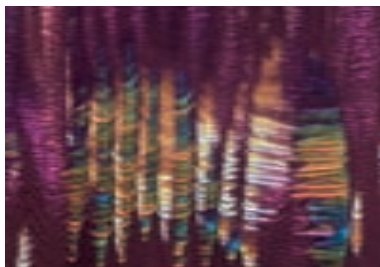


> L'agalsidase β a été développée pour le remplacement enzymatique dans le traitement de la maladie de Fabry, une maladie génétique rare due à un déficit en α -galactosidase A, une enzyme lysosomale. L'absence de cette enzyme entraîne une accumulation tissulaire progressive de globotriaosylcéramide, résultant en une morbi-mortalité rénale, cardiovasculaire et cérébrovasculaire importante. L'agalsidase β fut approuvée par l'agence européenne pour l'évaluation des médicaments en 2001 à la dose recommandée de 1 mg/kg de poids corporel. En 2003, après une évaluation rigoureuse par la *Food and Drug Administration*, l'autorisation de mise sur le marché aux États-Unis fut aussi accordée à l'agalsidase β . Cette décision fut consécutive à l'analyse des essais cliniques, de la dose, de l'effet potentiel des anticorps et de la capacité du médicament à démontrer une réduction de l'accumulation tissulaire en Gb3 dans les organes cibles. Cet article met en lumière les aspects essentiels du programme de développement clinique et du processus d'évaluation par les agences de régulation d'un médicament orphelin, développé pour le traitement d'une maladie génétique létale. <

Développement clinique de l'agalsidase β pour le traitement de la maladie de Fabry

Dominique P. Germain



Unité de Génétique Clinique,
 Hôpital Européen Georges
 Pompidou, 20, rue Leblanc,
 75015 Paris, France.
dp.germain@mageos.com

le taux de Gb3 dans le plasma des patients ainsi traités [1, 2]. Les obstacles technologiques (difficultés à préparer par méthode extractive des quantités suffisantes d'enzyme) freinèrent les progrès qui ne reprirent qu'une quinzaine d'années plus tard avec le clonage du gène *GLA* et l'avènement du génie génétique.

La transfection dans des cellules d'ovaires de hamsters chinois (cellules CHO), système standard de production des protéines recombinantes (facteurs VIII et IX, hormones de croissance, érythropoïétines, interférons), de l'ADN complémentaire du gène de l' α -galactosidase humaine a permis la production d'une α -galactosidase recombinante en quantités telles qu'il devenait envisageable de traiter l'être humain [3]. L'obtention d'une souris invalidée pour le gène murin de l' α -galactosidase (*gla*^{-/-}) représenta la deuxième avancée importante. Le modèle murin reproduit le déficit enzymatique et les inclusions lysosomales de la maladie de Fabry humaine, mais ne mime qu'imparfaitement la maladie humaine sur le plan clinique, les animaux n'ayant pas d'insuffisance rénale et une espérance de vie normale.

Disposer de l'enzyme recombinante et du modèle murin a permis de conduire des essais précliniques, pour vérifier l'innocuité de l'enzyme chez l'animal et pour choisir la meilleure dose possible. Quatre isoformes d' α -galactosidase recombinante furent étudiées, avec des contenus différents en mannose-6-phosphate et en acide sialique. L'isoforme la plus riche en acide sialique avaient les meilleures caractéristiques pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Il exis-

La perspective d'une thérapie enzymatique substitutive pour la maladie de Fabry apparut dans les années 1970, avec les travaux pionniers indépendants de Roscoe Brady et Robert Desnick. Il avait été démontré que les maladies lysosomales étaient dues à un défaut du catabolisme des substrats, par déficit enzymatique, et il apparaissait logique d'administrer l'enzyme manquante, d'autant que des « pseudo-déficits » avaient été identifiés, dans lesquels l'activité d'une enzyme lysosomale, bien que très diminuée mais non nulle, permettaient une vie tout à fait normale aux individus porteurs, laissant penser qu'il ne serait pas nécessaire de restaurer 100 % d'activité enzymatique pour guérir les patients. Des injections d'enzyme d'origine extractive (plasma, rate) parvinrent à restaurer partiellement l'activité α -galactosidase plasmatique et à faire temporairement baisser

tait une capture importante de l'enzyme par le foie et seul un pourcentage résiduel très faible de l'enzyme recombinante atteignait les tissus cibles. Grâce aux essais précliniques, deux enseignements importants furent obtenus : administrer l'enzyme recombinante entraînait la clairance du substrat accumulé dans l'organisme de l'animal et cette clairance était clairement dose-dépendante [4].

Par ailleurs, en l'absence de reperfusion de l'enzyme, une ré-accumulation du substrat survenait au bout de 3 semaines dans les tissus (4 semaines dans le foie), ce qui a conduit à proposer une fréquence bimensuelle pour les injections de l'enzyme, afin d'allier le meilleur compromis entre les données pharmacodynamiques et la qualité de vie des patients.

À la suite de ces essais pré-cliniques chez l'animal, un premier essai clinique fut organisé, avec inclusion de malades et non de volontaires sains et donc compacté en un seul essai de phase 1 et 2, comme le permet la législation sur les médicaments orphelins. Cet essai monocentrique a porté sur 15 malades et a essentiellement étudié la sécurité de l'enzyme et recherché sa dose optimale. Trois doses de l'enzyme ont été étudiées : 0,3 mg/kg, 1 mg/kg et 3 mg/kg. Les trois doses se sont révélées efficaces, mais une clairance plus rapide et plus complète fut observée pour les doses de 1 mg/kg et 3 mg/kg. La dose de 1 mg/kg de poids corporel fut choisie pour la poursuite des essais thérapeutiques, sur la base du meilleur rapport entre l'efficacité et la sécurité, puisque les effets secondaires liés aux perfusions étaient plus fréquents pour les posologies de 3 mg/kg [5].

À la suite de l'essai de phase 1 et 2, fut organisé un essai clinique de phase 3, international, multicentrique, contrôlé, en double aveugle contre placebo, qui fut, à l'époque, le plus grand essai clinique jamais organisé pour une maladie orpheline lysosomale. Cinquante-huit malades furent inclus dans l'essai. Par tirage au sort, 29 patients reçurent un placebo et 29 patients une dose active de 1 mg/kg d'agalsidase β en perfusion toutes les deux semaines pour un total de 11 injections, soit une phase en double-aveugle d'une durée de 20 semaines. Les critères d'inclusion dans cet essai étaient relativement stricts et excluaient les patients sévèrement atteints sur le plan rénal (hémodialysés, transplantés et patients dont la créatinine sérique était $> 196 \mu\text{mol/l}$) ainsi que les enfants âgés de moins de 16 ans. Lors de la construction d'un essai clinique, le choix d'un critère primaire clinique est généralement recommandé par les agences de régulation. Toutefois, pour la maladie de Fabry, maladie métabolique lentement progressive, il apparaissait qu'une phase de double-aveugle d'une durée limitée à six mois était probablement trop courte pour permettre d'atteindre un objectif primaire clinique et qu'un marqueur intermédiaire pouvait être mieux à même de prédire une efficacité, dans la mesure où ce marqueur était pertinent. Aussi, en accord avec la *Food and Drug Administration* (FDA) américaine, un marqueur intermédiaire (*surrogate marker*) fut-il choisi, correspondant à la clairance totale du Gb3 des cellules de l'endothélium capillaire de l'interstitium rénal. Ce choix était justifié par l'importance pronostique de l'atteinte rénale dans la maladie de Fabry, d'une part, et par l'impact essentiel de l'atteinte des vaisseaux dans la progression de la maladie, d'autre part.

Les biopsies firent l'objet d'une lecture en aveugle pour le caractère pré- ou post-thérapeutique des prélèvements et pour l'appartenance des patients

au groupe traité ou au groupe placebo. Les anatomopathologistes étudièrent en moyenne 230 vaisseaux par biopsie et cotèrent les biopsies selon un score de gravité allant de zéro à trois en fonction de la surcharge métabolique, 0 : absence de surcharge, 1 : surcharge mineure, 2 : surcharge modérée, 3 : surcharge sévère. Les résultats sur le critère primaire d'évaluation et deux critères secondaires (clairance du Gb3 de l'endothélium capillaire des vaisseaux de la peau et du cœur) ont montré une clairance tout à fait significative pour le groupe traité alors que les patients sous placebo n'étaient pas améliorés ($p < 0,001$) [6]. Après la phase de double-aveugle, tous les patients signèrent un nouveau consentement pour participer à la phase d'extension de cet essai clinique, réalisée en ouvert, où les 58 malades reçurent l'enzyme en perfusion. La plupart des patients acceptèrent une troisième biopsie rénale mais aussi une troisième biopsie cutanée et parfois une biopsie endomyocardique. Après 6 mois d'étude d'extension, une clairance complète fut obtenue pour les patients initialement sous placebo et désormais traités par l'agalsidase β . De plus, la clairance quasi-totale de la surcharge en Gb3 des cellules endothéliales fut maintenue à un an de traitement dans le groupe initialement traité par agalsidase β . Une bonne clairance fut également constatée pour les cellules endothéliales des capillaires glomérulaires et des artéριοles ainsi que pour les cellules mésangiales et interstitielles du glomérule. Une clairance partielle fut obtenue pour les cellules musculaires lisses des artéριοles et un nettoyage très modeste pour les podocytes [7]. Le même type de travail fut réalisé pour la peau avec, outre la clairance des vaisseaux du derme superficiel précédemment connue, mise en évidence d'une élimination progressive du substrat de l'endothélium des vaisseaux profonds du derme, des cellules musculaires lisses des vaisseaux et du périméurium [8].

Ces données furent analysées lors d'une audition publique de la FDA en janvier 2003. Lors de ce type d'auditions publiques, une revue de l'ensemble des résultats scientifiques accumulés à travers les essais cliniques est présentée par le laboratoire et par les experts de la FDA. Ces auditions incluent également des commentaires des experts et des associations de malades et sont suivies de votes. Dans le cas de l'agalsidase β , un marqueur intermédiaire avait été choisi en accord avec la FDA lors des essais cliniques. Après des discussions pendant l'ensemble de la journée, le vote final porta sur la question suivante : « La normalisation de l'endothélium capillaire rénal obtenue dans ces essais est-elle raisonnablement susceptible de prédire un bénéfice cliniquement significatif ? ». Le vote répondit de manière positive à cette question par 14 voix sur 15. Sur la base de cette audition publique par le comité ad hoc, la FDA

accorda une autorisation de mise sur le marché pour l'agalsidase β (Fabrazyme®) quelques mois plus tard. Une deuxième molécule, l'agalsidase α subit le même processus d'évaluation le lendemain, lors d'une autre audition publique avec les mêmes experts de la FDA. Les résultats des essais cliniques présentés ne furent pas jugés probants ni significatifs (8 experts sur 15 votèrent contre). L'autorisation de mise sur le marché aux États-Unis fut donc subséquentement refusée à l'agalsidase α (Replagal®).

L'extension en ouvert de l'essai clinique de phase III du programme de développement clinique de l'agalsidase β fut poursuivie pendant 5 ans et s'est terminé en juillet 2004. Des données complémentaires correspondant à l'analyse de la base de données après 3 ans sont disponibles et ont été publiées [9]. Sur le plan de la tolérance, 8 des 58 malades initiaux sortirent de l'essai avant trois ans, dont trois en raison de manifestations d'ordre immuno-allergiques (séroconversion pour des IgE au niveau du plasma ou positivité du test cutané). Ces trois malades purent être à nouveau perfusés avec succès, soit dans le cadre d'un protocole de *re-challenge* (D.P. Germain *et al.*, *European Study Group on Lysosomal Storage Disease*, Oslo, Norvège, 2005), consistant à réadministrer la drogue de façon extrêmement progressive, soit avec l'agalsidase β commercialisée.

Une séroconversion IgG fut observée chez 52 des 58 patients. Parmi ces 52 malades, 2 (4 %) restèrent faiblement répondeurs, avec un faible titre d'anticorps, 7 (14 %) montrèrent une tolérisation (production initiale d'anticorps ensuite négative). Dix patients (20 %) eurent des taux stables en plateau. Enfin, l'immense majorité des patients (60 %) exhiba une tendance nette à la décroissance de leurs titres d'anticorps au fil du temps avec, au dernier prélèvement disponible, un taux au moins divisé par quatre par rapport au pic maximum (Figure 1) [9]. L'impact possible de la production d'IgG sur l'efficacité thérapeutique de l'enzyme a été étudié à travers un certain nombre de données. Un premier élément de réponse était le taux de Gb3 plasmatique. Initialement élevé, ce taux diminue considérablement dès l'induction de la thérapie. En spectrométrie de masse, le taux de Gb3 plasmatique est normalisé par le traitement par l'agalsidase β . Des prélèvements sanguins obtenus après 18, 24 et 30 mois montrent la persistance de la normalisation des valeurs du Gb3 plasmatique, argument plaidant indirectement pour une absence d'effet défavorable de la production d'anticorps. Les biopsies cutanées itératives réalisées pendant 3 ans furent un autre moyen de vérifier l'absence d'impact négatif : à 30 ou 36 mois de traitement,

une clairance quasi-totale du Gb3 au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux dermiques superficiels était toujours observée [9]. Les réactions liées aux perfusions furent relativement fréquentes lors de la phase en double-aveugle. Il s'agissait toutefois de réactions faciles à gérer, d'intensité mineure à modérée, consistant surtout en des symptômes de type pseudo-grippal. Une décroissance très nette du nombre de réactions liées aux perfusions fut observée au cours des 3 premières années de l'essai thérapeutique [9] et l'agalsidase β présente donc un très bon profil de sécurité.

Sur le plan de l'efficacité du traitement au long cours, la fonction rénale, étudiée à travers la créatininémie et le débit de filtration glomérulaire (DFG) estimé (formule MDRD) fut stabilisée après 30 à 36 mois de traitement (Figure 2). Toutefois, l'écart type des valeurs moyennes de créatininémie semblant s'agrandir (Figure 2) motiva une étude par les investigateurs, des sous-populations de patients inclus dans l'essai [9]. Il fut ainsi noté que dix des 58 malades de l'étude avaient à l'inclusion un DFG diminué, inférieur à 90 ml/min/1,73m². Sur ces 10 patients, sept montrèrent une stabilisation, voire une amélioration de leur DFG après 30 à 36 mois de traitement. Pour trois d'entre eux, il y eut, au contraire, une dégradation de plus de 25 % du débit de filtration glomérulaire. Les points communs à ces trois patients étaient un âge supérieur à 40 ans, une protéinurie majeure et plus de 50 % de glomérulosclérose sur les biopsies rénales à l'inclusion. Ces trois patients expliquent à eux seuls l'élargissement de l'écart type (Figure 2). L'étude de phase 3 a donc apporté des données complémentaires intéressantes : 94 % des patients ont vu leur fonction rénale stabilisée à 36 mois alors que la dégradation annuelle très rapide

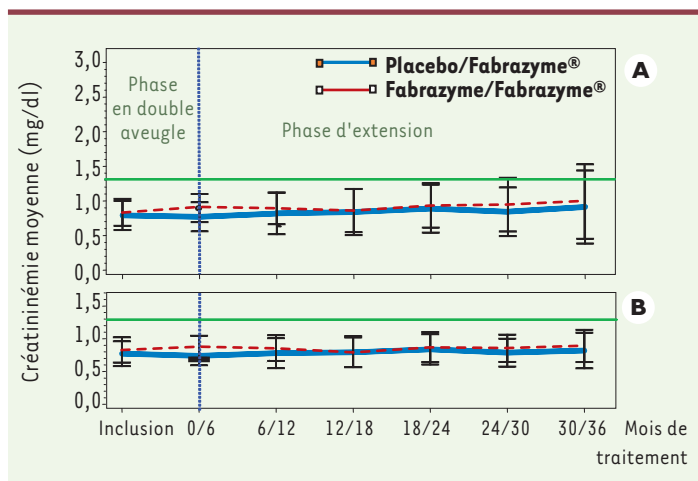


Figure 1. Essai clinique de phase III. A. Stabilisation de la créatininémie moyenne pour l'ensemble des 48 patients suivis à 30/36 mois de traitement. L'augmentation des écarts type constatée est uniquement liée à la dégradation des 3 patients les plus sévèrement atteints (âgés de plus de 40 ans avec une protéinurie > 2 g/jour et plus de 50 % de glomérules sclérotiques sur les biopsies rénales avant traitement). **B.** Stabilisation de l'ensemble de la population à l'exclusion de ces 3 patients. Cette étude a également montré que 7 patients sur 10, qui avaient un GFR < 90 ml/min/1,73 m², ont vu leur fonction rénale se stabiliser (modifiée d'après [9]).

(- 12 ml/min/1,73m²) de la fonction rénale dans la maladie de Fabry est connue [10]. Cette étude d'extension a également démontré l'importance majeure de la protéinurie et de la fibrose comme facteurs de mauvais pronostic, plaidant en faveur d'un traitement initié précocement afin de prévenir la survenue de dégâts irréversibles.

L'étude du dossier de développement clinique de l'agalsidase β selon une procédure rapide (*fast track*) propre aux médicaments orphelins et l'autorisation de mise sur le marché ont été assorties par la FDA d'un certain nombre d'obligations pour le laboratoire. L'agence américaine a ainsi exigé que soit conduite une étude post-AMM de phase 4. Une étude de relativement grande ampleur dans le contexte des maladies orphelines, fut mise en place, portant sur 82 malades atteints de maladie de Fabry. Les critères d'inclusion, relativement stricts, obligèrent à évaluer 250 patients pour enrôler 82 malades satisfaisant aux critères d'inclusion. Le principe de l'étude était de comparer le temps de survenue d'un premier événement clinique morbide, entre le groupe traité par agalsidase β (1 mg/kg) et le groupe sous placebo. Des considérations éthiques conduisirent à une randomisation proche d'un ratio 2:1 (deux patients traités par l'agalsidase β pour un seul patient traité par placebo). Le groupe traité par l'enzyme contenait ainsi 51 malades contre 31 pour le groupe sous placebo. Les événements considérés furent, sur le plan rénal, soit une augmentation de 33 % de la créatininémie lors de deux mesures consécutives, soit le passage en hémodialyse, soit la greffe rénale ; sur le plan cardiaque, la survenue d'un infarctus du myocarde ou la détérioration significative de l'état clinique du malade ; sur le plan cérébrovasculaire : la survenue d'un

AVC ou d'un AIT. L'étude des caractéristiques démographiques montre que les deux groupes étaient globalement bien appariés, avec peu de différences entre le groupe placebo et le groupe traité par l'agalsidase β . Les patients n'étaient pas hypertendus. La moyenne d'âge était de 45 ans, à comparer à un âge moyen de 30 ans chez les patients inclus dans la phase 3. Les malades étaient donc significativement plus âgés et plus sévèrement atteints sur le plan rénal, avec une créatininémie pouvant aller jusqu'à 3 mg/dl.

L'analyse statistique en intention de traiter (ITT) fut conduite par un test du *Log-Rank*, portant sur le critère principal et comparant donc le délai de survenue du premier événement morbide entre les patients du groupe traité par agalsidase β et ceux du groupe placebo. Une réduction de risque de 43 % fut observée ($p = 0,145$). Si la significativité statistique n'était pas atteinte, ces données semblaient intéressantes à prendre en compte en pratique clinique. Tout essai clinique étant par essence difficile à conduire, il y eut huit déviations de protocole consistant essentiellement en des absences aux perfusions de patients randomisés dans le groupe traité par agalsidase β . Quatre patients manquèrent ainsi plus de 20 % de leurs injections. Par ailleurs, si les caractéristiques cliniques des patients étaient relativement comparables entre les deux groupes, notamment en terme de fonction rénale ou d'antécédents cérébrovasculaires ou cardiaques, il existait une différence notable concernant la protéinurie, initialement plus élevée dans le groupe traité par agalsidase β que dans le groupe placebo à l'inclusion. La protéinurie est connue pour être un facteur de mauvais pronostic favorisant la survenue de tous les types d'événements morbides non seulement rénaux mais aussi cardiovasculaires ou cérébrovasculaires [11]. L'ajustement de l'analyse statistique prévu dans le dessin du protocole sur cette caractéristique clinique, facteur de déséquilibre entre les deux groupes, associée à l'analyse en per-protocole montre une réduction de risque de 61 % ($p < 0,05$).

En conclusion de l'étude de phase 4, il apparaît que la thérapie enzymatique substitutive ne prévient pas complètement la survenue des événements morbides, puisque quatorze sont apparus dans le groupe traité. Lorsque l'on ajuste l'analyse statistique sur la protéinurie, facteur de mauvais pronostic, l'agalsidase β (Fabrazyme®) réduit de façon significative le risque de survenue d'un événement morbide (réduction du risque = 53 % de la population en intention de traiter ($p = 0,0577$)) ; réduction du risque = 61 % de la population traitée per-protocole ($p = 0,0341$). Ce résultat était identique pour les événements rénaux, cardiaques et cérébrovasculaires. Ces résultats d'efficacité

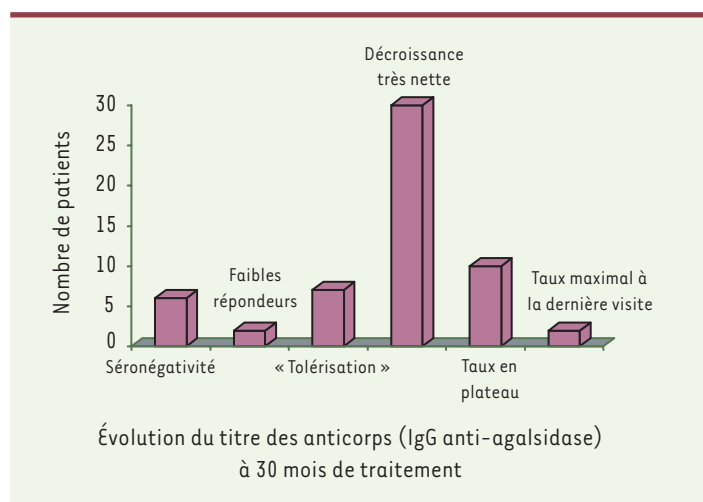


Figure 2. Évolution du titre d'anticorps (IgG anti-agalsidase) à 30 mois de traitement. Parmi 57 patients, 6 demeurèrent séronégatifs, 2 faibles répondeurs n'ont présenté qu'un faible titre d'anticorps (< 400), 7 patients montrèrent une tolérisation (production initiale d'anticorps suivie d'une négativation), 10 patients eurent des taux stables en plateau tout au long de l'étude, 2 patients eurent un taux maximal d'anticorps lors de la dernière visite ; enfin, l'immense majorité des patients ($n = 30$) présentèrent une nette tendance à la décroissance du taux d'anticorps (taux divisé au minimum par 4).

clinique ont été intégrés par la *European Medicines Agency* (EMA) dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP) de l'agalsidase β (Fabrazyme®). \diamond

SUMMARY

Clinical development of agalsidase-beta for the treatment of Fabry disease

Agalsidase beta has been developed for enzyme replacement for the treatment of Fabry disease, a rare and debilitating genetic disease caused by deficient activity of the lysosomal enzyme alpha-galactosidase A. Lack of this enzyme leads to a progressive tissular accumulation of globotriaosylceramide (Gb3), resulting in life-threatening renal, cardiac and cerebrovascular complications. Agalsidase beta (Fabrazyme®), was approved by the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMEA) in 2001 at a recommended dose of 1 mg/kg. In 2003, after a rigorous evaluation by the Food and Drug Administration (FDA), the approval was also granted to agalsidase beta in the US. This decision reflected clinical trial design, how dosage was determined, antibody effects and the ability of the product to demonstrate reduction of tissue storage of Gb3 in major organs of pathology when administered at the recommended dosage. This review highlights key issues in the clinical development program and evaluation process of an orphan drug developed to treat a life-threatening genetic disorder. \diamond

RÉFÉRENCES

1. Brady RO, Tallman JF, Johnson WG, et al. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified ceramidetrihexosidase in Fabry's disease. *N Engl J Med* 1973 ; 289 : 9-14.
2. Desnick RJ, Dean KJ, Grabowski G, et al. Enzyme therapy in Fabry disease : differential *in vivo* plasma clearance and metabolic effectiveness of plasma and splenic alpha-galactosidase A isozymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979 ; 76 : 5326-30.
3. Ioannou YA, Bishop DF, Desnick RJ. Overexpression of human alpha-galactosidase A results in its intracellular aggregation, crystallization in lysosomes, and selective secretion. *J Cell Biol* 1992 ; 119 : 1137-50.
4. Ioannou YA, Zeidner KM, Gordon RE, Desnick RJ. Fabry disease : preclinical studies demonstrate the effectiveness of alpha-galactosidase A replacement in enzyme-deficient mice. *Am J Hum Genet* 2001 ; 68 : 14-25.
5. Eng CM, Banikazemi M, Gordon RE, et al. A phase 1/2 clinical trial of enzyme replacement in fabry disease : pharmacokinetic, substrate clearance, and safety studies. *Am J Hum Genet* 2001 ; 68 : 711-22.
6. Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, et al. Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase replacement therapy in Fabry's disease. *N Engl J Med* 2001 ; 345 : 9-16.
7. Thurberg BL, Rennke H, Colvin RB, et al. Globotriaosylceramide accumulation in the Fabry kidney is cleared from multiple cell types after enzyme replacement therapy. *Kidney Int* 2002 ; 62 : 1933-46.
8. Thurberg BL, Randolph Byers H, et al. Monitoring the 3-year efficacy of enzyme replacement therapy in Fabry disease by repeated skin biopsies. *J Invest Dermatol* 2004 ; 122 : 900-8.
9. Wilcox W, Banikazemi M, Guffon N, et al. Long-term safety and efficacy of enzyme replacement therapy Fabry disease. *Am J Hum Genet* 2004 ; 75 : 65-74.
10. Branton MH, Schiffmann R, Sabnis SG, et al. Natural history of Fabry renal disease : influence of alpha-galactosidase A activity and genetic mutations on clinical course. *Medicine (Baltimore)* 2002 ; 81 : 122-38.
11. Kowey PR, Dickson TZ, Zhang Z, et al. Losartan and end-organ protection : lessons from the RENAAL study. *Clin Cardiol* 2005 ; 28 : 136-42.

TIRÉS À PART

D.P. Germain

