

Maßgeschneiderte Medizin durch genetische Ansätze in der Hämostaseologie

Werner Streif MD

Medizinische Universität Innsbruck (MUI)

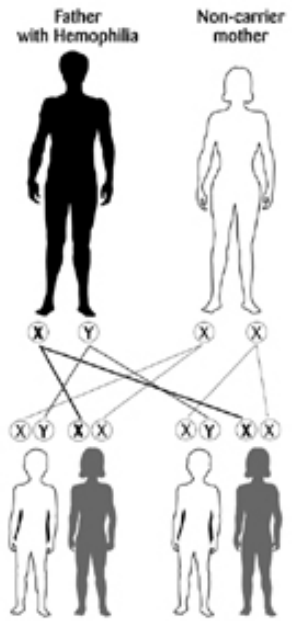
Department für Kinder- und Jugendheilkunde



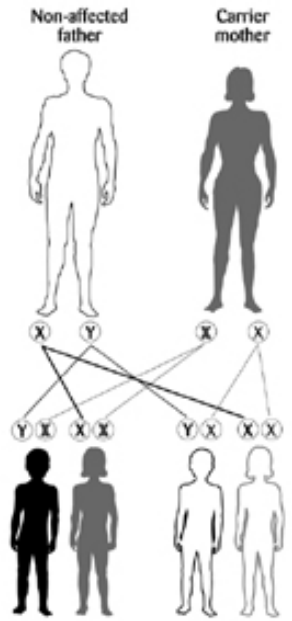
MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT
INNSBRUCK

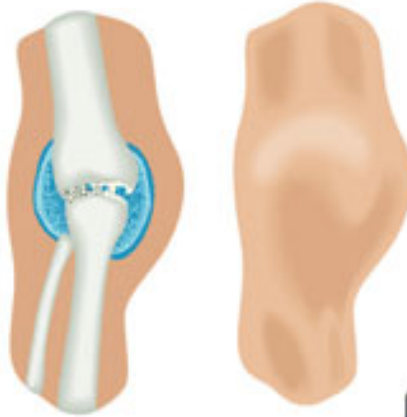
- Präsymptomatische Risikoeinschätzung für frühe Intervention
- Diagnose
 - Bestätigung einer klinischen Diagnose
 - „One-Stop“ Diagnose
 - Bestätigung einer familiären/ angeborenen Erkrankung
- Erklärung für klinische Ereignisse
- Prognose Einschätzung
 - Assoziierte Erkrankungen/ Vorsorge
- Familienplanung und pränatale Diagnostik
- Gezielte/ personalisierte Behandlung
- Pharmakogenomik

Father with hemophilia

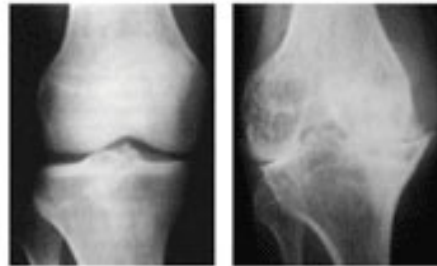


Mother carrying hemophilia gene

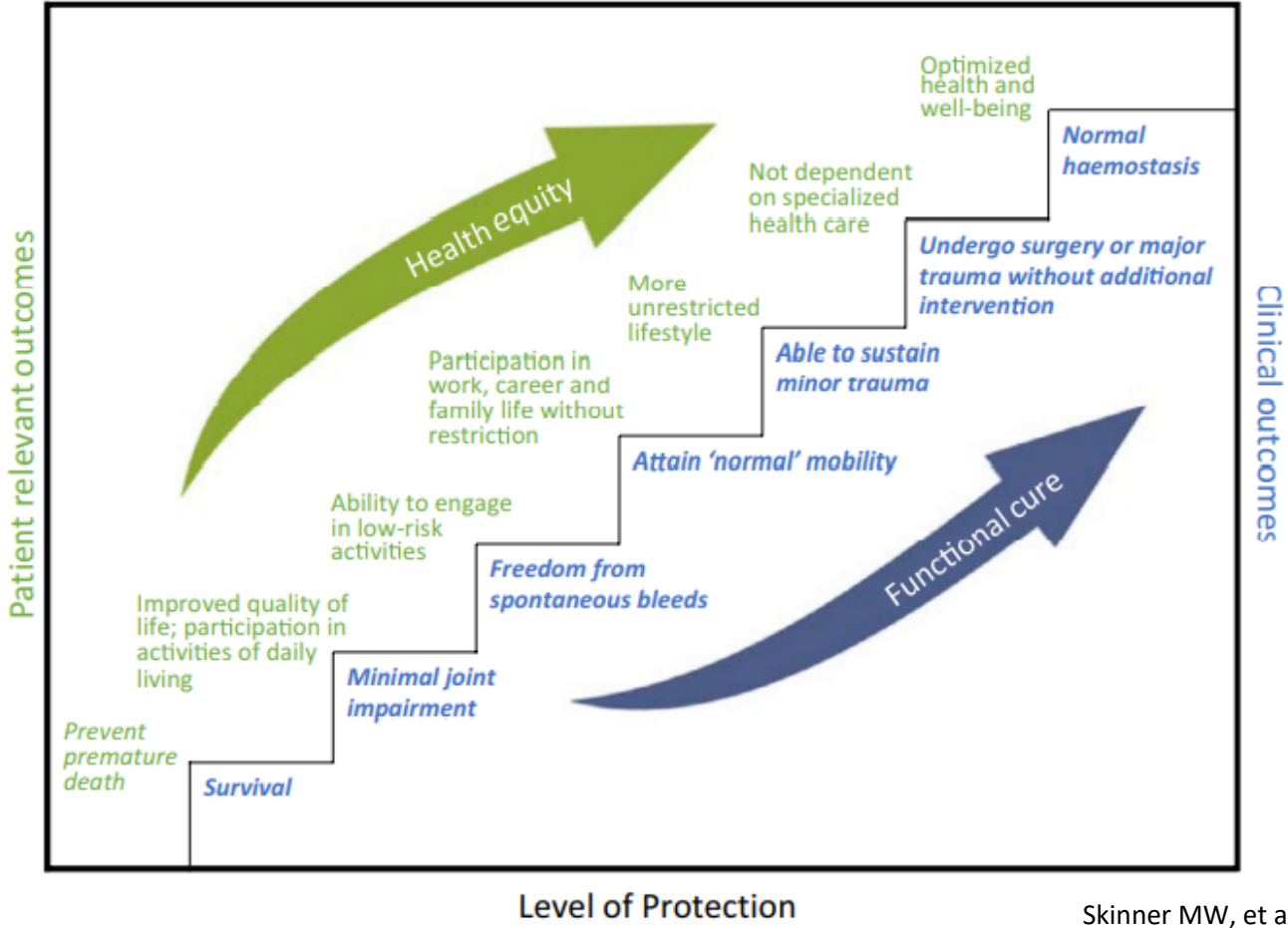




2



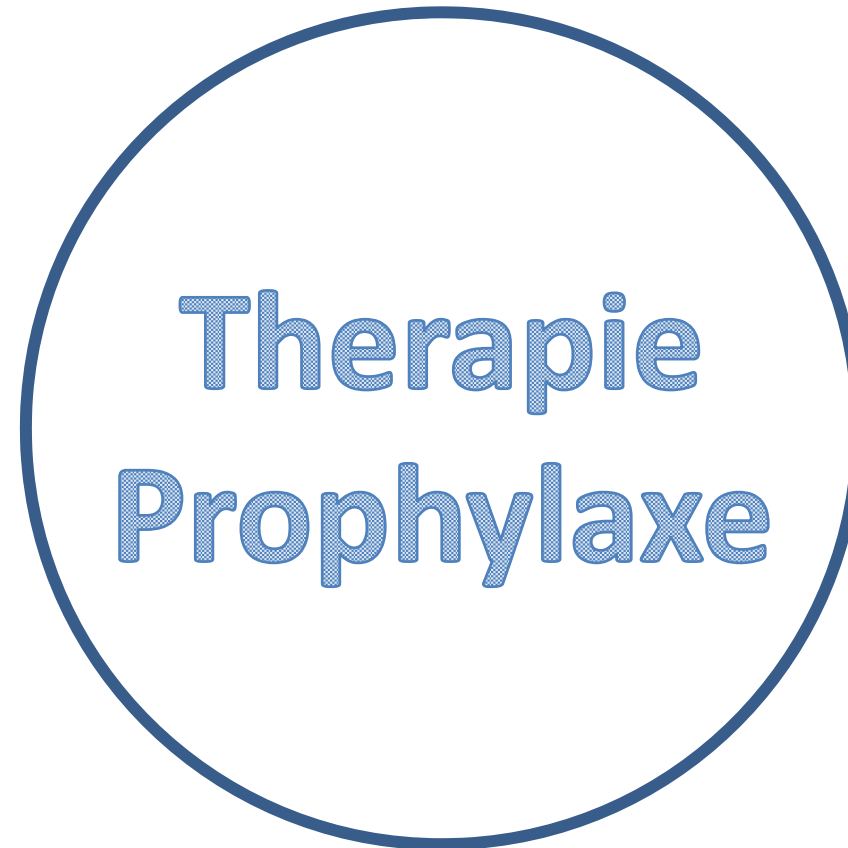
Therapieziele



Skinner MW, et al. Haemophilia. 2020

Wirksamkeit

Verfügbarkeit



Anwendung
Praktikabilität

Sicherheit/ Nebenwirkungen

Wirksamkeit

Blutungen behandeln und verhindern

Therapie
Prophylaxe

Anwendung
Praktikabilität

Verfügbarkeit

Hemmkörper vermeiden

Sicherheit/ Nebenwirkungen

Todesursachen

7386 schwere Hämophile A
13 Jahre Beobachtung

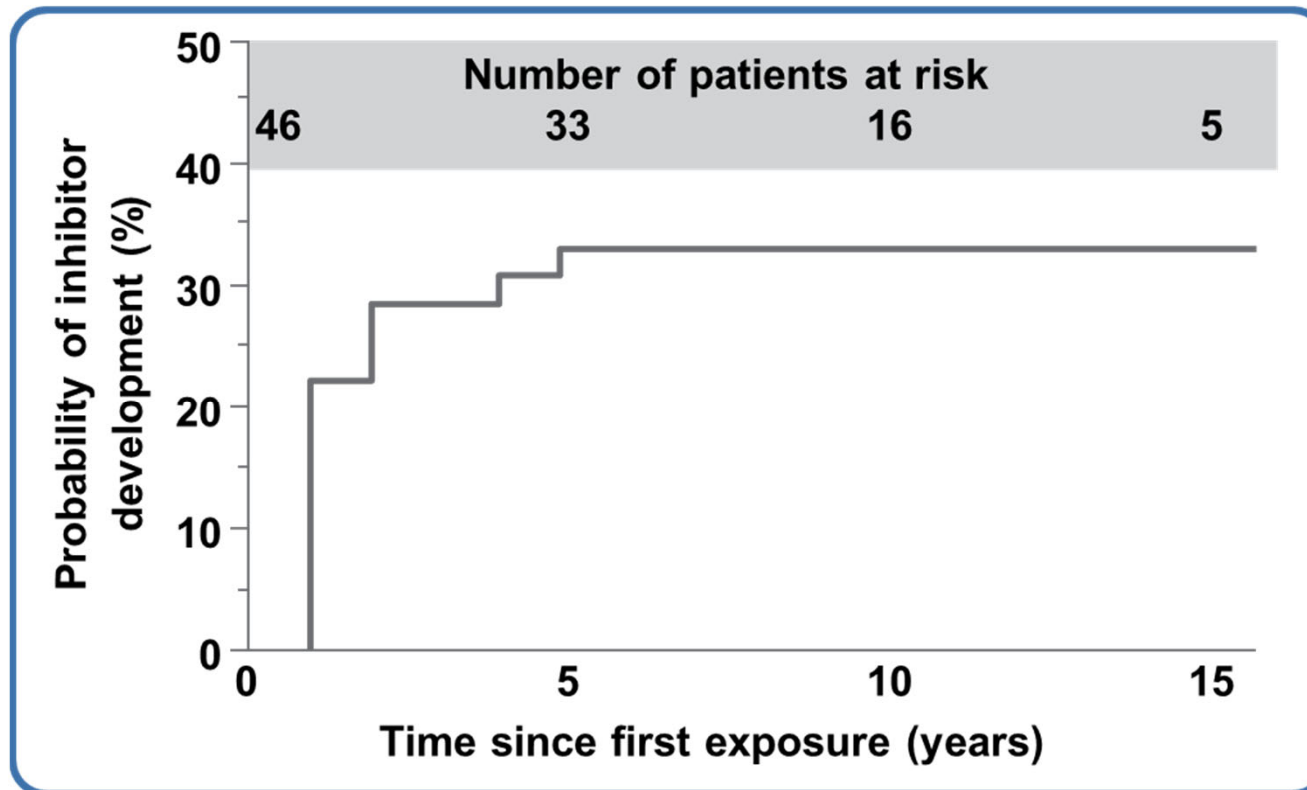
432 Todesfälle

41,7% mit Hämophilie und Inhibitoren assoziiert
12% mit Hämophilie ohne Inhibitoren assoziiert

$P < 0,001$

OR 1,7 (95% CI 1,2 – 2,5)

> 30% aller schweren Hämophilen entwickeln Alloantikörper gegen Faktor VIII



Schweregrad
Mutation

Genetik

Polymorphismen
Thrombozytäre Faktoren
Familienanamnese

Umwelt

Hemmkörper

Therapie

Immunologische Herausforderung

Immunisierung
Infektion
Chirurgie
Schwere Blutung

Präparat / Therapie
Behandlungsintensität /-regime

HK-Prävalenz

100

Mehrere Domänen

88%

75

Große Deletionen

41%

50

Einzelne Domänen

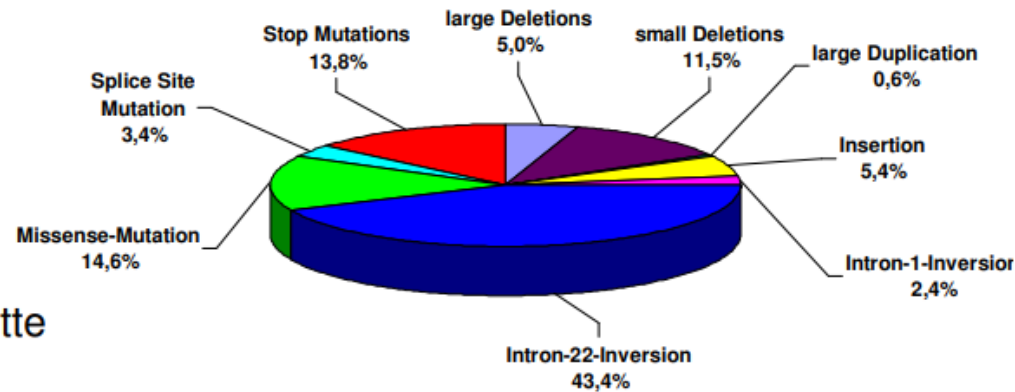
25%

25

0

Mutationstyp und Hemmkörperprävalenz n = 1068 (mit Hemmkörper n=188)

Severe Haemophilia A, n = 892, inh. 202 (22,5%)



Leichte Kette
40%

Nonsense

31%

Intron 22 Inversionen

21%

Non A-Run

21%

Kleine Deletionen

16%

C1-C2

10%

Missense

5%

Non C1-C2

3%

Splice site

3%

Schwere Kette
17%

A-Run
3%



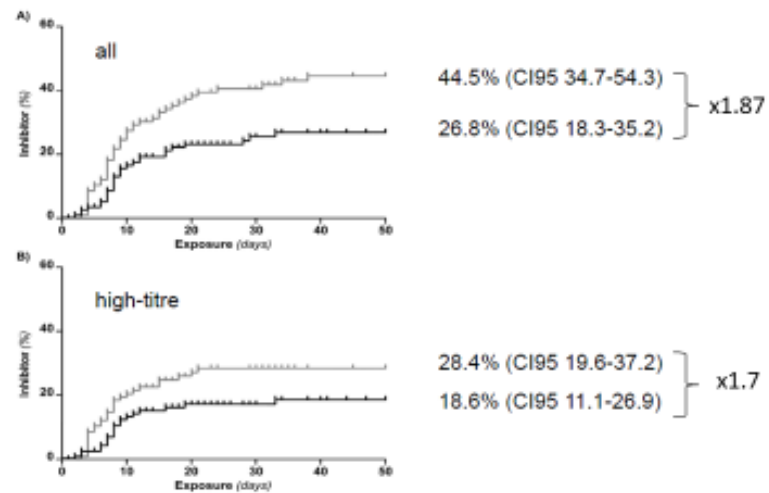
A Randomized Trial of Factor VIII and Neutralizing Antibodies in Hemophilia A

N Engl J Med 2016; 374:2054-2064

The SIPPET Study

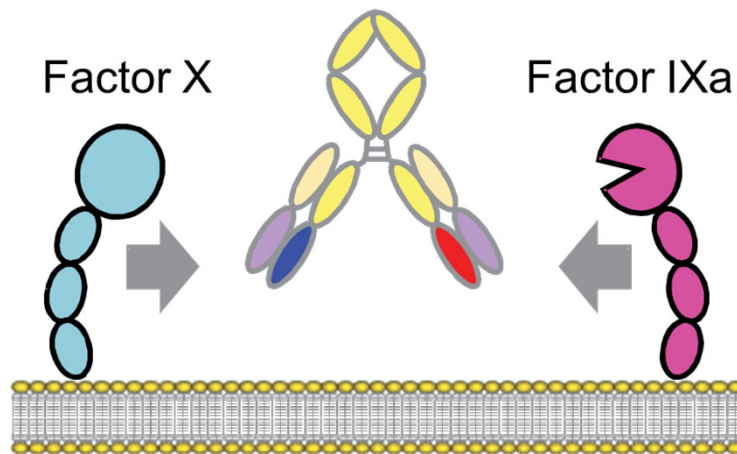
Survey of Inhibitors in Plasma-Product Exposed Toddlers

CUMULATIVE INCIDENCE BY ARM



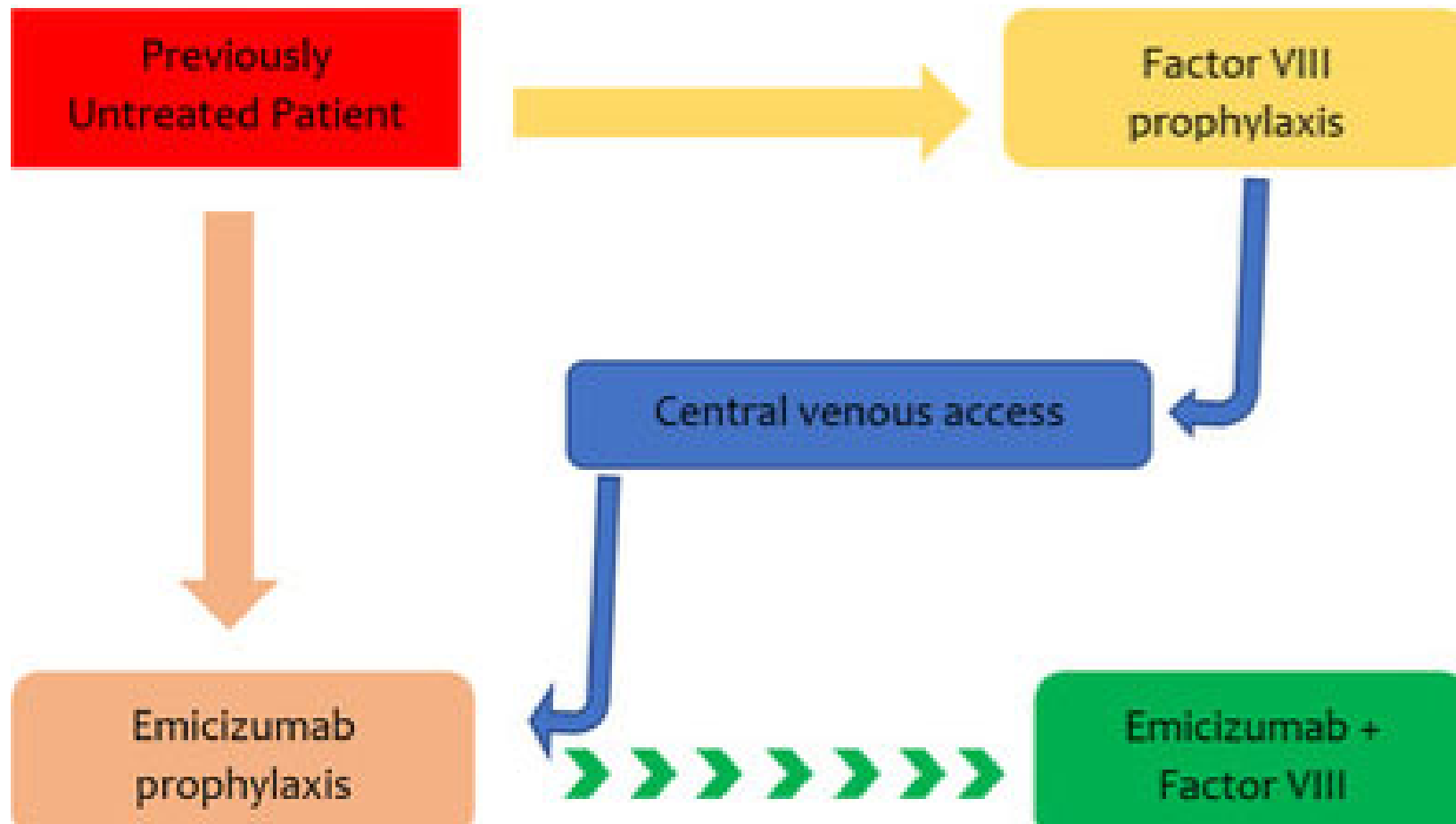
2019

Emicizumab

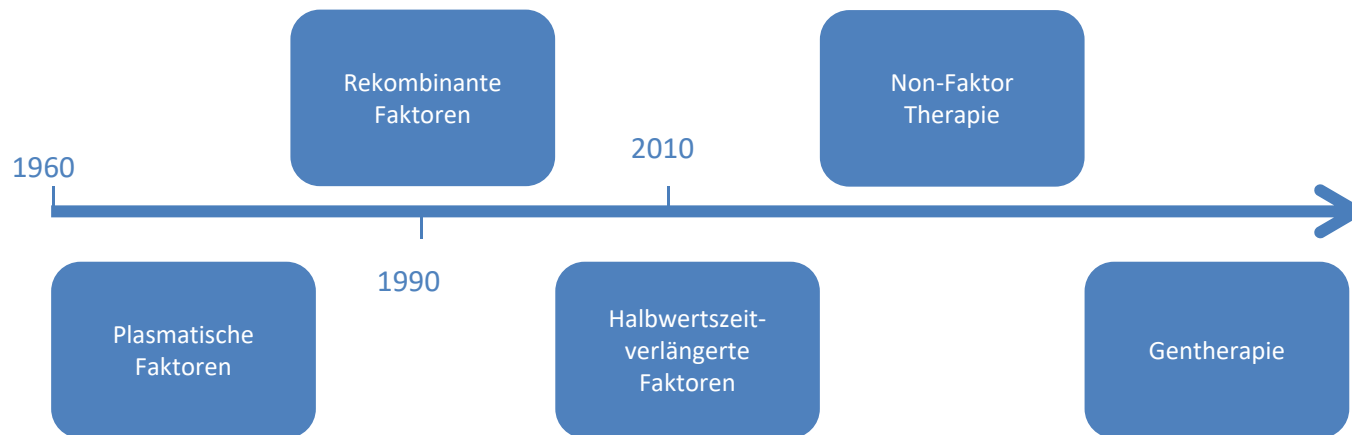


- Humanized bispecific monoclonal antibody¹
- Bridges activated factor IX (FIXa) and FX to restore function of missing FVIIIa¹
- No structural homology to FVIII, so not expected to induce FVIII inhibitors or be affected by presence of FVIII inhibitors¹
- Approval in all ages with and without FVIII inhibitors

1. Kitazawa T, et al. Nat Med. 2012;18:1570-74; 2. HEMLIBRA (emicizumab-kxwh) [prescribing information]. 2018; 3. Young G, et al. Blood 2017;130 (Suppl 1):85; 4. Mahlangu J, et al. N Engl J Med. 2018; 379:811-22; 5. Pipe S, et al. WFH 2018 (abstract 861)



Entwicklung der Hämophiliebehandlung



Gentherapie

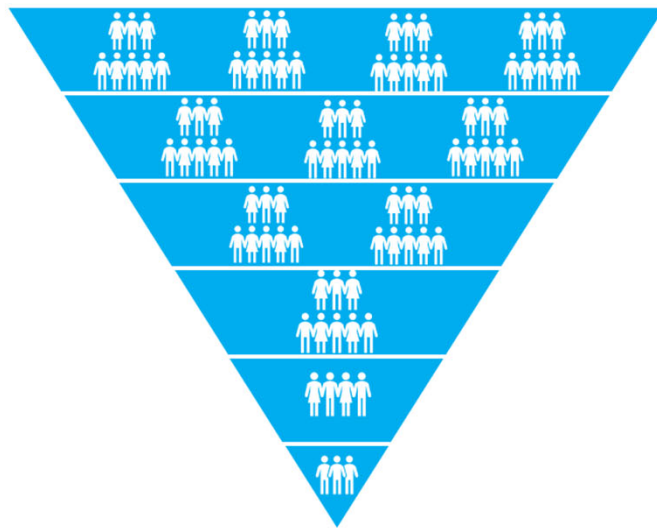
Ein Gentherapeutikum ist ein biologisches Arzneimittel, dessen Wirkstoff eine Nukleinsäure (Träger der Erbinformationen) enthält oder daraus besteht. Es wird eingesetzt, um eine Nukleinsäuresequenz zu regulieren, zu reparieren, zu ersetzen, hinzuzufügen oder zu entfernen. Die therapeutische, prophylaktische oder diagnostische Wirkung steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der rekombinanten Nukleinsäuresequenz, die es enthält oder mit dem Produkt, das auf Basis dieser genetischen Information gebildet wird.

Paul-Ehrlich-Institut



Bundesinstitut für Impfstoffe
und biomedizinische Arzneimittel

Auswahlkriterien/ Kontraindikationen



Factors that may impact eligibility for AAV gene therapy

Total population with genetic disease^{1,2}



Prior exposure to AAV^{*1,2}



antibodies

Disease progression¹



no inhibitor

Patient's age^{1,2}



no children

Comorbidities^{1,2}



liver disease; C₂-abusus

Eligible patient population



patients', expectations and consent

Die Leber als Zielorgan für die Hämophilie-Gentherapie

FVIII and FIX werden natürlich in der Leber produziert

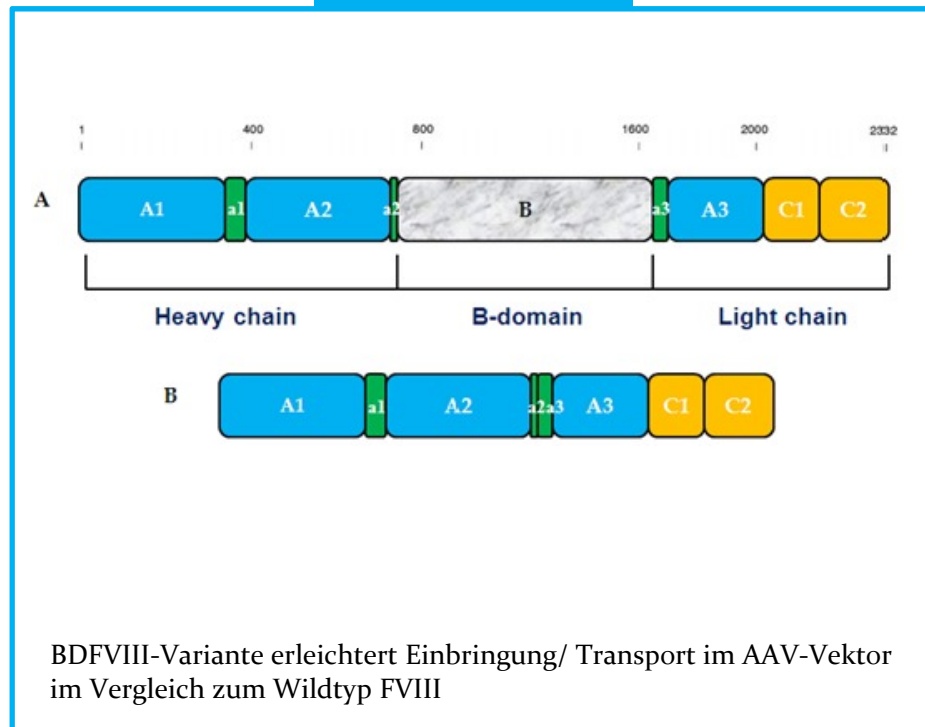
- FVIII wird von sinusoidalen Endothelzellen produziert
- FIX wird von Hepatozyten produziert



Anders als bei Kindern sind erwachsene post-mitotische Hepatozyten langlebig und teilen sich nicht

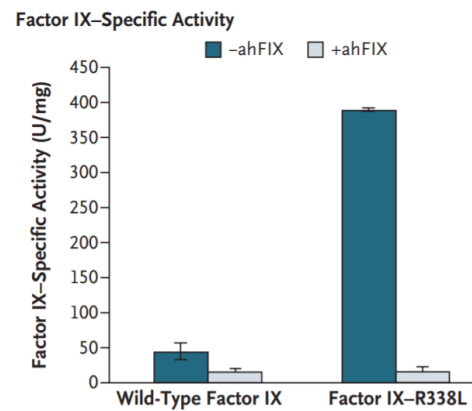
Spezifische AAV-Serotypen können die Transduktion der Leberzellen unterstützen (z.B. AAV₂, AAV₅, AAV₈ oder AAV₉³)

Hämophilie A B-domain deleted



Hämophilie B FIX Padua

Die R338L-Substitution verursacht eine gain-of-function-Mutation, die zu einem hyperfunktionalen Faktor IX Protein führt



Simioni et al., *NEJM* 2009; 361:1671-1675.

Padua-Variante zeigt eine ca. 8-fache Steigerung der spezifischen Aktivität im Vergleich zum Wildtyp FIX

Prinzip der Gentherapie: *in vivo*

- Ein funktionelles Gen (Transgen) wird in einem Transporter, sog. Vektor (viral oder nicht-viral), verpackt.
- Der Vektor wird *intravenös* verabreicht und gelangt zur Zielzelle (Leber)
- Sobald der Vektor *mit* dem Gen von der Zielzelle aufgenommen wurde, wird dieses Gen im Zellkern transkribiert und das therapeutisch notwendige Protein produziert

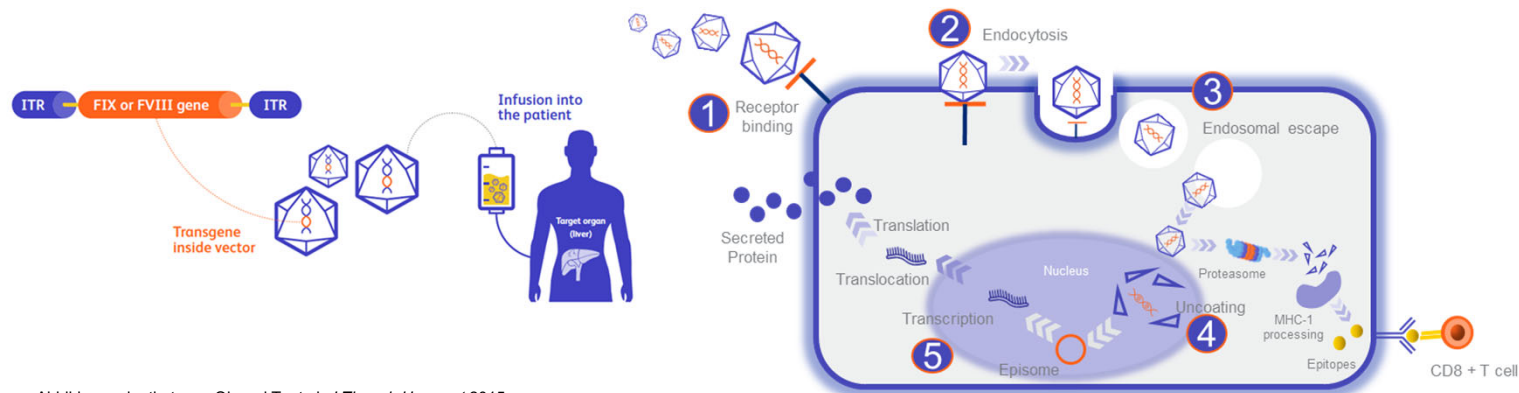
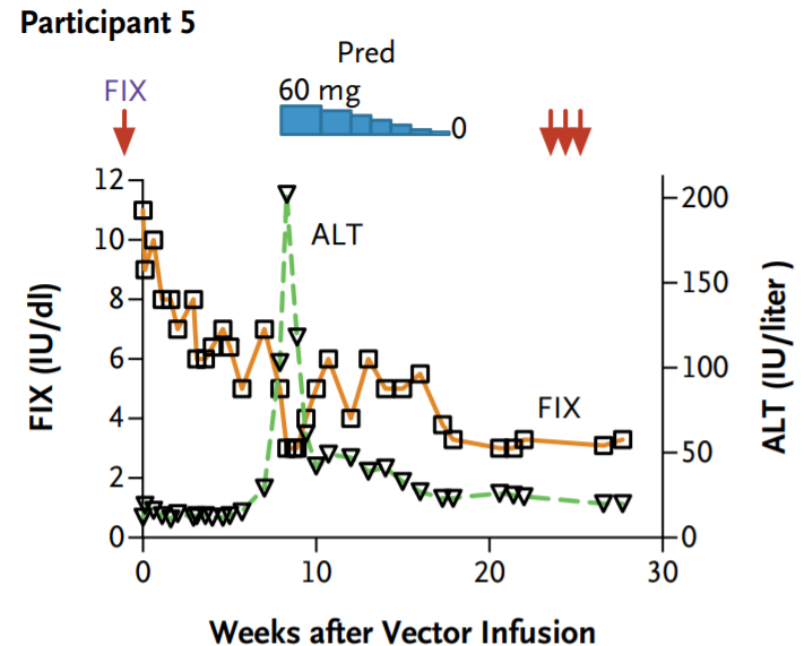


Abbildung adaptiert von: Ohmori T, et al. *J Thromb Haemost* 2015

Zelluläre Immunantwort bei GTx - Beispiel

- 17 Tage nach der letzten Infusion von FIX-Konzentrat lag der Plasma-FIX-Spiegel bei 7% der Normalwerte
- Nach 7 Wochen: starker **Anstieg der LFP** und **Rückgang der FIX-Werte** auf 3% der normalen Werte



Faktor IX-Spiegel

George et al.

Page 12

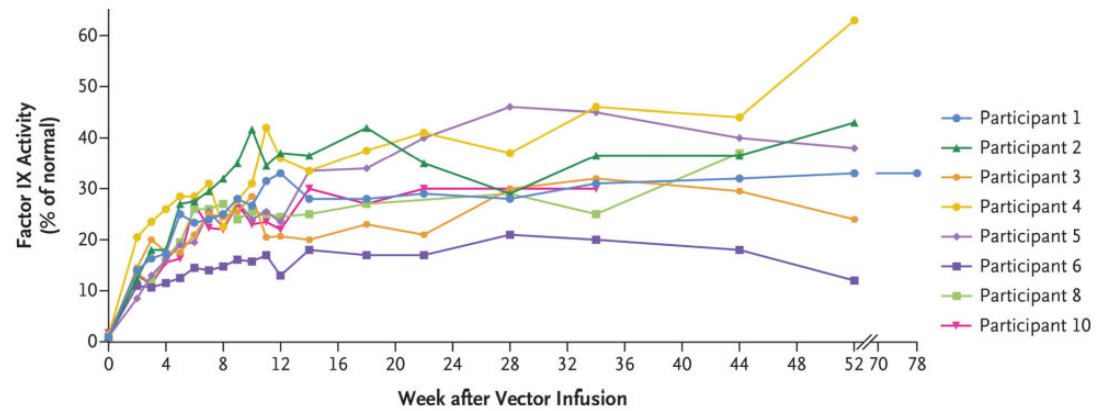
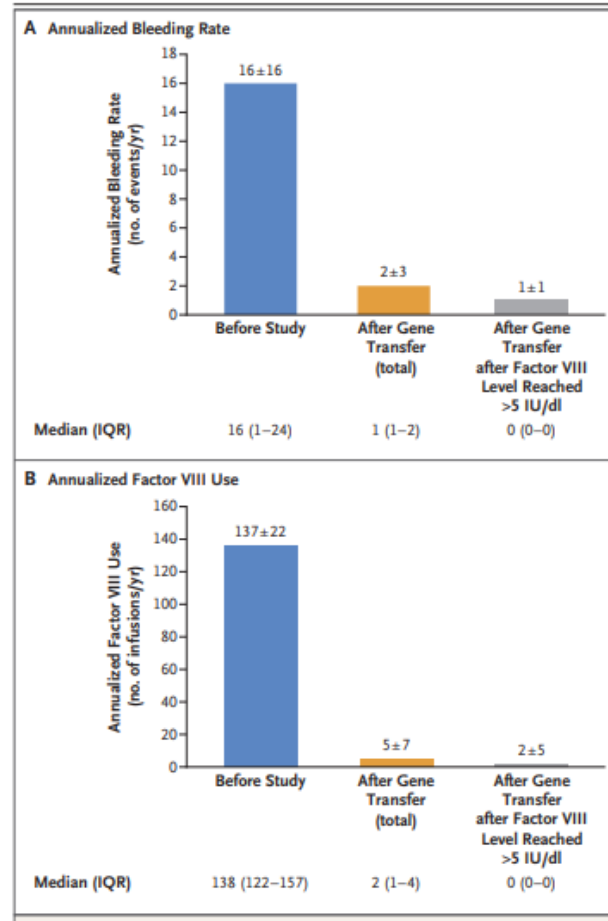
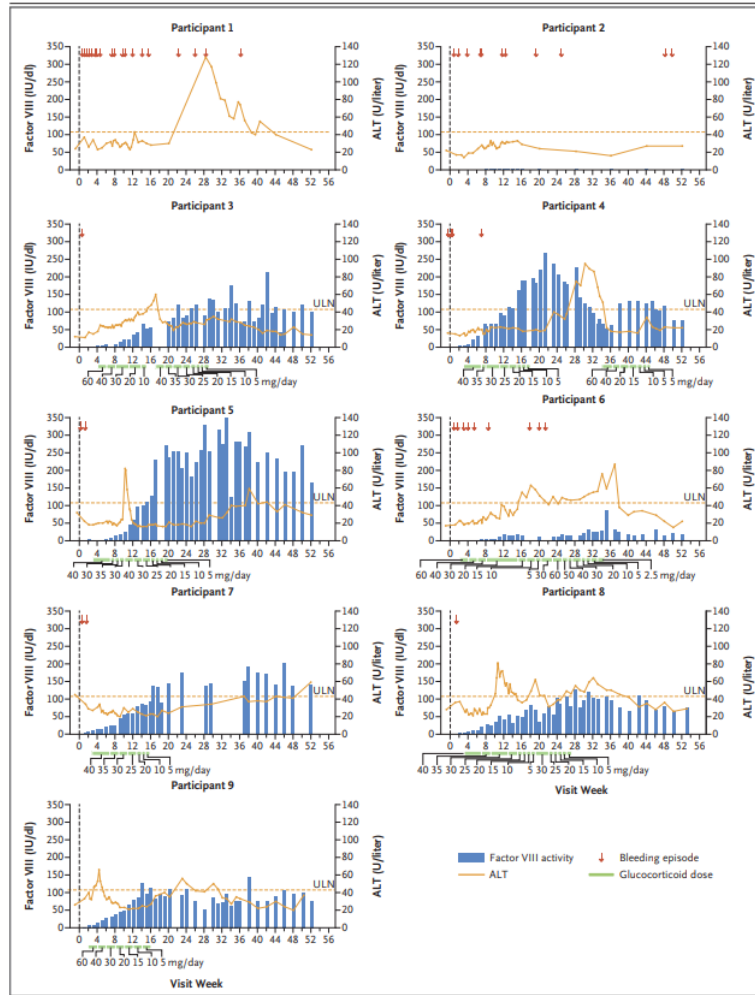


Figure 1. Factor IX Activity after One Peripheral Infusion of SPK-9001 in the Eight Participants Who Did Not Have an Adeno-Associated Viral Capsid-Directed Immune Response
The vector SPK-9001 was administered at a dose of 5×10^{11} vector genomes per kilogram of body weight.

George et al NEJM, 2017

Faktor VIII-Spiegel



Rangarajan *et al* NEJM, 2017

8/22

Valoctocogene roxaparvovec is an investigational AAV5 gene therapy for the treatment of severe hemophilia A. It has been approved for conditional use in the European Union and is marketed as **ROCTAVIAN™** (valoctocogene roxaparvovec).

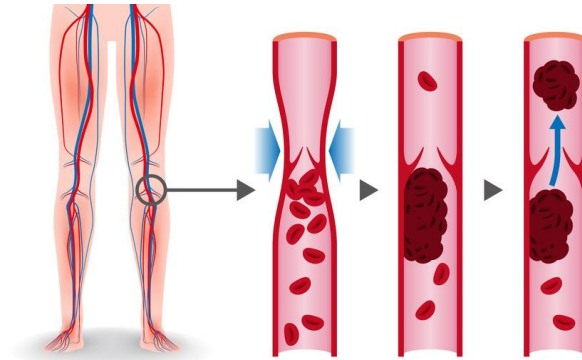
B:OMARIN®

1/23

First Gene Therapy for Hemophilia B, CSL's **HEMGENIX®**, Approved by the European Commission

CSL Behring

Rakim 13 Jahre



70kg 97P, 174cm 90P, BMI 1,85 kg/m² 90P, Puls 121, RR 119/71 mmHg, SO₂ 99%

- Gipsruhigstellung bei Außenknöchelfraktur
- Thrombose der Beckenbeinvenenstrombahn links bis in die Vena iliaca externa trotz adäquater Thromboseprophylaxe mit NMH
- Symptomatische zentrale Pulmonalarterienembolie

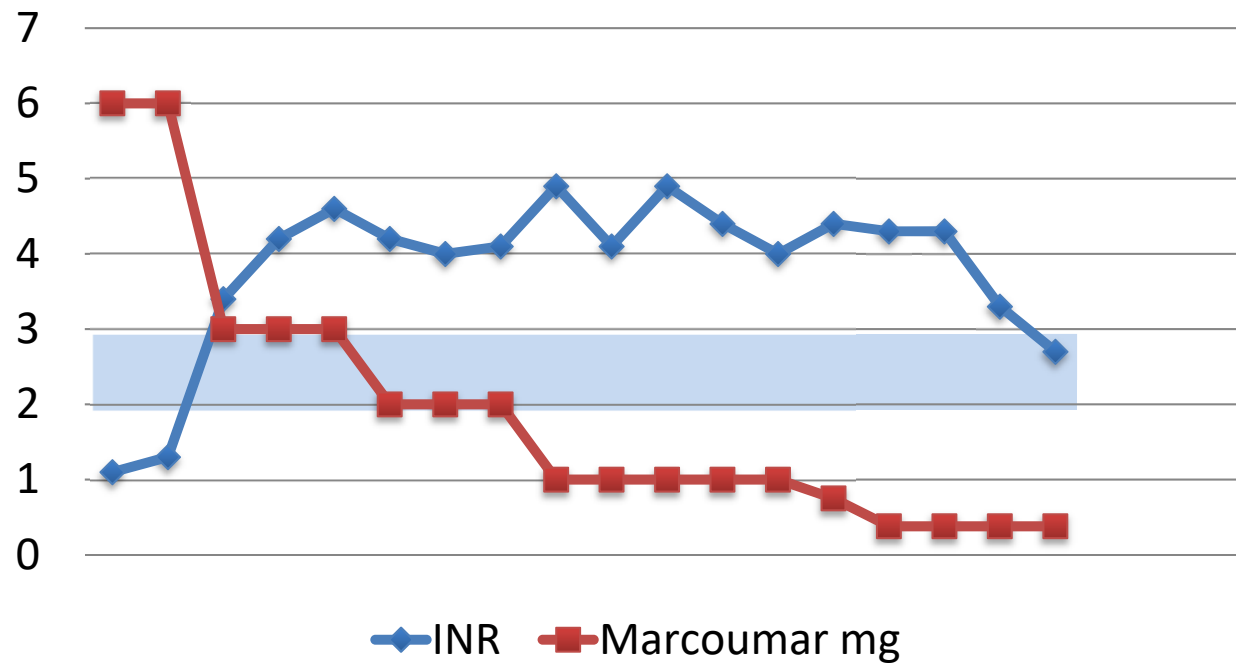
Initiale Therapie

UFH aPTT 1,5-2,0 x = 60-80sek

Bei erniedrigten AT-Werten (30%) und aPTT nicht im Zielbereich von 60-80 sek wiederholte AT-Gaben

Dosierung und INR

Ziel INR 2 - 3

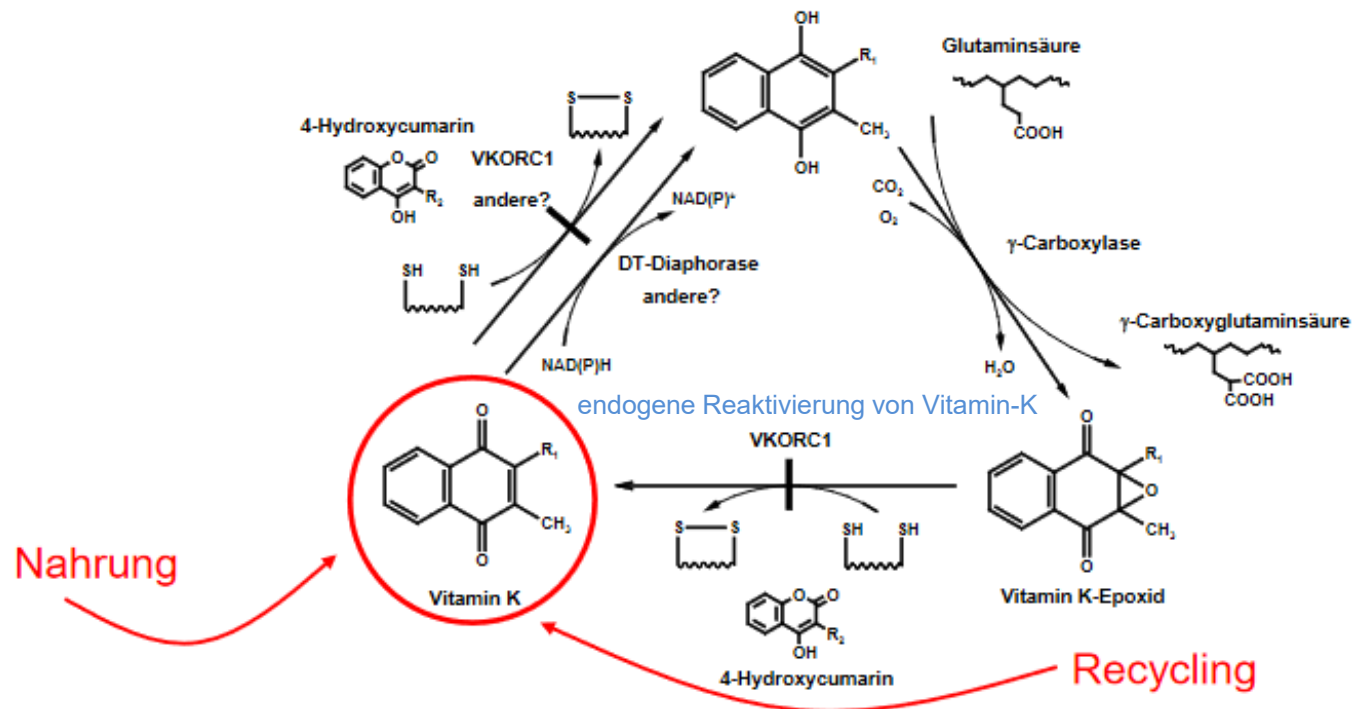


Vitamin K Gehalt von Nahrungsmitteln

- Grüne Gemüse (Grünkohl, Spinat) -700µg/100g
- Soja/Olivenöl 50-200µg/100g
- Käse 35-55µg/100g Menaquinone

- Aufgrund der hohen Variabilität keine Diät empfohlen

Therapieintensivierung mit VK-Antagonisten oder Heparin

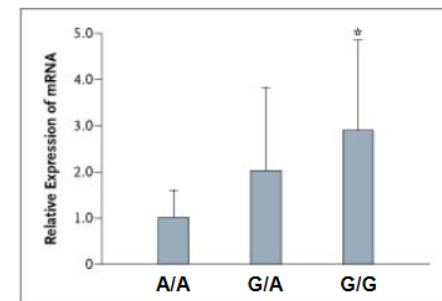


VKORC Polymorphismen und Mutationen

VKORC1 c.1639G>A

Häufigkeit G:A

Europäern	50:50
Ostasien	10:90
Afrika	90:10



Seltene Mutationen im VKORC1 Gen mit VKA-Resistenz

Insgesamt ca. 50% der Dosisvariabilität genetisch erklärbar

Polymorphismen in CYP 2C9 für Marcoumar (Phenprocoumon) nicht dosisentscheidend

**VKORC1 mRNA Konzentration in
humanem Lebergewebe**

Untersuchung:

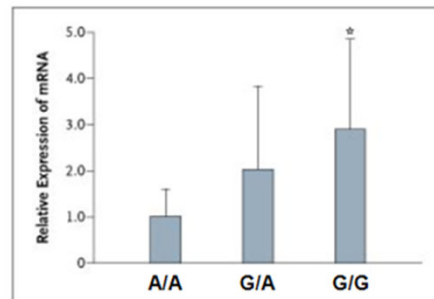
VKORC1 -1639G>A

Genotyp:

AA

Erläuterung:

Genotyp ist ein Hinweis für eine erhöhte Cumarin-Sensitivität (niedrigerer Cumarin-Bedarf).



**VKORC1 mRNA Konzentration in
humanem Lebergewebe**

Antithrombin Mutationsanalyse

Molekulare Diagnostik

Zuweisungsdiagnose: **Pulmonalembolie
Thrombose**

Material: Peripheres Blut

Serpin C1 Sequenzanalyse: Exon 1-7, Promotorregion, Exon/Intron Übergänge

Referenzsequenzen: NG_012462.1 NM_000488.3
Serpin C1 Mutationsdatenbank: www.biobase-international.com

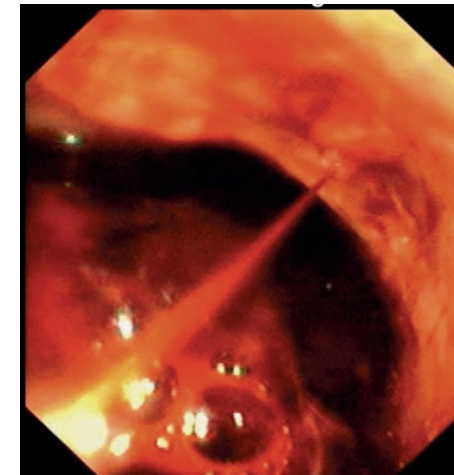
Untersuchungsmethode: direkte Sequenzierung der genomischen DNA (ABI Genetic Analyzer 3130xl);
HGVS Nomenklatur

Zusammenfassung:

Folgende Mutation, die in der Serpin C1 Mutationsdatenbank mit Antithrombin Mangel assoziiert ist, konnte nachgewiesen werden:

Exon 6: c.1189T>C, p.Ser397Pro in heterozygoter Form

Mukokutane Blutung



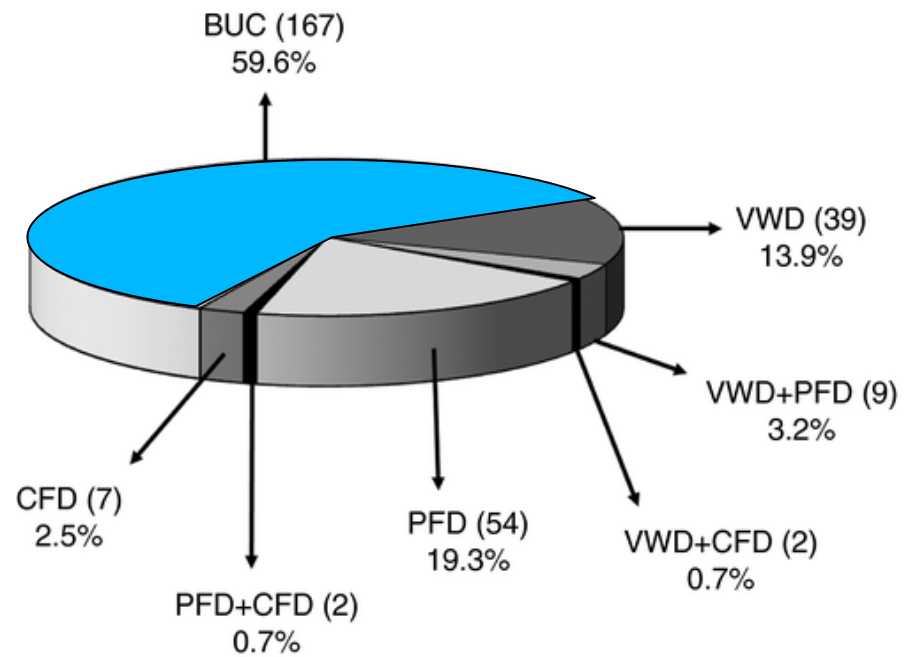
Diagnostic challenges of inherited mild bleeding disorders: a bait for poorly explored clinical and basic research

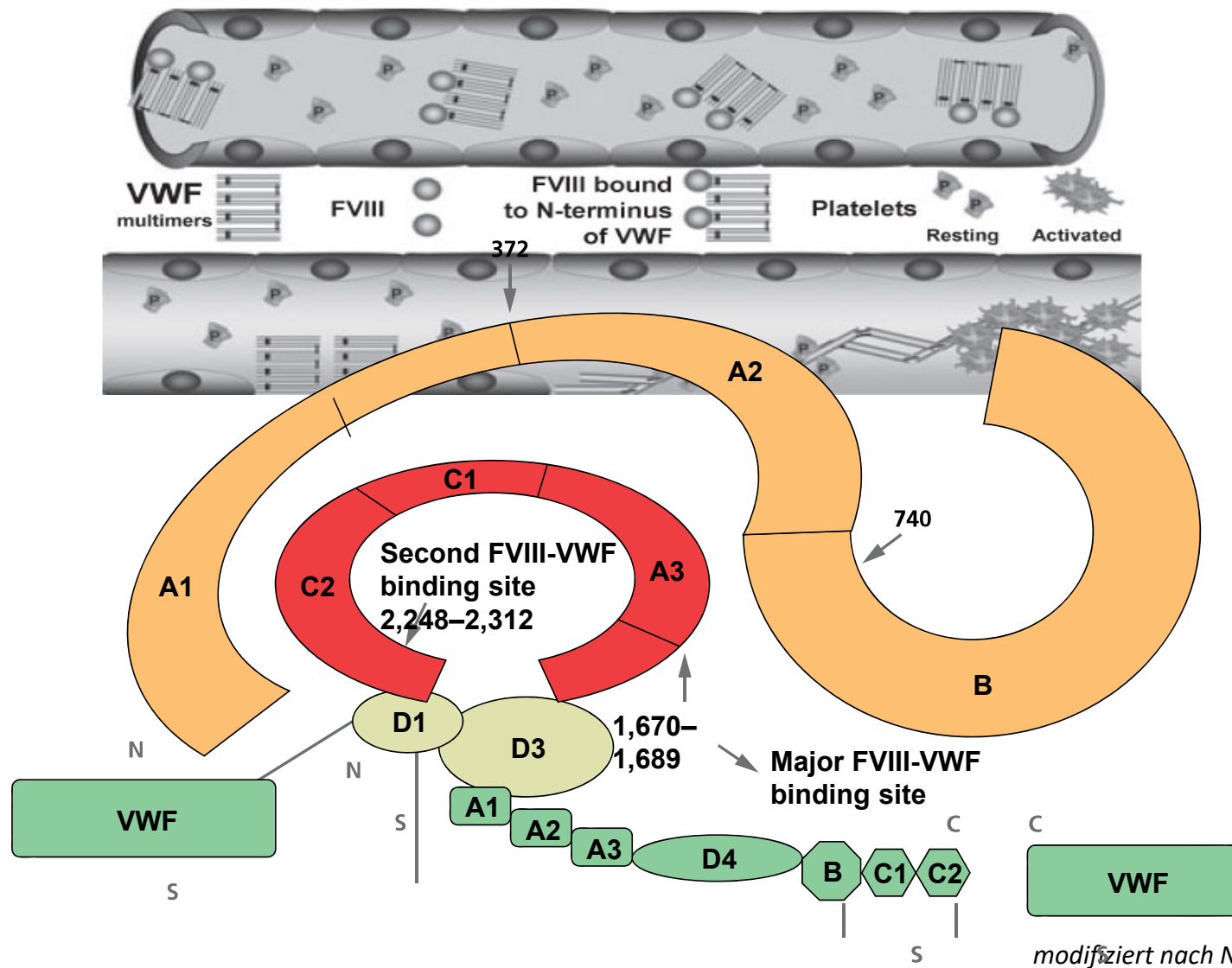
D. Mezzano, T. Quiroga

First published: 18 December 2018 | <https://doi.org/10.1111/jth.14363> | Cited by: 1

Manuscript handled by: F. R. Rosendaal
Final decision: F. R. Rosendaal, 5 December 2018

Mucocutaneous bleeding
mild bleeding
N = 220



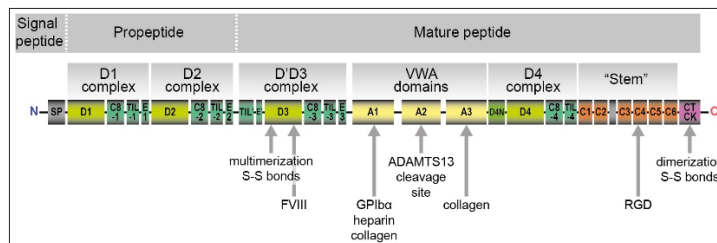


VWS Klassifikation

	Häufigkeit	Vererbung	Blutungsneigung
Quantitative Defekte			
Typ 1	60 – 90 %	a.d.	mild
Typ 3	< 1 – 2 %	a.r.	schwer
Qualitative Defekte			
Typ 2 Typ 2 A,B,M,C Typ 2 N	10 – 30 %	a.d. a.r.	variabel
PT-VWS	< 1 %	a.d	variabel

modifiziert nach Favaloro , Castamann und Schneppenheim

VWS Typ (1) und 2



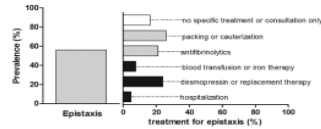
Klassifikation nach Blutungstyp (VWS Typ 1)

Klassifikation

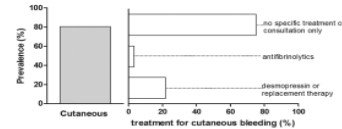
- Synthesestörung
- verminderte Aktivität
- beschleunigter Abbau (Clearance)

Bleeding spectrum in children with moderate or severe VWD

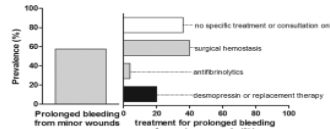
Epistaxis (60%)



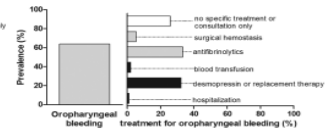
Cutaneous (80%)



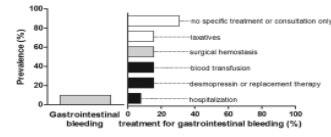
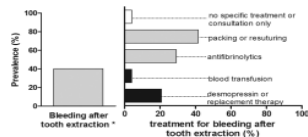
Prolonged bleeding after minor wound (60%)



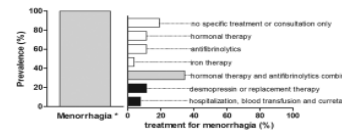
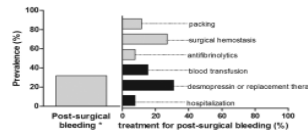
Oropharyngeal bleeding (65%)



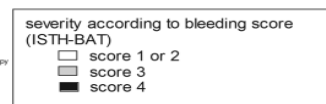
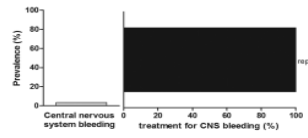
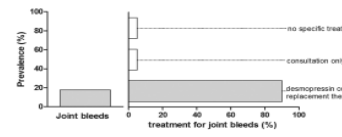
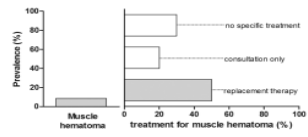
Bleeding after tooth extraction (40%)



Postsurgical bleeding (30%)



Menorrhagia (100%)



American Journal of Hematology

Volume 90, Issue 12, pages 1142-1148, 17 NOV 2015 DOI: 10.1002/ajh.24195

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajh.24195/full#ajh24195-fig-0001>

Physiologisch niedriger/hoher VWF

Neugeborene/Säuglinge	++
Mit höherem Alter	+
Schwangere	+++
Inflammation	++
Blutgruppe o	--
Ende der Regelblutung	-
Blutverlust	--
Hämodilution	- (-)

2,5% der Bevölkerung haben VWF:Ag < 50 E/dl
VWF = Akutphaseprotein

ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease

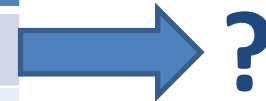
VWF- Thrombozytenbindungsaktivität

Name	Sensitivität/ Spezifität
VWF:RCoF	0,83 – 1,0 / 0,87 – 0,95
VWF:GPIbR	0,80 – 1,0 / 0,81 – 0,97
VWF:GPIbM	0,62 – 0,82 / 0,90 – 0,97

ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease

VWF- Thrombozytenbindungsaktivität

Name	Sensitivität/ Spezifität
VWF:RCoF	0,83 – 1,0 / 0,87 – 0,95
VWF:GPIbR	0,80 – 1,0 / 0,81 – 0,97
VWF:GPIbM	0,62 – 0,82 / 0,90 – 0,97



ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease

VWF- Thrombozytenbindungsaktivität

Name	Sensitivität/ Spezifität
VWF:RCoF	0,83 – 1,0 / 0,87 – 0,95

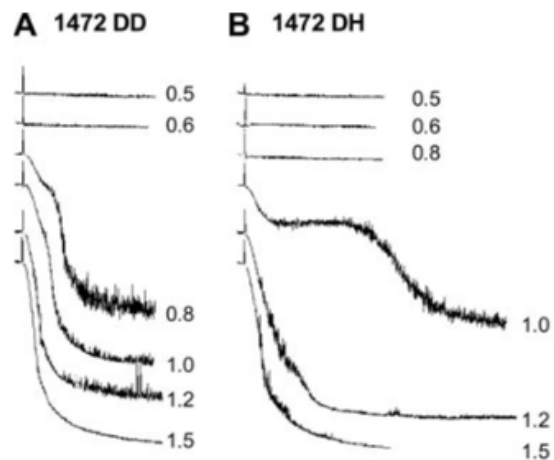
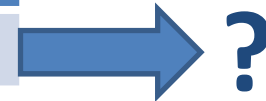
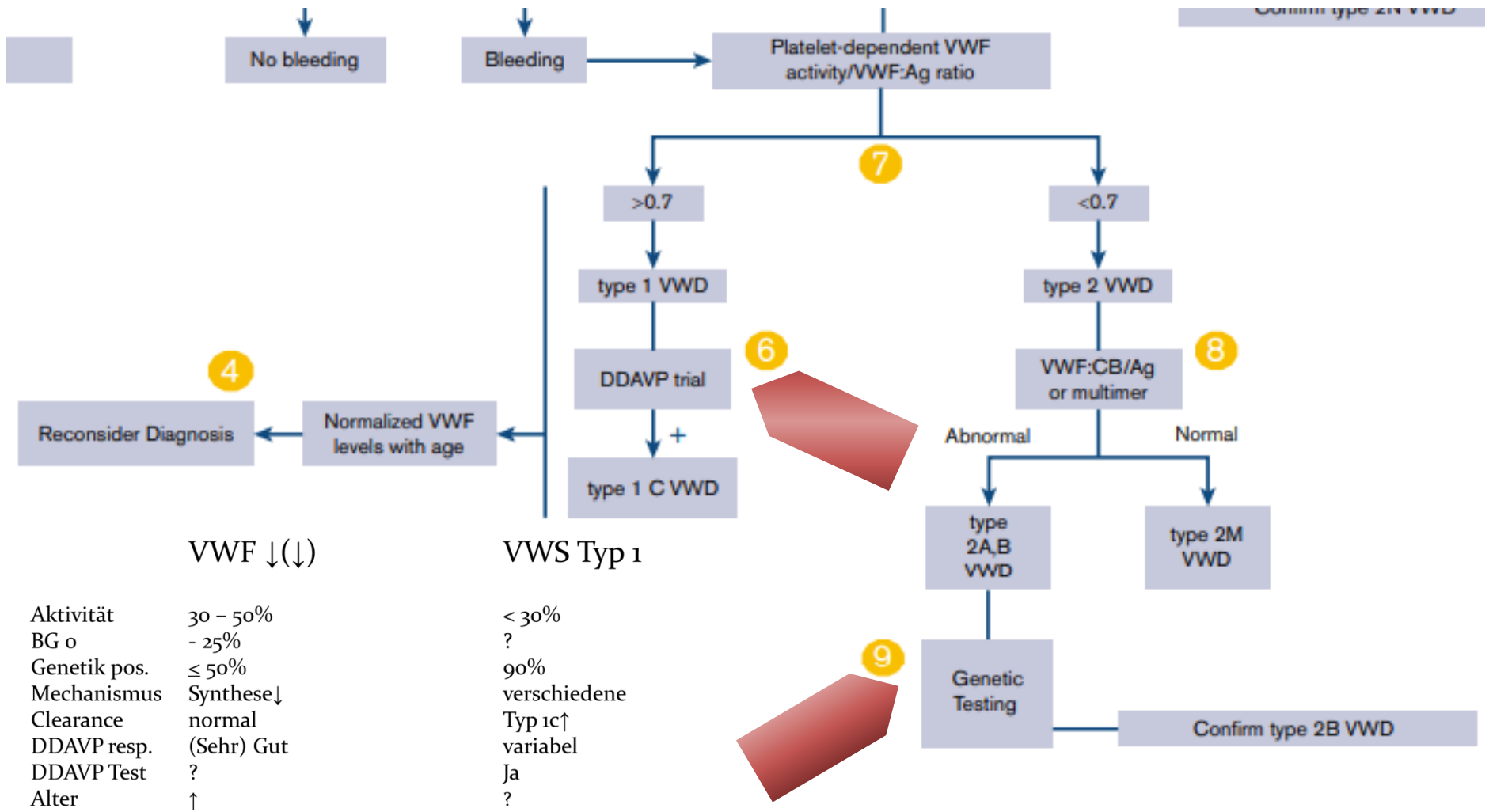


Figure 6. Ristocetin-induced platelet aggregation. Various concentrations of ristocetin were added to platelet-rich plasma from a control subject (A) and a subject heterozygous for the D1472H polymorphism (B).

- „Indirekte“ Messung der Aktivität
- Unpräzise bei niedriger Aktivität
- Bei D1472H Polymorphismus falsch niedrige Aktivität



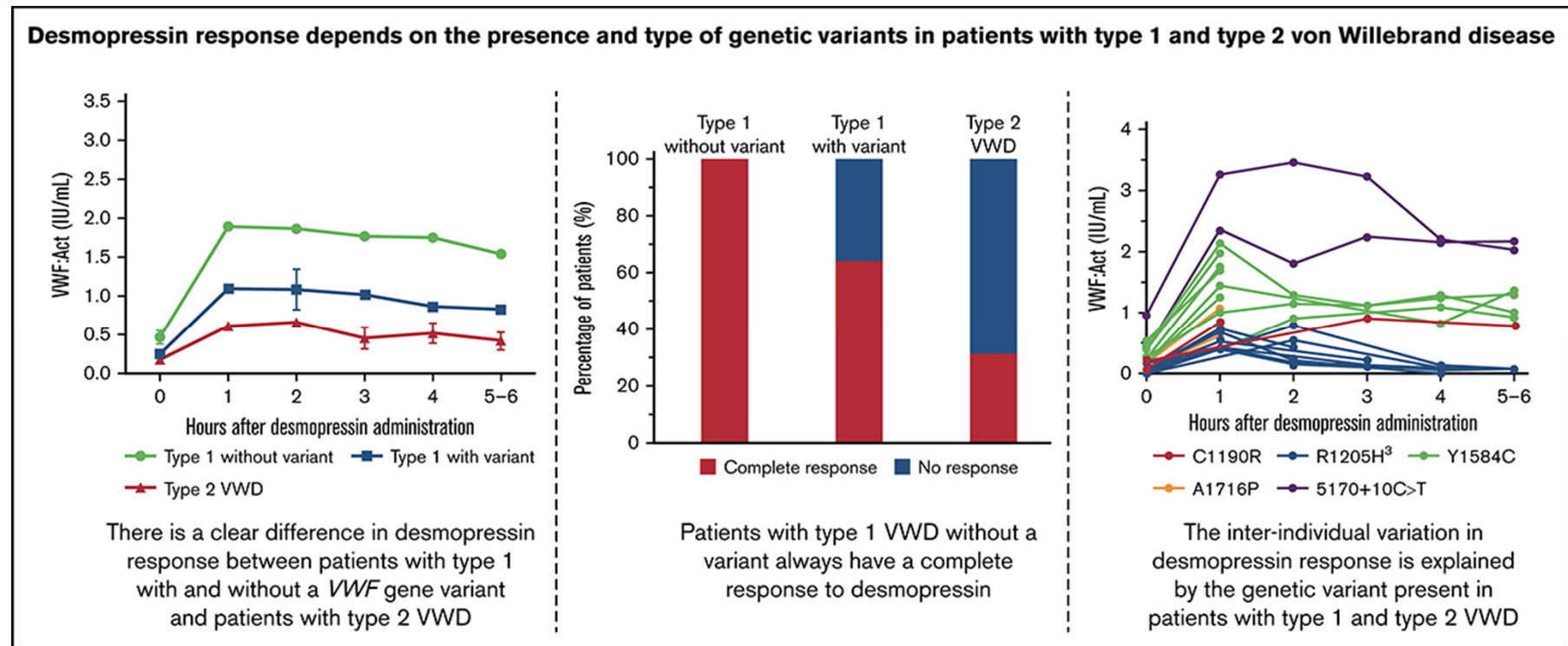
VWF ↓(↓)

Aktivität 30 - 50%
 BG o - 25%
 Genetik pos. ≤ 50%
 Mechanismus Synthese↓
 Clearance normal
 DDAVP resp. (Sehr) Gut
 DDAVP Test ?
 Alter ↑

VWS Typ 1

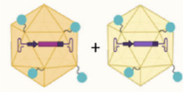
< 30%
 ?
 90%
 verschiedene
 Typ 1c↑
 variabel
 Ja
 ?

Desmopressin response depends on the presence and type of genetic variants in patients with type 1 and type 2 von Willebrand disease



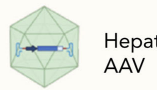
Genetic approaches

Somatic gene therapy



EC-specific dual-vector AAV + Lentivirus targeting ECs

- Expression of full-length VWF in ECs to ensure optimal multimerization
- All VWD-types, but absence of dominant-negative mutants in host cells is obligatory



Hepatocyte-specific AAV

- Expression of VWF D1-D2-D'-D3 fragment in hepatocytes to normalize FVIII levels
- VWD-type 2N & type 3

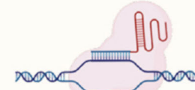
Transcriptional silencing



siRNA

- Silencing of mutant alleles
- All types of VWD

Gene editing

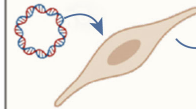


Crispr-Cas9
TALENs
Zinc-finger nucleases

- Mono-allelic gene editing for dominant-negative mutants
- Bi-allelic gene editing for recessive mutants
- All types of VWD

Cellular therapy

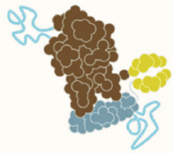
Ex vivo transfection or transduction of ECFCs



- Expression of full-length VWF in ECs to ensure optimal multimerization
- No co-multimerization with mutant VWF, but co-existence in circulation
- All types of VWD

Protein-based therapies

Compensating FVIII deficiency



BIVV001



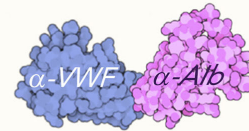
emicizumab

- BIVV001 is a FVIII-variant that circulates independently of endogenous VWF
- Emicizumab is a bispecific antibody mimicking FVIII-cofactor function & can be given subcutaneously
- VWD-type 2N and type 3

Increasing endogenous VWF levels



Interleukin-11



bispecific nanobodies

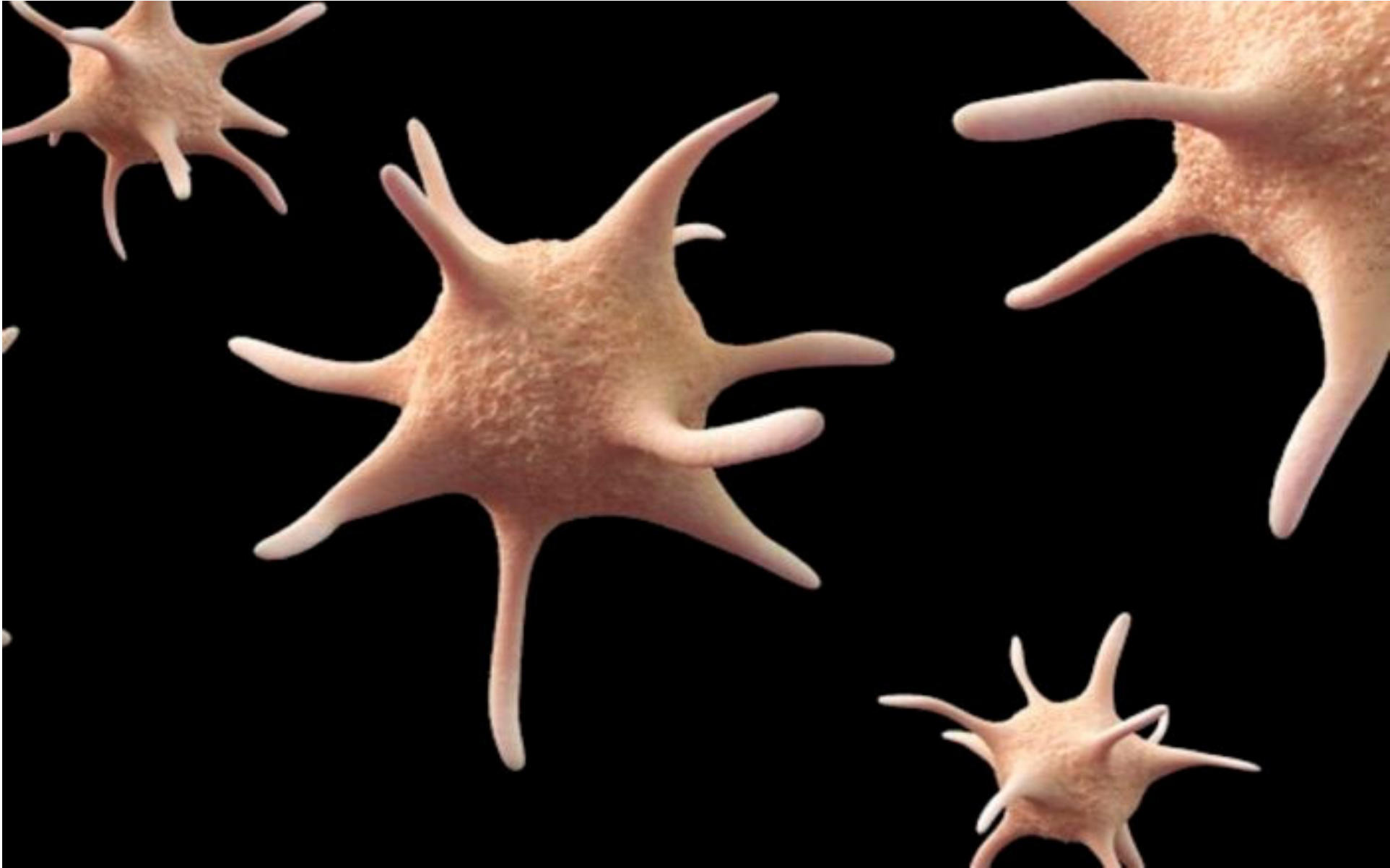
- IL-11 stimulates synthesis of VWF, resulting in a modest rise of VWF levels (1.1-1.5-fold)
- can be given subcutaneously
- Bispecific nanobodies may delay clearance of endogenous VWF & can be given subcutaneously
- VWD-type 1 and type 2M

Preventing excessive VWF degradation



Mab508

- Mab508 impairs VWF-ADAMTS13 interactions, thereby conserving high-molecular weight multimers
- VWD-type 2A (IIA)
- Acquired VWs-type 2A (including severe aortic stenosis, LVAD, ECMO,...)



Angeborene Störungen der Thrombozyten

„Klassische“ Plättchenfunktionsstörungen

TAG, BSS

Milde IPDs und ITs

Sekretionsdefekte

„unklare“ Thrombopenie

nicht klassifiziert

„Syndromale“ Plättchenfunktionsstörungen

MYH9: Prävention des Nierenversagens

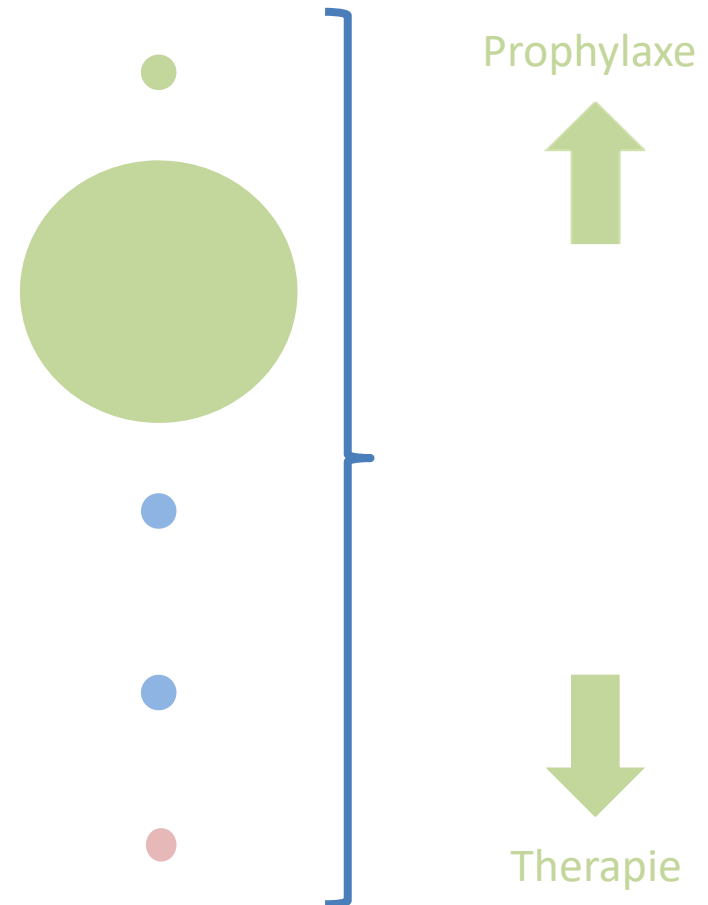
HPS: Prävention der Lungenfibrose

„Komplexe“ Erkrankungen

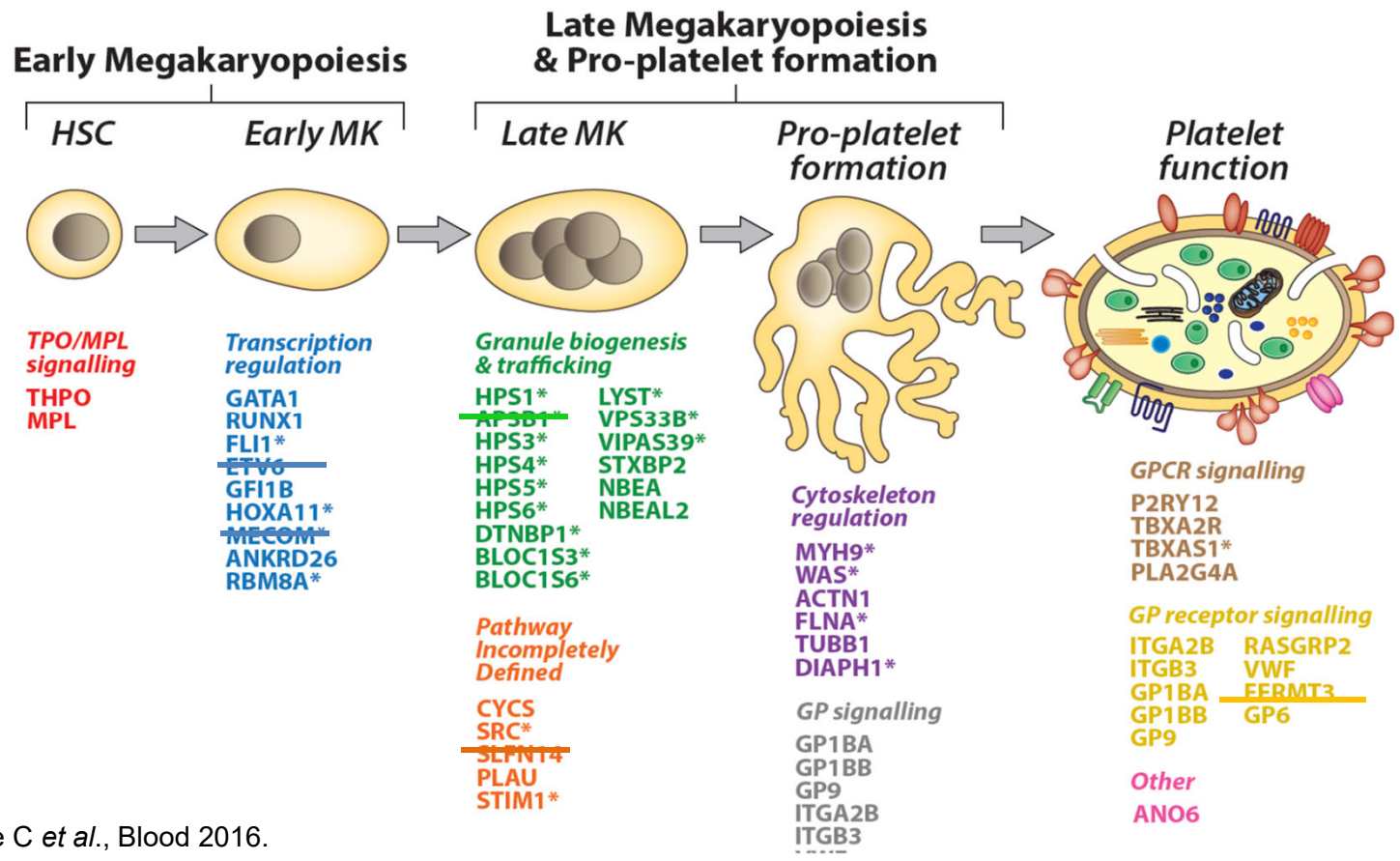
WAS, CAMT, MECOM: STX

Prädisposition

RUNX1, ANKRD26, ETV6



NGS-Panel-Ansatz in der Diagnose von IPD



Lentaigne C *et al.*, Blood 2016.

Syndromal?

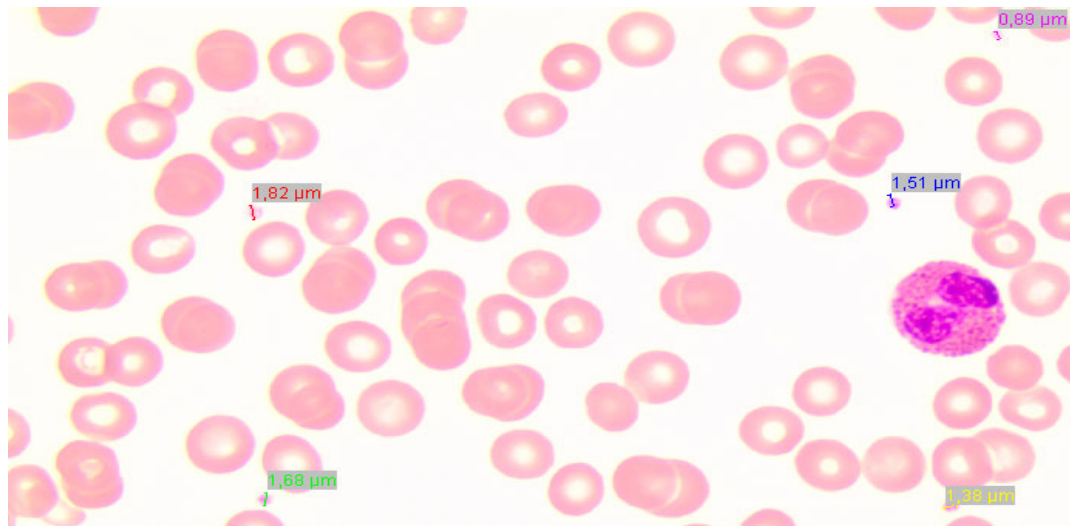
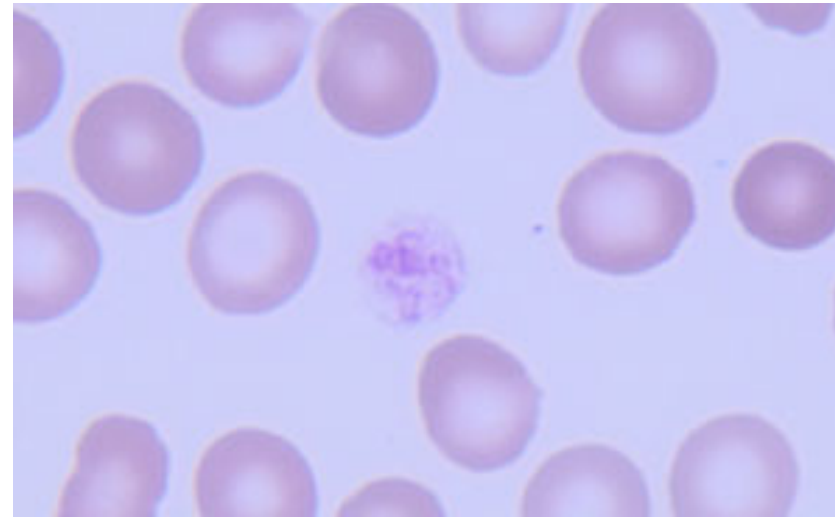


TAR-Syndrom



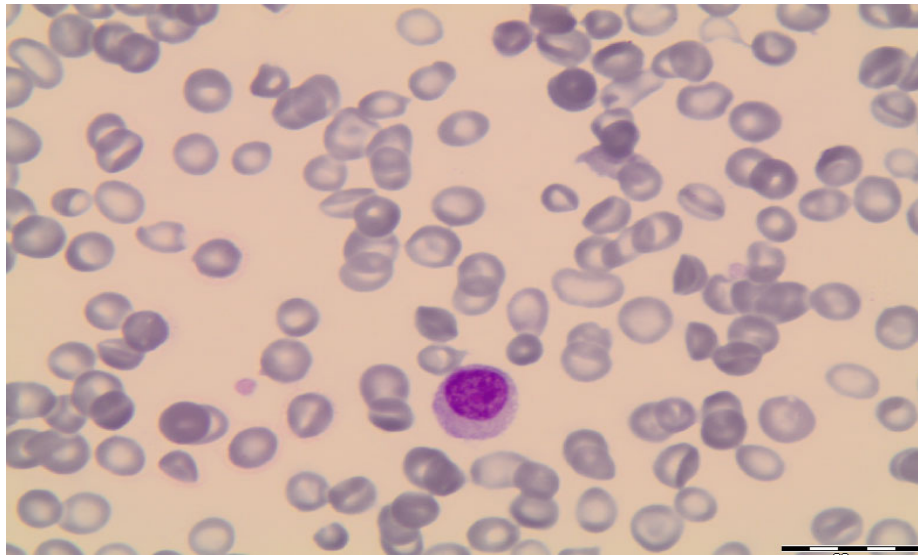
MYH9-Defekt

- Makrothrombozyten
- Thrombozytopenie
- Nephritis
- Hypakusis
- Katarakt



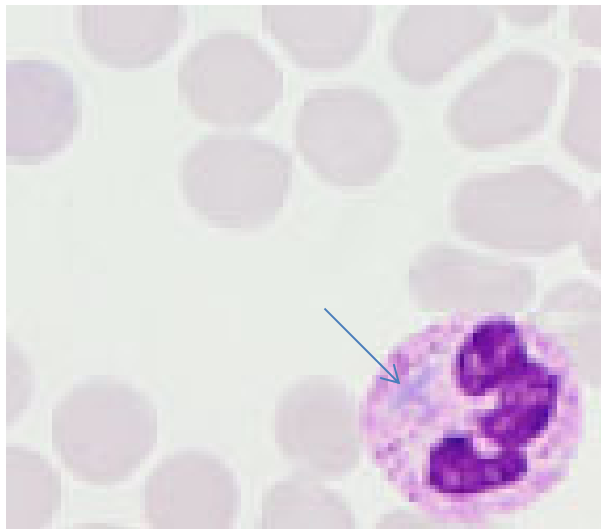
WAS

- Thrombozytopenie/-pathie
- Mikrothrombozyten
- Ekzeme
- Immundefekt
- Allergien



GATA 1-Defekt

- dyserythropoetische Anämie
- Thalassämie
- Thrombozytopenie
- Funktionsstörung
- Hepatosplenomegalie



MYH9-Defekt

- Makrothrombozyten
- Thrombozytopenie
- Döhle Einschlusskörper
- Nephritis
- Hypakusis
- Katarakt

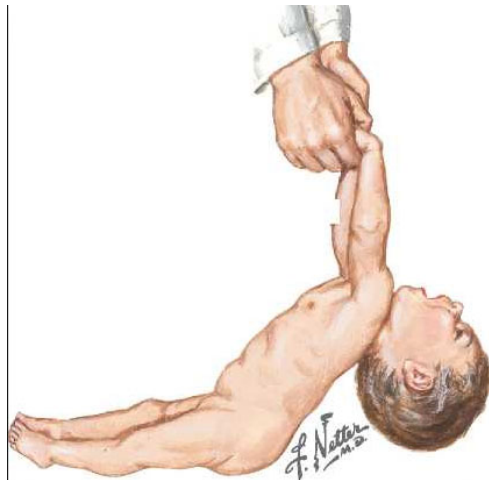
Neugeborener Knabe M.S.

TG; SGA mit 2600g

Muskuläre Hypotonie; hypoplastische Nägel, breite Nasenwurzel, Strabismus convergens,
Hand- und Fussrückenödeme

Verzögertes Erreichen der Meilensteine

Persistierende Thrombopenie



M.S. geb. 14.03.2016

Patienten-ID : 2204411843	ärztlich validiert : 25-Mär-2016 12:26	Fax : DW 25884	
Auftrag : 7286017606			
Diagnose : Kontrolle		Beleg Nr. :	

Routine-Endbefund	Ergebnis:	Einheit:	Referenzbereich:	Grafik:
Hämatologie				
BLUTBILD				
Leukozyten	11.7	G/l	(5.0 - 21.0)	(*)
Absolute Neutrophilenzahl	3.4	G/l	(2.0 - 7.0)+	(*)
Erythrozyten	3.82	T/l	(4.50 - 6.20)	<-()
Hämoglobin	130	g/l	(140 - 230)	<-()
Hämatokrit	0.361	l/l	(0.450 - 0.620)	<-()
Thrombozyten	54	G/l	(223 - 515)	<-()
MCH	34.0	pg	(33.0 - 40.0)	(*)
MCHC	360	g/l	(300 - 370)	(*)
MCV	94.5	fl	(91.0 - 102.0)	(*)
Ery-Verteilungsbreite	20.7	%	(11.0 - 16.0)+	()->
Retikulozyten	18.6	%	(0.0 - 10.0)	()->
Retikulozyten absolut	71.1	G/l	(0.0 - 60.0)	()->
DIFFERENTIALBLUTBILD				
Segmentkern. Neutrophile	29.0	%	(18.0 - 36.0)	(*)
Lymphozyten	45.0	%	(40.0 - 62.0)	(*)
Lympho absolut, korr.	5.26	G/l	(2.00 - 14.02)	(*)
Monozyten	12.0	%	(8.0 - 13.0)	(*)
Eosinophile	13.0	%	(0.0 - 7.0)	()->
Basophile	0.0	%	(0.0 - 2.0)	(*)
Myelozyten	1.0	%	(0.0 - 0.0)+	()->

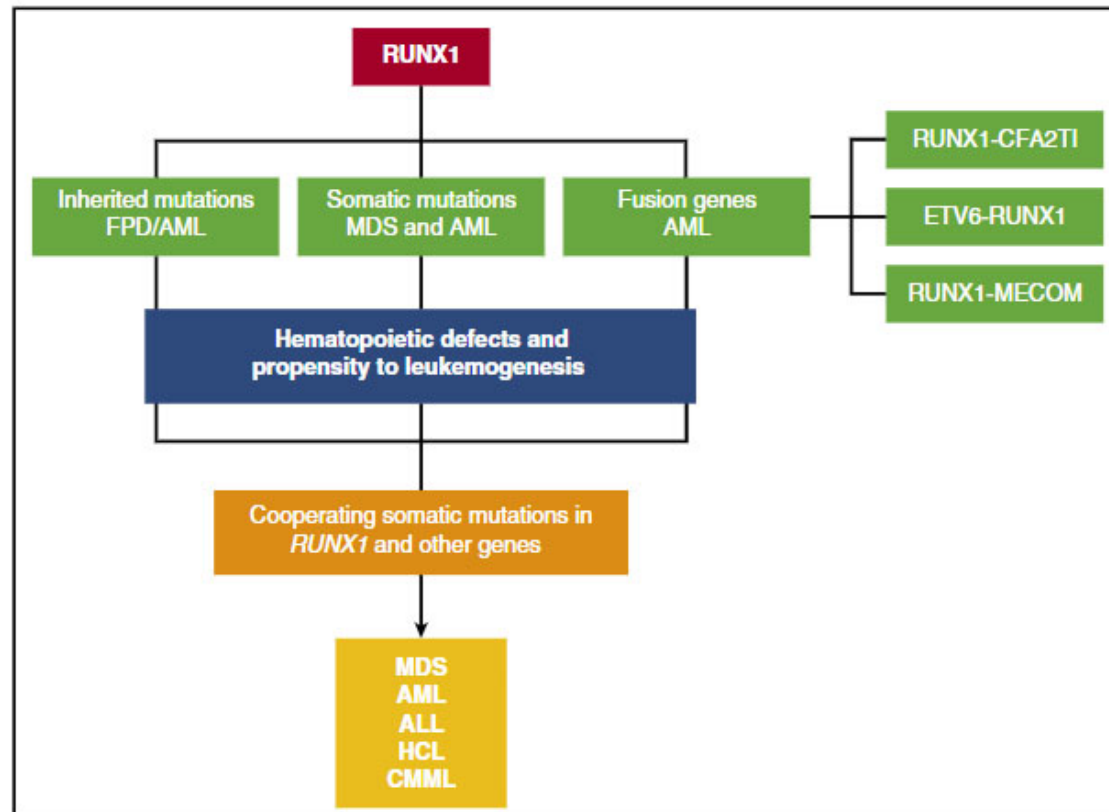
Einzelne polychromet.Ery
Anisozytose der Ery

DNA-Array: Deletion am 21q22. 11q23. 13 -4,2 Mb, 93 Gene einschließlich RUNX1

Diagnose: Braddock-Carey-Syndrom

American Journal of Medical Genetics Part A
 Volume 170, Issue 10, pages 2580-2586, 23 AUG 2016 DOI: 10.1002/ajmg.a.37870
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajmg.a.37870/full#ajmga37870-fig-0001>

Figure 3. A schematic depicting the various mechanisms by which RUNX1 gene is altered in hematological malignancies. Inherited mutations cause FPD/AML. Somatic mutations and fusion genes with cooperating mutations in other genes cause hematological malignancies, such as MDS, AML, ALL, HCL, and CMML.

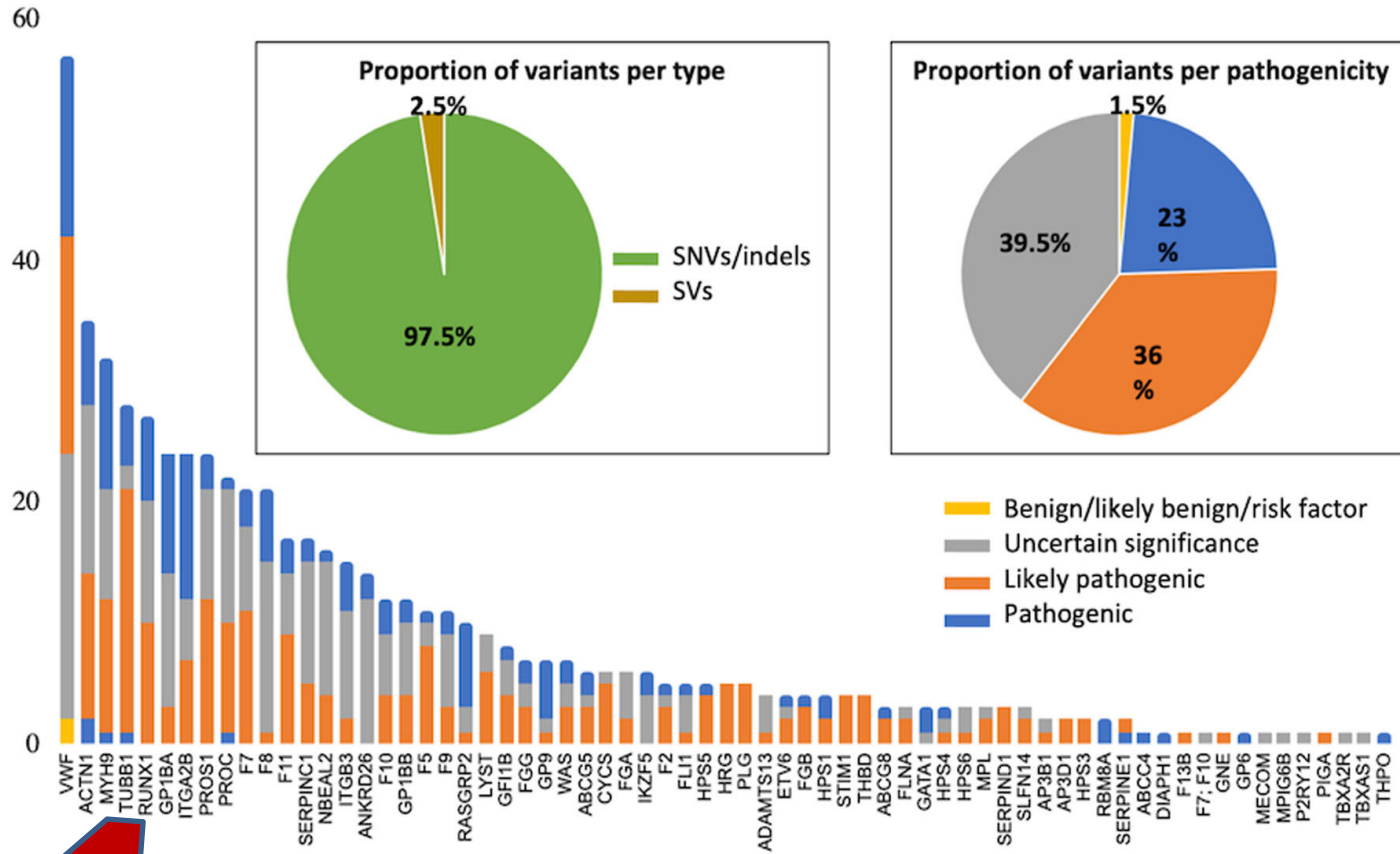


GoldVariants, a resource for sharing rare genetic variants detected in bleeding, thrombotic, and platelet disorders: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Genomics in Thrombosis and Hemostasis

Karyn Megy^{1,2} | Kate Downes^{1,2,3} | Marie-Christine Morel-Kopp^{4,5} | José M. Bastida⁶ | Shannon Brooks⁷ | Loredana Bury⁸ | Eva Leinoe⁹ | Keith Gomez¹⁰ | Neil V. Morgan¹¹ | Maha Othman^{12,13} | Willem H. Ouwehand^{1,2,3} | Juliana Perez Botero¹⁴ | José Rivera¹⁵ | Harald Schulze¹⁶ | David-Alexandre Trégouët¹⁷ | Kathleen Freson¹⁸

...und das Recht auf (Nicht-) Wissen?

GoldVariants, a resource for sharing rare genetic variants detected in bleeding, thrombotic, and platelet disorders: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Genomics in Thrombosis and Hemostasis





THROMBOSIS AND HEMOSTASIS

Diagnostic high-throughput sequencing of 2396 patients with bleeding, thrombotic, and platelet disorders

Kate Downes,^{1,4*} Karyn Megy,^{1,2*} Daniel Duarte,^{1,2} Minka Vries,⁵ Johanna Gebhart,⁶ Stefanie Hofer,² Olga Shamardina,^{1,2} Sri V. V. Deevi,^{1,2} Jonathan Stephens,^{1,2} Rutendo Mapeta,^{1,2} Salih Tuna,^{1,2} Namir Al Hasso,⁴ Martin W. Besser,⁷ Nichola Cooper,⁸ Louise Daugherty,^{1,2} Nick Gleadall,^{1,3} Daniel Greene,^{1,3,9} Matthias Haimel,^{10,11} Howard Martin,⁷ Sofia Papadia,^{1,2} Shoshana Revel-Vilk,^{1,2} Suthesh Sivapalaratnam,^{1,3,13} Emily Symington,⁷ Will Thomas,⁷ Chantal Thys,¹⁴ Alexander Tolios,¹⁵ Christopher J. Penkett,^{1,2} NIHR BioResource,² Willem H. Ouwehand,^{1,3,16}

ThromboGenomics HTS Panel
37% molecular diagnosis
20% variants of unknown significance

