



# **FACULTAD DE FARMACIA**

Grado en Farmacia

## **Terapias basadas en ácidos nucleicos**

**(Glybera, un medicamento basado en terapia génica para el tratamiento de la deficiencia de lipoproteína lipasa)**

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2015

**Autor: Piedad Ortega Fernández**

Modalidad: Revisión bibliográfica

Tutor: Antonio Martínez Laborda

## Índice

1.- Resumen.....	4
2.- Introducción.....	4
- Enzima lipoproteína lipasa.....	4
- Presentación clínica de la LPLD.....	6
- Prevalencia de la LPLD .....	7
- Diagnóstico de la LPLD .....	7
- Patogénesis de la pancreatitis aguda .....	7
- Tratamiento de la LPLD .....	8
- Restricción en la dieta .....	8
- Terapia de reemplazo enzimático.....	8
3.- Terapia génica .....	9
- Alipogén Tiparvovec (AAV1-LPL <sup>S447X</sup> ).....	9
4.- Desarrollo preclínico .....	12
- Estudios en ratones .....	13
- Estudios en gatos .....	18
5. Desarrollo clínico.....	22
- AMT-010-01 .....	23
- AMT-011-01 .....	24
- AMT-011-02 .....	28
- AMT-011-03 .....	29
6. Aprobación de Glybera.....	30
7.- Forma de presentación y tratamiento.....	33

8.- Discusión.....	34
9.-Tabla de abreviaturas .....	40



## 1.- RESUMEN

Glybera (Alipogén tiparvovec), la primera terapia génica humana que ha recibido la aprobación para su comercialización por parte de la Agencia Europea del Medicamento, está indicado para el tratamiento de pacientes con deficiencia de la enzima lipoproteína lipasa. Esta revisión tiene como objetivo la descripción de los estudios llevados a cabo para la obtención de este medicamento, desde los ensayos en modelos animales hasta la aprobación de Glybera en noviembre de 2012. Se realizaron estudios preclínicos en dos modelos animales, ratón y gato. Para el desarrollo clínico, se realizaron 2 estudios observacionales, tres estudios de intervención (CT-AMT-010-01, CT-AMT-011-01, CT-AMT-011-02) y una revisión (CT-AMT-011-03) para proporcionar datos sobre la incidencia y la naturaleza de la pancreatitis en los enfermos y establecer la eficacia del medicamento.

## 2.- INTRODUCCIÓN

### Enzima lipoproteína lipasa

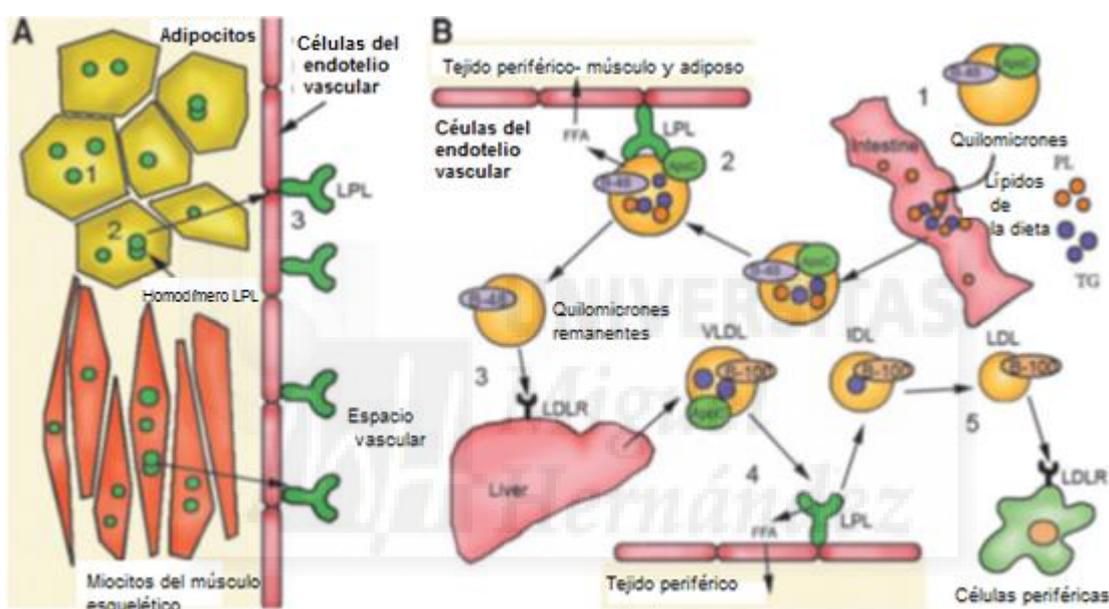
La lipoproteína lipasa (LPL) es una acilglicerol éster hidrolasa que se sintetiza principalmente en los adipocitos, músculo esquelético, corazón, pulmón e hígado, y se ancla al endotelio vascular a través de interacciones electrostáticas con moléculas de heparán sulfato. Esta enzima hidroliza los triglicéridos (TG) de los quilomicrones (QM) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), descomponiéndolos en ácidos grasos libres (FFA) y glicerol para su liberación en músculo y tejido adiposo (Fig.1).<sup>1</sup>

Los trastornos metabólicos que causan hipertrigliceridemia grave se pueden clasificar como trastornos primarios (genéticos) o secundarios. La causa más común de los primeros es la deficiencia de la enzima lipoproteína lipasa (LPLD) o hiperquilomicronemia familiar (tipo I, según la clasificación de Fredrickson), que se caracteriza por la incapacidad de los individuos afectados para producir enzima funcionalmente activa, lo que deriva en la acumulación de

---

<sup>1</sup>Ross CJ1, Liu G, Kuivenhoven JA, Twisk J, Rip J, van Dop W. Complete rescue of lipoprotein lipase-deficient mice by somatic gene transfer of the naturally occurring LPLS447X beneficial mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(10):2143-50.

TG en lipoproteínas como los QM y las VLDL. Otras causas incluyen mutaciones en los genes que codifican proteínas o enzimas que afectan a la actividad de la LPL, tales como la deficiencia de su cofactor Apo C-II y la deficiencia de proteína ligadora de lipoproteínas de alta densidad (HDL) anclada por glicosilfosfatidilinositol (GPIHBP1). Por otro lado, las causas de hipertrigliceridemia secundarias más comunes son la obesidad, la diabetes mellitus, los diversos fenotipos resistentes a la insulina, el embarazo, el consumo excesivo de alcohol y medicamentos como las tiazidas, los estrógenos y los beta bloqueantes.<sup>2</sup>



**Figura 1.** Función de la lipoproteína lipasa (LPL). (A) La LPL se sintetiza principalmente en los adipocitos y el músculo esquelético (1), formando homodímeros en las células antes de ser secretada (2) y transportada al endotelio vascular, donde se ancla a proteoglicanos de heparán sulfato (3). (B) Las grasas dietéticas se acumulan en los quilomicrones (QM) (1). ApoCII en la superficie de los QM sirve como cofactor para la LPL, que hidroliza los triglicéridos (TG) de los QM para producir ácidos grasos libres (FFA) que pueden ser absorbidos por los tejidos periféricos (2). Los QM remanentes, empobrecidos en TG, son absorbidos por el hígado a través del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR) (3) y son transformados en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Éstas se secretan en el plasma, donde la LPL hidroliza los TG de las VLDL para producir FFA (4), un paso esencial en la conversión de VLDL a lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). Las IDL son convertidas en lipoproteínas de baja

<sup>2</sup>Gaudet D, Méthot J, Kastelein J. Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Curr Opin Lipidol.* 2012; 23(4):310-20.

densidad (LDL), que pueden ser captadas por las células a través del LDLR para su uso por los tejidos (5).<sup>3</sup>

El gen de la LPL se localiza en la región cromosómica 8p22 y consta de 10 exones. Se han descrito más de 70 mutaciones causantes de la LPLD, algunas de ellas asociadas con la pérdida total de la función catalítica, mientras que otras ejercen un efecto moderado sobre la actividad de la enzima. La enfermedad presenta herencia autosómica recesiva y se caracteriza por hipertrigliceridemia grave debido a la acumulación en ayunas de QM en el plasma y valores bajos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y HDL, lo que provoca que incluso 12 horas después de las comidas se mantenga presente una hipertrigliceridemia, quilomicronemia y lipemia visible.<sup>4</sup>

### **Presentación clínica de la LPLD**

La LPLD se manifiesta generalmente en la infancia con episodios de dolor abdominal severo y retraso en el crecimiento. Los pacientes pueden presentar xantomas eruptivos, lipemia retinalis y hepatoesplenomegalia. Poco después de nacer también puede ocurrir aumento de la irritabilidad aguda, diarrea y sangrado intestinal. La presentación clínica es inespecífica, pero el plasma de estos pacientes es siempre de color blanco lechoso o lipémico, incluso en condiciones de ayuno. La manifestación más grave de la LPLD es la pancreatitis aguda, una condición inflamatoria heterogénea que conduce a la mortalidad o morbilidad significativa en el 20-30% de los pacientes. La diabetes es otra complicación que se observa con frecuencia, y puede ser debida a los episodios recurrentes de pancreatitis, lo que produce una insuficiencia pancreática endocrina y exocrina y/o la alteración del metabolismo energético. También puede provocar aterosclerosis prematura con el consiguiente riesgo coronario. Estas lesiones generalmente desaparecen con la reducción de los niveles de TG.<sup>5</sup>

---

<sup>3</sup>Bryant LM, Christopher DM, Giles AR, Hinderer C, Rodriguez JL, Smith JB. Lessons learned from the clinical development and market authorization of Glybera. Hum Gene Ther. 2013 Jun; 24(2):55-64.

<sup>4</sup>Gaudet D, de Wal J, Tremblay K, Déry S, van Deventer S, Freidig A. Review of the clinical development of alipogene tiparvovec gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. Atheroscler Suppl. 2010; 11 (1):55-60.

<sup>5</sup>Nierman MC, Rip J, Twisk J, Meulenberg JJ, Kastelein JJ, Stroes ES. Gene therapy for genetic lipoprotein lipase deficiency: from promise to practice. Neth J Med. 2005; 63 (1):14-9.

## **Prevalencia de la LPLD**

La prevalencia en Europa de esta enfermedad es muy baja, con tan sólo dos personas afectadas por cada millón de habitantes, tratándose, por tanto, de una enfermedad huérfana. En la provincia de Quebec (Canadá), se determinó una frecuencia elevada de quilomicronemia, observándose que la prevalencia de la LPLD en estas regiones era muy alta en comparación con el resto del mundo (1 afectado de cada 6382 habitantes). Posteriormente, una reconstrucción genealógica reveló un efecto fundador genético de los primeros colonos llegados en el siglo XVII a Quebec procedentes de Francia y Escocia.<sup>6,7</sup>

## **Diagnóstico de la LPLD**

El diagnóstico de la LPLD se basa en el ensayo de actividad de la enzima en el plasma después de la administración intravenosa de heparina. La detección de actividad muy baja o ausente de LPL en un sistema de ensayo que contiene ya sea plasma normal o apoproteína C-II y excluye la lipasa hepática es diagnóstico de la enfermedad.

No obstante, a pesar de lo anterior y de la presencia de síntomas externos, el diagnóstico más exacto de la LPLD depende de la secuenciación molecular del gen, ya que el fenotipo no se puede distinguir clínicamente de otras causas de hiperquilomicronemia.<sup>7</sup>

## **Patogénesis de la pancreatitis aguda**

La hipertrigliceridemia grave es la tercera causa más común de pancreatitis aguda después de la colelitiasis y el alcohol.<sup>8</sup> Aunque no está claro el mecanismo mediante el cual la hipertrigliceridemia induce los episodios de pancreatitis aguda, el riesgo aumenta en pacientes en ayunas con niveles de TG en el plasma por encima de 10 mmol/L. Cuando la actividad LPL es menor del 5% de lo normal, el riesgo de pancreatitis aguda es 360 veces mayor que en los individuos con valores normales de TG.<sup>4</sup>

---

<sup>6</sup>Kastelein JJ, Ross CJ, Hayden MR. From mutation identification to therapy: discovery and origins of the first approved gene therapy in the Western world. *Hum Gene Ther.* 2013; 24(5):472-8.

<sup>7</sup>Brunzell JD. Familial Lipoprotein Lipase Deficiency. *Gene Reviews* [revista en internet]. 1999 [12 marzo 2014]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1308/>.

<sup>8</sup>Srinivasa P Munigoti, Alan Rees. Hypertriglyceridaemia, LPL deficiency and pancreatitis -pathogenesis and therapeutic options. *Br. J. Of Diabetes and Vascular Medicine Disease.* 2011; 11 (3): 107-112.

No obstante, los resultados derivados del tercer estudio de intervención (AMT-011-02) sugieren que los TG totales en el plasma no parecen ser la mejor medida del riesgo de pancreatitis aguda, y más bien lo serían las características de las lipoproteínas, QM o VLDL, a las que aquéllos estarían asociados. En este sentido, se cree que las altas concentraciones de QM en la microcirculación pancreática aumentarían la liberación de enzimas lipolíticas que contribuyen a la hidrólisis de los QM y a un aumento de los FFA, causando la inflamación pancreática.<sup>6</sup>

### **Tratamiento de la LPLD.**

El objetivo principal en pacientes con LPLD es reducir el riesgo de pancreatitis. Esto se puede conseguir disminuyendo los niveles de TG en el plasma por debajo de 10 mmol/L. Entre las opciones terapéuticas están:

- Restricción en la dieta.<sup>6</sup>

La terapia farmacológica, como el uso de fibratos, estatinas o derivados del ácido nicotínico, es ineficaz en los pacientes con LPLD, de manera que el tratamiento convencional es la reducción severa de la grasa de la dieta a menos de un 20% y, a veces, hasta menos de un 10% de la ingesta calórica. Parte de la grasa puede ser sustituida por TG de cadena media como el aceite de coco, ya que éstos se absorben directamente en la vena porta sin llegar a ser incorporados a los QM. Además, la poca grasa que se ingiere debe contener ácidos grasos omega-3 y omega-6. Sin embargo, seguir esta pauta dietética es casi imposible e, incluso con un buen cumplimiento, la dieta a menudo no es lo suficientemente eficaz en la reducción de los niveles de TG y QM.

- Terapia de reemplazo enzimático.<sup>9</sup>

La terapia de reemplazo enzimático (ERT) consiste en suministrar al paciente la proteína que en su organismo está siendo sintetizada de forma anormal. La proteína puede provenir de tejidos y fluidos humanos, o ser sintetizada en bacterias, células de mamífero o levaduras a las cuales se les ha introducido el gen correspondiente. Estudios llevados a cabo en el modelo

---

<sup>9</sup>Liu G, Ashbourne Excoffon KJ, Wilson JE, McManus BM, Rogers QR, Miao L. Phenotypic correction of feline lipoprotein lipase deficiency by adenoviral gene transfer. Hum Gene Ther. 2000; 11(1):21-32.

felino de la enfermedad muestran que la terapia de reemplazo intravenosa de la enzima LPL no es una opción efectiva, debido a que su semivida es muy baja (<10 min).

Por lo tanto, la justificación para el desarrollo de la terapia génica para pacientes con LPLD fue la falta de una terapia eficaz, ya que la única opción era una restricción severa en la ingesta de grasa para controlar los síntomas. Sin embargo, en muchos pacientes los síntomas persistían aún con las restricciones de la dieta, provocando riesgo de pancreatitis o progresión de la enfermedad.

### **3.- TERAPIA GÉNICA DE LA LPLD**

Inicialmente, la terapia génica consistía en introducir genes funcionales ausentes en el genoma del individuo. Se realizaba en las células competentes de un individuo para tratar la enfermedad, utilizando un agente basado en el ADN que codifica una proteína terapéutica para complementar el gen disfuncional.

La terapia génica para la LPLD se basa en un vector viral adenoasociado (AAV) portador de un alelo de ganancia de función del gen humano para la enzima LPL. Se administra en los músculos de las extremidades inferiores para que el gen expresado en las fibras musculares dé lugar a la enzima, que migra a los capilares sanguíneos. Una vez transportado a la superficie luminal de las células endoteliales, LPL se une al endotelio a través de moléculas de heparán sulfato.<sup>2</sup>

#### **Alipogén Tiparvovec (AAV1-LPL<sup>S447X</sup>)**

Glybera (Alipogén tiparvovec) es un agente farmacológico basado en técnicas de terapia génica, desarrollado por Amsterdam Molecular Therapeutics (posteriormente uniQure) para el control de los síntomas y para prevenir las complicaciones de la LPLD. Está indicado en pacientes con diagnóstico de LPLD hereditaria, confirmado mediante análisis genéticos y que

hayan presentado ataques graves o múltiples de pancreatitis a pesar de seguir una dieta baja en grasas.<sup>10</sup>

El medicamento contiene el alelo de ganancia de función *LPL*<sup>S447X</sup>, que está presente en el 20% de los caucásicos. Esta variante natural del gen de la *LPL* humana se asocia con una mayor eliminación de partículas proaterogénicas, niveles más bajos de TG plasmáticos, mayores concentraciones de colesterol HDL y tasas más bajas de enfermedad cardiovascular en comparación con la población general. Además, puede tener propiedades antiinflamatorias, lo que podría prevenir la aparición de pancreatitis.<sup>4,8</sup>

Inicialmente, se utilizó adenovirus como vector. Sin embargo, no resultó eficaz debido a la elevada respuesta inmune y a la expresión transitoria de *LPL* que se observó en los modelos animales.<sup>9</sup>

Posteriormente, se utilizaron vectores AAV, los cuales han demostrado seguridad en varios ensayos clínicos para el tratamiento de otras enfermedades, como la amaurosis congénita de Leber de tipo 2 o la hemofilia B.<sup>11</sup> Los AAV pertenecen al género *Dependovirus* de la familia Parvoviridae. Presentan un genoma muy simple, constituido por una cadena sencilla de ADN con una longitud máxima de 4,7 kb, que codifica solamente dos genes: *REP* y *CAP*. Éstos son sustituidos por el ADN del gen terapéutico con un promotor y secuencias de poliadenilación. El empaquetamiento del ADN en la partícula viral requiere las funciones aportadas por un virus coadyuvante, que puede ser adenovirus, herpesvirus o virus de la vacuna.<sup>3,12</sup>

Entre las ventajas de un vector AAV están que su genoma se mantiene como episoma tras entrar en la célula huésped, lo cual elimina el riesgo de mutagénesis insercional, permite la expresión a largo plazo en los tejidos, muestra mínima toxicidad inmunológica en comparación con otros vectores, exhibe amplio tropismo tisular y no presenta patogenicidad. Las limitaciones son el tamaño reducido del transgén, la expresión no controlada en los tejidos,

---

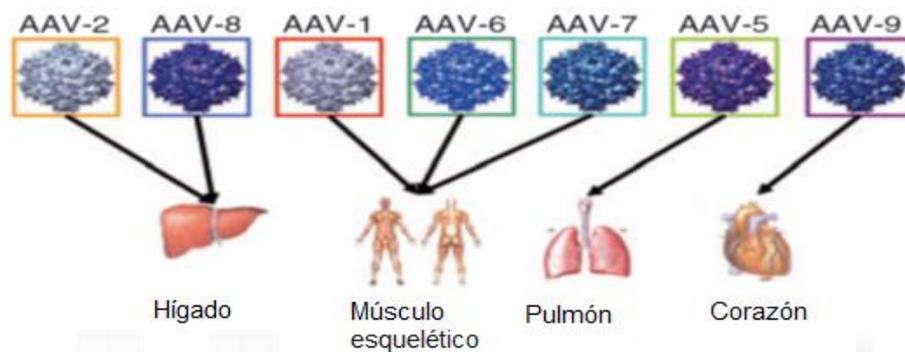
<sup>10</sup> Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Glybera: ficha técnica o resumen de las características del producto [monografía en Internet]. Madrid, España. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; [citada 27 mar 2015]. Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002145/WC500135472.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002145/WC500135472.pdf)

<sup>11</sup> Maguire AM, High KA, Auricchio A, Wright JF, Pierce EA, Testa F. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2009 Nov 7; 374 (9701):1597-605.

<sup>12</sup> Ferreira V, Petry H, Salmon F. Immune Responses to AAV-Vectors, the Glybera Example from Bench to Bedside. *Front Immunol*. 2014; 5:82.

que puede causar toxicidad, y la posibilidad de una respuesta del sistema inmune contra el vector y/o el producto transgénico.<sup>13</sup>

Hay unos 12 serotipos diferentes de AAV naturales con tropismo a diferentes tejidos y variada eficacia de transducción. El serotipo 2 (AAV2) es el más usado, sin embargo se demostró que los AAV1, AAV5 y AAV7 transducen las células musculares con mayor eficacia.<sup>13,6</sup> (Fig. 2)



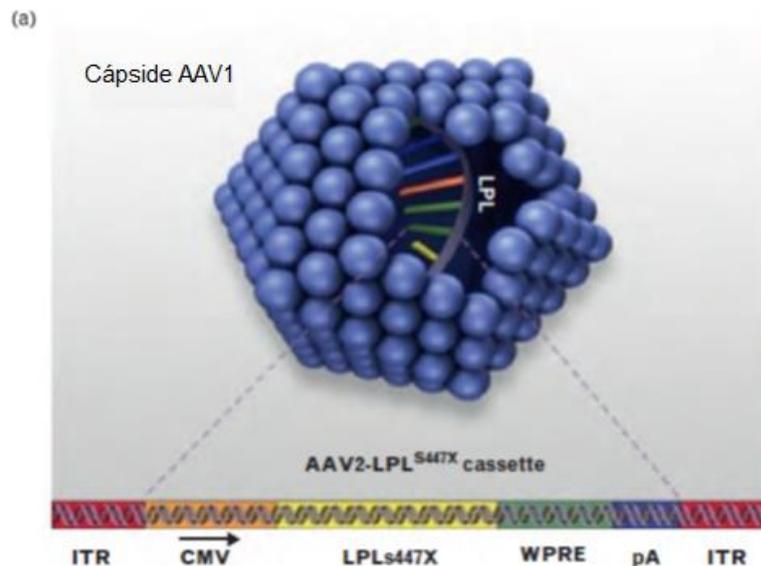
**Figura 2.** Tejido diana de diferentes serotipos de AAV. Representación parcial de los vectores AAV probados para la transferencia génica en modelos animales pequeños y grandes y sus principales tejidos diana.<sup>14</sup>

El vector utilizado para administrar el gen terapéutico *LPL<sup>S447X</sup>* está formado por una cubierta proteica derivada del AAV1, por su tropismo y transducción en el músculo esquelético, el promotor del citomegalovirus (CMV), un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) y repeticiones terminales invertidas (ITR) derivadas del AAV2.<sup>10</sup> El virus recombinante AAV1-LPL<sup>S447X</sup> (inicialmente designado AMT-010), fue producido inicialmente en un sistema de empaquetamiento con células de mamífero, pero para la producción a gran escala no era apropiado. Por lo tanto, cuando comenzaron los ensayos clínicos en humanos, se reemplazó por un sistema de producción más eficiente basado en baculovirus

<sup>13</sup> Dan Wang, Li Zhong, M Abu Nahid, Guangping Gao. The potential of adeno-associated viral vectors for gene delivery to muscle tissue. *Expert Opin Drug Deliv.* 2014; 11(3): 345–364.

<sup>14</sup> Arruda VR, Xiao W. It's all about the clothing: capsid domination in the adeno-associated viral vector world. *J Thromb Haemost.* 2007; 5(1):12-5.

en células de insecto. De esta forma, se denominó Alipogén tiparvovec (AMT-011).<sup>4</sup> (Fig.3)



**Figura 3.** Ilustración esquemática de la estructura del AAV1-LPL<sup>S447X</sup>. (a) El casete de expresión del transgén lleva un promotor de CMV (citomegalovirus) que impulsa la expresión del alelo *LPL*<sup>S447X</sup>, un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) y una secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (pA). Todo el casete está flanqueado por las repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV2. El casete de codificación AAV-LPL<sup>S447X</sup> de AAV2 se empaqueta dentro de las cápsides de serotipo1 (AAV1) que transducen células musculares esqueléticas más eficazmente que el AAV2.<sup>2</sup>

#### 4.- DESARROLLO PRECLÍNICO

Se utilizaron dos modelos animales deficientes en LPL para llevar a cabo los ensayos preclínicos de AAV1-LPL<sup>S447X</sup>, un ratón knockout LPL y un modelo felino natural con un alelo mutante que codifica una LPL catalíticamente inactiva.

### Estudios en ratón<sup>3,15</sup>

La deficiencia de LPL en ratones homocigotos *LPL* <sup>-/-</sup> provoca la muerte neonatal, por lo que es necesario el rescate mediante la administración intramuscular de un vector adenoviral con el transgén *LPL*<sup>S447X</sup> ( $1 \times 10^8$  Unidades formadoras de placas (UFP)), que impide la letalidad y permite que los ratones sobrevivan hasta la edad adulta. Estos ratones presentan los niveles de TG en plasma extremadamente elevados, niveles de LDL altos y muy bajos niveles de HDL. Al presentar un perfil similar al humano, estos ratones rescatados al nacer con Ad-*LPL*<sup>S447X</sup> se utilizaron para los estudios iniciales de la eficacia de la administración del transgén mediada por AAV.<sup>16,17</sup>

Ratones *LPL* <sup>-/-</sup> con 10-16 meses de edad fueron tratados con AAV1-*LPL*<sup>S447X</sup>, divididos en dos cohortes. Cada una recibió una dosis diferente de vector recombinante,  $8 \times 10^{11}$  u  $8 \times 10^{12}$  copias de genoma (gc)/kg, inyectada por vía intramuscular en 36 sitios (25  $\mu$ l por punto). Alternativamente, en otra cohorte, se inyectó por vía intramuscular  $8 \times 10^{12}$  gc/kg en 4 sitios (50  $\mu$ l por punto), para determinar si la disminución en los sitios de inyección del vector afectaba a la síntesis de LPL o a la corrección de la dislipemia. A los ratones control se les administró fosfato salino (PBS) en 36 sitios.

Tras el tratamiento de los ratones *LPL* <sup>-/-</sup> con alta dosis, los análisis de los niveles de proteína LPL humana en plasma mostraron un aumento de 12 veces en comparación con los controles, mientras que en los tratados con la dosis baja mostraron un aumento de 2 veces los niveles de proteína LPL de los controles (Fig. 5A). En cuanto a los análisis de la actividad enzimática LPL, mostraron un incremento de hasta el 33% en los ratones tratados con dosis elevada y 9% en los tratados con dosis baja. (Fig. 5B)

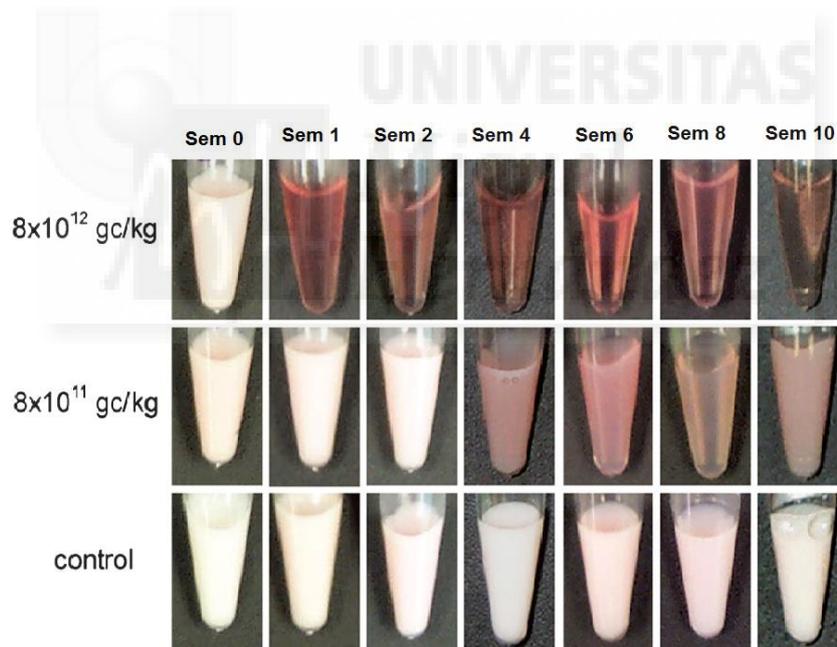
---

<sup>15</sup>Ross CJ, Twisk J, Meulenberg JM, Liu G, van den Oever K, Moraal E. Long-term correction of murine lipoprotein lipase deficiency with AAV1-mediated gene transfer of the naturally occurring LPL (S447X) beneficial mutation. *Hum Gene Ther.* 2004; 15 (9):906-19.

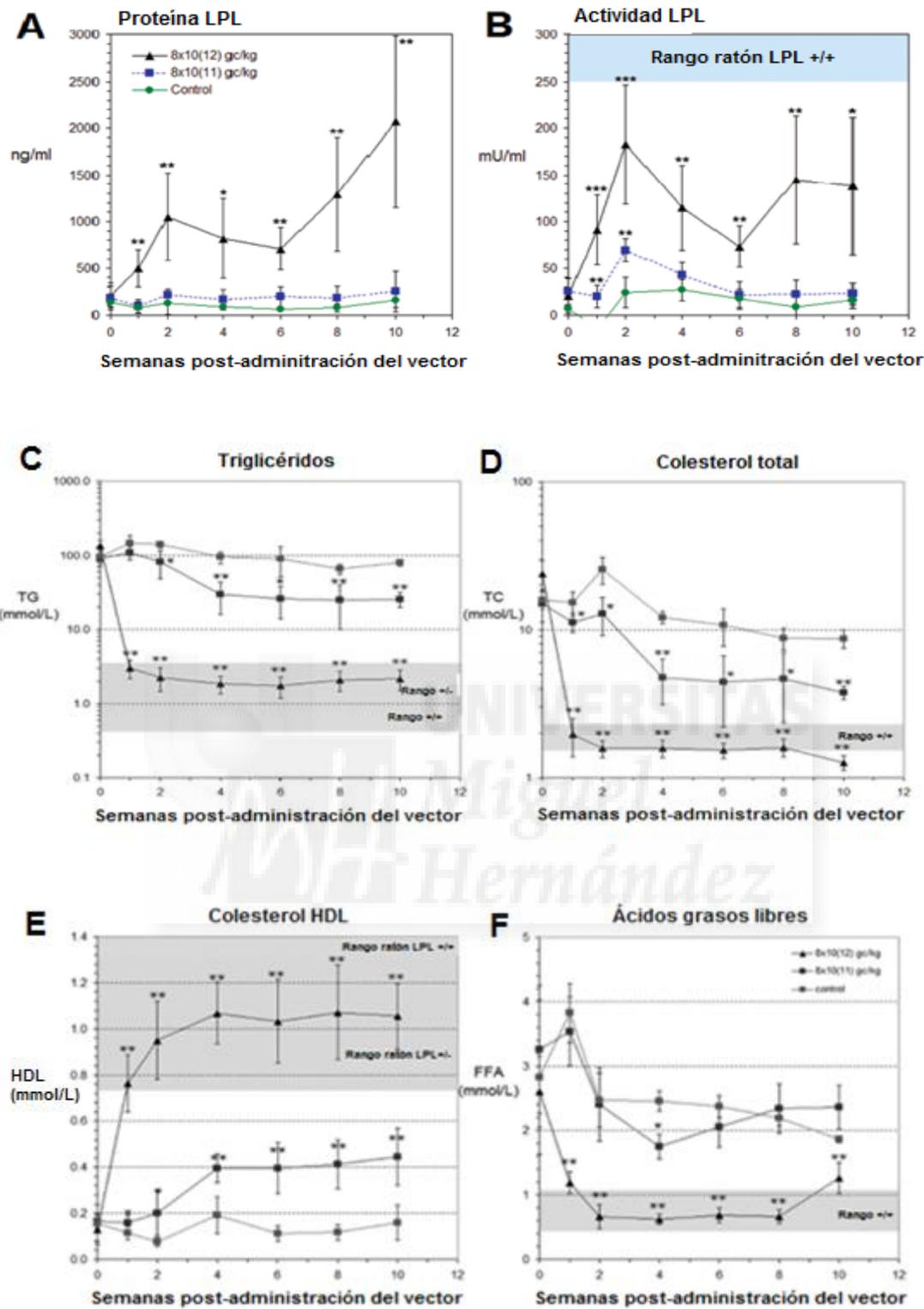
<sup>16</sup>Weinstock PH, Bisgaier CL, Aalto-Setälä K, Radner H, Ramakrishnan R, Levak-Frank S. Severe hypertriglyceridemia, reduced high density lipoprotein, and neonatal death in lipoprotein lipase knockout mice. *J Clin Invest.* 1995; 96(6):2555-68.

<sup>17</sup>Ross CJ1, Liu G, Kuivenhoven JA, Twisk J, Rip J, van Dop W. Complete rescue of lipoprotein lipase-deficient mice by somatic gene transfer of the naturally occurring LPLS447X beneficial mutation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25(10):2143-50.

La hiperlipidemia visible en plasma se corrigió en el periodo de una semana después de la administración de la dosis alta (Fig.4). También se observó reducciones, respecto a los niveles observados antes del tratamiento, de los TG (98%) y del colesterol total (TC) (92%) (Fig. 5C,D), así como la normalización de los niveles de FFA y el aumento de los niveles de colesterol HDL (61%) en comparación a los controles (Fig. 5E,F). En los ratones tratados con la dosis más baja, la eliminación de los lípidos en plasma fue más lenta y no se observó la corrección completa de la hiperlipidemia (Fig. 4). Se produjo reducción moderada de TG y TC (73% y 76%, respectivamente, de los niveles anteriores al tratamiento), mientras que los niveles de FFA se mantuvieron elevados y los de colesterol HDL aumentaron un 24% en relación a los observados en los controles (Fig.5C-F). En la cohorte cuyo régimen era la administración en 4 sitios, los niveles de actividad y proteína LPL, así como la corrección de los lípidos en plasma fue similar a la de los 36 sitios de inyección.



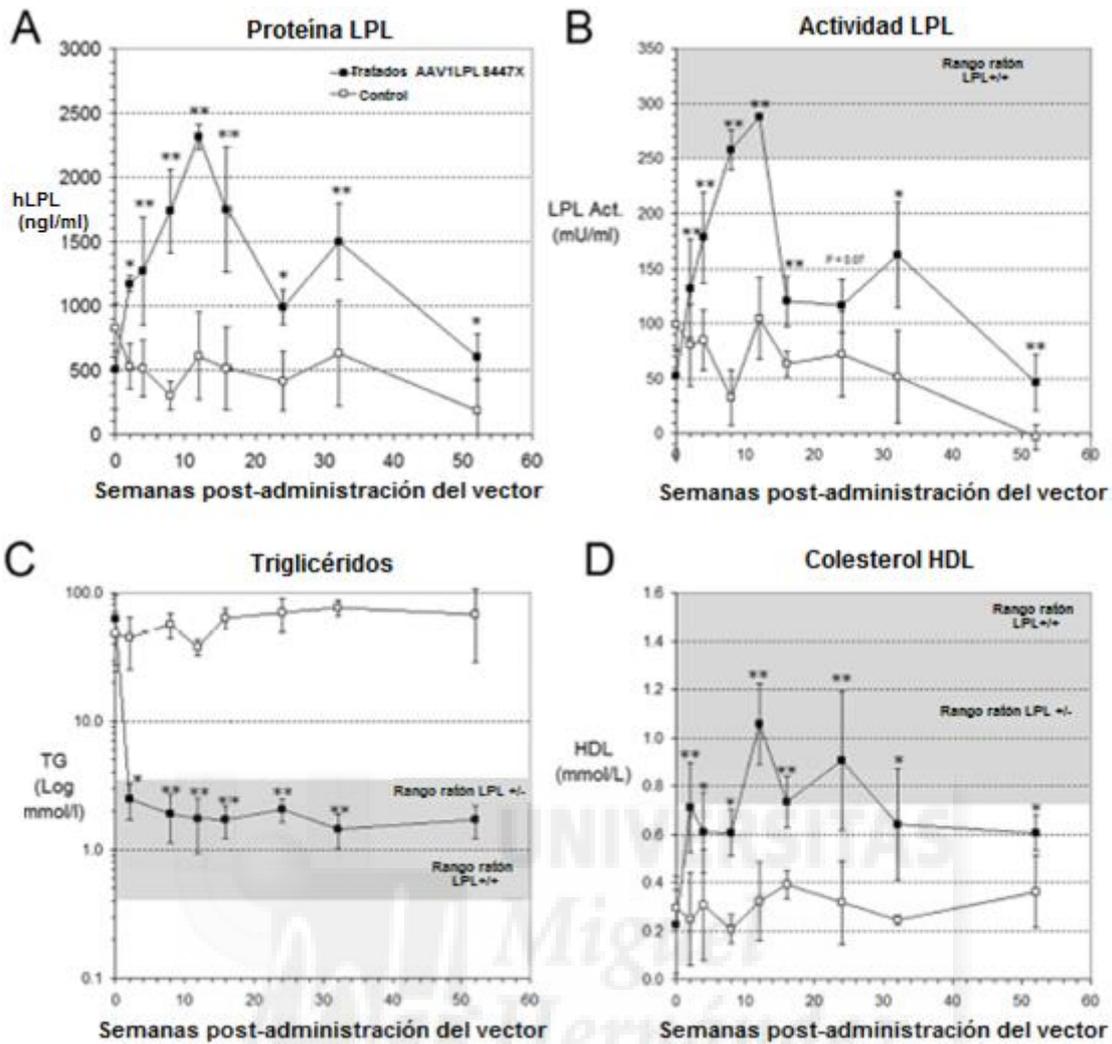
**Figura 4** .Corrección de la hiperlipidemia visible en plasma (plasma lechoso) después de la administración intramuscular (IM) de AAV1-LPL<sup>S447X</sup> a ratones *LPL*<sup>-/-</sup>. La hiperlipidemia visible en el plasma fue resuelta dentro de 1 semana después de la administración de  $8 \times 10^{12}$  copias del genoma de AAV1-LPL<sup>S447X</sup> por kilogramo (gc/kg). Mientras que con la dosis baja se logró a las 4 semanas y de forma incompleta.<sup>15</sup>



**Figura 5.** Expresión de LPL (A) y su actividad (B) después de la administración intramuscular de AAV1-LPL<sup>S447X</sup> en ratones *LPL*<sup>-/-</sup>. En las siguientes gráficas se muestra la corrección de los triglicéridos (TG), colesterol total (TC), colesterol HDL (HDL- C) y ácidos grasos libres (FFA) en el plasma de ratones *LPL*<sup>-/-</sup> tratados con AAV1-LPL<sup>S447X</sup>.<sup>15</sup>

A las 12 semanas, se sacrificaron los ratones para el análisis de la proteína y la actividad LPL dentro de los músculos inyectados (gastrocnemio y aductores), hígado, corazón y el tejido adiposo. Tanto la enzima como su actividad fueron detectadas sólo en el músculo, lo que sugiere que el producto transgénico, aunque secretado, permanece vinculado localmente al tejido inyectado.

Para estudiar la expresión a largo plazo del transgén y su efecto sobre los lípidos plasmáticos, inyectaron un grupo de ratones *LPL*  $-/-$  con una dosis alta ( $8 \times 10^{12}$  gc/kg) de AAV1-LPL<sup>S447X</sup> en 36 sitios y un grupo control con una dosis equivalente de AAV1-GP (con un transgén de la proteína verde fluorescente), y se realizó el seguimiento durante más de un año. Tanto los niveles de LPL en plasma como la actividad de la enzima alcanzaron un pico en la semana 12, después de lo cual disminuyeron lentamente (Fig. 6A,B). Esto podría ser debido al recambio del tejido muscular, con la producción de nuevas fibras musculares en respuesta al crecimiento o daño. En todo caso, los niveles de TG en plasma se redujeron un 97% y los de colesterol HDL incrementaron 3,3 veces durante la duración del experimento (Fig. 6C,D), lo que dio lugar a la corrección de la hiperlipidemia visible en plasma.



**Figura 6.** Corrección a largo plazo de la deficiencia de LPL en ratones *LPL*<sup>-/-</sup> tratados con AAV1-LPL<sup>S447X</sup> ( $8 \times 10^{12}$  gc/kg).<sup>15</sup>

Estos resultados demuestran que la expresión de la LPL humana mediada por AAV1-LPL<sup>S447X</sup> en el músculo esquelético de ratones *LPL*<sup>-/-</sup> da lugar a una normalización de la dislipemia dependiente de la dosis. A pesar de que la actividad LPL sólo alcanzó alrededor de un 33% en comparación con los ratones silvestres, esto fue suficiente para la corrección de la dislipidemia. Por lo tanto, este resultado sugiere que con una fracción de la actividad LPL normal puede ser suficiente para que el transgén sea terapéuticamente eficaz.

No se observó una respuesta inmune contra la LPL humana, probablemente debido a que los ratones se han hecho tolerantes al nacer por

el tratamiento con Ad-LPL<sup>S447X</sup>. Sin embargo, se detectaron anticuerpos anti-AAV1 en estudios similares.

### **Estudios en gatos**<sup>18,6,3</sup>

En este estudio se utilizan gatos LPL deficientes, miembros de una colonia de gatos domésticos de Nueva Zelanda, homocigotos para la mutación GLy412Arg en el gen de la LPL, que da lugar a una ausencia completa de la actividad catalítica. Estos gatos manifiestan síntomas clínicos similares a los de la deficiencia de LPL humana, incluyendo plasma lechoso debido a quilomicronemia, xantomas periféricos, lipemia retinalis, pancreatitis y retraso en el desarrollo.

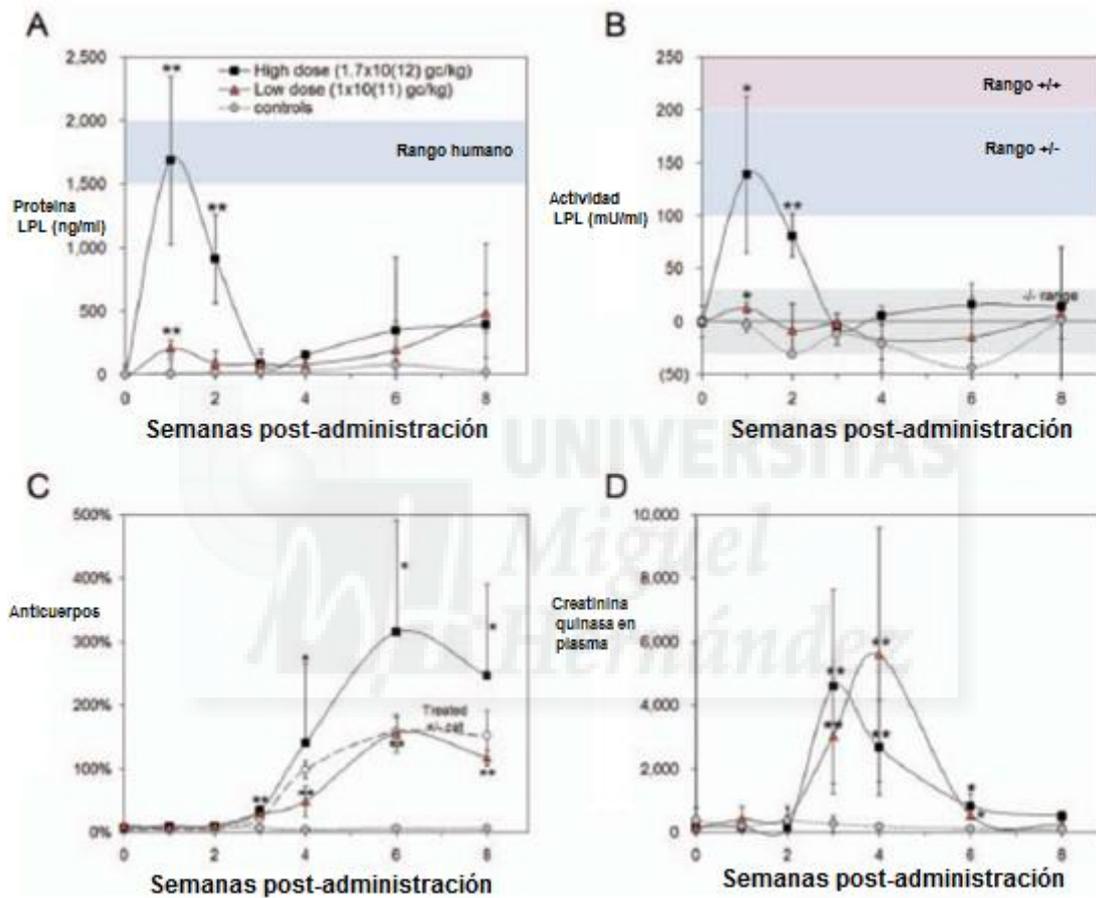
En un primer experimento, los gatos *LPL*<sup>-/-</sup> fueron tratados con AAV1-LPL<sup>S447X</sup> a una dosis baja de  $1 \times 10^{11}$  o a una dosis alta de  $1,7 \times 10^{12}$  gc/kg por inyección intramuscular en 10 sitios (1 ml/sitio). A los controles se les administró solución PBS mediante el mismo número de inyecciones. Durante las primeras semanas, en los gatos tratados con dosis alta, la lipemia visible en plasma se resolvió completamente, la reducción de los TG fue de un 99% con respecto al valor basal y el del TC un 77%. También se produjo un aumento del 27% de los niveles de colesterol HDL. En los gatos tratados con la dosis más baja no se observó ningún efecto sobre los niveles de lípidos en plasma. Sin embargo, tanto los incrementos en la actividad LPL y la cantidad de enzima como los cambios en los niveles de lípidos en plasma fueron transitorios, volviendo a los niveles previos al tratamiento en 2-3 semanas (Fig. 7A,B).

La disminución de la expresión del transgén y de la eficacia coincidió con una inducción de anticuerpos anti-LPL, detectables a las tres semanas después de la administración de AAV1-LPL<sup>S447X</sup>, tanto en los gatos tratados con dosis altas como en los tratados con dosis bajas, y con incrementos en los niveles de anticuerpos dependientes de la dosis (Fig. 7C). En todos los animales tratados, excepto en uno, los anticuerpos anti-LPL neutralizaron completamente la actividad LPL. Esta respuesta inmune se debió probablemente a que el

---

<sup>18</sup>Ross CJ, Twisk J, Bakker AC, Miao F, Verbart D, Rip J. Correction of feline lipoprotein lipase deficiency with adeno-associated virus serotype 1-mediated gene transfer of the lipoprotein lipase S447X beneficial mutation. Hum Gene Ther. 2006; 17(5):487-99.

transgén *LPL<sup>S447X</sup>* administrado no era específico de la especie. Junto al aumento de anticuerpos, los niveles de creatinina quinasa (CPK) en plasma aumentaron significativamente, volviendo a los valores basales en la semana 8. Este incremento transitorio indica daño en el tejido muscular producido por la administración intramuscular del virus recombinante (Fig.7D).



**Figura 7.** Expresión de LPL en plasma después de la inyección intramuscular de AAV1-LPL<sup>S447X</sup> con 1,7x10<sup>12</sup> o 1x10<sup>11</sup> gc/kg. Se observa un aumento transitorio de la enzima dependiente de la dosis (A), y aumento en los niveles de actividad, alcanzando el pico máximo una semana después de la transferencia génica (B). Medición de los anticuerpos anti-LPL, que fueron detectados a partir de la semana 3 (C). Se midió la creatinina quinasa en plasma (CPK) para observar el daño en el tejido muscular (D).<sup>18</sup>

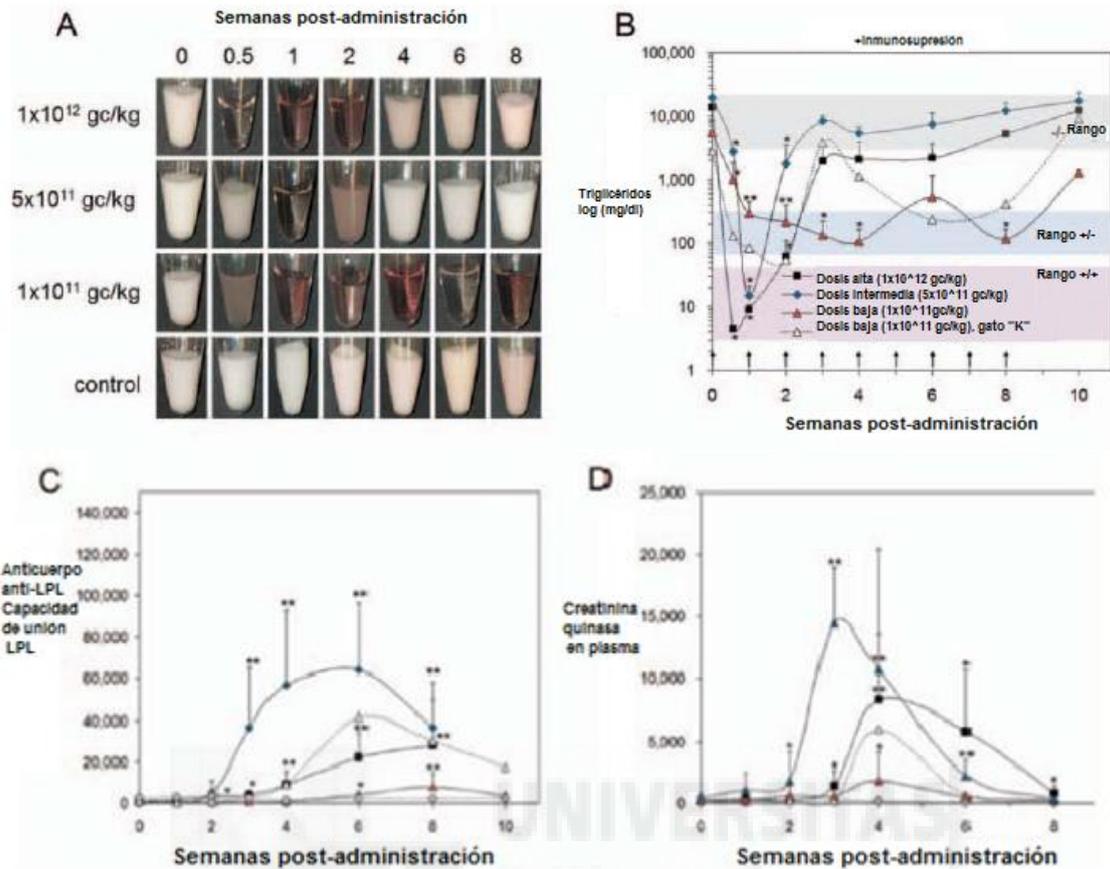
Al igual que se ha observado en otros estudios, también se formaron anticuerpos contra proteínas de la cápside después del tratamiento con AAV1-LPL<sup>S447X</sup>.

Se realizó un segundo experimento en el que los gatos fueron tratados con AAV1-LPL<sup>S447X</sup> a dosis de  $1 \times 10^{11}$  (dosis baja),  $5 \times 10^{11}$  (dosis media) o  $1 \times 10^{12}$  (dosis alta) gc/Kg, mediante inyecciones en 10 sitios, junto con dosis orales semanales de inmunosupresores (ciclofosfamida 100-200 mg/m<sup>2</sup>) para inhibir la respuesta inmunitaria.

En los gatos tratados con la dosis alta, se observó una resolución completa de la lipemia en plasma dentro de los primeros tres días y reducción de los TG más de un 99% en el día 7. Con las otras dosis también se observó disminución de TG y de la lipemia, aunque algo más lentamente (Fig. 8A,B). Así mismo, se produjo disminución del TC y aumento del colesterol HDL.

Sin embargo, a pesar del uso de un inmunosupresor, en los gatos tratados con dosis alta o intermedia la eficacia fue transitoria, volviendo a los niveles de lipemia y de TG basales en el intervalo de 2-3 semanas, junto a la aparición de anti-LPL en plasma (Fig. 8A,B,C). En contraste, dos de los tres gatos tratados con dosis baja mostraron una eficacia prolongada con una duración de 8 semanas. Estos animales no desarrollaron una respuesta inmune anti-LPL detectable hasta la semana 8, que fue cuando se retiró la administración del inmunosupresor (Fig. 8A,B,C). En estos dos gatos, los niveles de LPL disminuyeron con el tiempo, pero se mantuvieron por encima de los niveles basales, a la vez que se observaron niveles de actividad LPL equivalentes al 13% de los niveles normales de felinos.

Los niveles de CPK fueron significativamente elevados en los animales que produjeron anticuerpos, alcanzando un nivel máximo en la semana 4 con la dosis alta y en la semana 3 con la dosis intermedia. Los animales que no generaron anticuerpos mostraron una menor elevación en la semana 4. (Fig. 8D)



**Figura 8.** En estas gráficas se muestra la expresión de LPL después de la inyección intramuscular de AAV1-LPL<sup>S447X</sup> combinado con ciclofosfamida en gatos *LPL*<sup>-/-</sup>, a diferentes dosis de  $1 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$  o  $1 \times 10^{12}$  gc/kg. De los animales tratados con dosis bajas, un gato (gato "K") desarrolló anticuerpos y sus datos están representados por separado. Se observa una corrección transitoria de la lipemia en plasma (A) y los niveles de TG (B). Se muestra también la aparición de anticuerpos anti-LPL (C) y los niveles de creatinina quinasa en plasma (D).<sup>18</sup>

Estos resultados indican que la coadministración de ciclofosfamida fue eficaz, al menos parcialmente, en la atenuación de la respuesta de anticuerpos anti-LPL, permitiendo la eficacia del tratamiento a una dosis baja de AAV1-LPL<sup>S447X</sup>. Los niveles de proteína y actividad de LPL fueron mayores con la administración de ciclofosfamida y se logró una resolución más completa de la lipemia.

Se hizo un tercer experimento, para determinar si la capacidad secretora del tejido muscular era un factor limitante, el cual mostró que la producción y capacidad secretora del músculo esquelético no era un factor limitante.

Los resultados obtenidos en gatos proporcionan la primera prueba de la corrección de la dislipemia en un modelo animal de gran tamaño. Los datos derivados de los experimentos en ratones, por otro lado, demuestran la eficacia a largo plazo (superior a 1 año) después de una sola administración intramuscular de AAV1-LPL<sup>S447X</sup>, con ausencia de respuesta inmune contra la LPL.<sup>19</sup> Sin embargo, esto no se observa en los gatos, que sí dan lugar a respuesta inmune contra la proteína humana, lo que aconseja la utilización de un tratamiento inmunosupresor. Por tanto, los investigadores asumen la hipótesis de que la presencia de niveles detectables de LPL inactiva en la circulación debe disminuir el riesgo de una respuesta inmune contra el transgén, de manera que los individuos afectados de LPLD que escogen para los ensayos clínicos presentan niveles detectables de enzima, aunque inactiva, para evitar la reacción inmune contra la proteína transgénica.<sup>3</sup>

## 5.- DESARROLLO CLÍNICO

Para el desarrollo clínico de Glybera, se realizaron 2 estudios observacionales, tres estudios de intervención (AMT-010-01, AMT-011-01, AMT-011-02) y una revisión (AMT-011-03) para proporcionar datos sobre la incidencia y la naturaleza de la pancreatitis y establecer su eficacia. Los pacientes que participaron en estos ensayos se caracterizaban por la producción de enzima LPL con pérdida de función, lo que minimiza el riesgo de una respuesta inmune contra el producto transgénico.

---

<sup>19</sup>Rip J, Nierman MC, Sierts JA, Petersen W, Van den Oever K, Van Raalte D. Gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: working toward clinical application. *Hum Gene Ther.* 2005; 16(11):1276-86.

## **AMT-010-01**<sup>2,20</sup>

Este estudio se inició en Julio de 2005 por Amsterdam Molecular Therapeutics (AMT) en los Países Bajos. Antes de la administración del transgén, los pacientes participaron en un estudio observacional (PREP-01), en el cual fueron seguidos durante 18 meses por un dietista y se evaluaron los niveles de TG, el efecto de una dieta baja en grasa y la aparición de pancreatitis. Se demostró que el control de una dieta baja en grasa no produce la reducción significativa ni de los TG ni del riesgo de pancreatitis. Después del estudio observacional, ocho pacientes fueron divididos en dos cohortes, los tratados con una dosis baja de  $1 \times 10^{11}$  gc/kg y los tratados con una dosis alta de  $3 \times 10^{11}$  gc/kg de AAV1-LPL<sup>S447X</sup> administrado en 40 o 60 inyecciones intramusculares, respectivamente.

La eficacia se evaluó inicialmente en las 12 primeras semanas, determinándose la seguridad del tratamiento y los niveles de TG. Todos los participantes mostraron una disminución en ayunas de los niveles medios de TG en plasma, en comparación con el valor basal antes del tratamiento, y cuatro de ellos mostraron una reducción mayor del 40%. No se informaron efectos adversos graves durante el periodo de evaluación, siendo el dolor muscular generalizado en el lugar de la inyección el más común. Para evaluar la eficacia a largo plazo, se realizó un seguimiento durante un periodo desde 26 semanas hasta 3 años después de la administración. En todos los participantes se observaron niveles de TG alrededor del valor basal, lo que indica una pérdida de eficacia. Ya que la reducción había sido transitoria, se planteó que podía ser debida a una respuesta inmune contra las proteínas de la cápside de AAV1. Sin embargo, no se detectaron anticuerpos contra el transgén.

Estos resultados, además de la ausencia de acontecimientos adversos graves debidos al tratamiento, revelaron la necesidad de una dosis más alta de AAV1-LPL<sup>S447X</sup> para aumentar la expresión del transgén y el uso de un inmunosupresor para reducir la respuesta inmune contra el vector.

---

<sup>20</sup>Stroes ES, Nierman MC, Meulenberg JJ, Franssen R, Twisk J, Henny CP. Intramuscular administration of AAV1-lipoprotein lipase S447X lowers triglycerides in lipoprotein lipase-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*2008;28(12):2303-4.

El segundo ensayo clínico se inició en Quebec, en agosto de 2007. Los objetivos primarios fueron evaluar la seguridad a largo plazo del tratamiento en un mayor número de pacientes y la eficacia, consistente en una reducción en ayunas de TG en plasma de al menos el 40%. Los objetivos secundarios fueron conseguir una reducción en ayunas de TG en el plasma a una concentración  $\leq 10$  mmol/l, que es el criterio tradicional empleado para el control de la enfermedad, dentro de las 12 semanas después de la administración de Alipogén tiparovec, medir la actividad y expresión de la enzima LPL<sup>S447X</sup> en el músculo después de 26 semanas, evaluar la respuesta inmune contra las proteínas LPL<sup>S447X</sup> y de la cápside, y determinar la biodistribución y propagación a otros tejidos del ADN del virus AAV1-LPL<sup>S447X</sup>.

Se llevó a cabo un estudio observacional previo (PREP-02), en el que 22 pacientes adultos afectados de LPLD y con antecedentes de pancreatitis fueron seguidos durante más de 4 meses para observar las manifestaciones de la enfermedad, el efecto de una dieta controlada baja en grasa y los niveles en ayunas de TG en plasma. De los 22 pacientes, se escogieron 14 que cumplían los criterios de elegibilidad y se les dividió en tres cohortes. Los individuos de las cohortes 1 (n=2) y 2 (n=4) recibieron una dosis de  $3 \times 10^{11}$  gc/kg y los de la cohorte 3 (n=8) recibieron  $1 \times 10^{12}$  gc/kg. Además, los pacientes de las cohortes 2 y 3 recibieron un régimen de inmunosupresores durante 12 semanas, que consistía en ciclosporina A (3 mg/kg al día) y micofenolato de mofetilo (2 g al día).

Los efectos adversos más comunes se observaron en los sitios de inyección, consistiendo en dolor, hematomas y edemas transitorios. Durante el seguimiento a largo plazo tuvieron lugar 6 efectos adversos graves, aunque ninguno de ellos se relacionó con la administración del vector. Uno de estos efectos graves se produjo en un paciente diabético con antecedentes de pancreatitis recurrente frecuente e insuficiencia renal crónica, que sufrió un

---

<sup>21</sup>Gaudet D, Méthot J, Déry S, Brisson D, Essiembre C, Tremblay G. Efficacy and long-term safety of alipogene tiparovec (AAV1-LPLS447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial. *Gene Ther.* 2013; 20(4):361-9.

paro cardíaco y falleció durante el periodo de seguimiento. Los inmunosupresores no dieron lugar a efectos adversos.

No se observó producción de anticuerpos anti-LPL<sup>S447X</sup>, mientras que los anticuerpos anti-AAV1 se detectaron en aproximadamente la mitad de los sujetos antes de la administración de Alipogén tiparovec. Después del tratamiento todos los sujetos mostraron aumento de anticuerpos anti-AAV1. (Tabla 1)

**Tabla 1.** Respuesta inmune a AAV1

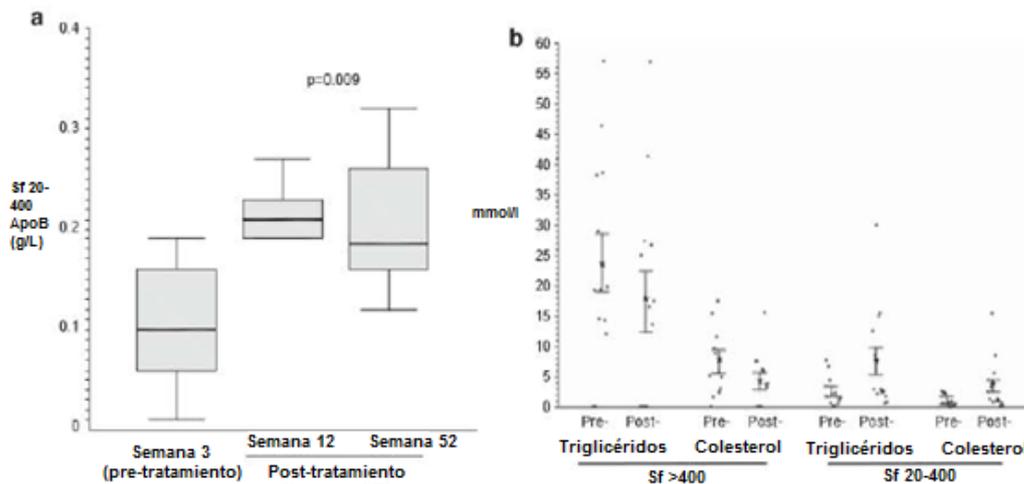
Sujeto	Dosis (gc/kg)	Anticuerpos contra AAV1	
		Pre-administración	Post-administración
01	$3 \times 10^{11} + \text{ISR}$	++	++
04	$3 \times 10^{11}$	n.d.	++
06	$3 \times 10^{11}$	-	++
07	$3 \times 10^{11} + \text{ISR}$	+	++
08	$1 \times 10^{12} + \text{ISR}$	-	++
09	$1 \times 10^{12} + \text{ISR}$	-	++
10	$3 \times 10^{11} + \text{ISR}$	-	++
11	$1 \times 10^{12} + \text{ISR}$	+	++
13	$1 \times 10^{12} + \text{ISR}$	+	++
14	$3 \times 10^{11} + \text{ISR}$	++	++
15	$1 \times 10^{12} + \text{ISR}$	+	++
18	$1 \times 10^{12} + \text{ISR}$	+	++
19	$1 \times 10^{12} + \text{ISR}$	-	++
20	$1 \times 10^{12} + \text{ISR}$	+	++

Los resultados de las pruebas de las muestras se ajustan en comparación con los de un control negativo (muestra de suero de un control humano sano). Las muestras son fuertemente positivo (++) , débilmente positivo (+) o negativo (-) para los anticuerpos contra AAV1.<sup>21</sup>

Siete sujetos dieron su consentimiento para la realización de una biopsia muscular a las 26 semanas, detectándose ADN AAV1-LPL<sup>S447X</sup> en todas las muestras y observándose la presencia de la proteína mediante tinción con anticuerpo en cuatro de ellas. También se detectó en cinco de ellas la acumulación de lípidos intracelulares, lo que es consistente con un incremento local de la actividad LPL. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros estudios en humanos que muestran expresión persistente de un transgén tras transferencia génica en músculo mediada por un vector AAV. No se detectaron cantidades significativas de ADN AAV1-LPL<sup>S447X</sup> en otros tejidos, siendo mínimo el riesgo de transmisión a través de la línea germinal.

Después de la administración de Alipogén tiparvovec, los niveles de TG en ayunas disminuyeron en todos los sujetos menos en dos, alcanzando la mitad de ellos el objetivo principal de una reducción de un 40% de TG. Incluso, cuatro pacientes alcanzaron el objetivo secundario de concentración de TG en el plasma  $\leq 10$  mmol/l. Sin embargo, los TG volvieron a sus niveles basales durante las semanas 16-26.

Debido al efecto transitorio sobre los TG, con el fin de determinar si Alipogén tiparvovec podía tener un efecto prolongado sobre otro aspecto del metabolismo de las lipoproteínas, se estudió la distribución de TG, colesterol y la concentración de apolipoproteína B, ésta como medidora del número de lipoproteínas circulantes ricas en TG, en las distintas fracciones de lipoproteínas hasta la semana 52. Los parámetros de Sf (unidades de flotación Svedberg)  $>400$  corresponden a la densidad de los QM y entre 20-400 a la densidad de las VLDL. El análisis mostró que la concentración total de apolipoproteína B en la fracción Sf 20-400 se incrementó en comparación con el nivel basal (Figura 9a), coincidiendo con un aumento en el colesterol y TG en esta fracción (Figura 9b). Estas modificaciones de las características de las lipoproteínas ricas en TG fueron independientes del efecto de Alipogén tiparvovec sobre los TG totales, que se mantuvieron invariables a las 52 semanas de tratamiento respecto a los valores iniciales. Puesto que la LPL es una enzima esencial en la conversión de QM en VLDL, esto sugiere que hubo un aumento sostenido de la actividad LPL a pesar de la falta de efecto a largo plazo sobre los TG totales en plasma.



**Figura 9.** (a) Apolipoproteína B en la fracción Sf 20-400 antes del tratamiento, 12 y 52 semanas después de la administración de Alipogén tiparvovec. (b) Distribución de TG y colesterol en plasma en la fracción de Sf>400 y Sf 20-400 antes del tratamiento y 52 semanas después de la administración de Alipogén tiparvovec.<sup>21</sup>

Además, en la mayoría de los pacientes, la administración del transgén se asoció con beneficios clínicos, tales como la capacidad de comer más o de comer alimentos que antes no toleraban, aumento de energía, disminución de la incidencia de pancreatitis, así como disminución de la intensidad, duración y el pico de dolor abdominal durante la crisis de pancreatitis en comparación con lo que ocurría antes del tratamiento. La reducción en la incidencia de pancreatitis durante 2 años de estudio fue de 5 veces.

Estos resultados demuestran que Alipogén tiparvovec está bien tolerado para el periodo de 2 años de seguimiento máximo, y se asocia con beneficios clínicos y expresión de LPL persistente en los músculos, disminución transitoria de TG en plasma y alteraciones en el metabolismo de los QM. Este estudio plantea la posibilidad de que las características de las lipoproteínas (tamaño, contenido de lípidos y la cinética de los QM) podría ser un mejor marcador de la expresión clínica de LPLD y del efecto de la administración de Alipogén tiparvovec que la concentración de TG totales en plasma, ya que las modificaciones en las características de las lipoproteínas aparentemente podrían contribuir a beneficios clínicos y a la disminución de pancreatitis.

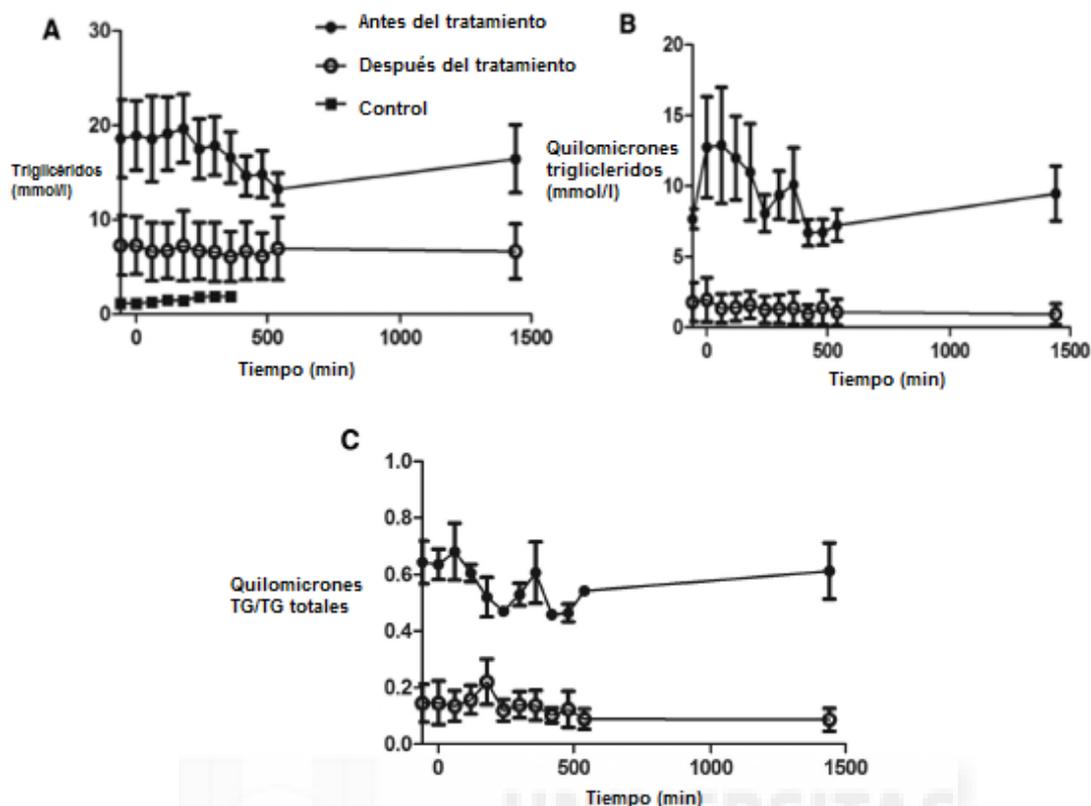
## **AMT-011-02**<sup>3,22</sup>

Este tercer estudio se realizó para medir el efecto de Alipogén tiparovec sobre el metabolismo de los QM y, de esta forma, plantear el uso de los QM posprandiales como marcador de la eficacia. A 5 pacientes con LPLD, se les administró Alipogén tiparovec a una dosis de  $1 \times 10^{12}$  gc/kg, junto con el tratamiento inmunosupresor con ciclosporina oral (3 mg/kg al día) y micofenolato de mofetilo (2g al día), que comenzó 3 días antes de las inyecciones y se prolongó hasta 12 semanas, para reducir una posible reacción inmune contra la cápside AAV1. Además, para potenciar el tratamiento inmunosupresor, se administró una única inyección intravenosa de metilprednisolona (1 mg/kg) 30 minutos antes de la administración de Alipogén tiparovec.

A diferencia de los ensayos anteriores, en los que se medían los niveles en ayunas de lípidos en plasma, en este estudio se midió el metabolismo posprandial de los QM en plasma desde 2 semanas antes hasta 14 semanas después de recibir el tratamiento, tras la ingesta de una dieta baja en grasas, apropiada para pacientes con LPLD, que contenía <sup>3</sup>H-palmitato. Antes de la administración de Alipogén tiparovec, después de las comidas, los sujetos con LPLD mostraron niveles de TG en plasma elevados y un mayor contenido de TG en la fracción de lipoproteína de los QM comparado con los sujetos control (individuos sanos con sobrepeso), mientras que a las 14 semanas después de recibir el tratamiento los resultados posprandiales fueron similares a los de los sujetos control (Fig.10).

---

<sup>22</sup>Carpentier AC, Frisch F, Labbé SM, Gagnon R, de Wal J, Greentree S. Effect of alipogene tiparovec (AAV1-LPL (S447X)) on postprandial chylomicron metabolism in lipoprotein lipase-deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97(5):1635-44.



**Figura 10.** TG posprandiales en plasma (A), TG de la fracción de lipoproteína de los QM (B) y TG de la fracción de lipoproteína de los QM/TG totales en plasma (C) que se muestran en pacientes con LPLD 2 semanas antes y 14 semanas después de la administración de Alipogén tiparovec. También se muestran los niveles plasmáticos de TG totales posprandiales en sujetos sanos de control.<sup>22</sup>

Por lo tanto, los resultados de este estudio sugieren que el efecto predominante de Alipogén tiparovec se produce sobre el metabolismo de los QM recién formados tras la comida, lo que hipotetizan pudiera ser decisivo en la reducción de la incidencia de pancreatitis observada en los ensayos clínicos, con un menor efecto en los QM remanentes, las LDL y los TG totales en plasma.

**AMT-011-03**<sup>2,3</sup>

Este estudio se realizó para proporcionar datos sobre la incidencia y la naturaleza de la pancreatitis y de los episodios de dolor abdominal en

pacientes con LPLD antes y después del tratamiento para, de esta forma, establecer la eficacia de Alipogén tiparovec.

Se trata de un estudio retrospectivo que incluye 17 pacientes tratados con Alipogén tiparovec. Se evaluó la aparición de pancreatitis en un periodo de tres años, antes y después del tratamiento, observándose una disminución en el número de episodios de pancreatitis. Sin embargo, antes del tratamiento tuvieron lugar 41 episodios, de los cuales 11 fueron en sólo 3 sujetos, de manera que la mayoría de los episodios se produjeron en estos individuos. Además, 8 sujetos no tuvieron ningún episodio durante el periodo de seguimiento. Debido a esto, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) consideró, en principio, que estos resultados eran insuficientes para proporcionar evidencia de la eficacia en la reducción de pancreatitis, aconsejando la necesidad de un periodo de seguimiento más largo.

## 6.- APROBACIÓN DE GLYBERA<sup>3,23,24</sup>

La aprobación de Glybera ha sido un proceso largo y complejo, tras la presentación de la solicitud de comercialización a la EMA en diciembre de 2009. En esta vía, la aprobación final para la comercialización de un medicamento en la Unión Europea (UE) recae en la Comisión Europea (EC). Debido a que nunca se había aprobado en Europa una terapia génica, dos de las preocupaciones que se plantearon fueron la seguridad relacionada con la transferencia de genes mediada por un vector viral y el proceso de fabricación del vector viral.

En junio de 2011, tanto el Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP), responsable de realizar revisiones científicas y hacer recomendaciones finales a la EC para la comercialización de medicamentos, como el Comité de Terapias Avanzadas (CAT), establecido por la EMA para la evaluación de terapias génicas y celulares, adoptaron dictámenes negativos

---

<sup>23</sup>Ylä-Herttuala S. Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European Union. *Mol Ther.* 2012; 20(10):1831-2.

<sup>24</sup>Ylä-Herttuala S. The need for increased clarity and transparency in the regulatory pathway for gene medicines in the European Union. *Mol Ther.* 2012; 20(3):471-2.

sobre el uso de Glybera. Aunque las cuestiones de seguridad relacionadas con la transferencia génica y el proceso de manufacturación del vector fueron consideradas satisfactorias, se identificó el tratamiento de inmunosupresión durante 12 semanas como un riesgo potencial y no completamente justificado.

Con todo, la demostración de la eficacia del tratamiento fue el principal obstáculo para la aprobación de Glybera. El CAT propuso que, a pesar de que los datos con los modelos animales y la opinión de los expertos sugerían inicialmente que el nivel de TG en el plasma era un marcador adecuado del riesgo de pancreatitis, tanto la elevada variabilidad en los niveles de TG en ayunas, antes y después del tratamiento, como el efecto transitorio del tratamiento sobre éstos indicaban que podría tratarse de un mal indicador de la eficacia, afirmación con la que también se mostró de acuerdo el CHMP. Así, el CAT propuso establecer, de acuerdo con “la evolución del conocimiento científico” sobre esta rara enfermedad, un cambio en el objetivo primario hacia medidas del metabolismo posprandial de los QM. La ausencia de datos que certificaran un efecto duradero del Alipogén tiparvovec sobre los niveles de TG en el plasma o sobre el metabolismo de los QM posprandiales fue tomada en cuenta a la hora de que el CAT y el CHMP rechazaran la comercialización.

Además, otro hecho que el CAT y el CHMP tuvieron en cuenta fue que, a pesar de que los análisis de los datos realizados por expertos independientes sugerían una reducción en la incidencia de pancreatitis, la mayoría de los casos se produjeron en 3 de los 17 individuos que se evaluaron en el ensayo clínico (AMT-011-03), siendo por tanto muy limitado el número de episodios en el resto de sujetos como para llegar a conclusiones sólidas respecto al efecto de Glybera sobre la reducción de los casos de pancreatitis.

En octubre de 2011, AMT solicitó una nueva revisión, incluyendo cambios para resolver las cuestiones anteriores. La compañía reconoció que el estudio del metabolismo de los QM posprandiales podría ser un marcador adecuado de eficacia, en lugar de los niveles totales en ayunas de TG en el plasma, consultó a médicos para examinar el riesgo relativo del tratamiento inmunosupresor, quienes dictaminaron que el riesgo era mínimo debido a la duración corta del tratamiento, y creó un panel de expertos para evaluar con

mayor objetividad la incidencia de pancreatitis, aumentando su relevancia, a pesar del pequeño número de pacientes. Además, aceptaron la realización de un estudio de seguimiento de los pacientes tratados, posterior a la aprobación, para resolver todas las cuestiones propuestas. El CAT dio un dictamen positivo para Glybera en pacientes con pancreatitis recurrente. Sin embargo, el CHMP determinó que no había datos suficientes para mostrar la eficacia, denegando la aprobación. En este momento, AMT pasó por grandes problemas financieros y una empresa privada denominada uniQure adquirió sus derechos.

En una tercera fase, en enero de 2012, la Comisión Europea (EC) solicitó al CHMP que volviera a evaluar la relación beneficio-riesgo de Glybera para su aplicación en un grupo restringido de pacientes con pancreatitis recurrente. Éste solicitó datos adicionales, como los índices de diabetes y hospitalización, pero aun así dictaminó negativamente en abril de 2012, ya que los datos de eficacia no le resultaron suficientemente convincentes debido a que la información aportada sobre la reducción de QM posprandiales en el plasma se basaba únicamente en 5 individuos. No obstante, cabe destacar que una mayoría no suficiente de los miembros del CHMP se manifestaron a favor de la comercialización de Glybera y que el comité sí determinó la seguridad del tratamiento inmunosupresor.

Tras varias sesiones de diálogo entre el CAT y el CHMP con los representantes de uniQure, se planteó una nueva solicitud, en la que el CAT mantuvo la necesidad de un estudio postcomercialización para añadir datos de eficacia, justificando la aprobación en las circunstancias excepcionales de los pacientes afectados de cuadros graves de pancreatitis recurrente y teniendo en cuenta la dificultad para obtener datos sobre esta enfermedad huérfana. Y, finalmente, en julio de 2012, el CHMP declaró su acuerdo con el CAT en que Glybera pudiera comercializarse para el tratamiento de pacientes adultos con diagnóstico de LPLD y que sufren de episodios graves o múltiples de pancreatitis a pesar de las restricciones de la grasa en la dieta. De esta manera, aunque varios miembros del CHMP expresaron su desacuerdo, argumentando que las evaluaciones postcomercialización de los efectos de Glybera sobre el metabolismo de los QM posprandiales y la incidencia de

pancreatitis deberían haberse realizado antes de su aprobación como medicamento, finalmente prevalecieron los previsibles efectos beneficiosos de Glybera sobre sus riesgos potenciales.

Después de la recomendación positiva del CHMP, en noviembre de 2012, la EC aprobó Glybera para su comercialización en la UE. Las disposiciones de la aprobación incluyeron la adopción de un programa de farmacovigilancia, un plan de gestión de riesgos, informes semestrales sobre la seguridad del medicamento y la creación de un registro para cada paciente tratado con Glybera.

## **7.- FORMA DE PRESENTACIÓN Y TRATAMIENTO<sup>9</sup>**

La forma de presentación es Glybera  $3 \times 10^{12}$  gc/ml solución inyectable. Se administra en una sola serie de inyecciones en los músculos de las extremidades inferiores, con una dosis máxima de  $1 \times 10^{12}$  gc/kg. El número de viales, número de jeringas y número de puntos de inyección se calcula a partir del peso del paciente en Kg. Como el contenido de cada vial es 1 ml de solución inyectable conteniendo  $3 \times 10^{12}$  gc del AAV recombinante, el número de viales se calcula dividiendo el peso entre 3 y se redondea al número entero superior más próximo. En cada punto de inyección la dosis recomendada es de  $1,5 \times 10^{12}$  gc o 0,5 ml de solución inyectable, de manera que para calcular el número de puntos de inyección y el número de jeringas, el peso se divide entre 3, se multiplica el número obtenido por 2 y se redondea al número entero superior.

La pauta inmunosupresora consta de ciclosporina (3 mg/kg/día) y micofenolato mofetilo (2 x 1 g/día) durante tres días antes y hasta 12 semanas después de la administración de Glybera. Media hora antes se debe administrar un bolo intravenoso de metilprednisolona (1mg/Kg).

## 8.- DISCUSIÓN

La terapia génica consiste en la utilización de ácidos nucleicos con fines terapéuticos, incluyendo:

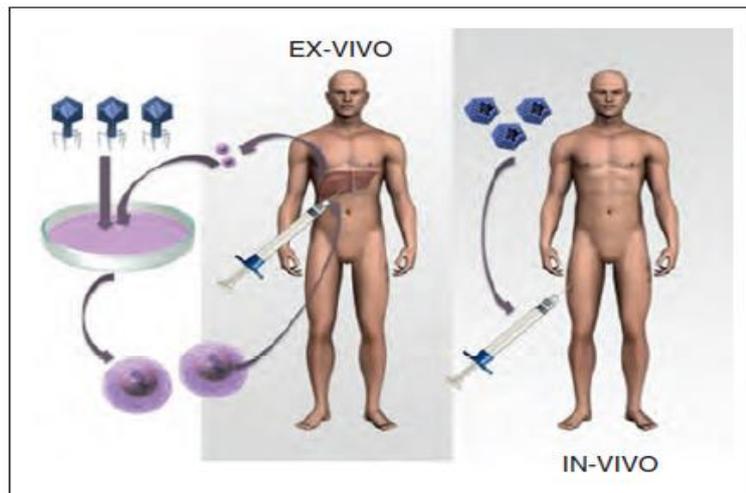
- Restaurar la función de un gen defectuoso.
- Incrementar la función de un gen endógeno con fines terapéuticos.
- Eliminar la expresión de un gen endógeno con efecto patológico o la expresión del gen/es de un patógeno.

Para llevarse a cabo, se requiere un profundo conocimiento de las causas moleculares de la enfermedad como la identificación de las células o tejido diana, genes y proteínas implicados.

En la actualidad, la terapia génica somática es la única que se contempla dentro de la práctica médica debido a razones éticas, ya que la terapia génica de células germinales implica una potencial modificación de la descendencia del individuo. La terapia génica somática se realiza sobre las células no germinales (no implicadas en la producción de gametos) de un individuo, por lo que las modificaciones que se producen con la terapia únicamente tienen lugar en ese paciente, no afectando a la descendencia. Se lleva a cabo ya sea *ex vivo*, técnica en la que se extraen células a las que se les introduce el ácido nucleico terapéutico y una vez transformadas se vuelven a introducir en el organismo, o *in vivo* en la cual se añade directamente el ácido nucleico terapéutico al organismo. En ambos casos suele requerirse un sistema de administración utilizando vectores virales o no virales para asegurar la entrega de ADN.<sup>25</sup> (Fig. 11)

---

<sup>25</sup>Strachan, T. y Read, A.P. (2006) Genética Humana. Tercera Edición. McGraw-Hill Interamericana.



**Figura 11.** Terapia génica ex vivo e in vivo. Se muestra la diferencia entre terapia génica ex vivo e in vivo.<sup>2</sup>

La terapia génica que plantea la utilización de Glybera es, por tanto, una terapia de aumento génico que pretende la restauración de la función de un gen defectuoso, mediante una estrategia in vivo sobre células somáticas como son las fibras musculares.

La justificación para intentar la terapia génica para la LPLD se basa en que no existen tratamientos eficaces. La ERT no es adecuada, ya que la vida media de la enzima es muy corta, y el tratamiento farmacológico es ineficaz. La única opción era la restricción severa de las grasas en la dieta para controlar los síntomas y aun así en muchos pacientes éstos no se resolvían, provocando elevado riesgo de pancreatitis, lo cual puede resultar mortal y disminuir en gran medida la calidad de vida de los pacientes.

Se utilizaron dos modelos animales para los ensayos preclínicos. Por un lado los ratones, a los cuales se les administró una dosis de  $8 \times 10^{11}$  u  $8 \times 10^{12}$  gc/kg de AAV1-LPL<sup>S447X</sup>. En ambos casos tuvo lugar una disminución de TG a niveles casi normales, aumento de la actividad LPL y una resolución de la lipemia en plasma, aunque en la cohorte de la dosis baja estos cambios se produjeron más lentamente. No se observó respuesta inmune contra el transgén, lo que puede ser debido a la tolerancia creada al nacer por la administración de Ad-LPL<sup>S447X</sup>. Además, a pesar de que la actividad LPL sólo

alcanzó el 33% comparada con los ratones normales, esto fue suficiente para una corrección de la dislipemia. Se puede concluir que una fracción de la actividad LPL normal es terapéuticamente eficaz. Aunque doce semanas después de la inyección la expresión de LPL disminuyó lentamente, el efecto beneficioso posterior se prolongó durante más de un año, indicando que esta terapia génica es factible a largo plazo.

Con posterioridad, se utilizó un modelo felino, empleando dosis diferentes de AAV1-LPL<sup>S447X</sup> en el tratamiento. Los resultados fueron dosis-dependientes, mostrando una corrección rápida de TG y de la lipemia visible en plasma. Sin embargo, la eficacia fue transitoria debido a la respuesta inmune contra la proteína LPL<sup>S447X</sup>, probablemente causada porque el transgén administrado no era específico de la especie. Para evitar la respuesta inmune, se incluyó un régimen inmunosupresor. Los resultados mostraron la atenuación parcial de la respuesta de anticuerpos anti-LPL, mejorando la duración de la eficacia a una dosis baja de AAV1-LPL<sup>S447X</sup>. Se concluye que la presencia de niveles detectables de LPL inactiva en la circulación disminuye el riesgo de una posible respuesta inmune y eficacia a largo plazo. Por lo tanto, uno de los requisitos para la inclusión en los ensayos clínicos en pacientes con LPLD fue la presencia de niveles detectables de LPL inactiva en la circulación.

Es de gran utilidad tener modelos animales pequeños y grandes, que se utilizan en el desarrollo de los datos preclínicos para apoyar los posteriores estudios en humanos. El modelo de ratón no se asemeja completamente al fenotipo de los seres humanos, mostrando una deficiencia completa de LPL en el nacimiento que es letal, mientras que el modelo felino es más parecido a las características de la enfermedad en humanos, lo que resultó muy útil. (Tabla 2)

**Tabla 2.** Parámetros de los modelos preclínicos.

	Ratón	Gato	Humano
Genotipo	LPL -/-	LPLG412R (mutación catalíticamente inactiva)	Múltiple
Rescate Ad al nacer	Sí	No	No
Respuesta inmune a LPL	No	Sí	No
Hipertrigliceridemia	Sí	Sí	Sí
Pancreatitis	No	Sí	Sí
Daño muscular	Sí	No	No

Los ratones con LPLD muestran varias características distintas con respecto a la enfermedad en los humanos, como el rescate mediado por adenovirus en el nacimiento, daño muscular preexistente, acumulación de lípidos y ausencia de pancreatitis. El modelo felino se asemeja más a las características de la enfermedad humana.<sup>3</sup>

Al tratarse de una enfermedad muy rara, antes de los ensayos clínicos se realizaron estudios observacionales que permitieron una mejor comprensión de la LPLD, demostrando que la dieta baja en grasa no es suficiente como tratamiento eficaz de la enfermedad.

Los resultados del primer ensayo en humanos (AMT-010-01) mostraron que una única administración intramuscular de AAV1-LPL<sup>S447X</sup> inducía la expresión local de LPL y una reducción transitoria de TG en ayunas. El efecto transitorio del transgén podría ser debido a la presencia de anticuerpos contra la cápside AAV1. Estos datos indican la necesidad de acompañar con un tratamiento con inmunosupresores y una dosis más alta de Alipogén tiparvovec.

Los resultados del segundo ensayo (AMT-011-01) mostraron un efecto transitorio sobre los niveles de TG en ayunas, expresión de LPL persistente y signos de mejoría clínica, incluyendo una disminución en la incidencia de pancreatitis, así como cambios en las características de las lipoproteínas ricas en TG independientemente del efecto sobre los TG totales en ayunas. Por lo tanto, se planteó la posibilidad de que las características de las lipoproteínas

(tamaño, contenido de lípidos y la cinética de los QM) podrían ser mejores marcadores de riesgo de pancreatitis, en lugar de la concentración plasmática de TG en ayunas. Estos resultados llevaron a la ejecución de dos estudios adicionales diseñados para evaluar el efecto de Alipogén tiparvec en el metabolismo de los QM posprandiales (AMT-011-02) y en la pancreatitis (AMT-011-03).

En el ensayo AMT-011-02, a todos los sujetos se les administró una dosis de  $1 \times 10^{12}$  gc/kg de Alipogén tiparvec junto con el régimen inmunosupresor. Los niveles de TG de la fracción de lipoproteína de los QM y la relación de TG de la fracción de lipoproteína de los QM/TG totales en plasma disminuyeron a lo largo del periodo posprandial, observándose por tanto una mejora significativa del metabolismo de QM posprandiales en pacientes con LPLD.

Por último, el ensayo AMT-011-03 se trató de un estudio retrospectivo en el que fueron incluidos 17 pacientes de los estudios anteriores. Los datos mostraron una disminución en el número de episodios de pancreatitis después del tratamiento. Sin embargo, concluimos que es necesario un periodo de seguimiento más largo para evaluar el efecto del tratamiento sobre la pancreatitis aguda, ya que la mayoría de episodios de pancreatitis tuvieron lugar en tres pacientes. En definitiva, Glybera no cura la enfermedad, pero aparentemente sí permite paliar los efectos más graves y nocivos de ésta, como los ataques de pancreatitis potencialmente mortales.

El proceso de aprobación para la comercialización fue largo y costoso. Según la estructura de regulación de la EMA, el CAT está autorizado para aconsejar sobre la aprobación de terapias génicas y celulares, mientras el CHMP es quien decide tras el consejo del CAT, cuando los verdaderos expertos en estas terapias son los miembros del CAT. Uno de los hechos que llama la atención, indicativo de la complejidad del proceso, es que en enero de 2012, tras la negativa reiterada por parte del CHMP, la EC, que por lo general ratifica las recomendaciones del CHMP, pidió a este comité reexaminar la solicitud de Glybera para una indicación restringida.

Una de las enseñanzas que derivan de este proceso es la necesidad de regular adecuadamente la aprobación de terapias para estas enfermedades huérfanas, ya que una de las limitaciones de los ensayos clínicos es el pequeño número de sujetos disponibles. Esto hace que sea muy difícil generar datos estadísticamente significativos, así como asegurar la eficacia a largo plazo. Además, uno de los requisitos para incluir a los pacientes en los estudios fue la presencia de niveles no funcionales de enzima LPL para evitar la respuesta inmune contra el transgén, lo que limitó aún más el número de potenciales pacientes. La falta de claridad sobre la situación regulatoria para la aprobación de tratamientos contra estas enfermedades raras frena aún más las inversiones en terapia génica, poniendo en peligro que las empresas biotecnológicas comprometan fondos en la cura de estas enfermedades.

Los primeros tratamientos con Glybera se han iniciado durante el primer semestre de 2015, con un precio de venta en Alemania de 1,1 millones de euros, lo que lo convierte en el medicamento más caro del mundo. Esto hay que relacionarlo con el gran interés de AMT en presionar para la aprobación y con el hecho de que los reiterados dictámenes negativos llevaron a la empresa a graves problemas financieros, siendo adquiridos sus derechos por la empresa uniQure. La entrada de esta compañía aparentemente dio lugar a presiones políticas e intenso *lobbying* que culminaron con la solicitud de la EC al CHMP para que reexaminara su opinión negativa sobre la comercialización de Glybera<sup>23</sup>, teniendo en cuenta la práctica imposibilidad de conseguir estadísticas sólidas cuando se trabaja con enfermedades huérfanas tan raras, y finalmente en la aprobación de la comercialización de Glybera bajo condiciones restringidas, que incluían la aplicación del tratamiento a enfermos de LPLD con elevado riesgo de sufrir procesos agudos de pancreatitis y la necesidad de realizar un registro que informara sobre los resultados obtenidos en los pacientes tratados con el medicamento.

## 9.- TABLA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas y acrónimos	
AAV	Virus adenoasociado
AMT	Amsterdam Molecular Therapeutics
CAT	Comité de terapias avanzadas
CHMP	Comité de medicamentos de uso humano
CMV	Citomegalovirus
CPK	Creatinina quinasa
EC	Comisión Europea
EMA	Agencia Europea del Medicamento
ERT	Terapia de reemplazo enzimático
FFA	Ácidos grasos libres
GPIHBP1	Deficiencia de proteína ligadora de HDL anclada por glicosilfosfatidilinositol
HDL	Lipoproteína de alta densidad
IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
ITR	Repeticiones terminales invertidas
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLR	Receptor de lipoproteína de baja densidad
LPL	Lipoproteína lipasa
LPLD	Deficiencia de la enzima lipoproteína lipasa
pA	Poliadenilación
PBS	Tampón fosfato salino
QM	Quilomicrones
Sf	Unidades de flotación Svedberg
TC	Colesterol total
TG	Triglicéridos
UE	Unión Europea
UFP	Unidades formadoras de placas
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
WPRE	Elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota