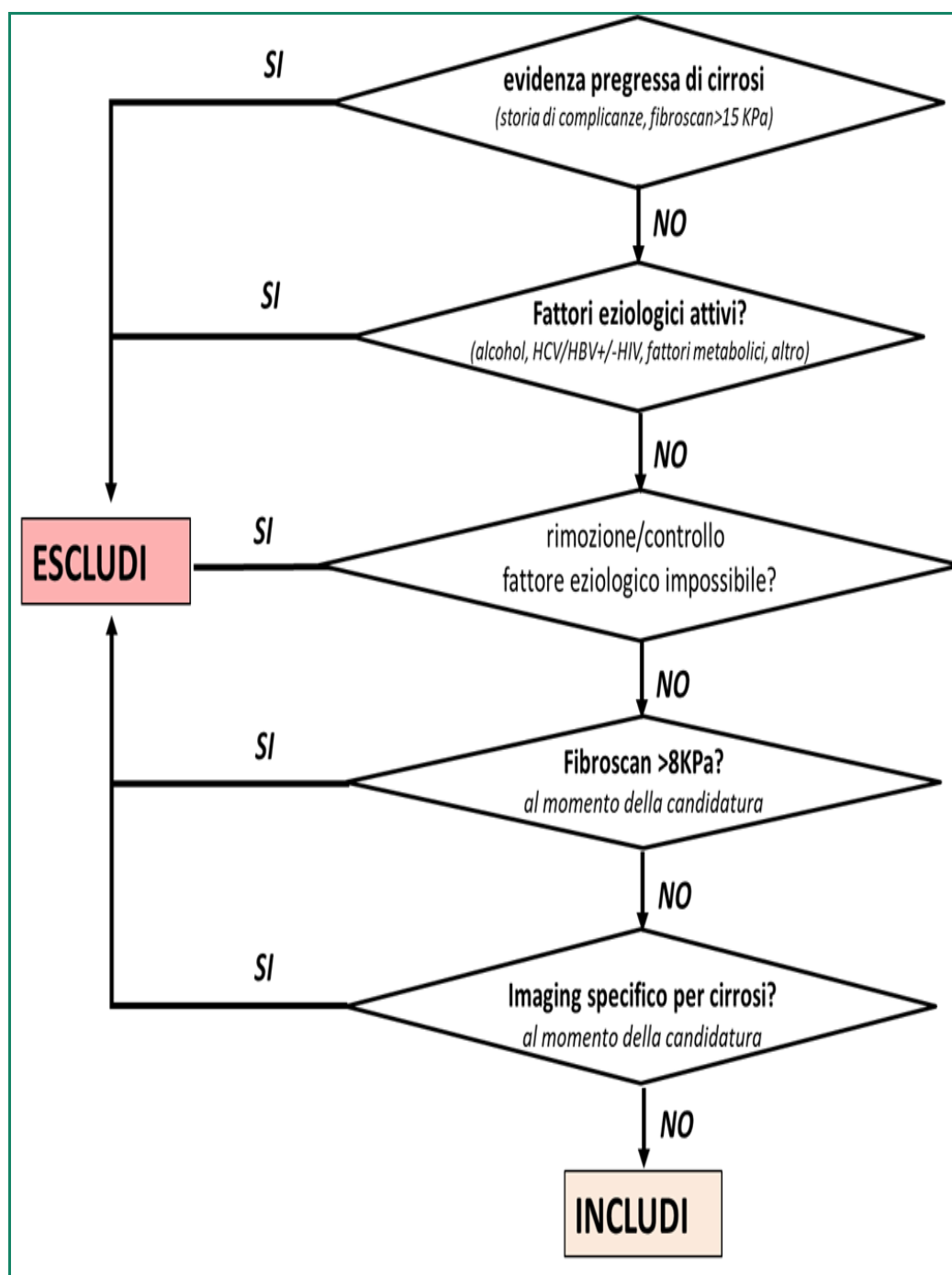
7. Quanto è elevato il rischio di carcinogenesi epatocellulare? In particolare, nei pazienti con preesistenti fattori di rischio come, ad esempio, cirrosi, fibrosi epatica avanzata, epatite B o C, malattia steatosica epatica (comunemente nota come Nonalcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD; oggi Steatotic Liver Disease, SLD), consumo alcolico cronico, steatoepatite non alcolica (comunemente nota come Nonalcoholic Steatohepatitis, NASH; oggi Metabolic Dysfunction-associated Steatotic Liver Disease, MASLD)?

6 vedi anche Appendice.2 - Informazioni aggiuntive sull' epatotossicità

La possibilità che la terapia genica possa essere causa di sviluppo di un tumore al fegato nell'uomo è, ad oggi, ancora da dimostrare. L'integrazione del vettore virale AAV nel genoma degli epatociti è un evento teoricamente possibile, sebbene raro. Gli studi condotti sull'uomo hanno registrato un unico caso di carcinoma primitivo epato-cellulare un anno dopo la somministrazione della terapia genica in un paziente con emofilia B. Un' approfondita analisi genetica eseguita sul tessuto tumorale non ha dimostrato una chiara relazione causa-effetto con la terapia genica [29,72]. Tuttavia, nei pazienti con una storia di pregressa eradicazione dell'infezione da HCV e in quelli con una storia di pregressa infezione da HBV o con infezione da HBV con replicazione virale soppressa mediante terapia con analoghi nucleotidici, il rischio di carcinoma epato-cellulare, indipendentemente dalla terapia genica, non è nullo. Questo rischio è associato, tra le altre cose, allo stadio di malattia fibrotica e cirrotica presente prima di iniziare la terapia eradicante.

Va poi tenuto presente che le malattie metaboliche, la cui prevalenza aumenta con l'età, sono di per sé fattori di rischio per lo sviluppo di malattia epatica avanzata. La malattia da steatosi epatica (SLD), che tipicamente si associa a disfunzioni metaboliche, prendendo il nome di MASLD (in passato steatosi non alcolica, NAFLD) [73], può causare carcinoma epato-cellulare anche prima dello sviluppo di una cirrosi conclamata [74,75]. Inoltre, l'esposizione attiva all'alcol e ad altri prodotti epatotossici va, sistematicamente, ricercata e rimossa prima di intraprendere un percorso di terapia genica, come pure in caso di aumento degli enzimi epatici dopo la terapia. La risposta del fegato al danno cronico da alcol dipende dal quantitativo assunto ma è anche molto eterogenea, dipendendo da fattori genetici e dal sesso. Pertanto, può essere solo in parte predetta. Il quantitativo di alcol convenzionalmente ritenuto a minimo rischio di danno epatico nel sesso maschile è fino a 2-3 drink/die. Per drink (o unità alcolica) s'intende: un quantitativo di etanolo puro pari a 12 g che può corrispondere un bicchiere di vino a 12° da 125 mL, un boccale di birra da 330 mL, un bicchierino di superalcolico da 40 mL. Per tali ragioni, una corretta anamnesi sui fattori di rischio di epatopatia cronica e la definizione dello stadio di fibrosi epatica devono essere accurate ed eseguite da uno specialista epatologo cui il potenziale candidato a terapia genica deve essere riferito dall'ematologo, ponendogli lo specifico quesito.

Figura 2. algoritmo di screening epatologico raccomandato dall' AICE



8. Qual è il rischio di attivazione del sistema immunitario contro il vettore virale e come può essere gestito?

Il sistema immunitario del paziente che riceve la terapia genica può attivarsi e sviluppare una risposta contro le cellule del fegato in cui il virus è entrato [76].

Questo accade perché ogni qualvolta un virus entra in una cellula, il suo capsido viene smantellato e ridotto in piccoli frammenti che vengono esposti sulla superficie della cellula come fossero delle bandiere. In questo modo, il sistema immunitario può riconoscere la presenza del virus nella cellula “infettata” ed eliminarla. Sebbene si cerchi di modificare opportunamente il capsido dei vettori virali, affinché queste “bandiere” siano meno evidenti e richiamino meno l'attenzione delle cellule del sistema immunitario, è comunque possibile che tali reazioni avvengano lo stesso. La risposta del sistema immunitario contro le cellule epatiche in cui è entrato il virus ne causa la distruzione provocando l'aumento delle transaminasi e, parallelamente, la riduzione dei livelli di espressione di FVIII o FIX. L'attivazione del sistema immunitario può, quindi, determinare la perdita di efficacia della terapia genica. Per tale motivo, nei pazienti in cui si osservi un aumento delle transaminasi viene impiegata una terapia immunosoppressiva, in genere basata sull'uso di corticosteroidi, al fine di bloccare la risposta immune nel tentativo di salvare le cellule del fegato, preservandone la capacità di produrre FVIII o FIX.

9. Qual è il rischio derivante dall'uso di steroidi in presenza di altre comorbidità?

Al fine di preservare la salute del fegato e, soprattutto, contrastare la distruzione immunomediata degli epatociti trapiantati, è stato necessario, durante gli studi di sperimentazione clinica, utilizzare, in alcuni pazienti, terapie immunosoppressive, principalmente basate sull'uso di corticosteroidi. In alcuni trial la somministrazione di tali farmaci era prevista in via preventiva mentre, in altri, la terapia immunosoppressiva veniva instaurata solo a seguito di un aumento delle transaminasi e fino a loro normalizzazione [67,68]. I regimi terapeutici utilizzati nei diversi studi sono molto variabili, spesso basati su precedenti esperienze su pazienti sottoposti a trapianto d'organo o sui risultati ottenuti in altri studi di terapia genica, che utilizzavano vettori AAV [77,78]. Ad oggi, non esiste, pertanto, un definito regime terapeutico ed è verosimile che finché avremo diversi tipi di capsidi e diversi dosaggi, la strategia immunosoppressiva più idonea possa essere prodotto-specifica. È noto, d'altra parte, che i corticosteroidi, pur essendo una risorsa essenziale in numerosi contesti clinici, possono causare numerosi e rilevanti effetti collaterali, amplificati in presenza di altre comorbidità. Il loro uso è, infatti, spesso associato a un aumentato rischio di infezioni e di osteoporosi, alterazioni del metabolismo del glucosio, ipertensione arteriosa, soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e cataratta [79]. I corticosteroidi influenzano, inoltre, il benessere

psicologico, causando disturbi dell'umore, ansia e insonnia che compromettono la qualità di vita del paziente. Tali complicazioni richiedono, dunque, un'attenta gestione clinica nell'ambito di un team multidisciplinare.

10. Qual è il rischio di trovare/rilevare il vettore virale nel liquido seminale?

I vettori virali usati per la terapia genica possono in parte diffondersi nell'organismo e trasdurre gli spermatozoi che a loro volta possono trasferire il transgene ad un eventuale prodotto del concepimento [80]. Questa preoccupazione è più rilevante in caso la terapia genica venga utilizzata in soggetti giovani e/o in età riproduttiva. Sebbene non si conosca la frequenza con cui possa determinare gravi effetti negativi, in teoria l'integrazione di nuovo DNA potrebbe potenzialmente interrompere lo sviluppo somatico delle cellule e causare patologie trasmissibili ai figli [81]. Molti studi hanno dimostrato la presenza di DNA del vettore virale (sebbene in piccolissime quantità) nei testicoli dopo sua somministrazione per via endovenosa, ma non la sua integrazione nella linea germinale, cioè negli spermatozoi [82]. Inoltre, l'esposizione diretta di spermatozoi di topo a concentrazioni molto elevate di un vettore di terapia genica, il virus AAV-2, non ha portato all'integrazione nelle cellule germinali [83,84]. La diffusione del vettore dipende, infatti, dalla via di somministrazione, dal tropismo tissutale e dalla dose. Tuttavia, è da considerare che:

- la somministrazione endovenosa del vettore AAV presenta un rischio maggiore di contaminazione germinale rispetto all'iniezione intramuscolare, come dimostrato negli studi clinici per la terapia genica dell'emofilia B [21,22] e del deficit di α -1 antitripsina;
- la presenza di AAV è stata riscontrata transitoriamente nello sperma in modelli animali ed era dose- e tempo-dipendente, ma indipendente dal sierotipo del vettore AAV infuso; nell'uomo, è stato osservato che un ciclo di spermatogenesi dura 74 giorni [85], mentre la cinetica di clearance dei virus AAV cambia a seconda del sierotipo, essendo molto più rapida per l'AAV-5 (21-35 giorni), rispetto all' AAV-6 (70-90 giorni) rendendo, ipoteticamente, questo sierotipo meno rischioso del secondo. Non è stata riscontrata alcuna recidiva tardiva di sequenze di AAV-8 nello sperma durante diversi cicli consecutivi di spermatogenesi; in particolare, sia per AAV-2 che per AAV-8

non è stato trovato DNA del vettore nello sperma dopo il terzo ciclo di spermatogenesi (nei modelli di coniglio).

- le variazioni anatomiche legate all'età, lo stato patologico delle vescicole seminali, della prostata, delle ghiandole bulbo uretrali e uretrali, oltre ai testicoli, contribuiscono alla distribuzione del vettore nello sperma, ma non negli spermatozoi;
- gli anziani mostrano una persistenza prolungata del DNA di AAV nel liquido seminale, rispetto a soggetti più giovani [86]; il rischio può aumentare se si verificano danni e/o disfunzioni iatrogene dei tessuti causati, ad esempio, dai farmaci immunomodulatori;
- la presenza di un'immunità preesistente verso uno specifico capsido di AAV può non impedire la diffusione di vettori di un sierotipo alternativo nel liquido seminale [38]; in particolare, la terapia genica attualmente disponibile per l'emofilia A (*valoctocogene roxaparvovec*), è stata testata per la potenziale trasmissione alle cellule della linea germinale nei topi, dopo iniezione con la stessa dose somministrata agli uomini [87]; il DNA del gene FVIII è stato rilevato a bassi livelli nei testicoli di tutti i topi, ed è stato stimato persistere fino a 67 settimane; è importante notare che non è stato rilevato alcun DNA transgenico nel fegato di nessuno dei figli/discendenti dei topi esaminati;
- nel caso della terapia genica per l'emofilia B (*etranacogene dezaparvovec*), a 24 mesi dal trattamento, è stata rilevata la clearance del DNA del vettore in campioni di sperma ottenuti da 47 su 54 pazienti trattati (87%) [29,88].

In conclusione, il rischio di trasmissione germinale in seguito alla somministrazione endovenosa di vettori AAV è molto basso [38,89]. Ciò nonostante, si raccomanda di evitare una gravidanza mediante l'uso di una doppia contraccezione di barriera, cioè dispositivi che bloccano fisicamente l'accesso degli spermatozoi nell'utero della donna (il preservativo per l'uomo e il diaframma per la donna) per almeno 6 mesi nel caso di emofilici A che ricevano *valoctocogene roxaparvovec* (Roctavian®) e almeno 12 mesi per emofilici B che ricevano *etranacogene dezaparvovec* (Hemgenix®) o fino a quando il liquido seminale non risulti negativo per la presenza di sequenze del vettore. Si raccomanda inoltre la conservazione di liquido seminale prima di intraprendere la terapia genica.

Il modello Hub e Spoke per la gestione della terapia genica

La terapia genica rappresenta un approccio di trattamento innovativo. Rappresenta, pertanto, una sfida per lo staff medico e il team dei Centri Emofilia, in quanto differisce, significativamente, dagli attuali protocolli terapeutici. Inoltre, l'esperienza è stata finora limitata ai trials clinici con inclusione di un ristretto numero di centri selezionati e di un limitato numero di pazienti sulla base di criteri di arruolamento molto stringenti. La transizione nella comune pratica clinica pone, quindi, non pochi problemi gestionali, oltre che clinici, durante l'intero percorso: dalla selezione dei pazienti, all'informazione, alla somministrazione e all'organizzazione dell'assistenza prima e dopo la terapia. La realizzazione di questo processo dovrebbe essere affidata a Centri con elevata esperienza e formazione, sia in emofilia che in terapia genica, e che siano dotati di tutti i servizi necessari, che vanno oltre quelli standard dei Centri Emofilia. Richiede, pertanto, di ripensare ai criteri dell'*European Hemophilia Network* (EUHANET) per la definizione degli *Haemophilia Comprehensive Care Center* (EHCCC) e *Haemophilia Treatment Center* (EHTC). Ciò allo scopo di ottenere i massimi benefici e minimizzare i rischi nella gestione dei pazienti. In Europa l'EUHANET ha riconosciuto 409 EHTC e 117 EHCCC (in Italia: 11 EHTC, 7 EHCCC). I criteri fondamentali della definizione di EHTC/EHCCC restano immutati ma devono essere implementate attività ed expertise aggiuntive, affinché un Centro possa avere i requisiti per iniziare la somministrazione e/o la gestione della terapia genica [90,91].

Il modello Hub e Spoke applicato alla terapia genica è raccomandato dalla *European Association of Haemophilia and Allied Disorders* (EAHAD) e dal *European Haemophilia Consortium* (EHC). Lo scopo e la chiave del successo di questo modello è la stretta collaborazione tra i centri per garantire sicurezza ed efficacia della terapia e un monitoraggio degli *outcome* a lungo termine. In particolare, il Centro Spoke, in stretta comunicazione con l'Hub che prescrive e gestisce la terapia genica, dovrebbe eseguire il follow-up e i test di laboratorio [92].

Nell'ottobre 2023 l'EAHAD, in collaborazione con EHC, ha definito un aggiornamento delle linee guida per la certificazione dei Centri Emofilia che includono criteri riguardanti il personale, i servizi clinici e di laboratorio necessari per la gestione ottimale delle nuove opzioni terapeutiche, incluso il modello Hub e Spoke per la somministrazione della terapia genica [93]. Tale modello è stato sviluppato per assicurare l'equità dell'accesso per i pazienti eleggibili, facilitare la somministrazione e qualificare meglio il centro che gestisce tutte le problematiche della terapia genica [90,94]. È stato, quindi, disegnato come una

rete dinamica di Centri Emofilia che coordina la terapia genica, dal counselling del paziente, al consenso informato, alla preparazione e somministrazione della terapia, fino allo stretto monitoraggio nel periodo post-infusione e nel follow-up a lungo termine.

I Centri Hub sono definiti come EHCCCs che hanno esperienza nell'assistenza multidisciplinare dell'emofilia e, nel contempo, saranno specialisti in terapia genica. Questo è dunque un criterio aggiuntivo che li definisce come *European Haemophilia Gene Therapy Centre* (EHGTC) (Tabella 3) [91].

Tabella 3. Criteri per la definizione di Centro Hub per la Terapia Genica [90,93]

• EHCCC
• Esperienza nei trial di terapia genica o partecipazione a un programma di formazione del team multidisciplinare
• Conservazione, preparazione e somministrazione della terapia genica (autorizzazione dell'Ente di appartenenza, disponibilità di idonee apparecchiature e procedure)
• Gestione del consenso informato/processo decisionale condiviso
• Laboratorio adeguato all'esecuzione dei test necessari per il programma di terapia genica e follow-up dei pazienti
• Stretta collaborazione con i centri Spoke (preparazione check-list per screening pazienti e durante il follow-up; formazione del personale)
• Diagnosi tempestiva e gestione delle reazioni avverse
• Stretta collaborazione con epatologi e immunologi
• Elaborazione di protocolli per differenti strategie di immunosoppressione
• Valutazione muscolo-scheletrica
• Supporti psicologico ai pazienti (consenso e follow-up)
• Partecipazione a registri nazionali e internazionali

I Centri Spoke sono di solito, ma non necessariamente, i Centri dove il paziente è abitualmente seguito e riceve le iniziali informazioni sulle varie opzioni terapeutiche. Tali Centri, oltre a valutare i criteri di inclusione/esclusione, dovrebbero offrire il follow-up a lungo termine. Il follow-up a breve e lungo termine prevede, come visto precedentemente, la determinazione di parametri coagulativi e immunologici, il monitoraggio dello stato articolare e della funzionalità epatica e dovrebbe essere attuato in stretta collaborazione con scambio di informazioni tra Centri Hub e Spoke. Tutti i servizi per le valutazioni

previste nel follow-up dovrebbero essere comunque disponibili nel Centro Spoke (Tabella 4) [90,93,95,96].

Tabella 4. Criteri per la definizione di Centro Spoke per la Terapia Genica [90,93,95,96]	
•	Personale medico formato per identificare i pazienti eleggibili e fornire informazioni dettagliate
•	Pre-screening pazienti candidati, preparazione report clinico per Centro Hub con check list
•	Laboratorio adeguato per eseguire i test necessari per il programma di terapia genica e il follow-up (coagulativi e immunologici); invio campioni al Laboratorio centralizzato per la determinazione degli anticorpi anti-AAV5 (congelamento -70° in freezer dedicato)
•	Stretta collaborazione con il Centro Hub (identificazione candidati e follow-up)
•	Conoscenza e gestione degli eventi avversi
•	Stretta collaborazione con epatologi, infettivologi e immunologi
•	Conoscenza di protocolli su differenti strategie di immunosoppressione
•	Valutazione muscolo-scheletrica (HJHS a cura di fisiatra/fisioterapista; HEAD-US score)
•	Supporto psicologico ai pazienti (consenso e follow-up)
•	Formazione del team multidisciplinare per eseguire un corretto follow-up
•	Contributo a registri nazionali e internazionali

Sono necessari protocolli definiti e strutturati per il follow-up volti a definire gli *outcome* del trattamento, determinare la riduzione o la perdita di espressione del fattore carente e monitorare i possibili effetti collaterali, inclusa la tossicità epatica in collaborazione con epatologi e immunologi che dovranno essere consultati, quando opportuno. Nella Tabella 5 sono riassunti i compiti dei Centri Hub e Spoke.

L'AICE intende adottare tali criteri e le responsabilità individuate da EAHAD e EHC per i Centri Hub e i Centri Spoke per la terapia genica. Essi saranno inizialmente valutati mediante un progetto pilota di accreditamento in modo da assicurare standard uniformi a livello europeo. Ciò potrà comportare che Centri in possesso di tutti i requisiti di EHCCC o EHTC non soddisfino pienamente anche i criteri addizionali per il riconoscimento quali Centri EHGTC Hub o Spoke. Non di meno, il processo di accreditamento è da intendersi in maniera dinamica e Centri che, inizialmente, non soddisfino tutti i criteri potranno essere in seguito riconosciuti come idonei, una volta raggiunti gli standard previsti. D'altra parte

andranno anche considerate le decisioni degli organi competenti a livello nazionale e/o regionale, che potranno definire il numero dei Centri Hub e Spoke in relazione alle ipotizzate necessità e realtà locali.

Tabella 5. Responsabilità dei Centri Hub e dei Centri Spoke [83].

	Centro Hub	Centro Spoke
Counseling sulle opzioni di trattamento e discussione delle aspettative Selezione dei pazienti	Ridiscussione prima dell'infusione	Più volte nel percorso pre-infusione
	Revisione dei criteri di eleggibilità	Reclutamento dei pazienti - Monitoraggio criteri di eleggibilità - Identificazione dei possibili candidati
Monitoraggio di laboratorio ed esecuzione dei test diagnostici per il programma di terapia genica Educazione e formazione	<u>Test richiesti prima del trattamento:</u> - Anticorpi anti-AAV	<u>Test richiesti prima del trattamento:</u> - Anticorpi anti-AAV pre-esistenti <u>Dopo il trattamento:</u> - Possibili markers immunologici - Livelli dei fattori di coagulazione
	Formazione degli operatori sanitari di altri centri emofilia e raccomandazioni di gestione (ad es. trattamento steroideo)	Il team multidisciplinare deve essere formato
Consenso informato	Revisione prima dell'infusione	Educazione e regolare follow-up di pazienti e medici
Preparazione del prodotto per la terapia genica e infusione	Conservazione del materiale per la preparazione e somministrazione	
Follow-up		
A breve termine (primo anno)	Counseling e collaborazione Possibile follow-up regolare Protocolli di immunosoppressione (come previsto nei diversi studi)	Follow-up regolare (settimanale, poi mensile) Inizio del trattamento immunosoppressivo
A lungo termine (dal secondo anno)	Counseling sui rischi a lungo termine Follow-up con progressivo passaggio a rivalutazioni occasionali	Follow-up regolare (ogni 3 mesi, poi 6 mesi) Rivalutazione epatologica
Raccolta dati	Partecipazione a registri nazionali e internazionali	Partecipazione a registri nazionali e internazionali
Team multidisciplinare	Counseling e collaborazione	Supporto in caso di episodi emorragici o gestione di effetti collaterali Condivisione delle informazioni con il Centro Hub

Le aspettative del paziente riguardo alla terapia genica: una guida per una scelta informata e consapevole

Questa guida, elaborata da un gruppo multidisciplinare comprendente specialisti e pazienti, si rivolge alle persone con emofilia A o B, ai loro familiari e ai loro amici coinvolti nelle valutazioni per decidere se intraprendere o meno un percorso di terapia genica. L'obiettivo è informare e aiutare chi sta prendendo in considerazione l'ipotesi di sottoporsi al trattamento a compiere scelte di salute consapevoli, in particolare sulle terapie geniche *valoctocogene roxaparvovec* e *etranacogene dezaparvovec*, ormai approvate e proponibili, rispettivamente, ai pazienti con emofilia A grave (FVIII inferiore a 1 U/dL) e con emofilia B grave e moderatamente grave (FIX inferiore a 2 U/dL). Altre terapie geniche sono attualmente in fase di studio (per emofilia A e B) e/o approvate in altri stati (*fidanacogene elaparvovec*, disponibile per i pazienti con emofilia B grave o moderatamente grave in USA e Canada)

In ragione della innovatività di tali trattamenti, è importante conoscere il loro meccanismo di funzionamento e le implicazioni cliniche. Tuttavia, è altrettanto importante prendere in esame ciò che non appartiene propriamente all'ambito clinico ma ha un impatto sulla vita di chi si sottopone alla terapia genica e dei suoi familiari. La conoscenza di questi aspetti extra-clinici è fondamentale per la costruzione di un processo decisionale ragionato ed equilibrato. In particolare, se stiamo pensando alla terapia genica come a una possibilità, dovremo capire qual è il nostro effettivo livello di conoscenza sia della terapia genica stessa che delle numerose altre opzioni attualmente disponibili o che saranno disponibili a breve, quali sono le aspettative nostre e della nostra famiglia in rapporto alla terapia genica, e i suoi effetti sulla vita di tutti i giorni. In definitiva, questo breve opuscolo vuole essere una traccia per aiutarci ad assumere decisioni ponderate, consapevoli e informate. Le domande che qui vengono proposte vanno viste come spunti di riflessione che possono guidare il dialogo clinico, il confronto e la discussione con familiari, amici e magari con altre persone con emofilia.

Indagare le proprie aspettative sulla terapia genica e la conoscenza delle opzioni terapeutiche attuali

Un ottimo punto di partenza è comprendere i motivi per cui stiamo considerando la possibilità di sottoporci alla terapia genica, quali sono le nostre aspettative e quali gli eventuali elementi di insoddisfazione del trattamento in corso. Esplorare i nostri motivi e le nostre conoscenze è cruciale, vista la natura irrevocabile del trattamento, la sua potenziale durata per più anni nonché la significativa differenza rispetto a tutte le opzioni terapeutiche

fin qui utilizzabili o che lo saranno a breve. Se stiamo pensando di sottoporci a un trattamento di terapia genica, la prima domanda che dovremmo porci è:

Perché voglio sottopormi alla terapia genica?

Per facilitare l'individuazione dei punti chiave della questione, la domanda può essere articolata in tre parti:

- *Cosa mi aspetto dalla terapia genica e dalla mia vita dopo la terapia genica?*
- *Quali sono le mie aspettative sulla durata della terapia genica?*
- *Quali sono le mie aspettative sul livello di fattore che può essere raggiunto, episodi emorragici cui posso andare incontro e stato del mio danno articolare?*

Oltre a interrogarci su ciò che ci aspettiamo dalla terapia genica, anche in termini di impatto sulla nostra emofilia, è opportuno che la possibilità di sottoporci alla terapia genica sia posta in relazione al nostro attuale regime terapeutico. Le domande seguenti possono essere una guida alla riflessione:

- *Rispetto al mio attuale regime terapeutico, che cosa mi soddisfa e che cosa no?*
- *Quali sono per me gli elementi più importanti?*

Speciale attenzione andrà posta, oltre che alle priorità individuali in relazione al proprio stile di vita, anche a questioni quali la via di somministrazione, la frequenza di somministrazione, la praticità di utilizzo, la facilità nell'ottenere il farmaco, la flessibilità, l'efficacia in termini di riduzione degli episodi emorragici e di livello di protezione rispetto al rischio di comparsa di episodi emorragici acuti che richiederanno un trattamento con FVIII o IX.

Dopo aver individuato le nostre priorità sul trattamento attuale, sui bisogni insoddisfatti e su quelli che vorremmo vedere soddisfatti, dobbiamo interrogarci su quanto sappiamo delle opzioni terapeutiche disponibili al momento e su quelle che lo saranno a breve:

- *Che cosa so delle altre opzioni terapeutiche disponibili oggi?*
- *Che cosa so delle altre opzioni terapeutiche che potrebbero essere disponibili nei prossimi due anni?*

Livello di conoscenza, criteri di eleggibilità e considerazioni pratiche

Se sto valutando la scelta della terapia genica, è fondamentale conoscere e riflettere su aspetti quali l'eleggibilità (cioè se rientro o meno nei parametri clinici che consentono l'accesso alla terapia genica), i programmi di follow-up (cioè i controlli che dovrò effettuare nei mesi e negli anni successivi), la frequenza con cui dovrò recarmi al Centro, le modalità

di follow-up, il tipo di esami cui dovrò sottopormi, ecc. Occorre poi tener presente che è possibile vengano prescritti trattamenti farmacologici aggiuntivi.

È importante che mi vengano descritti in maniera chiara ed esaustiva i possibili effetti indesiderati, comprese le reazioni avverse, la logistica del trattamento (eleggibilità, impatto sulla quotidianità, viaggi, vita lavorativa, vita sociale, rapporti con il partner, ecc.), le limitazioni imposte dalla terapia genica alla vita di tutti i giorni (astensione o limitazione nel consumo di alcool, impatto sulla procreazione, sulla vita lavorativa, su quella sentimentale, ecc.).

Criteri di inclusione ed esclusione

Ci sono condizioni ostative al trattamento con terapia genica e situazioni che, al momento, precludono il trattamento ad alcune categorie di persone. Per gestire al meglio le proprie scelte è necessaria una buona base di conoscenza.

Gli studi clinici sono stati condotti su un numero limitato di pazienti con emofilia A grave e con emofilia B grave e moderatamente grave, senza inibitori anti-FVIII o FIX senza storia di HCV o con storia pregressa di infezione da HCV ma con replicazione virale soppressa e, se affetti da HIV, con infezione sotto controllo. Inoltre, per la natura del trattamento e per il vettore utilizzato che va a esplicare la sua attività nel fegato, non devono esserci evidenze di danni epatici o compromissione della funzione epatica (come per esempio livelli di enzimi epatici anormali o biopsie epatiche che abbiano rivelato anomalie). Occorre poi godere generalmente di buona salute e non avere preferibilmente particolari patologie come, ad esempio, diabete, ipertensione, malattie oncologiche o cardiache, ecc. Vi è poi il principale criterio di esclusione, legato alla natura stessa della terapia, e cioè che il ricevente non abbia anticorpi contro l'AAV utilizzato per il trasporto al fegato. La ricerca di questi anticorpi deve essere effettuata contestualmente alla valutazione delle altre condizioni cliniche ostative alla terapia e bisogna sapere che la loro presenza potrebbe precluderci la possibilità della terapia genica. È inoltre importante che mi vengano date informazioni adeguate rispetto alla presenza degli anticorpi e di tutte le altre condizioni cliniche, che abbia la possibilità di porre tutte le domande che ritengo opportune e che riceva risposte chiare e che mi soddisfino pienamente.

Programmi di follow-up, esami, visite e frequenza di accessi al centro

Se sto prendendo in considerazione la possibilità di intraprendere un percorso di terapia genica, devo essere consapevole che i controlli successivi alla sua somministrazione saranno impegnativi, soprattutto nei primi sei-dodici mesi. Bisogna inoltre avere presente

che, trattandosi di un trattamento complesso, almeno per i primi anni, la terapia genica potrebbe essere disponibile solo in pochi centri specializzati (centri Hub).

A seconda del modello organizzativo adottato nelle singole regioni, per la somministrazione e forse anche per le valutazioni preliminari, così come pure per i primi controlli di follow-up, potrei dovermi spostare presso un altro centro. Questo comporterebbe un cambio di interlocutori e un adattamento a diversa modalità di colloquio con altri medici, rispetto a quelli con cui siamo abituati a confrontarci. Ovviamente, è fondamentale che ci sia garantita una chiara informazione circa i requisiti per accedere al trattamento, i controlli successivi e le modalità di svolgimento.

Nel periodo di valutazione dell'eleggibilità vi saranno numerosi incontri con il team multidisciplinare per discutere del trattamento, espletare le questioni burocratiche e raccogliere il consenso informato. La frequenza e la durata di questi incontri di discussione, approfondimento e valutazione verranno concordate con l'ematologo; in genere si raccomanda che vi siano più colloqui distribuiti nell'arco di alcune settimane consentendo adeguati tempi di riflessione (generalmente tra le 6 e le 12 settimane, ma il lasso di tempo andrà valutato secondo la specifica situazione). Subito prima della somministrazione della terapia e poi nel periodo successivo sono previste numerose visite al Centro (una o più alla settimana per le prime 12 settimane, poi una ogni quindici giorni, a seconda della risposta e delle condizioni). Queste visite si ridurranno progressivamente se non saranno riscontrati effetti collaterali.

Il periodo post somministrazione richiederà maggiori controlli e la loro frequenza e le modalità di accesso (se presso il centro spoke o il centro hub) andranno discusse con l'ematologo e definite tenendo conto delle mie esigenze, degli impegni lavorativi, familiari e personali. In linea di massima, le visite si diraderanno dopo i primi quattro-cinque mesi, a seconda della risposta, dei livelli di FVIII o FIX raggiunti e di eventuali effetti collaterali, compreso il riscontro di valori di laboratorio fuori norma. I controlli proseguiranno con minore frequenza per tutto il primo anno ma, fatte salve situazioni particolari, dovrò recarmi al Centro emofilia per almeno sei mesi. D'altro canto, i controlli sono necessari per sorvegliare la nostra salute generale, rilevare con tempestività eventuali effetti indesiderati, che non sempre vengono percepiti immediatamente, e monitorare i livelli di espressione del FVIII o FIX dopo la terapia genica.

In caso di adozione di un modello Hub & Spoke, quale sarà il Centro che eseguirà particolari test/visite/valutazioni?

Il modello Hub & Spoke prevede la collaborazione fra il Centro specializzato, che si occuperà della somministrazione del farmaco per la terapia genica e di alcune fasi del follow-up, e il Centro che frequentiamo abitualmente per la cura dell'emofilia, che si occuperà di altre fasi del follow-up e di valutazioni più frequenti. Nel caso venga adottato questo modello organizzativo, è fondamentale avere un quadro chiaro di chi farà cosa e dove.

Che cosa comportano questi accessi al centro (test, valutazioni, visite, ecc.)?

Le visite probabilmente includeranno:

- Misura della temperatura corporea
- Frequenza cardiaca e respiratoria
- Peso corporeo
- Test di laboratorio su
 - Sangue
 - Urina
 - Liquido seminale
- Valutazione cardiaca (ECG, eventuale Ecocardiogramma)
- Valutazione dello stato delle articolazioni mediante tecniche strumentali e parametri clinici (HJHS)
- Compilazione di questionari (generalmente sulla qualità della vita e la capacità di svolgere le attività quotidiane e sul dolore cronico)
- Valutazione della salute del fegato che, in alcuni casi, potrebbe anche comprendere una biopsia epatica.

Trattamenti farmacologici aggiuntivi che potrebbero rendersi necessari

Il trattamento con terapia genica potrebbe determinare la necessità di trattamenti farmacologici aggiuntivi. Il farmaco usato più spesso (anche se non è sempre necessario) per controllare la risposta infiammatoria del fegato ed evitare una possibile perdita di espressione di FVIII o FIX, è il cortisone. La durata del trattamento con cortisone può variare da qualche settimana a qualche mese, a seconda della risposta individuale.

Il trattamento con cortisone aiuta l'organismo ad "accettare" agenti esterni, ma può avere effetti indesiderati⁷, alcuni dei quali non privi di un impatto notevole sulla qualità di vita. È

importante soffermarsi adeguatamente su questi aspetti nel colloquio clinico con il medico, ponendo tutte le domande che riteniamo utili a farci avere un quadro il più possibile chiaro e completo. Come in buona parte dei colloqui clinici prima e dopo il trattamento di terapia genica, può essere una buona idea avere accanto un amico, un parente o anche un paziente esperto, che ci aiuti a riflettere e a individuare ambiti meritevoli di approfondimento.

Modalità del trattamento, impatto sulla vita di tutti i giorni e limitazioni imposte dalla terapia genica

Nel contesto della decisione, è fondamentale avere ben chiare le modalità di trattamento e di follow-up e il loro impatto sulla quotidianità, con particolare riguardo alla situazione (personale, lavorativa, familiare, etc.) in cui ci troviamo al momento, anche in relazione all'eventuale progetto di avere un figlio. In particolare, è necessario considerare le limitazioni che influiscono sulla vita quotidiana:

- Limitazione al consumo di alcol nel periodo immediatamente precedente la terapia e raccomandazione di astenersi dal consumo di alcol per 6-12 mesi dopo la somministrazione

Contraccezione di barriera necessaria per i primi 6-12 mesi per evitare qualsiasi possibilità di trasferimento del vettore attraverso lo sperma, il cosiddetto “vector shedding”. L'uso di contraccettivi di barriera sarà necessario finché i residui del vettore non saranno più rilevabili nel liquido seminale

- Limitazioni alla vita sociale
- Limitazioni alla vita lavorativa

Durante il primo anno sarà necessario assentarsi ripetutamente dal posto di lavoro. È importante avere un'idea quanto più possibile precisa dell'impegno di tempo per i controlli presso il Centro, compresi gli eventuali viaggi, e dei costi connessi.

È opportuno dedicare attenzione e avere ben chiare le limitazioni alla propria vita sociale e i cambiamenti imposti dal trattamento, comprese le assenze dal posto di lavoro, in particolare nel corso del primo anno. Inoltre, nei vari incontri con il medico o con il team multidisciplinare dovranno trovare spazio anche valutazioni sull'impatto che la terapia genica, i trattamenti aggiuntivi (o gli eventuali effetti indesiderati) potrebbero avere sulla nostra vita sentimentale e sociale.

Supporto per il paziente

Prima di iniziare il processo è necessario capire insieme al medico quali sono le strutture di supporto disponibili, sia all'interno del team multidisciplinare che nella rete sociale del paziente.

Supporto psicologico e sociale alla decisione

Una scelta come questa ha notevoli implicazioni psicologiche. Com'è noto, al momento non è possibile ricevere la terapia genica una seconda volta e dunque la decisione deve essere ben ponderata. Oltre a comprendere e ragionare sulle proprie aspettative come paziente, è importante discutere e individuare insieme al medico e a tutto il team il supporto psicologico più adeguato, all'interno del team multidisciplinare o anche al di fuori, secondo le nostre preferenze, anche tenendo conto della rete di sostegno sociale su cui possiamo contare.

Counseling

La presenza di un counselor in tutto il percorso, a cominciare dalla fase di valutazione e decisione, può aiutarci a riflettere, a esplorare aspetti che magari non ci appaiono immediatamente evidenti, a individuare le questioni che richiedono maggiore approfondimento e in generale a capire se sentiamo di avere gli elementi necessari per fare una scelta consapevole e informata.

Supporto sociale

Negli incontri iniziali sarà opportuno parlare con il medico e il team del contesto sociale in cui si vive e dei sostegni su cui si può contare. I network sociali di amici, parenti e persone con cui si è in intimità e confidenza sono fondamentali e possono aiutarci a ragionare e a scegliere ciò che è meglio per noi nel contesto della nostra vita. Naturalmente, nessuno ci impone niente in tal senso e ciascuno valuterà che cosa condividere e con chi. La scelta di accedere o meno al percorso di terapia genica è assolutamente personale e l'ultima parola deve averla sempre il diretto interessato.

Supporto psicologico e sociale durante il primo anno e oltre

Il primo anno dopo la somministrazione sarà necessariamente il più impegnativo. È importante poter disporre dell'adeguato supporto sociale e psicologico, e prima di decidere essere sicuri di aver compreso bene quali sono i possibili benefici, quali i potenziali rischi e inconvenienti, e anche quali le aree di inevitabile incertezza (ciò che non sappiamo e non possiamo sapere a priori) misurandole con la nostra disponibilità ad accettarle. Bisogna

sempre ricordare che la terapia genica per sua natura, non consente ripensamenti. Vale la pena di spendere una settimana in più o di fare qualche domanda ulteriore, evitando decisioni prese senza la necessaria convinzione che possono produrre pentimenti tardivi.

Supporto psicologico e sociale in caso di perdita di espressione (parziale o totale) o non rispondenza alla terapia, ritorno al trattamento profilattico standard

Allo stato attuale, non ci sono caratteristiche biologiche, genetiche o cliniche in grado di predire quali livelli di fattore VIII o IX si raggiungeranno con la terapia genica e per quanto tempo quei livelli si manterranno, senza che sia necessario tornare alla profilassi con fattori della coagulazione o con terapie non sostitutive. È questo un punto che dobbiamo avere ben chiaro prima della somministrazione, ferma restando la possibilità di ricevere counseling anche a distanza di anni dalla somministrazione della terapia genica. Bisogna evidentemente far sì che l'eventuale contraccolpo emotivo (anche non rilevato dal team multidisciplinare o dai familiari) non si traduca in una difficoltà ad accettare il ritorno alla profilassi, con riflessi negativi sulla nostra condizione di salute.

Glossario

A

- ✚ **Allele:** una delle due o più forme alternative di un gene che si trova nello stesso sito sul cromosoma.
- ✚ **Adeno-Associato:** un virus che può infettare l'uomo ma incapace di replicarsi senza l'aiuto di un altro virus come l'adenovirus. È uno dei virus più frequentemente utilizzati nelle terapie geniche attuali.
- **Adenovirus:** una famiglia di virus che possono causare infezioni del tratto respiratorio, oculare e tratto gastrointestinale.
- **Alanina aminotransferasi (ALT):** un enzima che si trova principalmente nel fegato il cui livello, insieme all'AST, rappresenta un indicatore della salute del fegato. Livelli aumentati indicano un danno delle cellule epatiche.
- **Allergene:** una sostanza estranea all'organismo che scatena una risposta immunitaria, portando alla produzione di anticorpi.
- **Anticorpo:** una proteina prodotta dalle cellule immunitarie in risposta alla presenza di una molecola estranea; agisce legandosi alla molecola bersaglio rendendola inattiva o distruggendola.
- **Anticorpo neutralizzante:** un tipo specifico di anticorpo che difende l'organismo contro un agente infettivo o neutralizzandone l'effetto. Per esempio, può neutralizzare un virus, può essere diretta contro componenti di cellule tumorali e purtroppo anche, in alcuni casi, contro proteine del nostro corpo e per esempio inattivare un fattore della coagulazione come il FVIII o FIX (autoanticorpo).
- **Antigene:** qualsiasi sostanza (proteine, polisaccaridi, lipidi o altre sostanze chimiche) in grado di essere specificamente riconosciuta dal sistema di difesa dell'organismo, il sistema immunitario.
- **Aspartato aminotransferasi (AST):** un enzima che si trova principalmente nel fegato il cui livello, insieme all'ALT, rappresenta un indicatore della salute del fegato. Livelli aumentati indicano un danno alle cellule del fegato.

C

- **Capside:** il guscio proteico di un virus che ne racchiude il patrimonio genetico.
- **Cellula:** l'unità strutturale e funzionale di base di tutti gli esseri viventi. Essa contiene un nucleo con le informazioni genetiche (DNA), organelli, citoplasma ed elementi per la produzione di energia.
- **Cellule della linea germinale:** le cellule da cui provengono ovuli o spermatozoi, detti anche gameti, le cellule deputate alla funzione riproduttiva.
- **Ciclo di replicazione:** in biologia, si riferisce al ciclo di riproduzione di virus. Un ciclo di replicazione inizia con l'infezione di una cellula ospite e termina con il rilascio di particelle contenenti la progenie matura del virus (cioè i discendenti del virus). Per motivi di sicurezza, i virus utilizzati per l'attuale terapia genica non sono in grado di replicarsi.

D

- ✚ **DNA:** acido desossiribonucleico, è la molecola che contiene tutte le informazioni genetiche di un organismo. Si trova all'interno del nucleo delle cellule ed è trasmesso da una generazione all'altra.
- ✚ **Dominante:** un membro di una coppia di alleli che determina il fenotipo specifico mentre l'altro rimane inespresso.
- ✚ **De novo:** la prima occorrenza di qualcosa.
- ✚ **Doppia elica:** struttura tridimensionale del DNA. Due filamenti di DNA si avvolgono a formare un'elica.

E

- ✚ **EMA (European Medicines Agency):** uno dei principali organismi nel processo regolatorio dei medicinali a livello europeo. Le funzioni svolte dall'EMA garantiscono la sicurezza dai farmaci a tutti i cittadini dell'Unione europea. Ha il compito di valutare le domande di autorizzazione all'immissione in commercio, di monitorare la sicurezza dei medicinali durante tutto il percorso di sperimentazione e dopo la loro commercializzazione.
- ✚ **Enzima:** un tipo speciale di proteina che accelera le reazioni.
- ✚ **Epatociti:** cellule del fegato.
- ✚ **Episomale:** unità di DNA circolare a doppio filamento che non è integrata nel genoma della cellula.
- ✚ **Ereditarietà legata all'X:** significa che il gene che causa la malattia è localizzato sul cromosoma X. Nel caso di una ereditarietà di tipo dominante legata all'X, una singola copia della mutazione è sufficiente per causare la malattia sia nei maschi (che hanno un cromosoma X) che nelle femmine (che hanno due cromosomi X). Nel caso di una 'ereditarietà di tipo recessiva legata all'X, un maschio portatore di tale mutazione sarà malato, perché ha un solo cromosoma X, mentre una femmina, avendo due cromosomi X, sarà una portatrice e generalmente non esprime la malattia.
- ✚ **“Escalation” (aumento) della dose:** l'aumento progressivo della dose di vettore terapeutico somministrata.
- ✚ **Esogeno:** introdotto o prodotto al di fuori dell'organismo o sistema.
- ✚ **Ex vivo:** cellule di un soggetto prelevate e trattate in laboratorio per poi essere re-introdotte.

F

- ✚ **Fattore transgenico:** si identifica con questo termine il fattore (VIII/IX) che si genera nel paziente a seguito della terapia genica e che viene poi rilasciato nel plasma. La struttura di questi fattori potrebbe essere diversa rispetto a quelli prodotti dallo stesso gene in coltura cellulare.
- ✚ **FDA (U.S. Food and Drug Administration):** ente governativo che si occupa della valutazione delle nuove terapie e dell'autorizzazione per l'immissione in commercio

dei nuovi farmaci negli Stati Uniti. Esercita un controllo sui nuovi farmaci prima della loro messa sul mercato che il monitoraggio post-commercializzazione.

- ✚ **Fenotipo:** manifestazione fisica di un carattere genetico. Il fenotipo di un organismo è l'insieme delle sue caratteristiche di forma e funzione determinato sia dal patrimonio genetico (Genotipo) che dall'azione dell'ambiente.

G

- ✚ **Gene:** parte funzionale e fisica del DNA. I geni sono pezzi di DNA e la maggior parte dei geni contengono le informazioni per produrre specifiche proteine.
- ✚ **Gene editing:** l'uso di biotecnologie per modificare specifiche sequenze di DNA nel genoma di un organismo.
- ✚ **Genoma:** tutte le informazioni genetiche di una cellula o di un organismo. Nell'uomo, quasi ogni cellula del corpo contiene una copia completa del genoma, tranne i globuli rossi). Il genoma è composto da DNA e contiene tutte le informazioni necessarie affinché un organismo si differenzi.
- ✚ **Genotipo:** la costituzione genetica di un individuo.
- ✚ **Genotossicità:** l'effetto che l'integrazione del vettore nel genoma della cellula ospite possa portare a disordini/complicanze/gravi effetti avversi, non ultima la proliferazione incontrollata della cellula stessa e portare allo sviluppo di tumori.

I

- ✚ **Integrazione:** evento in cui un tratto di DNA si inserisce nel genoma di un organismo.
- ✚ **In vivo:** all'interno dell'organismo.
- ✚ **In vitro:** al di fuori dell'organismo o in laboratorio.

L

- ✚ **Lentivirus:** una famiglia di retrovirus che hanno un singolo filamento di RNA. Per la terapia genica ne viene utilizzata una versione modificata che non causa la malattia e che permette di inserire ("integrazione") il gene terapeutico nel genoma della cellula infettata. Vengono usati per trattare cellule in attiva proliferazione.
- ✚ **Like-vs-like:** Con questo termine si identifica il principio basilare di qualunque *metodo biologico*, usato per la misura di attività di due prodotti. Il fattore della coagulazione del plasma paziente che si intende misurare, dovrebbe possedere la stessa struttura di quello contenuto nello standard. Purtroppo, i fattori *modificati* di ultima generazione e i fattori prodotti a seguito della terapia genica, hanno spesso struttura diversa dal fattore nativo contenuto nello standard. Questa differenza potrebbe da sola giustificare le discrepanze metodologiche (coagulante vs cromogenico) che si osservano nei pazienti in post-infusione o dopo terapia genica.
- ✚ **Liposoma:** una minuscola vescicola lipidica, cioè formata da grassi, creata in laboratorio per veicolare farmaci o anche geni all'interno della cellula bersaglio.

- ✚ **Linfociti:** un tipo di globuli bianchi prodotto nel midollo osseo e si trova nel sangue e nel tessuto linfatico alla base della risposta immunitaria adattiva, nota anche come immunità acquisita o specifica.

M

- ✚ **Metodo coagulante:** misura dell'attività del FVIII/FIX. Basato sulla modifica del test aPTT in combinazione con il plasma carente specifico per il fattore che si vuole misurare. Il punto finale di questo metodo è coagulometrico (misura del tempo necessario per ottenere la coagulazione del plasma, dopo attivazione della coagulazione).
- ✚ **Metodo cromogenico:** misura dell'attività FVIII/IX. Questo metodo prevede due stadi. Nel primo si attiva la coagulazione con reagenti biologici (fattori della coagulazione esogeni), generando FXa. Nel secondo stadio, il FXa è misurato mediante un substrato sintetico, specifico per questo fattore. Il punto finale di questo metodo è fotometrico (variazione di densità ottica misurata a una specifica lunghezza d'onda). Esistono almeno *4 diversi preparati commerciali* per il FVIII e 2 per il FIX. Non ci sono dati sulla comparabilità dei risultati, ottenuti con questi metodi commerciali sullo stesso campione di plasma.
- ✚ **Monogenico:** carattere ereditario dovuto ad un singolo gene, come l'emofilia.
- ✚ **Mutazione:** qualsiasi cambiamento/variazione nella sequenza del DNA. Le mutazioni possono essere causate da errori durante la divisione cellulare o possono essere causate dall'esposizione ad agenti ambientali chimici o fisici che danneggiano il DNA. Le mutazioni possono essere dannose, benigne o non avere alcun effetto. Se si verificano nelle cellule che producono uova o spermatozoi, possono essere ereditate; se le mutazioni si verificano in altri tipi di cellule, non sono ereditate ("mutazioni somatiche"). Alcune mutazioni possono portare al cancro o altri tipi di malattie.
- ✚ **Mutagenesi:** il processo di generazione di una mutazione genetica. Le mutazioni possono essere presenti in natura o prodotte in laboratorio.

N

- ✚ **Nucleo:** un compartimento all'interno della cellula che contiene i cromosomi, che sono corpuscoli contenenti il DNA.

P

- ✚ **Placebo:** una sostanza farmacologicamente inattiva che è somministrata allo stesso modo del farmaco sperimentale in studio.
- ✚ **Plasma carente:** plasma normale, privato del fattore da misurare (FVIII o IX), mediante un processo di adsorbimento su anticorpi in fase solida, specifici per il fattore in questione. Esistono in commercio numerosi prodotti commerciali ed è possibile che, in combinazione con lo stesso reagente aPTT, possano generare risultati diversi sullo stesso campione di plasma.

- ✚ **Promotore:** regione del DNA costituita da una sequenza specifica che regola la trascrizione di un gene.
- ✚ **Proteina:** il principale costituente macromolecolare delle cellule. Si tratta di un polimero lineare di amminoacidi legati tra loro da legami cosiddetti peptidici in una sequenza specifica.
- ✚ **Proteina funzionale:** una proteina che è in grado di interagire con altre proteine per trasmettere segnali e/o avviare, continuare o modificare reazioni nelle cellule o all'interno degli organismi.

R

- ✚ **Reagenti aPTT:** reagenti per la misura dell'attività dei FVIII/IX, la cui composizione è formata da: attivatori (silice, acido ellagico e altri), fosfolipidi (di varia natura) e cloruro di calcio. Di solito si parla di aPTT, come se si trattasse di un unico test. In realtà esistono in commercio almeno 10 diverse composizioni, se si tiene conto della combinazione di attivatori e fosfolipidi. Ognuno di questi aPTT potrebbe (almeno in teoria) produrre risultati diversi sullo stesso campione di plasma.
- ✚ **RNA:** acido ribonucleico; uno dei due tipi di acidi nucleici prodotti dalle cellule. RNA contiene informazioni che sono state copiate dal DNA. All'interno delle cellule si hanno diverse forme di RNA e ogni forma ha un compito specifico. La maggior parte degli RNA svolgono funzioni legate alla produzione di proteine. RNA è anche il materiale genetico di alcuni virus. L'RNA può essere prodotto in laboratorio e utilizzato negli studi di ricerca.
- ✚ **Retrovirus:** virus contenenti solo RNA che si replicano in una cellula creando un DNA intermedio a doppio filamento.
- ✚ **Recessivo:** in genetica, si riferisce ad un carattere genetico/ereditario determinato da un gene su un cromosoma che si manifesta solo quando è presente anche sull'altro cromosoma.
- ✚ **Risposta immunitaria:** l'attività del sistema immunitario contro antigeni, cioè sostanze estranee o componenti di cellule tumorali o in casi particolari sostanze nel nostro corpo.

S

- ✚ **Sequenza:** l'ordine in cui i nucleotidi o gli amminoacidi compaiono in un singolo filamento di DNA/RNA o proteina.
- ✚ **Sperimentazioni cliniche ("Clinical trials"):** metodo di ricerca in cui uno o più persone sono preventivamente assegnate a uno o più trattamenti (che possono includere placebo o altro controllo) per valutare gli effetti (gli esiti biomedici e comportamentali) di tali trattamenti sulla salute:
 - **Fase:** Lo stadio di una sperimentazione clinica di un farmaco basata sulla definizione sviluppata dall'ente regolatorio americano "Food and Drug Administration" (FDA). La fase è definita sulla base dello scopo finale, del numero dei partecipanti e di altre caratteristiche pre-definite.

- **Fase 1:** Questa fase ha lo scopo di valutare la sicurezza del farmaco e la dose ottimale, e generalmente è condotta su un numero limitato di partecipanti, spesso volontari sani.
- **Fase 2:** Questa fase ha carattere esplorativo e condotti su piccoli gruppi di persone, generalmente meno di 100 per valutare l'efficacia di un medicinale. In ogni caso viene ulteriormente rivalutato il profilo di sicurezza e la dose.
- **Fase 3:** in questa fase il trattamento viene effettuato in un numero maggiore di soggetti affetti per confermare l'efficacia, monitorare gli eventi avversi e raccogliere ulteriori informazioni per rifinire il protocollo terapeutico. In questa fase sempre si confronta l'efficacia del nuovo trattamento con quella di trattamenti pre-esistenti correntemente in uso o con un placebo.

T

- ✚ **Titolo:** si riferisce comunemente agli anticorpi trovati nel sangue di una persona. E' una misura indiretta della loro concentrazione (o livello).
- ✚ **Transgene:** un gene esogeno che è stato trasferito in una cellula e che può integrarsi o meno nel DNA (episomale).
- ✚ **Trascrizione:** il processo in cui la sequenza genica di DNA viene copiata per produrre RNA messaggero (mRNA).
- ✚ **Trasferimento genico:** l'inserimento di materiale genetico in una cellula.
- ✚ **Traduzione (o sintesi proteica):** processo mediante il quale la sequenza di RNA messaggero viene letta (tradotta) in aminoacidi per produrre una proteina.

V

- ✚ **Virus:** in medicina, un microrganismo molto semplice che infetta le cellule e può causare malattie.
- ✚ **Vettore:** nella biologia cellulare, il DNA di un agente (virus o plasmide) utilizzato per trasmettere materiale genetico a una cellula o a un organismo.
- ✚ **Vettore di virus adeno-associato:** virus adeno-associato modificato per veicolare il gene terapeutico (es. FVIII/FIX) nella cellula bersaglio ed in particolare nel nucleo.
- ✚ **Vettore non virale:** non basato sulla modificazione di un virus. Nella terapia genica, un vettore non virale, come un liposoma, è un modo per introdurre una singola molecola di DNA o complessi di DNA nella cellula.

Bibliografia

1. Swierczewska M, Lee KC, Lee S. What is the future of PEGylated therapies? *Expert Opin Emerg Drugs*. 2015;20:531–536.
2. Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:715–725.
3. Schulte S. Innovative coagulation factors: albumin fusion technology and recombinant single-chain factor VIII. *Thromb Res*. 2013;131:S2–6.
4. Mannucci PM. Hemophilia treatment innovation: 50 years of progress and more to come. *J Thromb Haemost*. 2023;21:403–412.
5. Demers M, Aleman MM, Kistanova E, et al. Efanesoctocog alfa elicits functional clot formation that is indistinguishable to that of recombinant factor VIII. *J Thromb Haemost*. 2022;20:1674-1683.
6. von Drigalski A, Chowdary P, Kulkarni R, et al Efanesoctocog Alfa prophylaxis for patients with severe hemophilia A. *N Engl J Med* 2023;388:310-318.
7. Kitazawa T, Igawa T, Sampei Z, et al. A bispecific antibody to factors IXa and X restores factor VIII hemostatic activity in a hemophilia A model. *Nat Med*. 2012;18:1570-1574.
8. Oldenburg J, Mahlangu JN, Kim B, et al. Emicizumab prophylaxis in hemophilia A with inhibitors. *N Engl J Med*. 2017;377:809-818.
9. Mahlangu J, Oldenburg J, Paz-Priel I, et al. Emicizumab Prophylaxis in Patients Who Have Hemophilia A without Inhibitors. *N Engl J Med*. 2018;379:811-822.
10. Mahlangu J, Iorio A, Kenet J. Emicizumab state-of-the-art update. *Haemophilia*. 2022;28(Suppl.4):103-110.
11. VandenDriessche T, Pipe SW, Pierce GF, Kaczmarek R. First conditional marketing authorization approval in the European Union for hemophilia "A" gene therapy. *Mol Ther*. 2022;30:3335-3336.
12. Heo YA. Etranacogene Dezaparvovec: First Approval Drugs. 2023. *Drugs*. 2023;83:347-352.
13. Perrin GQ, Herzog RW, Markusic DM. Update on clinical gene therapy for hemophilia. *Blood*. 2019;133:407-414.
14. Pierce GF, Fong S, Long BR, Kaczmarek R. Deciphering conundrums of adeno-associated virus liver-directed gene therapy: focus on hemophilia. *J Thromb Haemost*. 2023:S1538-7836(23)00869-3.
15. Schulz M, Levy DI, Petropoulos CJ, et al. Binding and neutralizing anti-AAV antibodies: Detection and implications for rAAV-mediated gene therapy. *Mol Ther*. 2023;31:616-630.
16. Herzog RW, Hagstrom JN, Kung S-H, et al. Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:5804-5809.
17. Wang L, Takabe K, Bidlingmaier SM, III CR, Verma IM. Sustained correction of bleeding disorder in hemophilia B mice by gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:3906-3910.
18. Herzog RW, Yang EY, Couto LB, et al. Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nat Med*. 1999;5:56-63.

19. Snyder RO, Miao C, Meuse L, et al. Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. *Nat Med.* 1999;5:64-70.
20. Kay MA, Manno CS, Ragni MV, et al. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat. Genet.* 2000;24:257-261.
21. Manno CS, Chew AJ, Hutchison S, et al. AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood.* 2003;101:2963-2972.
22. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med.* 2006;12:342-347.
23. Nathwani AC, Tuddenham E, Rangarajan S, et al. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med.* 2011;365:2357-2365.
24. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham E, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med.* 2014;371:1994-2004.
25. Nathwani A, Reiss U, Tuddenham E, et al. Adeno-Associated mediated gene transfer for hemophilia B: 8 year follow up and impact of removing "empty viral particles" on safety and efficacy of gene transfer. *Blood.* 2018;132(Suppl. 1):491.
26. Simioni P, Tormene D, Tognin G, et al. X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua). *N Engl J Med.* 2009;361:1671-1675.
27. Donsante A, Miller DG, Li Y, Vogler C, et al. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science.* 2007;317:477.
28. Nguyen GN, Everett JK, Kafle S, et al. A long-term study of AAV gene therapy in dogs with hemophilia A identifies clonal expansions of transduced liver cells. et al. *Nat Biotechnol* 2021;39:47-55.
29. Pipe SW, Leebeek FWG, Recht M, et al. Gene Therapy with Etranacogene Dezaparvovec for Hemophilia B. *N Engl J Med.* 2023;388:706-718.
30. Konkle BA, Walsh CE, Escobar MA, et al. BAX 335 hemophilia B gene therapy clinical trial results: potential impact of CpG sequences on gene expression. *Blood.* 2021;137:763-774.
31. Eggan K. BioMarin. Exploratory analyses of healthy liver biopsies and a single case of parotid acinar cell carcinoma do not identify a role for valoctocogene roxaparvovec insertion in altering cell growth. Presented Monday, May 9, 2022 at the World Federation of Hemophilia 2022 World Congress. May 8-11, 2022. Montreal, Canada.
32. Thornburg CD, Simmons DH, von Drygalski A. Evaluating Gene Therapy as a Potential Paradigm Shift in Treating Severe Hemophilia. *BioDrugs.* 2023;37:595-606.
33. Update for the Hemophilia Community. from BioMarin regarding a serious adverse event in the ongoing hemophilia A gene therapy [valoctocogene roxaparvovec, BMN 270].
<https://www.hemophilia.org/sites/default/files/document/files/BioMarin%20Hemophilia%20NORAM%20Program%20Update%20for%20Patient%20Associations%2012SEP22.pdf>
34. Konkle BA, Peyvandi F, Coffin D, Naccache M, Youttananukorn T, Pierce GF; WFH Gene Therapy Registry Scientific Advisory Board. Landmark endorsement of a

- global registry: The European Medicines Agency (EMA) Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), publicly endorses World Federation of Hemophilia Gene Therapy Registry as global standard. *Haemophilia*. 2024;30:232-235.
35. Tripodi A, Chantarangkul V, Novembrino C, Peyvandi F. Advances in the Treatment of Hemophilia: Implications for Laboratory Testing. *Clin Chem*. 2019;65:254-262.
 36. Bowyer AE, Gosselin RC. Factor VIII and Factor IX Activity Measurements for Hemophilia Diagnosis and Related Treatments. *Semin Thromb Hemost*. 2023;49:609-620.
 37. Ingerslev J, Jankowski MA, Weston SB, Charles LA; ReFacto Field Study Participants. Collaborative field study on the utility of a BDD factor VIII concentrate standard in the estimation of BDDr Factor VIII:C activity in hemophilic plasma using one-stage clotting assays. *J Thromb Haemost* 2004;2:623– 628.
 38. Rosen S, Tiefenbacher S, Robinson M, et al. Activity of transgene-produced B-domain-deleted factor VIII in human plasma following AAV5 gene therapy. *Blood* 2020;136:2524-2534.
 39. Mahlangu J, Kaczmarek R, von Drygalski A, et al. Two-Year Outcomes of Valoctocogene Roxaparvovec Therapy for Hemophilia A. *N Engl J Med*. 2023;388:694-705.
 40. Robinson MM, George LA, Carr ME, et al. Factor IX assay discrepancies in the setting of liver gene therapy using a hyperfunctional variant factor IX-Padua. *J Thromb Haemost* 2021;19:1212-1218.
 41. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia*. 2020;(Suppl 6):1-158.
 42. Hilliard P, Funk S, Zourikian N, et al. Hemophilia joint health score reliability study. *Haemophilia*. 2006;12:518-525.
 43. Poonnoose PM, Thomas R, Keshava SN, et al. Psychometric analysis of the Functional Independence Score in Haemophilia (FISH). *Haemophilia*. 2007;13:620-626.
 44. van Genderen FR, Westers P, Heijnen L, et al. Measuring patients' perceptions on their functional abilities: validation of the Haemophilia Activities List. *Haemophilia*. 2006;12:36-46.
 45. Witkop M, Lambing A, Divine G, Kachalsky E, Rushlow D, Dinnen J. A national study of pain in the bleeding disorders community: a description of haemophilia pain. *Haemophilia*. 2012;18:e115–9.
 46. Kempton CL, Recht M, Neff A, et al. Impact of pain and functional impairment in US adults with haemophilia: patient- reported outcomes and musculoskeletal evaluation in the pain, functional impairment and quality of life (P- FiQ) study. *Haemophilia*. 2018;24:261-270.
 47. Witkop M, Neff A, Buckner TW, et al. Self- reported prevalence, description and management of pain in adults with haemophilia: methods, demographics and results from the Pain, Functional Impairment, and Quality of life (P- FiQ) study. *Haemophilia*. 2017;23:556-565.
 48. Paredes AC, Costa P, Almeida A, Pinto PR. A new measure to assess pain in people with haemophilia: The Multidimensional Haemophilia Pain Questionnaire (MHPQ). *PLoS One*. 2018;13:e0207939.

49. Chou SC, Hsu YC, Lin SW. Gene therapy for hemophilia, a clinical viewpoint. *J Formos Med Assoc.* 2023;122:1101-1110.
50. Castaman G, von Drygalski A, Mulders G, et al. The Future of Gene Therapy for Haemophilia A and B: Innovative Treatment Management Strategies, Perspectives, and Updated Trial Results. Presented at the virtual 15th Annual Congress of European Association for Haemophilia and Allied Disorders (EAHAD). *EMJ Hematol.* 2022;10[Suppl 3]:2-12.
51. George LA. Hemophilia A Gene Therapy - Some Answers, More Questions. *N Engl J Med.* 2023 Feb 23;388(8):761-763.
52. Pipe SW, Hay CRM, Sheehan J, et al. First-in-human gene therapy study of AAVhu37 capsid vector technology in severe hemophilia A: Safety and FVIII activity results [abstract]. *Res Pract Thromb Haemost* 2020;4(Suppl.1):OC 09.4
53. Giermasz A, Visweshwar N, Harrington TJ, et al. Updated results of the alta study, a Phase 1/2 study of giroctocogene fitelparvovec (PF-07055480/SB-525) gene therapy in adults with severe hemophilia A [abstract]. *Blood* 2022;140 (Supplement 1):7776–7777.
54. Samelson-Jones BJ, Ragni MV, Rasko JEJ, et al. Improved joint health after gene therapy with dirloctocogene samoparvovec (SPK-8011) in people with hemophilia A [abstract]. *Res Pract Thromb Haemost.* 2023;7(Suppl.2): OC 20.3.
55. De Wolf D, Singh K, Chuah MK, VandenDriessche T. Hemophilia Gene Therapy: The End of the Beginning? *Hum Gene Ther.* 2023;34:782-92.
56. Coppens M, Pipe SW, Miesbach W, et al. Adults with hemophilia B receiving etranacogene dezaparvovec in the HOPE-B phase 3 trial experiencing a stable increase in mean factor IX activity and durable haemostatic protection after 24 months' follow-up. *Haemophilia* 2023;29(S1):109.
57. Kavakli K. Efficacy and safety of Fidanacogene elaparvovec in adults with moderately severe to severe hemophilia B: The phase 3 BENEGENE-2 gene therapy trial [abstract]. Presented at the 16th Annual Congress of the European Association for Haemophilia and Allied Disorders (EAHAD), February 7–10, 2023.
58. Makris M. Hemophilia gene therapy is effective and safe. *Blood* 2018;131:952–953.
59. Laffan AM, Rangarajan S; Lester W, et al. Hemostatic results for up to 6 years following treatment with valoctocogene roxaparvovec, an AAV5-hFVIII-SQ gene therapy for severe hemophilia A [abstract]; *Res Pract Thromb Haemost.* 2022;6(Suppl.1): e12787.
60. Mahlangu J, von Drygalski A, Shapiro S, et al. Bleeding, FVIII activity, and safety 3 years after gene transfer with valoctocogene roxaparvovec: Results from GENE8-1 [abstract]. *Res Pract Thromb Haemost.* 2023;7(Suppl.2): OC 20.1.
61. Ozelo MC, Mahlangu J, Pasi KJ, et al. Valoctocogene roxaparvovec gene therapy for haemophilia A. *N Engl J Med* 2022;386:1013-1025.
62. George LA, Monahan PE, Eyster ME, et al. Multiyears factor VIII expression after AAV gene transfer for haemophilia A. *N Engl J Med* 2021;385:1961-1973.
63. Miesbach W, Meijer K, Coppens M, et al. Gene therapy with adeno-associated virus vector 5-human factor IX in adults with haemophilia B. *Blood* 2018;131:1022-1031.
64. Miesbach W, Meijer K, Coppens M, et al. First report of a long-term follow-up extension study 6 years after gene therapy with AMT-060 in adults with hemophilia B confirms safety and stable FIX expression and sustained reductions in factor IX use. *Haemophilia* 2024;30 (Suppl.1); 19.

65. Von Drygalski A, Giermasz A, Castaman G, et al. Etranacogene dezaparvovec (AMT-061 phase 2b): normal/near normal FIX activity and bleed cessation in haemophilia B. *Blkood Adv.* 2019;3:3241-3247.
66. Miesbach W, Leebeek FWG, Recht M, et al. Final analysis from the pivotal Phase 3 HOPE-B gene therapy trial: stable steady-state efficacy and safety of etranacogene dezaparvovec in adults with severe or moderately severe hemophilia B. *Haemophilia* 2022; 28 (Suppl.1): 99.
67. George LA, Sullivan SK, Giermasz A, et al. Hemophilia B gene therapy with a high-specific-activity factor IX variant. *N Engl J Med* 2017;377:2215-2227.
68. Chowdary P, Shapiro S, Makris M, et al. Phase 1-2 trial of AAVS3 gene therapy in patients with hemophilia B. *N Engl J Med* 2022;387(3): 237-247.
69. Gorovits B, Azadeh M, Buchlis G, et al. Evaluation of the Humoral Response to Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy Modalities Using Total Antibody Assays. *AAPS J.* 2021;23(6):108.
70. Available from https://www.ema.europa.eu/documents/rmp-summary/roctavian-epar-risk-management-plan-summary_en.pdf
71. Available from https://www.ema.europa.eu/documents/rmp-summary/hemgenix-epar-risk-management-plan_en.pdf
72. Schmidt M, Foster GR, Coppens M, et al. Liver safety case report from the phase 3 HOPE-B gene therapy trial in adults with hemophilia B [abstract]. *Res Pract Thromb Haemost.* 2023;5(Suppl.2):e12591.
73. Rinella ME, Lazarus JV, Ratzliff V, et al. A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *J Hepatol.* 2023;79:1542-1556.
74. Kim NJ, Vutien P, Berry K, Ioannou GN. Hepatocellular Carcinoma Risk Declines but Remains High Enough for Screening in the First 7 Years After Hepatitis C Virus Cure With Direct-Acting Antivirals in Patients With Cirrhosis or High Fibrosis-4 Score. *Gastroenterology.* 2022;163:1104-1106.e3.
75. Isfordink CJ, van Erpecum KJ, Fischer K, et al. Liver-related complications before and after successful treatment of chronic hepatitis C virus infection in people with inherited bleeding disorders. *Haemophilia.* 2023;29:106–14.
76. Verdera HC; Kuranda K; Mingozi F. AAV Vector Immunogenicity in Humans: A Long Journey to Successful Gene Transfer. *Mol. Ther.* 2020, 28, 723–46.
77. Arruda VR, Favaro P, Finn JD. Strategies to modulate immune responses: a new frontier for gene therapy. *Mol Ther* 2009; 17(9):1492-503.
78. Chu WS, Ng J. Immunomodulation in administration of rAAV: preclinical and clinical adjuvant pharmacotherapies. *Front Immunol* 2021;12:658038.
79. Saag KG, Warrington KJ. Major adverse effects of systemic glucocorticoids UpToDate; Oct 24, 2023. Available from Major adverse effects of systemic glucocorticoids - UpToDate.
80. Gordon JW. Germline alteration by gene therapy: assessing and reducing the risks. *Mol Med Today.* 1998;4:468-70.
81. Gordon JW. Direct exposure of mouse ovaries and oocytes to high doses of an adenovirus gene therapy vector fails to lead to germ cell transduction. *Mol Ther.* 2001;3:557-64.
82. Ye X, Gao GP, Pabin C, Raper SE, Wilson JM. Evaluating the potential of germ line transmission after intravenous administration of recombinant adenovirus in the C3H mouse. *Hum Gene Ther.* 1998;9:2135-42.

83. Couto L, Parker A, Gordon JW. Direct exposure of mouse spermatozoa to very high concentrations of a serotype-2 adeno-associated virus gene therapy vector fails to lead to germ cell transduction. *Hum Gene Ther*. 2004;15:287-91.
84. Favaro P, Downey HD, Zhou JS, et al. Host and vector-dependent effects on the risk of germline transmission of AAV vectors. *Mol Ther*. 2009;17:1022-30.
85. Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Spermatogenesis.
86. Available from <https://www.hemophilia.org/news/fda-places-the-pfizersangamo-therapeutics-phase-3-affine-haemophilia-a-gene-therapy-study-on-clinical-hold> \h
87. Fong, S., Yates, B., Sihn, CR. et al. Interindividual variability in transgene mRNA and protein production following adeno-associated virus gene therapy for hemophilia A. *Nat Med*. 2022;28:789–797.
88. Available at: Hemgenix, INN-etranacogene dezaparvovec (europa.eu).
89. Favaro P, Finn JD, Siner JI, Wright JF, High KA, Arruda VR. Safety of liver gene transfer following peripheral intravascular delivery of adeno-associated virus (AAV)-5 and AAV-6 in a large animal model. *Hum Gene Ther*. 2011;22:843-52.
90. Miesbach W, Chowdary P, Coppens M, et al. Delivery of AAV-based gene therapy through haemophilia centres-A need for re-evaluation of infrastructure and comprehensive care: A Joint publication of EAHAD and EHC. *Haemophilia* 2021;27: 967-973.
91. Miesbach W, Barcenilla SG, Golan G, Lobet S. Implications of haemophilia gene therapy for the changing role of the multidisciplinary team. *Haemophilia*. 2022 Jan;28(1):e12-e14.
92. EAHAD-EHC Statement on Gene Therapy, May 2020. <https://www.ehc.eu/ehc-eahad-joint-position-statement-on-gene-therapy/>
93. Boban A, Baghaei F, Karin F, et al. Accreditation model of European Haemophilia Centres in the era of novel treatments and gene therapy. *Haemophilia*. 2023;29:1442-1449.
94. Pipe SW, Reddy KR, Chowdary P. Gene therapy: Practical aspects of implementation. *Haemophilia*. 2022;28 (Suppl 4):44-52.
95. Hermans C, Gruel Y, Frenzel L, Krumb E. How to translate and implement the current science of gene therapy into haemophilia care? *Ther Adv Hematol*. 2023;14:20406207221145627.
96. Castaman G, Carulli C, De Cristofaro R, et al. Laying the foundations for gene therapy in Italy for patients with haemophilia A: A Delphi consensus study. *Haemophilia*. 2023;29:435-444

Allegato 1

CONCETTI CHIAVE SU EMOFILIA E TERAPIA GENICA

Emofilia: quale la causa.

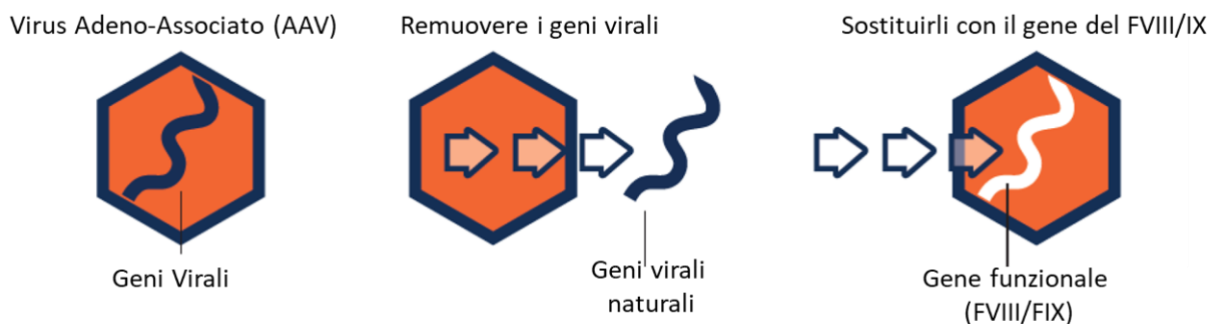
Il DNA contiene le informazioni genetiche per la produzione di tutte le proteine che costituiscono il nostro organismo e si trova all'interno della cellula. Il gene è un frammento di DNA (Fig.3A) che contiene le informazioni grazie a cui la cellula produce una determinata proteina (Fig.3B). A causa di un difetto genetico, le persone con emofilia non producono, o producono in quantità insufficienti, FVIII; (emofilia A) o FIX (emofilia B) entrambi necessari per garantire un'ottimale coagulazione del sangue.

Cos'è la terapia genica?

La terapia genica è un nuova opzione di trattamento per diverse condizioni/malattie genetiche, incluse l'emofilia A e B.

La terapia genica per l'emofilia consiste nell'introduzione in alcune cellule del corpo di una copia del gene funzionante mediante un vettore (veicolo). Nei due trattamenti di terapia genica attualmente disponibili viene utilizzato un virus chiamato virus adeno-associato (AAV). Il virus, viene opportunamente modificato, rimuovendo i geni virali e sostituendoli con una copia funzionante del gene del FVIII o FIX (Fig. 2).

FIGURA 2.
VEETTORE VIRALE PER LA TERAPIA GENICA DELL'EMOFILIA



Modificato da Hart *et al. Orphanet J Rare Dis* (2021)

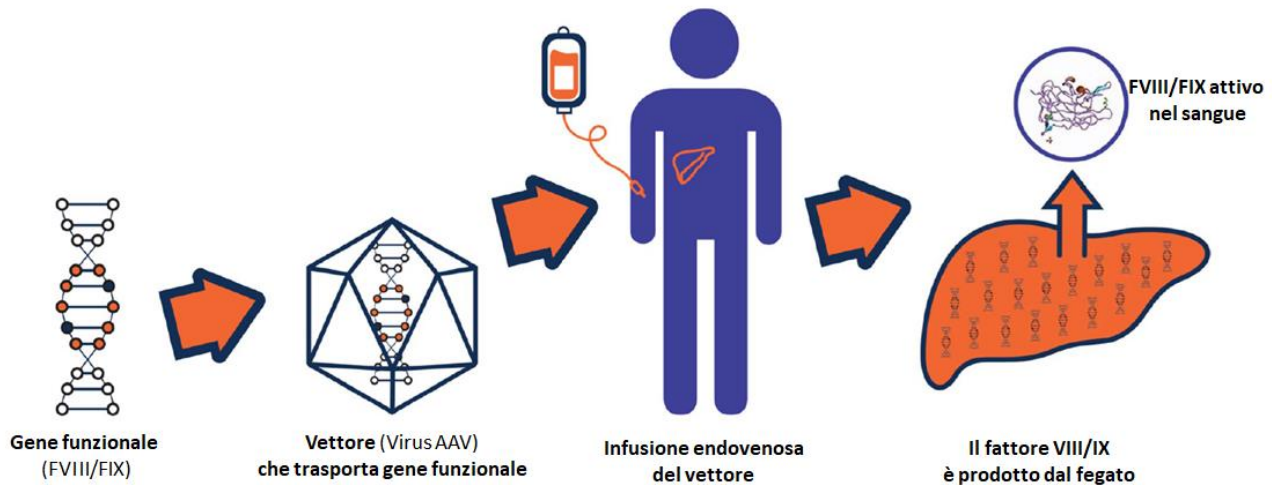
Il gene alterato non viene sostituito o modificato, ma se ne introduce nell'organismo una nuova copia funzionante, che va a collocarsi all'interno delle cellule del fegato, dove guiderà la produzione del FVIII o del FIX. Questa caratteristica non viene trasmessa alle generazioni future.

Come funziona la terapia genica al momento disponibile per l'emofilia?

Il vettore virale AAV modificato, contenente la copia funzionante del gene del FVIII o FIX, viene introdotto nell'organismo di un soggetto affetto da emofilia A o B mediante una singola infusione endovenosa. Il vettore AAV trasporterà il gene alle cellule del fegato che useranno l'informazione in esso contenuta per produrre il fattore FVIII o il FIX (Fig. 3).

L'obiettivo è quello di aumentare i livelli di FVIII/IX nel sangue, migliorando la funzionalità del processo coagulativo e riducendo frequenza, durata e gravità dei sanguinamenti.

FIGURA 4



Modificato da Hart et al. *Orphanet J Rare Dis* (2021)

COME FUNZIONA LA TERAPIA GENICA PER L'EMOFILIA AL MOMENTO DISPONIBILE SUL MERCATO?



- 1) La terapia genica inizia con la creazione di una copia corretta del gene alterato (FVIII/IX) che è alla base del difetto



- 2) Il nuovo gene funzionale è inserito in un vettore, che può essere considerato come una busta che indirizza il gene nel posto corretto del corpo



- 3) Il vettore può essere creato modificando un virus naturale. Il virus è scelto come vettore perché è capace di entrare nel corpo e nelle cellule. Il virus usato per la terapia genica dell'Emofilia è chiamato virus adeno-associato (o AAV) scelto perché non associato a malattie nell'uomo ed in grado di entrare nelle cellule del fegato. Il virus prima di essere infuso è modificato, togliendo i geni virali ed inserendo il gene terapeutico



- 4) Il vettore entra nel corpo mediante un'infusione endovenosa e trasporta il gene funzionale alle cellule del fegato penetrando nel suo nucleo.



- 5) Arrivato nel nucleo, il gene funzionante ha la capacità di far produrre il FVIII/FIX. Una volta nella cellula il resto del vettore è degradato lasciando solo la copia del gene.

Allegato 2

INFORMAZIONI AGGIUNTIVE SU EPATOTOSSICITA' ASSOCIATA A TERAPIA GENICA DELL' EMOFILIA A E B

L'epatotossicità può essere distinta in epatotossicità acuta (a breve termine) e cronica (persistente nel tempo). Come in tutte le epatopatie farmaco-indotte [Drug-induced Liver Injury, DILI] può essere distinta in epato-cellulare, avente come marcatori principali le transaminasi (ALT e AST), colestatica (marcatori: gamma-glutamilttransferasi, fosfatasi alcalina, bilirubina), mista. Utile considerare anche i potenziali danni macro e micro-vascolari.

EPATOTOSSICITA' ACUTA

Nei trial di fase 3 i cui risultati sono al momento disponibili un' epatotossicità acuta è stata maggiormente osservata nei pazienti con emofilia A, rispetto a pazienti affetti da emofilia B. Globalmente è stato registrato un aumento delle transaminasi che coinvolge fino a un massimo del 85,8% dei pazienti con emofilia A inclusi nello studio, anche se valori più di 5 volte maggiori il limite superiore della norma sono stati osservati solo nel 9% dei pazienti arruolati; un aumento degli indici di colestasi fino a un massimo di più di 5 volte più elevati, rispetto ai valori massimi di normalità, è stato osservato nel 9% dei pazienti; un aumento dei livelli di bilirubina, fino a un massimo compreso tra 1,5-3 volte i valori superiori della norma è stato osservato nel 4% dei pazienti in studio. Nel complesso, i dati attualmente disponibili non consentono, dunque, di valutare la reale incidenza di tossicità acuta epatocellulare o mista (epato-cellulare e colestatica). In nessun caso sono stati, tuttavia, descritti danni di natura vascolare. È importante, inoltre, notare che nessun caso di danno epatico acuto è stato associato a insufficienza d'organo. In ogni caso, l'utilizzo della terapia steroidea per fronteggiare il danno epatico acuto sarebbe giustificato qualora indotto dalla attivazione della risposta immunitaria capace di determinare un effetto citotossico. Tuttavia, ad oggi, non vi sono dati sufficienti per fornire precise indicazioni circa la dose e la durata più opportuna del trattamento con steroidi. Va, inoltre, tenuto presente che la risposta alla terapia steroidea in termini di valori di transaminasi e/o indici di colestasi è molto eterogenea potendo essere nulla, parziale o completa e variabile da paziente a paziente. Pertanto, il ricorso alla terapia steroidea non trova una precisa motivazione epatologica se non in casi selezionati e comunque in accordo con l'ematologo. Ciononostante, la terapia steroidea può essere considerata per modulare la risposta immunitaria ed è tesa a preservare l'espressione del transgene, come ad oggi riportato nelle schede tecniche dei prodotti per la terapia genica dell'emofilia A e B.

EPATOTOSSICITA' CRONICA

Tale tipo di epatotossicità classicamente si dimostra con il riscontro di un danno persistente evidenziabile mediante test biochimici eseguiti almeno ogni 6 mesi (transaminasi e indici di colestasi misurati per almeno 3 volte consecutive ogni 2 mesi) e/o danno istologico da fibrosi e/o alterazioni vascolari, evidenziabili mediante fibroscan o, in

casi selezionati, biopsia epatica da eseguirsi con frequenza da determinarsi caso per caso. A lungo termine, le complicanze di una epatopatia cronica possono essere: fibrosi avanzata/cirrosi e relative complicanze da ipertensione portale, carcinoma epato-cellulare (HCC), malattia colestatica cronica, malattia vascolare, insufficienza epatica.

Ad oggi, i trial di terapia genica in emofilici B hanno raggiunto un follow-up massimo di 12 anni, mentre per gli emofilici A la durata del follow-up è stata di e 6 anni. In questo arco temporale sono stati registrati incrementi delle transaminasi epatiche (specie ALT) rispetto al valore basale fino a un massimo di 85.5% di pazienti per emofilia A e 40,4% per emofilia B. È stato inoltre registrato un solo caso di HCC a un anno dalla infusione della terapia genica in un paziente con emofilia B. Da notare che il nesso di causalità di questo unico caso è stato giudicato improbabile basandosi su studi di analisi genetica e fattori di rischio preesistenti.