

VNIVERSITAT [ò*]
D VALÈNCIA
Facultat de Farmàcia

Elena Gras Colomer

Tesis Doctoral

2018



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

**MONITORIZACIÓN
E INDIVIDUALIZACIÓN
POSOLÓGICA DE
GLUCOCEREBROSIDASA
EN PACIENTES CON ENFERMEDAD
DE GAUCHER TIPO I**

**Tesis Doctoral
Elena Gras Colomer
València, 2018**

Diseño y grafismo de portada realizado por Laura Casagrande



**Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i
Parasitologia**

Servici de Farmàcia - Hospital Universitari Dr. Peset de València

Programa de Doctorat en Biomedicina i Farmàcia

***“MONITORIZACIÓN E INDIVIDUALIZACIÓN POSOLÓGICA DE
GLUCOCEREBROSIDASA EN PACIENTES GAUCHER TIPO I”***

Memoria para optar al
grado de Doctor realizada por

Elena Gras Colomer

Directores:

Mónica Climente Martí, Matilde Merino Sanjuán

València, marzo 2018



Doctorado en *Biomedicina y Farmacia*

Tesis Doctoral de
ELENA GRAS COLOMER

Titulada:

”Monitorización e individualización posológica de glucocerebrosidasa en pacientes con enfermedad de Gaucher Tipo I”

Lectura:

4 Mayo 2018

12,00 horas

Sala Juntas

Facultat de Farmàcia

Universitat de València

Directores/a

Matilde Merino Sanjuán Mónica Climente Martí



Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia

Servici de Farmàcia - Hospital Dr. Peset de València

Programa de Doctorat en Biomedicina i Farmàcia

Las que suscriben, Dra. **Mónica Climente Martí**, Jefa del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Dr. Peset y profesora asociada del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología y Dra. **Matilde Merino Sanjuán** catedrática del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología.

CERTIFICAN:

que la Memoria para optar al grado de Doctor realizada por **Elena Gras Colomer**, cuyo título es: "*MONITORIZACIÓN E INDIVIDUALIZACIÓN POSOLÓGICA DE GLUCOCEREBROSIDASA EN PACIENTES GAUCHER TIPO I*" ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos para su juicio y calificación.

Lo que suscriben en València, a 5 marzo 2018

Mónica Climente Martí

Matilde Merino Sanjuán

Este proyecto ha sido subvencionado por

- ✓ Fundación Genzyme mediante una beca para investigación en el campo de enfermedades de depósito lisosomal en 2012.
- ✓ Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO) mediante un contrato predoctoral en investigación en enfermedades depósito lisosomal y mediante la convocatoria de ayudas para el fomento de la actividad investigadora de modalidad de grupos emergentes en 2015 (UGP-15- 222).

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones

- Gras Colomer E, Martínez Gómez MA, González Álvarez A, Climente Martí M, León Moreno, P, Fernández Zarzoso M, Jiménez-Torres NV. *'Development and application to clinical practice of a validated HPLC method for the analysis of B-glucoocerebrosidase in Gaucher disease'*. J Pharm Biomed Anal. 2014 Mar;91:123-30. Doi: 10.1016/j.jpba.2013.12.027; Impact Factor: 2.829 Index JCR.
- Gras-Colomer E, Martínez-Gómez MA, Moya-Gil A, Fernandez-Zarzoso M, Merino-Sanjuan M, Climente-Martí M. *'Cellular Uptake of Glucoocerebrosidase in Gaucher Patients Receiving Enzyme Replacement Treatment'*. Clin Pharmacokinet. 2016 Sep;55(9):1103-13. Doi: 10.1007/s40262-016-0387-2; Impact Factor: 5.053 Index JCR.
- Gras-Colomer E, Martínez-Gómez MA, Climente-Martí M, Fernandez-Zarzoso M, Almela-Tejedo M, Giner-Galvañ V, Marcos-Rodríguez JA, Rodríguez-Fernández A, Torralba-Cabeza MÁ, Merino-Sanjuan M. *'Relationship between Glucoocerebrosidase Activity and clinical response to Enzyme Replacement Therapy in patients with Gaucher Disease type I'*. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2018 Feb 8. Doi: 10.1111/bcpt.12977; Impact Factor: 3.176. Index JCR.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Dra. Mónica Climente y a la Prof. Matilde Merino por vuestro compromiso y generosidad, por marcarme el camino y enseñarme a ser persistente, por vuestros consejos y ánimos infatigables, que han permitido hacer realidad esta tesis.

Al Prof. N. Víctor Jiménez Torres, por proporcionarnos el mapa mental y encendernos la chispa de esta investigación; por transmitirme la pasión de la farmacia hospitalaria, la curiosidad científica y enseñarme a vivir 'pericolosamente'.

A la Dra. M^a Amparo Martínez por tu inmensa ayuda en toda la parte cromatográfica y por estar siempre dispuesta a nuevos retos. Al Dr. Víctor Mangas y al Dr. Javier Martínez Moreno por su ayuda y docencia en el modelado farmacocinético.

Gracias a todos los profesionales del Servicio de Farmacia del Hospital Dr. Peset, por su compromiso con el paciente y por enseñarme día a día. Agradecer al servicio de Hematología del Hospital Dr. Peset su complicidad e implicación en el proyecto.

Mi agradecimiento a todos los profesionales de los hospitales participantes por vuestra colaboración entusiasta, demostrando que la investigación independiente en red es posible.

A mis amigos/as por vuestro cariño durante el tiempo que ha durado esta tesis. Gracias por esos vinos tan necesarios!

Gracias a mi familia. A Óscar, por tu enorme apoyo y porque siempre sabes sacarme una sonrisa. Gracias a mamá, papá y Diego por cuidarme siempre, y por inculcarme la disciplina y la fuerza de voluntad que me han permitido llegar hasta aquí.

A los pacientes por su generosidad

*'Apunta a construir catedrales
porque te quedará una capilla preciosa'*

Prof. N. Víctor Jiménez Torres

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	5
PRÓLOGO.....	7
RESUMEN.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	13
<i>1.1. LA ENFERMEDAD DE GAUCHER.....</i>	<i>13</i>
1.1.1. Epidemiología.....	13
1.1.2. Aspectos bioquímicos.....	14
1.1.3. Aspectos genéticos.....	16
1.1.4. Aspectos clínicos.....	16
1.1.5. Diagnóstico de la enfermedad de Gaucher.....	17
1.1.6. Escalas de evaluación de la enfermedad.....	18
1.1.7. Biomarcadores.....	19
<i>1.2. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE GAUCHER.....</i>	<i>20</i>
1.2.1. Terapia de Reducción de Sustrato.....	20
1.2.2. Terapia Enzimática Sustitutiva (TES).....	21
<i>1.3. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO.....</i>	<i>25</i>
1.3.1. Determinación cuantitativa de la actividad enzimática de glucocerebrosidasa.....	26
1.3.2. Farmacocinética de la terapia enzimática sustitutiva.....	27
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
3.1. DISEÑO.....	30
3.2. POBLACIÓN A ESTUDIO.....	31
3.3. ASPECTO ÉTICOS.....	31
3.4. ESQUEMA DE TRATAMIENTO.....	32
3.5. VARIABLES ESTUDIADAS.....	32
3.5.1. Variables relacionadas con el paciente.....	32
3.5.2. Variables relacionadas con la enfermedad.....	32
3.5.3. Variables relacionadas con la TES.....	33

3.5.4. Variables relacionadas con la actividad enzimática de glucocerebrosidasa	34
3.5.5. Variables relacionadas con la respuesta al tratamiento.....	35
3.6. ANÁLISIS DE DATOS.....	36
3.6.1. Métodos analíticos	36
3.6.1.1. Método analítico de cuantificación de la glucocerebrosidasa lisosomal (GBA1)	36
3.6.1.2. Método analítico de cuantificación de glucocerebrosidasa lisosomal y no lisosomal (GCase)	36
3.6.2. Estudios clínicos.....	37
3.6.2.1. Cuantificación enzimática y captación celular de GBA1	37
3.6.2.2. Evaluación de la relación entre la respuesta clínica a la TES y la actividad específica de GBA1 y de GCase.....	38
3.6.2.3. Validación de la individualización terapéutica de TES.....	38
3.6.2.4. Modelo farmacocinético poblacional de GCase	39
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
4.1. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	40
4.1.1. Método analítico para la cuantificación de la actividad de GBA1	40
4.1.1.1. Validación del método.....	40
4.1.1.2. Optimización multivariante de las condiciones experimentales de la reacción enzimática.....	40
4.1.2. Método analítico para la cuantificación de la actividad de GCase	42
4.2. ESTUDIOS CLÍNICOS.....	42
4.2.1. Cuantificación enzimática y captación celular de GBA1.....	42
4.2.1.1. Población a estudio.....	42
4.2.1.2. Curvas de la actividad enzimática GBA1 versus tiempo	43
4.2.1.3. Cuantificación <i>in vivo</i> de la actividad enzimática de GBA1 intraleucocito	45
4.2.1.4. Tasa de captación celular de la enzima por los leucocitos y tasa de desaparición de la enzima del plasma	48
4.2.1.5. Diferencias en la actividad enzimática en la administración de las rGBA1 (imiglucerasa o velaglucerasa)	50

4.2.2. Relación entre la actividad enzimática y la respuesta clínica	51
4.2.2.1. Población a estudio.....	51
4.2.2.2. Relación de la actividad enzimática de GBA1 y GCase con la respuesta óptima	51
4.2.2.3. Relación entre los marcadores basados en la actividad enzimática de GCase y la respuesta clínica	53
4.2.2.4. Relación de las variables clínicas y los marcadores de actividad enzimática de GCase	55
4.2.3. Validación de la individualización terapéutica de TES	58
4.2.4. Modelo farmacocinético poblacional de glucocerebrosidasa.....	59
4.2.4.1. Población a estudio.....	59
4.2.4.2. Modelo farmacocinético estructural.....	60
4.2.4.3. Análisis de covariables.....	61
4.2.4.4. Evaluación del modelo final □	63
5. CONCLUSIONES.....	67
6. BIBLIOGRAFIA.....	69
CAPÍTULO I. <i>Development and application to clinical practice of a validated HPLC method for the analysis of β-glucocerebrosidase in gaucher disease.....</i>	79
CAPÍTULO II. <i>Cellular uptake of glucocerebrosidase in gaucher patients receiving enzyme replacement treatment.....</i>	107
CAPÍTULO III. <i>Relationship between Glucocerebrosidase Activity and clinical response to Enzyme Replacement Therapy in patients with Gaucher Disease type I</i>	131
CAPÍTULO IV. <i>Glucocerebrosidase activity for enzyme replacement therapy monitoring in Gaucher disease.....</i>	150
CAPÍTULO V. <i>Pharmacokinetics of enzymatic activity in gaucher disease patients treated with enzyme replacement therapy.</i>	156
ANEXOS.	178
ANEXO I. LISTADO DE TABLAS	180
ANEXO II. LISTADO DE FIGURAS.....	181

ANEXO III. ESCALAS DE VALORACIÓN.....	182
ANEXO III.1 Índice de Gravedad de Zimran.....	182
ANEXO III.2 l Índice de Puntuación de Severidad de la Enfermedad de Gaucher- Tipo I (GauSSI-I).....	182
ANEXO III.3. Escala de valoración S-MRI de afectación de medula ósea.....	185
ANEXO III.4. Escala EVA para la evaluación del dolor.....	187
ANEXO III.5. Escala de Calidad de Vida (SF36)	189
ANEXO IV. PROCEDIMIENTOS ADMINISTRATIVOS.....	194
ANEXO IV.1. Dictamen CEIC del proyecto investigación periodo I.....	194
ANEXO IV.2. Clasificación AEMPS del estudio del periodo II como estudio postautorización de seguimiento prospectivo (EPA-SP)	195
ANEXO IV.3. Dictamen comité ético de investigación clínica estudio postautorización de seguimiento prospectivo (EPA-SP)	197
ANEXO IV.4. Hoja información al paciente y consentimiento informado periodo I	199
ANEXO IV.5. Hoja información al paciente y consentimiento informado, periodo II.....	200

ABREVIATURAS

EG	Enfermedad de Gaucher
EG1	Enfermedad de Gaucher tipo I
TES	Terapia enzimática sustitutiva
TRS	Terapia de reducción de sustrato
ActE	Actividad enzimática
GlcCer	Glucosilceramida
GCase	Glucocerebrosidasas humanas
GBA1	Enzima lisosomal glucocerebrosidasa 1
GBA2	Glucocerebrosidasa 2
GBA3	Glucocerebrosidasa 3
NLGCase	Glucocerebrosidasas no lisosomales
GlcSph	Glucoesfingosina
rGBA1	Glucocerebrosidasa 1 recombinante
CCL-18/PARC	quimioquina ligando 18/Pulmonary and activation regulated chemokine
IMG	Imiglucerasa; Cerezyme®
VELA	Velaglucerasa; Vpriv®
TALI	Taliglucerasa; Elelyso®
SSI	Severity scoring index
GauSSI-I	Índice de Severidad de la Enfermedad de Gaucher– Tipo I
RM	Resonancia magnética
S-MRI score	Puntuación española por imágenes de resonancia magnética para la afectación de medula ósea
CT	Quitotriosidasa
CBE	Conductirol-B-epóxido
RO	Respuesta óptima
RNO	Respuesta no óptima
ROC	Curva receiver operating characteristics
AUC	Área bajo la curva
SD	Desviación Standard
r	Correlación de Pearson
t _{1/2}	Semivida
Cl	Aclaramiento
V	Volumen de distribución
BM	Cantidad endógena de glucocerebrosidasas basal
VII	Variabilidad interindividual
popPK	Modelo farmacocinético poblacional
vp-VPC	Prediction corrected visual predicted check

PRÓLOGO.

La enfermedad de Gaucher tipo I (EG1) es una enfermedad de depósito lisosomal causada por una deficiencia de la enzima glucocerebrosidasa, cuyo tratamiento consiste en la reposición mediante la administración exógena de la enzima deficiente. La presente Tesis Doctoral se ha desarrollado con el objetivo de demostrar que la monitorización de la actividad enzimática intraleucocito de glucocerebrosidasa en pacientes con EG1 permite individualizar la posología de la terapia enzimática sustitutiva (TES) y contribuye a alcanzar respuestas óptimas al tratamiento y, por lo tanto, a establecer tratamientos personalizados y más coste-efectivos.

Se presenta como compendio de artículos científicos publicados en revistas científicas indexadas en el Journal Citation Reports (JCR) y posicionados en el primer y segundo cuartil; consta de un resumen global con los principales resultados y conclusiones, seguido de cinco capítulos que corresponden al trabajo desarrollado en la Tesis Doctoral:

El *capítulo I* describe el desarrollo y validación del método analítico para la cuantificación específica de la actividad enzimática de la glucocerebrosidasa lisosomal, así como el establecimiento del intervalo de normalidad de la enzima en individuos sanos. El *capítulo II* cuantifica la actividad enzimática de la glucocerebrosidasa lisosomal *in vivo* en diferentes puntos temporales para conocer la actividad acumulada en leucocitos, y estudia el proceso de captación enzimática desde el plasma a los leucocitos. En el *capítulo III* se demuestra la relación entre los marcadores de actividad enzimática en leucocitos de las glucocerebrosidasas lisosomales y no lisosomales con la respuesta clínica en pacientes en tratamiento con TES. El *capítulo IV* describe la aplicación práctica de los marcadores de actividad enzimática de glucocerebrosidasa en el ajuste posológico de TES en dos casos clínicos, demostrando que la monitorización de la actividad enzimática intraleucocito de glucocerebrosidasa permite alcanzar respuestas óptimas a la TES. En el *capítulo V* se desarrolla el modelo farmacocinético poblacional de glucocerebrosidasa que permite explicar los perfiles de actividad enzimática tiempo tras la administración de TES e identifica las covariables que afectan a los parámetros farmacocinéticos.

RESUMEN.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA ENFERMEDAD DE GAUCHER

Las enfermedades de almacenamiento lisosomal son un grupo de enfermedades hereditarias heterogéneas causadas por mutaciones que afectan a diversos genes que codifican la función de las enzimas lisosomales necesarias para la degradación de macromoléculas complejas[1]; son enfermedades poco frecuentes; pero dentro de estas, las mayoritarias son las esfingolipidosis asociadas a la degradación de los esfingolípidos. La enfermedad de Gaucher (EG, OMIM#230800, ORPHA355) es una glucoesfingolipidosis causada por mutaciones en el gen GBA1 que conllevan una deficiencia parcial o total de la enzima lisosomal β -glucocerebrosidasa (GBA1), que hidroliza al glucocerebrósido, denominado glucosilceramida (GlcCer), en ceramida y glucosa (figura 1)[2, 3].

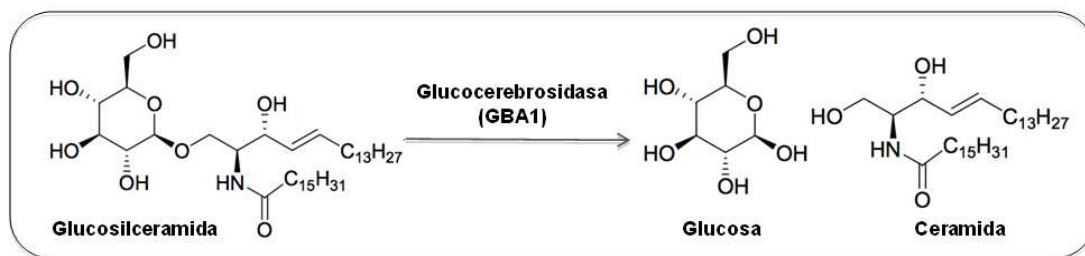


Figura 1. Reacción enzimática de la enzima lisosomal β -glucocerebrosidasa1

1.1.1. Epidemiología

La enfermedad de Gaucher tipo I (EG1) está considerada una enfermedad minoritaria o huérfana y presenta una incidencia que oscila entre 1/40.000 y 1/60.000 nacimientos en la población general, que puede llegar a 1/800 nacimientos en la población judía ashkenazi[4, 5]. En la península ibérica, la prevalencia de la EG1 se ha establecido en 1/149.000 habitantes[6].

1.1.2. Aspectos bioquímicos

Sustancia acumulada: glucosilceramida

Los macrófagos, en cuyos lisosomas se produce la acumulación de la GlcCer no catabolizada, son células procedentes del sistema fagocítico mononuclear; sistema formado por los monocitos circulantes en sangre periférica que, tras 24h de permanecer en el torrente sanguíneo, atraviesan el endotelio de los capilares y penetran en el tejido, donde se diferencian rápidamente a macrófagos, los cuales pueden ingerir y destruir bacterias, células dañadas y eritrocitos senescentes[7]. La acumulación de GlcCer en los lisosomas de los macrófagos, induce su transformación en células de depósito denominadas células Gaucher[8]. Las células Gaucher son típicamente agrandadas, con presencia de agregados de GlcCer en estructuras fibrilares retorcidas, que pueden visualizarse mediante microscopía electrónica (figura 2)[9]; se infiltran en diferentes tejidos, considerándose las principales responsables de la sintomatología de la enfermedad.

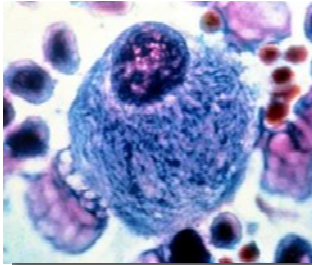


Figura 2. Aspecto de una célula Gaucher visualizada mediante microscopía electrónica[10].

Las enzimas: glucocerebrosidasas

Existen diferentes glucocerebrosidasas humanas (GCCase) implicadas en el catabolismo de los esfingolípidos: la enzima lisosomal β -glucocerebrosidasa (GBA1), que es la enzima deficiente en la EG[11, 12]; y otras dos glucocerebrosidasas no lisosomales (NLGCCase), la glucocerebrosidasa 2 (GBA2)[13-15] y la glucocerebrosidasa 3 (GBA3) [16, 17]. Las tres GCCase no muestran estructura homóloga y están codificadas en diferentes genes[18-21], pero sí comparten actividad enzimática (ActE) similar[22-24].

La GBA1 es una proteína que contiene 497 aminoácidos con un peso molecular aproximado de 62 KDa[25, 26] y con un pH óptimo ácido (entre 3,5 y 5,5) propio del lisosoma; mientras que la GBA2, localizada en la membrana celular, actúa a pH óptimo relativamente ácido (5,5 - 6,0), y la GBA3, presente en el citosol de la célula, actúa a pH óptimo neutro (6 -7,5).

Tradicionalmente se ha considerado que la única enzima responsable de la eliminación de GlCer, y por tanto de la EG, es GBA1. Sin embargo, recientemente se ha identificado una vía metabólica alternativa que se activa en caso de deficiencia de GBA1, mediante la implicación de GBA2[27] (figura 3): GlcCer abandona el lisosoma, convirtiéndose en sustrato de la enzima GBA2; por otro lado, GlcCer es también el sustrato de una ceramidasa que lo transforma en glucosilesfingosina en el lisosoma y que posteriormente difunde al citoplasma donde es metabolizada por GBA2 produciendo esfingosina, metabolito particularmente tóxico para el hueso[28, 29].

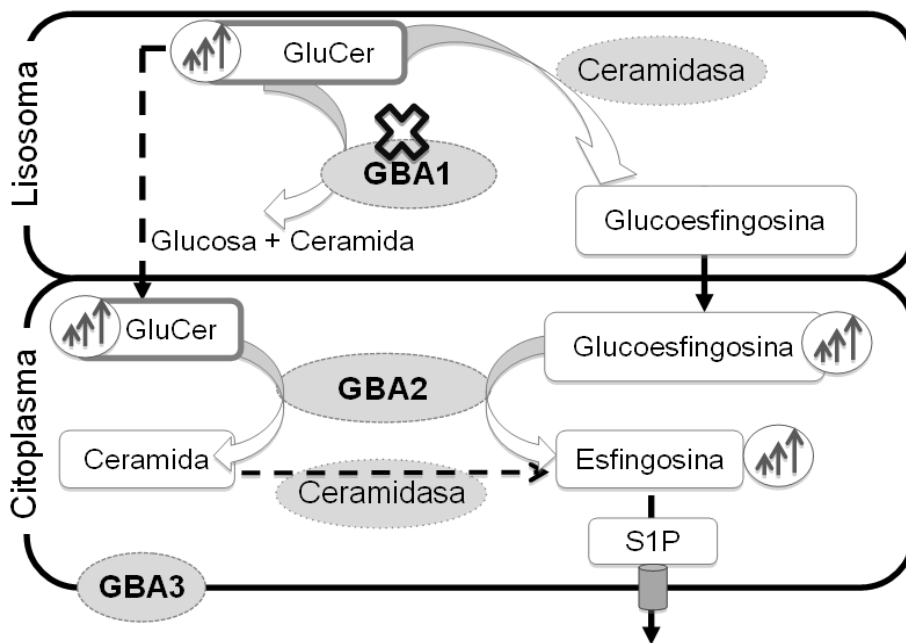


Figura 3. Vía metabólica para la eliminación de GlcCer. Adaptado de Stirnemann[2].

1.1.3. Aspectos genéticos

El gen GBA1 se localiza en el cromosoma 1q21. Se han descrito múltiples variantes patológicas en la región codificante del gen[30, 31] que conllevan más de 400 mutaciones diferentes [18, 32]. Recientemente se han incluido nuevos aminoácidos en la secuencia líder del gen modificando la nomenclatura de las mutaciones, no obstante, en la presente Tesis Doctoral se muestra la nomenclatura tradicional, por ser la más ampliamente utilizada.

En la península ibérica la mutación más prevalente es N370S/L444P[6]. Generalmente la mutación N370S está asociada con formas no neuropáticas de EG, pero no es predictiva de la severidad de la enfermedad en dominios óseos o viscerales. La homocigosidad es, *a priori*, predictiva de características de la enfermedad más leves e individuos asintomáticos[33]. Sin embargo, las correlaciones del genotipo con rasgos fenotípicos específicos no han sido concluyentes[34, 35].

1.1.4. Aspectos clínicos

La EG presenta tres subtipos clínicos: la EG tipo I, forma no neuropática [8]; la EG tipo II, forma neuropática infantil que es un trastorno muy raro que causa la muerte en los primeros años de vida[36]; y la EG tipo III, que es la forma neuropática crónica que afecta a menos del 10% de los pacientes [37, 38].

La variante clínica más prevalente es la EG tipo I (EG1) y presenta una manifestación clínica variable, desde casos asintomáticos hasta formas de inicio tempranas en la infancia. Los aspectos fundamentales de la EG1 incluyen:

Afectación visceral

En los pacientes con EG1 se observa hepatoesplenomegalia debido a la infiltración de las células Gaucher en estos órganos. La esplenomegalia se presenta en más del 90% de los pacientes y a veces es masiva, causando dolor abdominal o distensión. También es frecuente la hepatomegalia (70-80% de los casos), que suele ser

moderada y presentarse de forma más tardía. Además puede aparecer hepatopatía crónica, fibrosis hepática e incluso cirrosis[2, 39].

Citopenias

El acúmulo de células de Gaucher en medula ósea provoca desplazamiento del tejido hematopoyético, lo que produce citopenias periféricas, fundamentalmente anemia y trombopenia[2].

Afectación ósea

Las células Gaucher reemplazan a las células normales en la medula ósea[40], produciendo una infiltración que aumenta la presión mecánica intraósea provocando dolores agudos que se manifiestan como crisis óseas muy dolorosas y/o dolores crónicos. Estas crisis óseas agudas van asociadas con inflamación local, fiebre leve y leucocitosis; se relacionan con la aparición de futuros infartos óseos, que conllevan lesiones denominadas necrosis avascular u osteonecrosis[41], y son las manifestaciones más significativas e incapacitantes, ya que implican la muerte ósea, y son irreversibles[42, 43]. Además, los pacientes EG1 tienen una masa ósea significativamente menor, provocando osteopenia generalizada, que cursa con adelgazamiento de la cortical y pérdida de trabéculas y por tanto, favoreciendo las fracturas patológicas.

1.1.5. Diagnóstico de la enfermedad de Gaucher

Tradicionalmente el diagnóstico EG se ha basado en la presencia de signos y síntomas clínicos y el posterior estudio de la medula ósea o biopsias de tejido, donde se identificaban las células Gaucher. Además, los dos pilares fundamentales para el diagnóstico actual de la EG1 son:

- *Actividad enzimática (ActE) de GBA1 deficiente* mediante el análisis enzimático en leucocitos totales o fibroblastos[44]. La ActE residual inferior al 30% del valor de un individuo sano es un indicador de diagnóstico positivo de EG[32, 45, 46].

- *Mutación del gen GBA1* mediante el análisis del ADN, que proporciona resultados concluyentes, ya que la mayoría de los alelos mutados están bien caracterizados.

1.1.6. Escalas de evaluación de la enfermedad

Escalas de valoración global de la enfermedad

La primera escala de valoración de la severidad (severity scoring index; SSI) fue publicada por Zimran[47](Anexo III.1). Esta escala se centra en la enfermedad avanzada e irreversible, por lo que permite la estratificación de la severidad en el diagnóstico[48]. Di Rocco et al.[49] desarrollaron el Índice de severidad de la Enfermedad de Gaucher Tipo 1 (GauSSI-I)(Anexo III.2), que es un método fiable para estratificar la gravedad de la EG1 en adultos, y sensible para la monitorización de la respuesta clínica a la TES[49]; es la escala más ampliamente utilizada en la práctica clínica en nuestro ámbito[50]. Tiene un máximo de 42 puntos, distribuidos en seis dominios diferentes con parámetros de peso desigual según la relevancia clínica: el esquelético (infiltración de medula ósea y subdominios de componentes minerales óseos), el hematológico y el visceral representan el 76% de la puntuación.

Valoración de la afectación ósea

La valoración ósea puede realizarse mediante métodos cualitativos como la resonancia magnética (RM) que permite valorar la infiltración medular, los patrones de infiltración y la detección de crisis óseas, infartos y necrosis en estadios precoces; y mediante métodos semicualitativos que se basan en escalas de puntuación a partir del análisis de las alteraciones de la señal de la RM. Estas escalas permiten definir el estadio de la enfermedad, su severidad y valorar la respuesta a la TES debido a la aclaración medular o desaparición de los edemas en las crisis óseas, ya que la medula ósea recupera el aspecto y la señal de la medula grasa fisiológica. Los más usados son la puntuación de la carga en la medula ósea (Bone Marrow Burden Score; BMB score)[51, 52] y la puntuación española por

imágenes de resonancia magnética (S-MRI score) [53]. El S-MRI es una escala validada [53] que define una puntuación según el patrón RM en cada localización (cuerpos vertebrales, pelvis y fémures) y la existencia o no de complicaciones asociadas (necrosis, infartos, crisis óseas y aplastamientos vertebrales)(anexo III.3); es sensible y específica para definir el pronóstico de la enfermedad ósea y clasificarla en estadios avanzados[54].

1.1.7. Biomarcadores

Dado el papel trascendental de las células Gaucher en la fisiopatología de este trastorno, se ha prestado considerable atención a la identificación de marcadores plasmáticos derivados de tales macrófagos. La quitotriosidasa (CT) [55] es expresada por los macrófagos y se ha observado una relación entre la carga de células Gaucher en pacientes con EG y la concentración plasmáticas de CT, encontrándose del orden de 1000 veces más elevada que en individuos sanos[56]. Además, la disminución de CT muestra correlación positiva con la disminución del volumen hepático y esplénico, y el aumento de hemoglobina[57]; Sin embargo, aproximadamente un 6-8% de la población tiene un déficit absoluto o completo de la actividad de CT, debido a la homocigosidad para la duplicación en 24pb[58], por lo que en estos pacientes se ha propuesto utilizar otro marcador, el CCL18/PARC, una quimioquina elevada en pacientes con EG del orden de 40 veces, que se correlaciona con la visceromegalia, y la respuesta plaquetaria a la TES[59, 60]. Las concentraciones de estos dos marcadores son útiles para la confirmación del diagnóstico[59, 61], pero no son exclusivos de la EG y tienen una evidencia limitada en su utilidad para la monitorización de la TES[56, 62]. Recientemente, se ha demostrado que los niveles plasmáticos de GlcSph, molécula acumulada en las células Gaucher, se correlacionan con CT y CCL18/PARC, y es un marcador más sensible y específico para el diagnóstico de la EG que estos últimos, y sus niveles en sangre disminuyen tras la instauración de la TES [28, 63].

A pesar del esfuerzo del entorno científico en la búsqueda de marcadores que ayuden a monitorizar a los pacientes EG1, el documento de expertos recientemente publicado[48] no alcanzó consenso en incluir CT, CCL18/PARC, ni GlcSph en los objetivos terapéuticos del tratamiento, puesto que la relación entre los marcadores

y las consecuencias clínicas de la EG1 no están suficientemente demostradas. En este sentido, la búsqueda de marcadores para la monitorización de la TES en los pacientes con EG1, continúa siendo un reto.

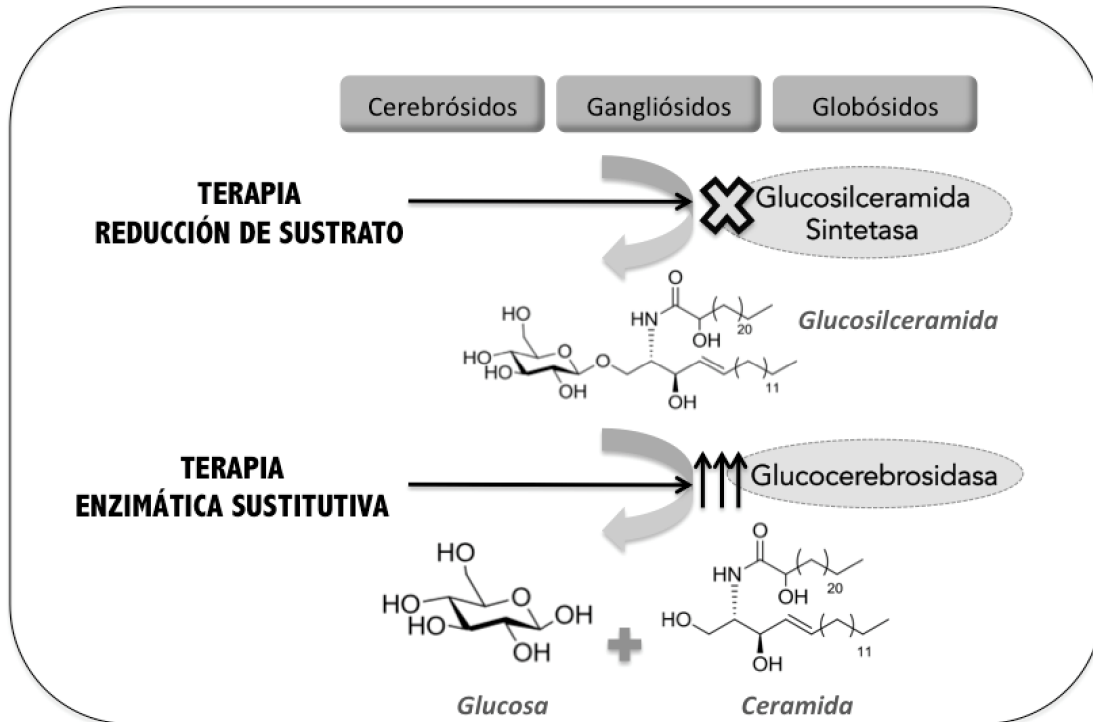


Figura 4. Aproximaciones terapéuticas en la EG1

1.2. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE GAUCHER

El tratamiento de la EG1 se basa en dos aproximaciones terapéuticas, la terapia de reducción del sustrato (TRS) y la terapia enzimática sustitutiva (TES)(figura 4):

1.2.1. Terapia de Reducción de Sustrato

El objetivo de la TRS es reducir el acúmulo celular de GlcCer disminuyendo su producción mediante la inhibición de la GlcCer sintasa: Miglustat (Zavesca®, Actelion) está indicado desde el año 2002 para el tratamiento por vía oral de la EG1 de leve a moderada cuando la TES no es adecuada[64]; y Eliglustat (Cerdelga®, Sanofi-Genzyme) está indicado desde el año 2015 para el tratamiento por vía oral de primera línea en los pacientes con EG1 como alternativa a las infusiones

quincenales de TES en los pacientes elegibles[65]. Su uso en primera línea frente a la TES en la EG1 es cuestionado por algunos autores, alegando una mejoría inferior en los parámetros objetivables y un perfil de reacciones adversas a nivel cardíaco no definitivamente establecido[66].

1.2.2. Terapia Enzimática Sustitutiva

El tratamiento de elección para la EG1 se basa en la administración de TES, lo que implica la reposición exógena de la enzima deficiente mediante una glucocerebrosidasa recombinante (rGBA1). La enzima GBA1 humana, aislada de placenta[67], fue modificada inicialmente mediante glicosilación dando lugar a la alglucerasa (Ceredase®, Genzyme)[68, 69]. Posteriormente, se han comercializado tres rGBA1: imiglucerasa (IMG; Cerezyme® Genzyme, Sanofi), velaglucerasa, (VELA; VPRIV®; Shire Pharmaceuticals S.L.)[50, 70-73], y más recientemente, taliglucerasa, (TALI; Elelyso®, Protalix/Pfizer)[74, 75]; esta última, no disponible en Europa[76].

El ensayo clínico pivotal[77] a nueve meses, randomizado, doble ciego y de no inferioridad de VELA frente a IMG en pacientes *naïve* demostró que la administración de ambas enzimas a la dosis de 60U/kg cada 2 semanas, permite alcanzar una mejora similar objetivable de los parámetros hematológicos, viscerales, y otros marcadores de seguimiento actualmente establecidos. Los estudios a largo plazo de IMG han mostrado un beneficio sostenido durante 10 años[78], cumpliendo los objetivos terapéuticos a largo plazo de la TES.

Los estudios de coste-efectividad de la TES para la EG1 han demostrado claramente su eficiencia, con mejorías significativa en la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, también supone un desafío a la sostenibilidad del sistema nacional de salud por el elevado impacto económico que supone[79], con estimaciones de coste entre 70.000€ y 550.000€ al año para un paciente adulto con EG1[80].

1.2.2.1. Pautas de dosificación

La dosis inicial de TES recomendada es de 60U/kg/14días [48, 50, 81]. Las dosis de mantenimiento se ajustan de forma individual en función de la situación clínica y la

respuesta terapéutica observada tras la administración de las dosis iniciales[50], a una pauta que puede variar desde la dosis máxima (60U/kg/14días) y la mínima (15U/Kg/14 días) recomendada. No obstante, existe una notable controversia en relación a la pauta de dosificación más adecuada para la TES[82]:

Dosis altas-baja frecuencia vs dosis bajas-alta frecuencia

Los esquemas con dosis alta y baja frecuencia (60U/kg/14días), se basan en que la eliminación del GluCer acumulado es dependiente de la cantidad de enzima administrada, más que de la frecuencia de la dosis[83]. Por otra parte, la dosis baja y alta frecuencia (2,5U/kg/3veces por semana) se basan en la supuesta cinética de la interacción enzima-receptor, y consideran que la administración de dosis elevadas de rGBA1 satura los receptores de manosa implicados en la captación de la enzima y gran parte de la enzima administrada se degradaría sin ejercer su acción terapéutica[84-86]. Desde este punto de vista, no se consideraría justificable iniciar TES con dosis superiores a 30U/kg/mes mediante perfusión de 2 horas 3 días a la semana. Por el contrario, otros autores [87] han descrito respuesta subóptima con este esquema terapéutico, que precisó aumento de dosis para el control de la sintomatología en el 25% de los pacientes. Además, algunos autores defienden que la dosis no debe estar basada en la gravedad de la enfermedad[46], ya que se ha comprobado que la respuesta es mucho mayor en los pacientes con mayor visceromegalia[88].

Ampliación del intervalo posológico de la TES

A pesar de que la pauta posológica autorizada por las agencias reguladoras es cada 2 semanas, se ha planteado ampliar el intervalo posológico en los pacientes con síntomas leves, una vez se hayan alcanzado los objetivos terapéuticos, con la finalidad de reducir las visitas al hospital.

Los ensayos clínicos de eficacia y seguridad de la TES administrada cada 2 semanas frente a la TES administrada cada 4 semanas[89, 90], no han mostrado diferencias significativas en los resultados de eficacia en ambos grupos. Sin embargo, el

porcentaje de pacientes que alcanzó objetivos terapéuticos fue inferior en la dosis mensual que en la dosis quincenal (84% frente 100%). Otros autores han reportado series de casos con aumento de la fatiga y de la CT (entre 43 y 96% respecto al basal) cuando se han utilizados pautas posológicas que incluyen la ampliación del intervalo[91]. Atendiendo a estas consideraciones, actualmente la terapia mensual se considera una opción adecuada en aquellos pacientes adultos que han alcanzado los objetivos terapéuticos y son clínicamente estables, pero requiere un control clínico exhaustivo.

Vacaciones terapéuticas

En el año 2010 la contaminación en la planta de fabricación de IMG y el cese de su producción, obligó a la disminución de dosis o suspensión de TES en los pacientes más estables con la finalidad de que los pacientes más graves, pudieran recibir dosis adecuadas de rGBA1[92]. Este acontecimiento dio lugar a que diversos pacientes experimentaran ‘vacaciones terapéuticas’ de TES, y los estudios observacionales posteriores demostraron que la mayoría de ellos se mantuvieron estables durante un intervalo de 6 meses sin tratamiento y sin efectos adversos clínicos perceptibles[93]. En consecuencia, algunos autores apoyan esta práctica [94], mientras que otros [95, 96] la cuestionan ante la ausencia de estudios robustos y la posibilidad de empeoramiento clínico del paciente.

1.2.2.2. Individualización terapéutica y evaluación de la respuesta

La individualización terapéutica consiste en ofrecer a cada paciente la máxima probabilidad de obtener una respuesta óptima a su tratamiento. El enfoque individualizado de la terapia en la EG1 se basa en la gravedad de la enfermedad que presenta el paciente al diagnóstico, en el cumplimiento de unos objetivos terapéuticos cuantitativos o cualitativos establecidos de manera individual para cada paciente y en el marco de tiempo esperado para la respuesta al tratamiento.

Las recomendaciones por consenso de expertos han establecido los objetivos a alcanzar con el tratamiento en la EG1 [48, 81](tabla 1).

Tabla 1. Objetivos terapéuticos desde el inicio del tratamiento con TES					
VARIABLES		0-12 meses	12-24 meses	2 -3^{er} año	4^o y años siguientes
1. Hemoglobina (g/dL)		Aumento continuo	> 11 mujeres > 12 varones	Mantener	
2. Plaquetas (x10⁹/L)	Esplenectomía	>120	Mantener	Mantener	
	No esplenectomía	Plaquetas 40-100	Incremento en 1,5-2 veces	>120	Mantener
		Plaquetas <40	Incremento de 1,5 veces	Aumento continuado (aunque no alcance valores normales)	
3. Volumen hepático (% peso corporal)		Reducción 20-30%		Reducción 30-40% o < 1,5 veces valor normal	
4. Volumen bazo (% peso corporal)		Reducción 30-50%	Reducción 50 -60% o <5 veces valor normal		
5. Enfermedad ósea		<ul style="list-style-type: none"> - Eliminar o reducir dolor óseo (escala EVA) - Prevenir crisis óseas, osteonecrosis, aplastamientos subcondrales articulares. 		Además de mantener resto de objetivos: - Mejorar la densidad ósea (Tscore)	
6. Biomarcadores	Quitotriosidasa (nmol/h/mL)	Descenso entre 40-70%		Descenso continuado	< 600
	CCL-18/PARC (ng/mL)*	Descenso entre 30-50%		Descenso continuado	<72

* CCL-18/PARC: quimioquina ligando 18/Pulmonary and activation regulated chemokine; en pacientes sin actividad quitotriosidasa por ser homocigotos para la duplicación 24pb

Además, el logro y mantenimiento de estos objetivos se basa en el seguimiento continuo, regular y sistemático de todos los aspectos de la enfermedad. La Fundación Española para el Estudio y Tratamiento de la Enfermedad de Gaucher y otras lisosomales (FEETEG) estratificó la respuesta al tratamiento en respuesta óptima, subóptima o no respuesta (tabla 2), basándose en el cumplimiento de los objetivos terapéuticos definidos.

Tabla 2. Estratificación de la respuesta al tratamiento

Óptima	Alcanzar al menos 5 de los 6 criterios de respuesta a los 4 años de tratamiento (debe estar incluido el dominio de enfermedad ósea).
Subóptima	Alcanzar solamente 3-4 de los 6 criterios de respuesta.
No respuesta	Alcanzar 2 o menos criterios de respuesta.

La FEETEG recomienda iniciar la TES en la EG1 con dosis de 60U/kg/14días, sobretodo en pacientes que manifiesten clínica grave o con afectación ósea extensa[97], y una vez alcanzados los objetivos terapéuticos, la individualización consiste en la reducción de la dosis habitual entre el 15 y el 25%, hasta una dosis mínima de 15U/kg/14días con la monitorización continua del paciente, siempre y cuando se mantenga una respuesta clínica óptima [81]. Sin embargo, la elevada variabilidad observada en la respuesta a la TES, muestra una amplia variabilidad en los regímenes de dosificación utilizados en la práctica clínica, y permite caracterizar a los pacientes, según postulan algunos autores, como pacientes ‘buenos respondedores’, ‘malos respondedores’ o ‘no respondedores’ [98-100].

En conclusión, la individualización terapéutica en la EG1 basado en objetivos terapéuticos, aunque permite el ajuste posológico de la TES según la respuesta clínica del paciente, conlleva la espera de entre 12-24 meses hasta objetivar la respuesta óptima o subóptima al tratamiento.

1.3. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

Las terapias enzimáticas sustitutivas se incluyen en el amplio grupo de proteínas terapéuticas, junto con los anticuerpos y proteínas de fusión. Estas moléculas representan un reto para caracterizar su farmacocinética por diferentes motivos: 1) los métodos analíticos son a menudo inespecíficos; 2) la unión a otras proteínas endógenas producen cambios en la distribución; 3) los cambios en la estructura con respecto a la proteína endógena (como la glicosilación) provocan cambios en la

farmacocinética; 4) la administración de la proteína exógena puede modificar los mecanismos de *feed-back* de la proteína endógena [101].

1.3.1. Determinación cuantitativa de la actividad enzimática de glucocerebrosidasa

El método de elección para determinar la cantidad de enzima presente en un fluido biológico es la cinética enzimática, que estudia la velocidad de las reacciones catalizadas por las enzimas, y proporciona información directa acerca del mecanismo de la reacción catalítica.

Beutler and Kuhl [102] fueron los primeros en demostrar la utilidad del sustrato fluorogénico no fisiológico, 4-metilumbeliferiferil- β -D-glucopiranosido (MUG) utilizando los leucocitos como fuente de GlcCer y medido a través de un fluorímetro. Consecutivamente Peters et al. [103], Wenget et al.[104], Svennerholm et al.[105], Raghavan et al.[106], Johnson et al.[107], y Michelin et al.[108] desarrollaron métodos analíticos en leucocitos totales. Posteriormente, Chamoles et al.[109] y Olivova et al.[110] han desarrollado y validado métodos analíticos en leucocitos de gota de sangre seca.

Recientemente se ha aplicado la citometría de flujo para la determinación de la ActE de GBA1, mediante la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (Fluorescence-Activated Cell Sorting; FACS) [111, 112]. Estos ensayos son sencillos, suficientemente sensibles para distinguir la ActE de GBA1 en monocitos de pacientes y muestran una excelente correlación con el método estándar[102], pero es necesario tener disponibilidad de FACS para su uso en la práctica clínica.

Otros autores[113] han utilizado análogos fluorescentes de GlcCer mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de GBA1. Este método es rápido, fiable y específico y demostró claramente la disminución de la ActE de GBA1 en los fibroblastos y suero del paciente en comparación con los individuos sanos, lo que sugiere que el método es aplicable para el diagnóstico de la EG1. Recientemente, el 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranosido (PNP-Glc) ha sido propuesto como sustrato sintético para la cuantificación de GBA1 en un ensayo

analítico basado en espectrofotometría destinado a realizar el análisis farmacocinético fase II de VELA en plasma en pacientes con EG1[114].

La estandarización de la técnica analítica de la ActE para la monitorización farmacocinética de la enzima presenta ciertas incertidumbres:

- Los métodos analíticos descritos difieren en el método de detección utilizado, fluorimetría[102, 108, 113] o ultravioleta-visible[114, 115], lo que modifica también los sustratos escogidos para llevar a cabo la reacción enzimática, y complica su comparabilidad si los resultados se presentan en valores absolutos y no en porcentaje con respecto a los valores obtenidos en individuos sanos.
- Las condiciones óptimas para la reacción enzimática (tiempo de incubación, temperatura, y pH) difieren entre los métodos.
- La especificidad en la cuantificación de las actividades: las técnicas analíticas ampliamente utilizadas para el diagnóstico de esta enfermedad no distinguen entre la enzima lisosomal y las enzimas no lisosomales[113], cuando el ratio de ActE de GBA1 en relación con las NLGCase en leucocitos se estima en 70/30[116], y la enzima administrada es específicamente rGBA1.

1.3.2. Farmacocinética de la terapia enzimática sustitutiva

Los estudios disponibles indican que tras la administración intravenosa de la TES la concentración de rGBA1 circulante desciende rápidamente en plasma, [semivida ($t_{1/2}$) de 5-25 minutos según la dosis y el fármaco] debido a la escisión proteolítica rápida en plasma y a la captación por el sistema monocito-macrófago a través de los receptores manosa[114, 117]. La enzima exógena se distribuye a los órganos diana, como hígado, bazo y médula ósea utilizando los macrófagos como sistema de transporte[118]. Por tanto, se considera que el receptor manosa es el responsable de la distribución activa. Sin embargo, con los datos disponibles, no es posible descartar el papel de otro receptor en la distribución de las rGBA1[72], y tampoco se han realizado estudios que examinen la unión de la enzima a las proteínas plasmáticas ni la distribución de las rGBA1 a las células sanguíneas.

Los estudios de distribución de VELA realizados en ratas, concluyeron que sólo el 6% de la enzima se encontraba en sangre y que el hígado, pulmones, médula ósea,

bazo y riñones fueron los t tejidos en los que se observaron altas concentraciones de enzima [70, 71, 117]. Al incrementar la dosis de VELA, sus concentraciones en sangre aumentaron al 38% y se redujeron del 70% al 24% en el hígado; sugiriendo que la administración de dosis elevadas conducen a la saturación del mecanismo de internalización mediado por el receptor de manosa[86].

Los proteínas terapéuticas son generalmente eliminadas a través de la degradación proteolítica en la sangre, hígado, riñones e intestino delgado, resultando aminoácidos que serán reutilizados para la síntesis *de novo* de proteínas [119]. Otra opción, es la eliminación a través del metabolismo intracelular tras la internalización mediada por receptor[120]. Los estudios de VELA realizados en rata calcularon tiempos de $t_{1/2}$ tisulares de 13 y 17 horas para bazo e hígado, respectivamente. Asimismo, los resultados disponibles de los estudios de TALI realizados en animales sugirieron que la eliminación podría ser saturable y, en cierta medida, inducible tras un tratamiento a largo plazo. Respecto a la acumulación del fármaco en el organismo, a las dosis e intervalos posológicos ensayados, considerando las semividas en tejido y la naturaleza proteica, no se espera que se produzca acumulación de las rGBA1 en humanos[71, 72].

No obstante, la farmacocinética de las rGBA1 apenas ha sido estudiada. La búsqueda bibliográfica realizada no ha suministrado resultados de la farmacocinética en humanos de IMG, y los únicos datos disponibles proceden de estudios en animales y de los ensayos clínicos pivotaes de VELA y TALI realizados en su momento para su aprobación por la agencias reguladoras. Además, las enzimas recombinantes se diferencian entre ellas en el número de residuos de manosa, y la diferente glicosilación podría afectar a su cinética y distribución[101].

2. OBJETIVOS

Objetivo principal

Demostrar que la monitorización de la actividad intraleucocito de glucocerebrosidasa en pacientes con EG1 permite individualizar la posología de la terapia enzimática sustitutiva y contribuye a alcanzar respuestas óptimas al tratamiento.

Objetivo específicos

1. Desarrollar un método analítico para la cuantificación específica de la glucocerebrosidasa lisosomal (GBA1).
2. Cuantificar la actividad enzimática de GBA1 intraleucocito *in vivo*.
3. Evaluar el proceso de captación celular de la enzima recombinante rGBA1 desde el plasma a los leucocitos.
4. Evaluar la relación entre la actividad enzimática intraleucocito (GBA1 y GCCase) con la respuesta clínica e identificar marcadores para la individualización posológica de la terapia enzimática sustitutiva en pacientes con EG1.
5. Validar la utilidad clínica de la medida de la actividad enzimática intraleucocito (GCCase) como herramienta útil para la individualización terapéutica.
6. Desarrollar un modelo farmacocinético poblacional que permita identificar y evaluar la relación entre las características del paciente y los parámetros farmacocinéticos individuales de la terapia enzimática para proponer ajustes de dosis de acuerdo con las covariables predictoras identificadas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO

Estudio prospectivo y cuasi-experimental desarrollado en dos periodos (figura 5):

3.1.1. **Periodo I:** estudio prospectivo, cuasi-experimental y unicéntrico, realizado desde enero de 2009 a diciembre de 2010:

- Cuantificación enzimática intraleucocito de GBA1 en pacientes con EG1 en tratamiento con TES e individuos sanos.
- Evaluación del proceso de captación celular de rGBA1.

3.1.2. **Periodo II:** Estudio postautorización de seguimiento prospectivo multicéntrico cuasi-experimental de diseño intrasujeto (pre-post) de grupo único, desarrollado entre junio 2012 y diciembre 2016:

- Evaluación de la relación entre la respuesta clínica a la TES y la ActE específica GBA1 y de GCase.
- Validación de la individualización terapéutica de TES.
- Desarrollo de un modelo farmacocinético poblacional de glucocerebrosidasa.

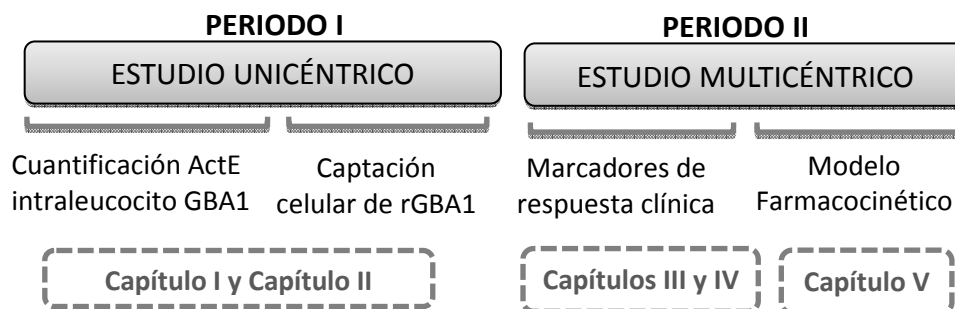


Figura 5. Periodos del estudio y su relación con los capítulos de la presente Tesis Doctoral.

3.2. POBLACIÓN A ESTUDIO

3.2.1. Grupo control

Criterios de inclusión: voluntarios sanos sin enfermedad genética o crónica conocida; no recibieron ningún medicamento durante el tiempo del estudio.

3.2.2. Grupo intervención

Criterios de inclusión: Pacientes adultos (>18 años), diagnosticados de enfermedad de Gaucher tipo I confirmada mediante criterios diagnósticos establecidos en tratamiento con imiglucerasa (Cerezyme®) y con velaglucerasa (Vprip®) según práctica clínica habitual e independiente de la participación del paciente en el estudio.

Criterios de exclusión: pacientes con enfermedad de Gaucher con afectación neurológica (tipo II y III). Positivos para hepatitis B y el antígeno C y positivos para el virus de inmunodeficiencia humana. Mujeres embarazadas.

3.3. ASPECTO ÉTICOS

El estudio del periodo I se clasificó como proyecto de investigación y el protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Dr. Peset (“Individualización del tratamiento con Imiglucerasa. Valor añadido de la Farmacocinética”. CEIC 50/10; Anexo IV.1.). El estudio del periodo II se clasificó como estudio post autorización de seguimiento prospectivo (Código: FIS-IMI-2012-01) por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (Anexo VI.2.), cuyo promotor fue la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO) y el Investigador principal coordinador Elena Gras Colomer; el protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Dr. Peset (Anexo IV.3.) y por los comités designados por las comunidades autónomas donde se realizó el estudio. Posteriormente, cada centro hospitalario incluido en el estudio firmó un contrato con FISABIO para la realización del mismo, conforme la Orden SAS/3470/2009. Todas las pruebas y procedimientos del estudio se

realizaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki; los pacientes otorgaron su conformidad mediante la firma del consentimiento informado (Anexo IV.4. y IV.5.).

3.4. ESQUEMA DE TRATAMIENTO

La terapia enzimática sustitutiva que se prescribe a cada paciente se realizó según práctica clínica habitual del médico prescriptor independiente de la participación del paciente en el estudio.

Las dos terapias enzimáticas comercializadas e indicadas para la EG1 en España son: IMG (Cerezyme®; Genzyme, Sanofi company S.L.) y VELA (Vprip®, Shire Pharmaceuticals S.L.). Las dosis de inicio son 60U/Kg/14días, y se ajusta la posología de la TES en función de la situación clínica: enfermedad ósea avanzada 60U/Kg/14días; visceromegalias importantes 30-60U/Kg/14días; anemia y/o trombocitopenia 30-60U/Kg/14días; afectación pulmonar 60U/Kg/14días; aumento progresivo de actividad de CT 30-60U/Kg/14días. No se recomienda administrar dosis inferior a: 15U/Kg/14días.

3.5. VARIABLES ESTUDIADAS

3.5.1. Variables relacionadas con el paciente

- Demográficas: Fecha nacimiento, sexo, peso, talla.
- Calidad de vida: puntuación de escala de Calidad de Vida (SF36; anexo III.4).

3.5.2. Variables relacionadas con la enfermedad

- Diagnóstico: año del diagnóstico y escala Zimran (anexo III.1).
- Genéticas: gen de la GBA y gen de CT.
- Marcadores: ECA (mcg/mL), Sideremia (ng/mL), Ferritina (mcg/mL).

- Analíticas: neutrófilos (10^9 cel/L), leucocitos (10^9 cel/L), linfocitos (10^9 cel/L), monocitos (10^9 cel/L), GOT (UI/L) GPT (UI/L), GGT (UI/L).
- Severidad de la enfermedad: Puntuación escala GauSSI-I (anexo III.2) realizada por investigador coordinador a partir de las variables recogidas.
- Variables óseas: densidad mineral ósea (T- Score), infiltración de la médula ósea (S-MRI Score; anexo III.3).

3.5.3. Variables relacionadas con la TES

Terapia enzimática: previas (TES inicial, medicamento, fecha y dosis inicial); actual (medicamento, dosis y fecha de inicio con esa pauta).

3.5.4. Variables relacionadas con la actividad enzimática de glucocerebrosidasa

Tabla 3. Variables relacionadas con la actividad enzimática de glucocerebrosidasa

Variables		Significado
ActD	Actividad enzimática residual de GBA1 endógena	Medida en un centro de referencia en el momento del diagnóstico, previo al tratamiento y expresada en porcentaje respecto a la actividad de individuo sano (<30% del valor normal).
Act ₀	Actividad enzimática a tiempo 0 o actividad basal	Previa al inicio de la perfusión de TES, representa la actividad enzimática residual de la enzima endógena del paciente, más la actividad residual de la enzima exógena (TES) administrada, en los leucocitos en pacientes en tratamiento.
Act ₅₀	Actividad enzimática a tiempo 50	Medida a los 50 minutos tras el inicio de la perfusión de TES.
Act ₆₅	Actividad enzimática a tiempo 65	Medida a los 5 minutos de finalizar la perfusión de TES.
Act ₇₅	Actividad enzimática a tiempo 75	Medida a los 15 minutos de finalizar la perfusión de TES (duración de perfusión de TES 60 min), representa la actividad enzimática máxima alcanzada en los leucocitos tras la administración de la dosis de TES.
Act _{t75-0}	Actividad enzimática acumulada durante la perfusión de TES	Representa la exposición total de TES durante la infusión y se calculó como la diferencia entre el Act ₇₅ y el Act ₀ .
Tcap	Tasa de captación celular de la enzima por los leucocitos	Relación entre la variación de la actividad enzimática medida de t ₀ a t ₇₅ y la variación temporal (75 minutos).
TcapD	Tasa de captación celular de la enzima por los leucocitos normalizada por dosis	Tcap utilizando las actividades enzimáticas normalizadas por dosis administradas.
Tdes	Tasa de desaparición de la enzima del plasma	Relación entre la variación de la actividad enzimática en el plasma medida a los 65 y 75 minutos de iniciada la perfusión y el intervalo de tiempo transcurrido entre ambas determinaciones. Incluye la tasa de absorción de leucocitos más la eliminación de la enzima de la sangre.
TdesD	Tasa de desaparición de la enzima del plasma normalizada por la dosis	Tdes utilizando las actividades enzimáticas normalizadas por la dosis administrada.
FD	Factor de disposición leucocitario de la enzima	Relación entre la actividad enzimática captada por los leucocitos con respecto a la actividad enzimática eliminada del plasma, y se calculó como la tasa entre Tcap y Tdes

3.5.5. Variables relacionadas con la respuesta al tratamiento

Respuesta óptima al tratamiento: se basó en los criterios de respuesta de la tabla 4 establecido en las conclusiones del Global Experts Meeting on Therapeutic Goals for the Treatment of Gaucher Disease[81] y Guía de actuación EG de la FEETEG[50], que definió respuesta óptima o subóptima a la TES (tabla 5).

Tabla 4. Variable combinada de criterios de respuesta

Variables	Objetivos terapéuticos
1. Hemoglobina (g/dL)	> 11 en mujeres. > 12 en varones.
2. Plaquetas (x10⁹/L)	>120
3. Volumen hepático (%peso corporal)§	< 1,5 veces valor normal.
4. Volumen bazo (% peso corporal)§	<5 veces valor normal.
5. Enfermedad ósea	- Eliminar o reducir dolor óseo (escala EVA<2) - Prevenir crisis óseas, osteonecrosis, aplastamientos subcondrales articulares. -Mejorar la densidad ósea (Tscore)
6. Biomarcadores	Quitotriosidasa (nmol/h/mL)< 600 *CCL-18/PARC (ng/mL)<72

§Volumen en mililitro. Se calcula a partir de 0,2% del peso corporal (suponiendo 1g/ml). Los múltiplos del valor normal se calculan dividiendo el volumen (ml) por el peso [kg x 25] para el hígado y [Kg x2] para el bazo.*En pacientes sin actividad quitotriosidasa por ser homocigotos para la duplicación 24pb se determinó CLL18/PARC.

Tabla 5. Respuesta óptima al tratamiento

Respuesta	Objetivos
Óptima (RO)	Alcanzar 5 de los 6 criterios de respuesta (incluido el dominio de enfermedad ósea).
Subóptima(RNO)	Alcanzar de los 6 criterios de respuesta un número igual o inferior a 4.

3.6. ANÁLISIS DE DATOS

3.6.1. Métodos analíticos

3.6.1.1. Método analítico de cuantificación de la actividad enzimática de GBA1

Se diseñó la reacción enzimática para cuantificar la ActE de GBA1, que consistió en una hidrólisis ácida entre la GBA1 y el sustrato PNP-Glc, basado en la propuesta de Zimran[114], mediante la incubación del sustrato en plasma y en leucocitos humanos y la cuantificación del producto p-nitrofenol (PNP) por HPLC-UV-Vis. Una unidad (U) de enzima es la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de PNP/min; la actividad enzimática se expresó como el número de mili unidades de enzima por mililitro de muestra (mU/mL).

Se llevó a cabo una optimización multivariante[121] para seleccionar las condiciones experimentales óptimas de la reacción enzimática que produjera mayor actividad de GBA1. Para ello se utilizó un diseño Box-Behnken para las tres variables experimentales más importantes en las reacciones enzimáticas: pH, tiempo (t) y temperatura (T) de incubación. Adicionalmente al diseño Box-Behnken, se ensayaron las condiciones experimentales utilizadas con mayor frecuencia para las enzimas endógenas (T: 37°C t: 60 min). Se evaluó la linealidad, precisión, exactitud, recuperación, selectividad, límite de detección y cuantificación de acuerdo con la validación de métodos analíticos de ICH[122].

Se estudió la especificidad del ensayo analítico para la cuantificación de GBA1 en la reacción, ya que la muestra sanguínea podía incluir la contaminación de las NLGCase (GBA2 y GBA3) capaces de degradar el sustrato artificial. La especificidad se midió a través de la adición al análisis de conductirol-B-epóxido (CBE), un inhibidor selectivo de la ActE de GBA1, puesto que las NLGCase son insensibles al CBE [14, 17, 113, 116, 123].

3.6.1.2. Método analítico de cuantificación de la actividad enzimática de GCCase

La reacción enzimática para cuantificar la ActE de GCCase consistió en una hidrólisis entre GCCase y el sustrato 4-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido y taurocolato sódico como detergente, basada en la técnica analítica de Peters[103] mediante la

incubación del sustrato en leucocitos humanos a pH 5,4, 37°C durante 60 minutos y la cuantificación del producto formado, la 4-metilumbeliferona (4MU), mediante análisis cromatográfico con detección fluorimétrica. Este análisis cuantifica la ActE de glucocerebrosidasa lisosomal (GBA1) y no lisosomal (GAB2 y GBA3)[108]. La actividad se expresó como el número de unidades de enzima por litro de muestra (U/L). Se evaluó la linealidad, precisión, exactitud, recuperación, selectividad, límite de detección y cuantificación de acuerdo con la validación de métodos analíticos de ICH[122].

3.6.2. Estudios clínicos

3.6.2.1. Cuantificación enzimática y captación celular de GBA1

Se recogieron muestras de sangre en tubos EDTA a los individuos del grupo control y a los pacientes a los 0 minutos, antes de iniciar la perfusión de TES (t0), a los 50 minutos desde la iniciación de la perfusión (t50), y a los 5 minutos y 15 minutos después de la infusión intravenosa de TES (t65 y t75), respectivamente. De cada muestra de sangre se extrajo una alícuota de leucocitos y una alícuota de plasma. El análisis para cuantificar la actividad enzimática del GBA1 se realizó mediante el método analítico descrito previamente, a los diferentes puntos temporales (Act₀; Act₅₀; Act₆₅; Act₇₅).

Se estableció el intervalo de normalidad de GBA1 en sanos como la media e intervalo de confianza del 95% de los valores de actividad GBA1. Se realizó la comparación los valores medios de actividad intraleucocitaria de GBA1 medidos en el grupo control y la Act₀ en pacientes tratados con TES, mediante la prueba no paramétrica de U-Mann-Whitney, con una significación estadística del 5%. La comparación de las tasas de captación y eliminación de la TES se realizó mediante el test no paramétrico U-Mann Whitney con un nivel de significación estadística del 5%. Se realizó un ajuste lineal entre las variables relacionadas con la ActE y las dosis administradas de la TES. La significación estadística se obtuvo mediante el coeficiente de correlación Pearson (r) con una significación estadística del 5%. Para evaluar las variabilidades inter e intrapaciente, de las ActE y de las tasas, se

estimaron los coeficientes de variación (CV). Se compararon las Act_0 y Ac_{t75-0} de ambas TES comercializadas (IMG, VELA), normalizadas según la dosis administrada de TES, y se analizó la modificación de la Act_0 y Ac_{t75-0} en pacientes tratados con las dos TES.

3.6.2.2. Evaluación de la relación entre la respuesta clínica a la TES y la actividad específica GBA1 y de GCase.

Se recogieron muestras de sangre en tubos EDTA a los individuos del grupo control y a los pacientes a los 0 minutos, antes de iniciar la perfusión de TES (Act_0), y 15 minutos después de la infusión intravenosa de TES (Act_{75}). Se estableció el intervalo de normalidad de GCase en sanos como la media e intervalo de confianza del 95% de los valores de actividad GCase. Se aplicó la curva ROC para estudiar la relación entre las variables relacionadas con la ActE y la respuesta clínica a la TES. Se definieron como marcadores de ActE aquellas variables relacionadas con la actividad enzimática con mayor capacidad discriminatoria para obtener el resultado óptimo a la TES. El área bajo la curva (AUC) de la curva ROC permitió distinguir la capacidad predictiva de los marcadores, de tal manera que se consideró marcador no predictivo cuando el valor del área fue igual o inferior a 0,5 ($AUC \leq 0,5$), poco predictivo cuando el valor del área estaba comprendido entre 0,5 y 0,7 ($0,5 < AUC < 0,7$), moderadamente predictivo para valores comprendidos entre 0,7 y 0,9 ($0,7 < AUC < 0,9$) o altamente predictivo para valores superiores a 0,9 ($0,9 < AUC < 1$)[234] de la respuesta óptima. La evaluación de la correlación de los marcadores de ActE y las variables clínicas cuantitativas y su punto de corte, se realizó utilizando el coeficiente de correlación de Pearson (r) o Spearman Rho, según normalidad.

3.6.2.3. Validación de la individualización terapéutica de TES

Se analizaron las variables clínicas y marcadores de ActE al inicio y al final del estudio en los pacientes en los que se realizó modificación de dosis, para validar la

utilidad clínica de la medida de la ActE intraleucocito en la individualización terapéutica en la respuesta a la TES

3.6.2.4. Modelo farmacocinético poblacional de GCase

El análisis farmacocinético poblacional se realizó a través de la construcción del modelo farmacocinético mediante el método no lineal de efectos mixtos utilizando el método de estimación condicional de primer orden con interacción (FOCE+I) implementado en el paquete de software NONMEM® versión 7.3 (ICON, Hannover, MD, EE. UU.) Las observaciones de GCase fueron transformadas en logaritmos para el análisis. El proceso de construcción de modelos se llevó a cabo secuencialmente: primero se desarrolló un modelo farmacocinético estructural para proporcionar una caracterización adecuada del ciclo temporal de las actividades de GCase tras la administración intravenosa de rGBA1 (IMG o VELA); en segundo lugar, se llevó a cabo el análisis de covariables realizado con el método *paso a paso* (SCM) implementado en PsN toolkit 3.4.2. Posteriormente el modelo farmacocinético poblacional fue adecuadamente evaluado utilizando métodos basados en la simulación de datos: método visual 'Prediction corrected visual predicted check' (pc-VPC) y mediante la técnica de muestreo bootstrap.

La selección del modelo se efectuó en base a la reducción del valor de la función objetiva (OFV) de acuerdo con el test de razón de verosimilitud o Likelihood ratio test (para dos modelos anidados se consideró significativa una disminución de 3,84 puntos en $-2 \times \log(\text{probabilidad})$ ($-2LL$) para un parámetro añadido con un nivel de 5%), y la exploración visual de las gráficas de bondad de ajuste (GOF).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.1.1. Método analítico para la cuantificación de GBA1

4.1.1.1. Validación del método

El método analítico propuesto para la cuantificación de la actividad de GBA1 a través de la medida del producto p-nitrofenol (PNP) mediante HPLC con detección UV-Vis fue adecuado en términos de linealidad, precisión, exactitud, recuperación, selectividad, límite de detección y cuantificación.

4.1.1.2. Optimización multivariante de las condiciones experimentales de la reacción enzimática

El gráfico estandarizado de Pareto (figura 6A) indica que los efectos más significativos para la ActE de GBA1 correspondieron al tiempo (t y t_2), pH x T y T. El modelo de regresión lineal múltiple fue estadísticamente significativo y explicó el 96% de la varianza de la ActE de GBA1. La figura 6C muestra la superficie de respuesta de ActE de GBA1 obtenida para un valor constante a temperatura de 10°C. Como se puede observar (figura 6B, 6C) la ActE de GBA1 se incrementó a medida que los principales factores pH, t y T disminuyeron. Por lo tanto, las condiciones experimentales óptimas correspondieron a los valores más bajos de las variables analizadas: pH, 4,5; T: 10°C; t : 6 min.

Además del diseño de Box-Behnken, se ensayaron otras condiciones experimentales comúnmente utilizadas: T: 37°C t : 60 min pH 4,5 y T: 37°C t : 6 min pH: 4,5; mostrando ActE inferiores a las obtenidas en las condiciones óptimas escogidas. El diseño experimental identificó el pH 4,5 como pH óptimo de la reacción; este resultado es concordante con las características de la enzima lisosomal que precisa un pH ácido para su funcionamiento (GBA1 pH entre 3,5 - 5,5). Usando 5 mM de CBE, la ActE disminuyó en un 100% a las 48h y usando una concentración 10mM, la inhibición total se observó a las 24h. Estos resultados

confirman que el método mide específicamente la ActE de GBA1 y es acorde a las condiciones experimentales óptimas del método desarrollado (pH 4,5) donde las NLGCase no son activas (GBA2 pH óptimo 5,5 - 6,0; GBA3 pH óptimo 6-7,5)[17, 113].

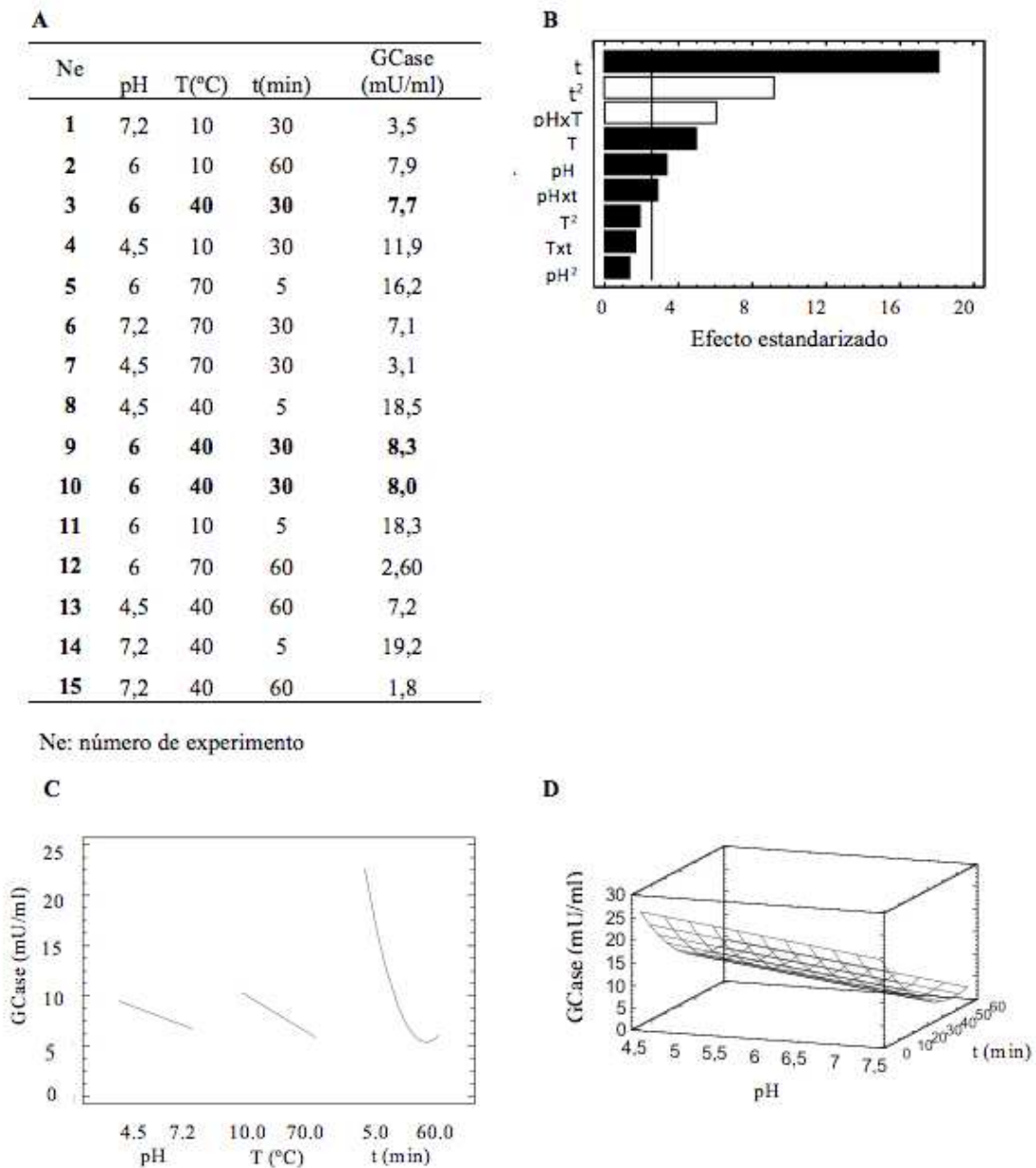


Figura 6. Principales resultados de optimización del diseño Box-Behnken: (A) Diseño experimental aleatorizado y valores obtenidos; (B) Gráfico estandarizado de Pareto para valores de actividad GBA1; (C) Efecto de cada factor en el valor de actividad GBA1; (D) Superficie de respuesta de actividad GBA1 obtenida para un valor constante de temperatura de 10°C.

4.1.2. Método analítico para la cuantificación de la actividad de GCase

El método analítico para la determinación de la actividad de GCase a partir de la cuantificación del producto formado, la 4-metilumbeliferona (4MU) en leucocitos es adecuado en términos de linealidad, precisión, exactitud, recuperación, selectividad, límite de detección y cuantificación. Este método analítico no distingue entre GBA1 y las NLGCase [108, 113], puesto que el método se desarrolla en condiciones de pH a 5,4, por lo que es capaz de cuantificar la enzima GBA1 (pH óptimo 3,4-5,5), y parte de NLGCase (pH 5,5-6 y 6-7,4 para GBA2 y GBA3, respectivamente).

4.2. ESTUDIOS CLÍNICOS

4.2.1. Cuantificación enzimática in vivo y captación celular de GBA1

4.2.1.1. Población a estudio

Las características clínicas y los parámetros posológicos de los pacientes incluidos en el estudio se resumen en las tablas 6 y 7.

Tabla 6. Características clínicas de los pacientes incluidos en el periodo I

Pac	Sexo	Años diag.	Genotipo	Edad actual	Peso (kg)	Hígado	Bazo	ósea	Hb	Plaq	CT
1	M	43	N370S/p.Arg87Trp	45	69	-	+	+	14,0	84	1577
2	M	27	N370S/N370S	47	80	-	E	+	15,2	184	1840
3	F	39	N370S/N188S	51	45	-	-	-	12,9	224	107
4	F	27	L444P/Gly416Ser	67	80	-	E	+	12,5	274	127
5	M	48	LEU375Arg/N370S	75	75	-	+	+	14,5	57	847
6	M	14	N370S/N188S	48	100	+	E	+	13,1	265	634
7	M	6	N370S/ p.Arg159Trp	38	80	-	-	+	15,0	155	137
8	F	13	N370S/ p.Arg159Trp	33	47	-	-	+	13,2	272	153

Pac: paciente; diag: diagnóstico; Hb: hemoglobina (g/L); Plaq: plaquetas 10^9 cel/L; CT (mmol/ml/h). Hígado: hepatomegalia se definió como una masa del hígado mayor de 1,25 veces el valor normal medido mediante resonancia magnética: leve (+) $\leq 1,25$, moderada (++) 1,25-2,5 and severa (+++) $>2,5$; Bazo: esplenomegalia se definió como una masa del bazo mayor de 5 veces el valor normal medido mediante resonancia magnética: leve (leve >5 , moderada 5-15 and severa >15 ; E: esplenectomía; Ósea: + con afectación; - sin afectación.

Tabla 7. Características de la dosificación de TES de los pacientes incluidos en el periodo I

Pac	Peso (kg)	Tiempo con TES	Dosis (U)	Dosis/kg (U/kg)	Intervalo dosis (días)	Dosis mensual U/Kg/28 días	Fármaco TES
1	69	2	2800	40.58	14	81.16	IMG y VELA
2	80	2	2800	35.00	14	70.00	IMG y VELA
3	45	14	800	17.78	28	17.78	IMG
4	80	13	800	10.00	28	10.00	IMG
5	75	5	800	10.67	14	21.34	IMG
6	100	14	3200	32.00	14	64.00	IMG
7	80	9	2400	30.00	28	30.00	IMG
8	47	14	800	17.02	28	17.02	IMG

Pac: paciente; TES: terapia enzimática sustitutiva; IMG: imiglucerasa; VELA: velaglucerasa

Se realizaron 41 determinaciones de actividad enzimática basal (Act_0) en leucocitos procedentes de los 8 pacientes EG1 en tratamiento con IMG y VELA; una determinación en cada uno de los diez individuos sanos incluidos en el estudio. Además, se evaluaron 14 curvas de actividad enzimática/tiempo (56 alícuotas de leucocitos y 56 alícuotas plasmáticas) en los diferentes puntos temporales tras la administración de la TES.

4.2.1.2. Curvas de la actividad enzimática GBA1 versus tiempo

De las 14 curvas de actividad enzimática/tiempo analizadas, 10 curvas correspondieron a los 8 pacientes en tratamiento con IMG y cuatro curvas correspondieron a 2 pacientes en tratamiento con VELA. La figura 7 muestra las 10 curvas de actividad enzimática versus tiempo en plasma y en leucocitos determinadas para cada paciente en tratamiento con IMG.

Siete de ocho pacientes lograron una Act_{75} superior a la determinada en tiempo cero (Act_0) ($p < 0,05$). Los pacientes 1 y 2 inicialmente recibieron IMG y posteriormente recibieron VELA. No hubo modificaciones de dosis de TES a lo largo del periodo de estudio, y cada paciente recibió siempre la misma dosis (tabla 7).

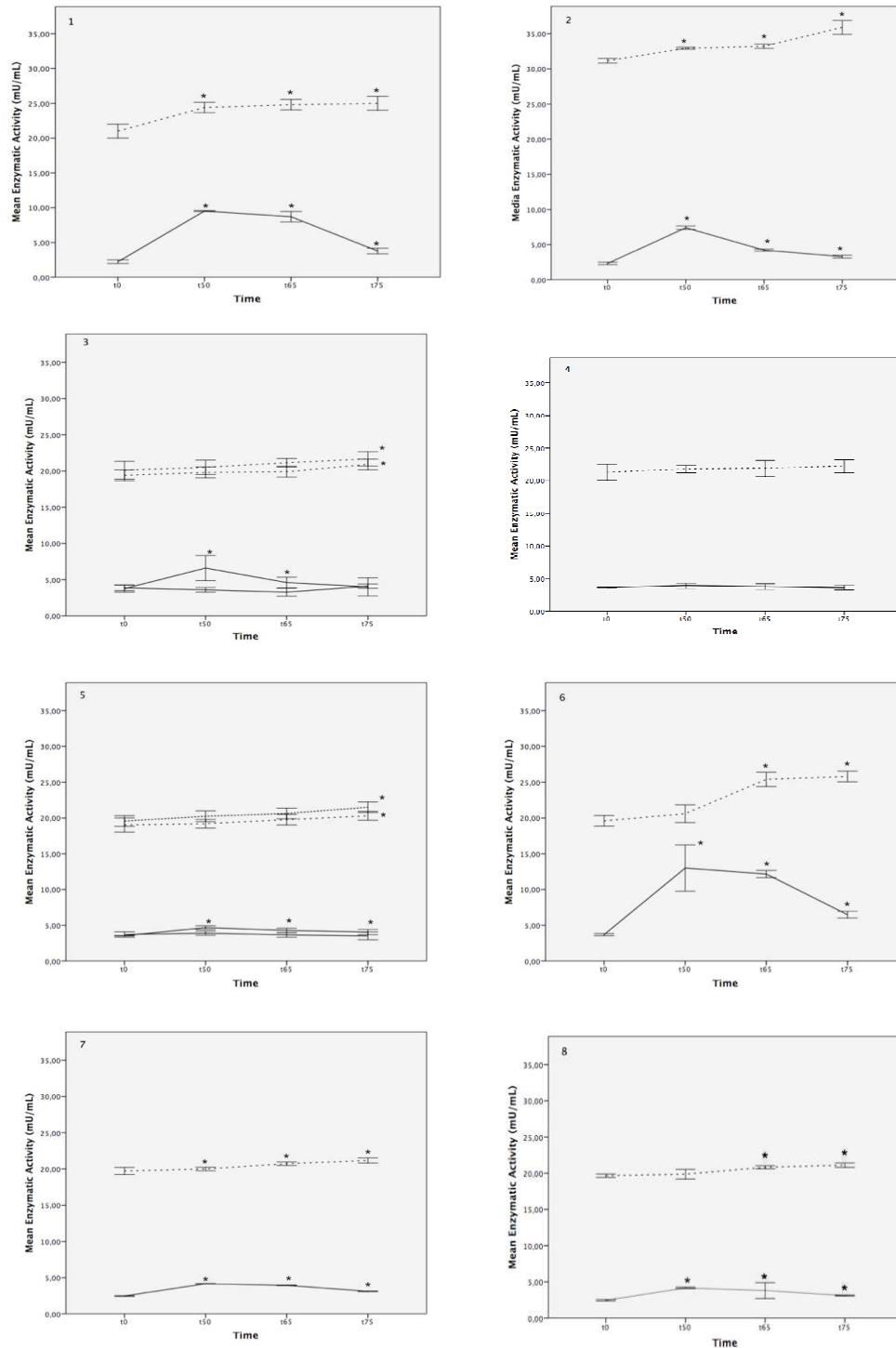


Figura 7. ActE (U/mL)/tiempo(min) en pacientes en tratamiento con IMG. Cada gráfico corresponde a un paciente. Las curvas en la parte inferior del gráfico corresponden a la ActE en el plasma (líneas sólidas), y las curvas en la parte superior corresponden a la ActE en los leucocitos (líneas punteadas) al mismo tiempo. Las curvas se muestran con las barras de error (95 %) de tres mediciones repetidas HPLC y con el significado estadístico entre la actividad enzimática basal (AcE_{t0}) y los otros tiempos ($p < 0,05$; indicado por asteriscos).

4.2.1.3. Cuantificación ActE de GBA1 intraleucocito

La media de ActE de GBA1 intraleucocito en el grupo control fue de 24,73 mU/ml (intervalo de referencia: IC95% 24,12-25,34; CV 3,43%. La mediana de Act₀ GBA1 intraleucocito en pacientes fue de 20,57 mU/ml (rango intercuartil 19,92 a 21,53; CV 18,30%); los CV muestran amplia variabilidad interindividual con respecto a los controles, resultado compatible con la variabilidad de las dosis administradas en la práctica clínica y con la incertidumbre mostrada en la literatura respecto a la dosis adecuada de TES; mostrando, además, diferencias significativas entre sanos y pacientes ($p=0,008$). Por tanto, presumiblemente, los pacientes con ActE cercanas al rango de valores determinados en sanos, recibirían la cantidad de rGBA1 que necesitan para un correcto funcionamiento del metabolismo de los lípidos, y los pacientes con ActE por encima del intervalo de normalidad en sanos, estarían recibiendo un exceso de rGBA1 (más dosis de TES), es decir estarían sobredosificados.

La figura 8A representa la correlación entre Act₀ y la dosis mensual administrada mostrando una correlación lineal ($R^2=0,587$; $r=0,766$; $p<0,05$), a la vez que se observa una gran variabilidad entre los pacientes.

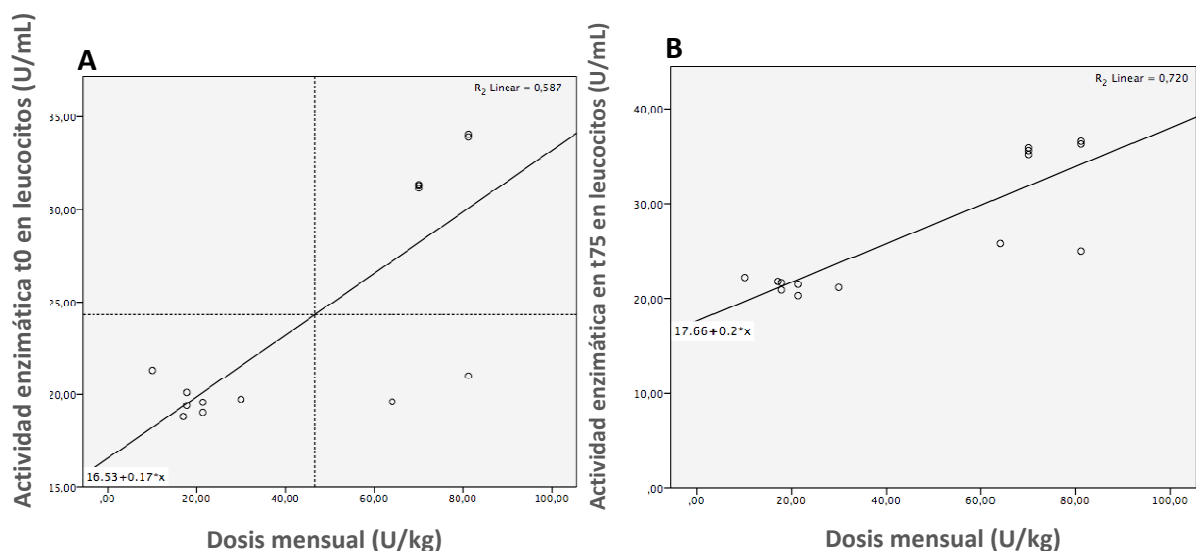


Figura 8. (A) Correlación entre Act₀ (mU/mL) en leucocitos y la dosis mensual administrada; (B) Correlación entre Act₇₅ (mU/mL) en leucocitos y la dosis mensual (U/kg) administrada a los pacientes.

Las líneas punteadas de la figura 8A muestran las medias de actividad enzimática Act_0 y de la dosis mensual, delimitando cuatro cuadrantes en la gráfica. Una gran parte de los pacientes obtienen Act_0 bajas con dosis bajas de TES o Act_0 altas con dosis altas de TES, como cabría esperar. Sin embargo, algunos pacientes tratados con altas dosis de TES no alcanzan actividad enzimática alta en los leucocitos (actividad enzimática en el cuadrante inferior derecho de la gráfica) y presentaron mayor infiltración de médula ósea y necrosis que el resto de pacientes. Estos resultados coinciden con la teoría que sustenta la existencia de pacientes respondedores y no respondedores[84]. Para alcanzar la respuesta a TES, se ha observado amplia variabilidad en la dosis y además, cuadruplicar la dosis no aumenta la tasa de respuesta en los no respondedores [46, 124, 125]. Por tanto, los resultados de este estudio pueden ayudar a explicar el fracaso terapéutico observado en algunos pacientes en los que a pesar de recibir altas dosis de enzimas no logran actividades enzimáticas en los leucocitos suficientes como para alcanzar los objetivos terapéuticos esperados.

Las $ActE$ de GBA1 en sanos y la Act_0 de GBA1 de los pacientes han mostrado diferencias significativas; la Act_0 en pacientes corresponde al 88% (SD16%) de la actividad enzimática del individuo sano (valores superiores a las actividades endógenas para el diagnóstico < 30% de un sano); y además la relación entre la Act_0 y la dosis administrada de TES es lineal (figura 8). Por tanto, se puede afirmar que el tratamiento crónico con TES aumenta el valor de la Act_0 de los pacientes aproximándolo a los valores obtenidos en adultos sanos. Sin embargo, distintos estudios farmacocinéticos han determinado que la $t_{1/2}$ de rGBA1 en los tejidos es inferior a 24h, y la pauta posológica de TES independientemente de la dosis seleccionada se ajusta a una frecuencia de 14 o 28 días[126, 127]. Estos resultados sugieren que, o bien los leucocitos periféricos mantienen la $ActE$ de rGBA1 tras la administración de cada dosis de TES, mediante un equilibrio de distribución de la enzima entre los monocitos periféricos y tisulares, o bien que mecanismos no dilucidados de activación por retroalimentación entre las GCase modificarían los valores basales de GBA1, como se ha descrito en otras proteínas terapéuticas[101].

La Act₇₅ fue de 27,14 mU/mL (SD 6,96 mU/mL; CV= 25,65%), mostrando relación lineal entre Act₇₅ y la dosis mensual de TES administrada ($R^2 = 0,720$; $r = 0,849$; $p < 0,05$) (figura 8B). Los estudios farmacocinéticos rGBA1 consultados [114, 128] han mostrado linealidad de las concentraciones plasmáticas de enzima y del AUC para dosis de TES bajas o intermedias. No obstante, los estudios realizados utilizando dosis superiores sugirieron la saturación del receptor [71, 72]. En el estudio realizado en esta Tesis la dosis media administrada a los pacientes (24U/kg) puede considerarse intermedia, y en la mitad de los pacientes el intervalo posológico fue de 28 días, valores inferiores a la dosis máxima establecida para la enzima (60U/kg cada 14 días); por tanto la linealidad observada entre la Act₇₅ y la dosis administrada está en concordancia con la bibliografía consultada.

La actividad enzimática media acumulada en leucocitos, Act₇₅₋₀, es decir, la actividad enzimática que proviene exclusivamente de la dosis de rGBA1 administrada, fue de 2,834 mU/mL (SD 1,577 mU/mL; CV= 55,64%), y su relación con la dosis administrada fue también lineal ($R^2 = 0,456$; $r = 0,675$; $p < 0,05$).

La variabilidad de la actividad enzimática interindividual expresada en CV, fue de 30,30% y 25,67%, en plasma y leucocitos, respectivamente. Por otra parte, la variabilidad intra-individual de las actividades enzimáticas fue de 17,09% y 7,03% en plasma y leucocitos, respectivamente. Es decir, la ActE plasmática muestra mayor variabilidad interindividual que la ActE leucocitaria. Esta diferencia puede ser el resultado de la influencia de factores individuales del paciente y factores farmacocinéticos de la rGBA1, ya que el tiempo de permanencia de la enzima en el plasma está muy limitado debido a su rápida captación por los monocitos, la hidrólisis enzimática debida a las proteasas plasmáticas o la participación de otros mecanismos no dilucidados hasta el momento [72]. La actividad enzimática intra-leucocitaria muestra una variabilidad interindividual ligeramente inferior a la plasmática y, lo más interesante, una variabilidad intraindividual baja. Ambos resultados avalan la selección de la actividad enzimática intraleucocitaria como un marcador óptimo para evaluar la actividad enzimática individual de los pacientes que reciben TES.

4.2.1.4. Tasa de captación celular de la enzima por los leucocitos y tasa de desaparición de la enzima del plasma

La Tcap fue de 37,73 mU/mL/min (IC95%: 25,63 a 49,84; CVinter: 55,57%) y la Tdes fue de 189,43mU/mL/min (IC95%: 80,31 a 298,55; CVinter: 99,77%). Cuando los valores se normalizaron por la dosis (TcapD y TdesD), los valores obtenidos fueron 0,980 (IC95%: 0,69 a 1,26; CVinter:50,20%) y 3,64 (IC95%: 2,11 a 5,16; CVinter: 72,73%,) respectivamente. La relación entre Tcap y Tdes con respecto a la dosis administrada mostró una lenta desaparición de la enzima del plasma (valor de Tdes bajo) cuando se administraron dosis bajas de enzimas, y a medida que la dosis de TES aumenta, también se observa un aumento en Tdes, obteniendo un ajuste lineal significativo ($R^2=0,507$; $R=0,712$; $p<0,05$). Así mismo, la Tcap mostró una correlación lineal con la dosis ($R^2=0,456$; $R= 0,675$; $p<0,05$). Sin embargo, debido al reducido número de pacientes y a la variabilidad interpaciente observada, no se puede descartar otro tipo de relación, ya que la Tcap tiende a estabilizarse en un valor umbral tras la administración de dosis de altas TES, lo que podría atribuirse a la saturación del receptor[86]. Por otro lado, se demostró una relación lineal entre la ActE que desaparece del plasma y la que absorben los leucocitos (Tcap-Tdes: R^2 lineal=0,658; $R=0,811$; $p<0,05$); es decir, cuanto mayor es la ActE que desaparece del plasma, mayor es la actividad absorbida por los leucocitos.

Por tanto, los datos obtenidos de ActE, de las Tcap y Tdes, y la variabilidad de los perfiles ActE/tiempo (figura 7) confirman la alta variabilidad interindividual en la distribución de rGBA1 observada también por otros autores[114, 129]. Las causas de esta variabilidad pueden deberse a los diferentes inmunofenotipos de macrófagos[130], a la variabilidad de los receptores manosa[131] o a la posible implicación de otros receptores[72, 132], que modificarían la tasa de captación de la enzima por parte de los leucocitos, la cantidad enzimática acumulada en el interior de los leucocitos y, por tanto, su posterior distribución en todo el organismo.

La media del factor de disposición leucocitario de la enzima (FD) (0,44) indica que la cantidad de la enzima internalizada por los leucocitos es inferior al 50% de la disponible en el plasma. Por otro lado, informa que los pacientes que reciben dosis

más bajas de TES son aquellos con mayor tasa de captación enzimática por parte de los leucocitos (figura 9; $FD < 0,44$) es decir, la mitad de la actividad enzimática que no se detectó en el plasma podría atribuirse a la captación enzimática por parte de los leucocitos.

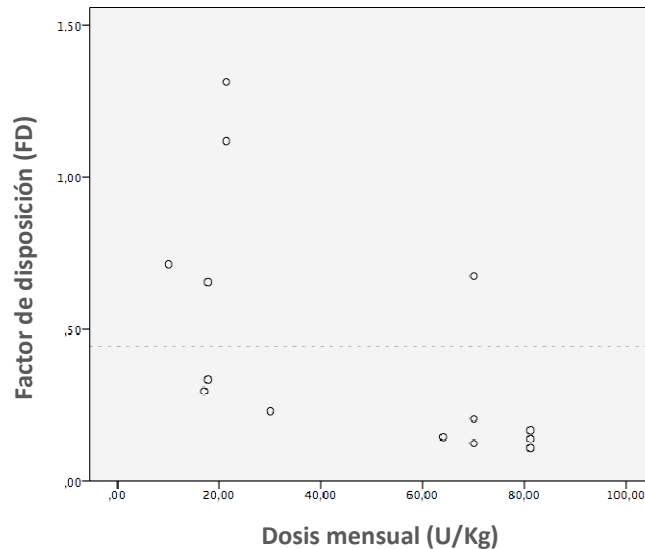


Figura 9. Relación entre la dosis y el factor de disposición leucocitario (FD). La línea horizontal representa la media FD.

Estos hallazgos parecen indicar que los pacientes que muestran una mayor captación de enzima por parte de los leucocitos requieren dosis más bajas de reposición enzimática; es decir, estos datos apoyarían la teoría de la selección de dosis baja y alta frecuencia basada en la cinética de la interacción enzima-receptor, y consideran que la administración de dosis elevadas de enzima saturan a los receptores de manosa facilitando así la degradación plasmática de la enzima[84, 85], mediante la proteólisis plasmática o bien porque otras células, como las endoteliales, pueden captar el enzima; y por tanto, una importante fracción de la dosis administrada se desaprovecharía sin darle la oportunidad de ejercer su acción terapéutica [132].

4.2.1.5. Diferencias en la ActE en la administración de las rGBA1 (IMG o VELA)

La Act₀ fue de 20,967 mU/mL (IC95%: 18,346 a 23,588 mU/mL) y 32,665 mU/mL (IC95%: 30,210 a 35,119 mU/mL) para IMG y VELA, respectivamente; mostrando diferencias significativas, que desaparecieron cuando estos valores se normalizaron por la dosis mensual administrada [0,89 para IMG (IC del 95%: 0,50 a 1,28 mU/mL) *versus* 0,43 para VELA (IC del 95%: 0,41 a 0,46 mU/mL); p>0,05]. Ambos pacientes en tratamiento con VELA habían recibido previamente IMG con la misma dosis por kg de peso: el paciente 1 mostró un aumento del 60% en la Act₀ y del 46% en la Act₇₅; sin embargo, el paciente 2 mostró diferencias inferiores al 1% en las Act₀ y en la Act₇₅. La Act₇₅₋₀ tras la administración de uno u otro fármaco no mostró diferencias significativas: 2,658 mU/mL (IC95%: 1,388 a 3,927) para IMG y 3,260 mU/mL (IC95%: 1,729 a 4,792 mU/mL) para VELA; p>0,05; ni con la normalización de dosis.

Este estudio *in vivo* muestra que la enzima se acumula en los leucocitos periféricos después de su administración, como ya demostraron otros estudios realizados *in vitro*, que además manifestaron mayor tasa de internalización en el monocito para VELA que para IMG[133], atribuyéndolo a la diferencia en la composición en glicanos entre ambas enzimas [134], y una mayor constante de unión al receptor de macrófagos para VELA[135]. Sin embargo, no se ha demostrado la repercusión clínica derivada de la diferencia observada para estos valores[136]. En esta Tesis Doctoral, en el estudio realizado *in vivo*, no se ha demostrado la existencia de diferencias significativas en las ActE intraleucocito obtenidas tras la administración de ambos fármacos; aunque es posible, que el reducido número de pacientes no haya permitido demostrar estas diferencias[133, 135].

En conclusión, los datos resultantes de este estudio, permiten obtener criterios objetivos para explicar la alta variabilidad interindividual en el comportamiento de estas enzimas exógenas procedentes de la administración de la TES observadas en la práctica clínica y ponen de relieve la necesidad, también postulada por otros autores[135], de realizar estudios preclínicos y clínicos comparativos bien diseñados entre ambos fármacos, para evaluar la asociación de la evolución de las variables clínicas con la magnitud de la enfermedad.

4.2.2. Relación entre la actividad enzimática y la respuesta clínica

4.2.2.1. Población a estudio

Se incluyeron un total de 19 pacientes diagnosticados con EG1 y 10 individuos sanos. La tabla 8 muestra las características clínicas, biométricas y de dosificación de los 19 pacientes con GD1 incluidos en el estudio; 4 de ellos obtuvieron una respuesta no óptima a la TES.

4.2.2.2. Relación de la actividad enzimática de GBA1 y GCase con la respuesta óptima

La actividad intraleucocitaria media del grupo control fue de 121,84 U/L (IC95%: 101,99 a 141,69; CV 8,2%) para la ActE de GCase y de 24,65 U/L (IC95% 24,12 a 25,01; CV 3,6%) para la ActE de GBA1. La actividad intraleucocitaria media del grupo de pacientes se muestra en la tabla 9 para la ActE de GCase y GBA1. Los marcadores de las ActE de GCase en el grupo de pacientes, presentaron un AUC superior con la respuesta óptima que con los marcadores de ActE GBA1 (tabla 9). Los resultados obtenidos permiten concluir que los valores de ActE de GCase (incluye GBA1, GBA2 y GBA3), se correlacionan mejor con la respuesta óptima que los valores de la actividad enzimática específica de la GBA1, corroborando por tanto la implicación de las NLGCasas en la EG1[29, 137].

Tabla 9. Relación de los marcadores de GBA1 y GCase con la respuesta clínica

Parámetro		Media (SD)	ROC: AUC (IC95%)
Act₀(%)	GCase	51.69 (52.58)	0.700 (de 0.402 a 0.998)
	GBA1	123.75(79.50)	0.600 (de 0.354 a 0.814)
Act₇₅ (%)	GCase	135.04 (112.20)	0.733 (de 0.484 a 0.906)
	GBA1	150.45 (108.45)	0.617 (de 0.369 a 0.826)
Act₇₅₋₀(%)	GCase	83.35 (81.48)	0.817 (de 0.575 a 0.954)*
	GBA1	26.71 (65.09)	0.583 (de 0.339 a 0.801)

SD: Desviación estándar; ROC *receiver operating curve*; AUC: área bajo la curva; * p<0,05 representa la significación estadística del 5%.

Tabla 8. Características basales de los pacientes incluidos en el periodo II.

Pac	Sexo	Genotipo	Peso (kg)	Edad al diagnóstico (años)	Edad actual (años)	ActD (%)	Dosis/kg (U/kg)	Intervalo posológico (días)	Tiempo (años) con TES	CT (nmol/ml.h)	TES	GauSSI-I (0-44)	Respuesta (puntos alcanzados de 6)
1	M	N370S/G195W	55	6	26	2,94	17,00	28	20	1003	IMG	5	RNO (4/6)
2	F	N370S/L444P	67	15	33	0,14	23,88	14	19	641	IMG	6	RO (5/6)
3	F	N370S/L444P	75	21	52	2,00	32,00	14	16	380	IMG	7	RNO (4/6)
4	F	N370S/L444P	49	27	33	3,00	24,49	14	5	363	IMG	3	RO (6/6)
5	F	N370S/N370S	51	28	49	18,75	15,69	14	22	614	IMG	2	RO (5/6)
6	M	N370S/N370S	80	28	52	15,63	30,00	14	19	323	IMG	0	RO (6/6)
7	F	N370S/N370S	51	28	49	18,75	15,69	14	22	359	IMG	2	RO (6/6)
8	M	N370S/DELTA 55	90	8	20	15,00	26,67	14	13	321	IMG	2	RO (6/6)
9	F	N370S/L444P	63	20	49	6,25	31,75	14	14	29	VELA	4	RO (6/6)
10	F	N370S/desconocido	53	21	64	27,00	67,92	14	12	1005	VELA	4	RO (5/6)
11	F	N370S/L444P	107	25	54	33,00	29,91	14	17	47	VELA	7	RO (5/6)
12	M	N370S/N370S	84	27	52	16,00	33,33	14	8	431	IMG	8	RO (5/6)
13	F	N370S/N188S	38	39	56	6,88	11,00	28	19	157	IMG	4	RO (5/6)
14	M	N370S/N188S	104	15	53	6,88	35,29	14	19	771	IMG	6	RO (5/6)
15	M	LEU375Arg/N370S	75	49	57	10,00	42,67	14	10	274	IMG	8	RNO (4/6)
16	F	L444P/Gly416Ser	77	27	71	2,50	20,78	14	18	40	IMG	9	RNO (4/6)
17	M	N370S/p.Arg159Trp	80	10	43	5,00	15,00	28	14	135	IMG	2	RO (5/6)
18	F	N370S/p.Arg159Trp	46	13	38	3,75	34,78	14	21	72	IMG	3	RO (6/6)
19	M	N370S/L444P	75	29	36	6,88	60,00	14	7	265	VELA	6	RO (6/6)

Pac: paciente; *F:* mujer; *M:* hombre; *Act_D:* Actividad enzimática residual de GBA1 endógena; *CT:* quitotriosidasa; *TES:* terapia enzimática sustitutiva; *GauSSI-I:* escala de severidad de la enfermedad de Gaucher tipo I; *RO:* respuesta óptima; *RNO:* respuesta no óptima.

4.2.2.3. Relación entre los marcadores basados en la actividad enzimática de GCase y la respuesta clínica

Como indica la tabla 10, los valores medios de la Act₇₅₋₀ y la Act₇₅ en los pacientes con respuesta óptima a la TES tienen un 98% y un 154% de la ActE determinada en sanos mientras que los pacientes que no responden a la TES tienen valores mucho más bajos: 27% y 58% respectivamente. Act₇₅₋₀ presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) en los pacientes con respuesta óptima y respuesta no óptima.

Tabla 10. Marcadores basados en GCase en función de la respuesta a la TES

Parámetro	Media (SD)	Valores medios según respuesta			CURVA ROC	
		Respuesta TES	Media (SD)	p-valor	AUC (IC95%)	Pto Corte
Parámetros Clínicos						
ActD (%)	10,54 (9,07)	Óptima	12,19 (9,43)	0,057	0,807 (0,575-0,954)	2,97
		No óptima	4,36 (3,78)			
Parámetros relacionados con la terapia						
Dosis (U/kg/28d)	57,51 (32,25)	Óptima	58,99 (33,78)	0,920	0,518 (0,190 - 0,846)	45,00
		No óptima	51,97 (29,38)			
Act ₀ (%)	51,69 (52,58)	Óptima	57,12 (55,04)	0,230	0,700 (0,402-0,998)	22,00
		No óptima	31,34 (41,79)			
Act ₇₅ (%)	135,04 (112,20)	Óptima	154,41 (115,07)	0,162	0,733 (0,484-0,906)	30,02
		No óptima	58,65 (62,29)			
Act ₇₅₋₀ (%)	83,35 (81,48)	Óptima	98,29 (85,34)	0,047*	0,817 (0,575-0,954)	57,98
		No óptima	27,32 (23,44)			

ActD: actividad enzimática residual de GBA1 endógena; SD: Desviación estándar; ROC *receiver operating curve*; AUC: área bajo la curva; Pto Corte: punto de corte de la curva ROC; * $p < 0,05$ representa la significación estadística del 5%.

Por lo tanto, la cantidad de enzima procedente de la TES (Act_{75-0}) en los pacientes que han mostrado respuesta óptima es la misma cantidad (100%) que los individuos sanos tienen de enzima endógena. Estos datos respaldan la hipótesis que una baja tasa de respuesta a la TES puede explicarse porque los leucocitos de los pacientes internalizan menos enzima exógena[132], debido, posiblemente, a la pérdida de los receptores de manosa[138], por lo que este marcador podría utilizarse para detectar de forma temprana a los pacientes no respondedores al tratamiento.

Por otro lado, Act_{75} presenta una elevada variabilidad interindividual (tabla 10). Si se tiene en cuenta que este marcador se define como la actividad máxima alcanzada en los leucocitos tras la perfusión que posteriormente se distribuirá por todo el organismo, la elevada variabilidad obtenida podría asociarse con la variabilidad que se atribuye al grado de captación de la enzima exógena[129], así como a las diferencias en los valores de enzima endógena de los pacientes (Act_D).

Respecto a la curva ROC, los marcadores moderadamente predictivos para obtener una respuesta óptima fueron las actividades AcE_{t75} y AcE_{t75-0} de GCCase (tabla 10); pero sólo se detectaron diferencias estadísticamente significativas para AcE_{t75-0} .

La asociación entre el punto de corte del 58% de la AcE_{t75-0} y la respuesta óptima (figura 10) mostró significación estadística ($p=0,018$) y una probabilidad del 64% de obtener una respuesta óptima a la TES. Es decir, reponiendo la actividad enzimática, mediante la administración de TES, de tal manera que el paciente alcance un 58% de la Act_E que tiene un individuo sano, tendría una mayor probabilidad de obtener una respuesta óptima al tratamiento. En este sentido, es de gran utilidad para la individualización de dosis conocer la cantidad de enzima que llega al sistema monocito-macrófago, para de esta forma poder ajustar las dosis que deben administrarse a los pacientes con el fin de obtener una respuesta óptima al tratamiento así como para detectar pacientes que son pobres respondedores.

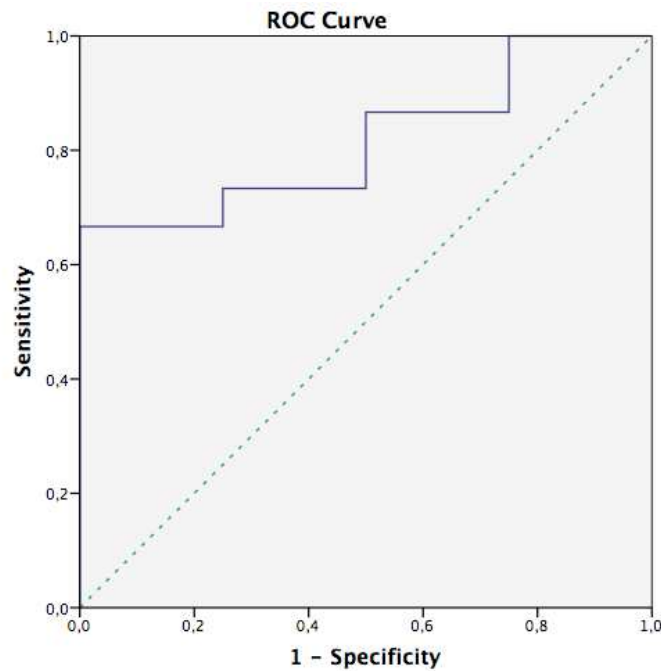


Figura 10. Curva receiver operating characteristics (ROC) que muestra la relación entre la Ac_{t75-0} en porcentaje de las GCase y la respuesta óptima (mostrada por la línea continua). La línea punteada representa la referencia diagonal.

Sin embargo, la sensibilidad del marcador es moderada, hecho que podría deberse a la técnica analítica utilizada y atendiendo al pH óptimo establecido para las GCase: se mide GBA1 y parcialmente GBA2 y GBA3. En esta línea de conocimiento y debido a la importante implicación GBA2[139, 140] y GBA3[141, 142] en la sintomatología de la EG, el desarrollo de una técnica más específica para GBA2 podría revelar la parte de sensibilidad no explicada mediante los marcadores presentados.

4.2.2.4. Relación de las variables clínicas y los marcadores de ActE de GCase

La Act₇₅ y la Act₇₅₋₀ presentaron una correlación significativa y positiva con la ActD (tabla 11). Un valor de ActD inferior a un 30% en leucocitos de individuos sanos es el marcador utilizado para realizar un diagnóstico positivo de la EG. Los resultados obtenidos en el estudio realizado muestran que los pacientes que presentan Act₇₅₋₀ en leucocitos superior al 58% respecto a un individuo sano, tienen una

probabilidad más alta de desarrollar una respuesta óptima a la TES. Estos resultados pueden considerarse satisfactorios, ya que el valor la deficiencia de GCCase utilizada en el diagnóstico de la enfermedad (inferior al 30% del valor de un adulto sano) y un reemplazo enzimático exógeno que represente una diferencia entre el valor basal del paciente (Act_0) y el determinado 15 minutos después de interrumpida la administración de la enzima (Act_{75}) superior al 58% dan valores cercanos a al 100% de ActE de un individuo sano.

Tabla 11. La correlación entre las variables clínicas y la Act_{75} y la Act_{75-0} , de las GCCase, y las medias de las variables clínicas individuales según el punto de corte de la Act_{75-0} .

Variable	Media (SD)	Correlación		Media según Act_{75-0}		
		Act_{75} r (p-valor)	Act_{75-0} r (p-valor)	$\geq 58\%$	$< 58\%$	p-valor
ActD	10,54 (9,07)	0,748 (0,0002)*	0,806 (0,00003)*	15,35	5,20	0,006*
Zimran Diag	7,45 (3,64)	-0,060 (0,861)	-0,060 (0,861)	7,83	7,00	0,662
Escala EVA	2,18 (2,46)	-0,104 (0,692)	-0,104 (0,692)	2,11	2,25	0,963
%SF36 FIS	48,12 (8,47)	-0,248 (0,338)	-0,248 (0,338)	45,68	50,88	0,167
%SF36 Ment	57,07 (8,70)	-0,103 (0,694)	-0,103 (0,694)	50,19	52,06	0,743
SMRI	6,16 (6,7)	-0,196 (0,421)	-0,266 (0,271)	5,60	6,78	0,400
GauSSI-I	4,63 (2,52)	-0,461 (0,044)*	-0,280 (0,246)	5,20	4,33	0,720

Zim Diag: Escala de gravedad de Zimran en el diagnóstico; Escala EVA: escala de dolor analógico de 0-10; %SF36 FIS y %SF36 Ment son evaluaciones de la calidad de vida física y mental utilizando la escala SF36; GauSSI-I: Índice de Severidad de Gaucher-tipo I; S-MRI: escala para infiltración en la médula ósea; r: coeficiente de correlación. ($p < 0,05$ representa significación estadística del 5%).*

ActD muestra una correlación positiva y lineal con Act₇₅ y la Act₇₅₋₀ (tabla 11); por lo que los pacientes con baja ActD también tienen valores disminuidos de ActE; los pacientes incluidos en este estudio con respuesta óptima y no óptima alcanzan valores medios de ActD del 12% y 4%, respectivamente (Tabla 11). Estos valores no alcanzan la diferenciación estadística ($p > 0,05$), probablemente debido a la variabilidad de los datos disponibles y a la escasa población, pero aun así la baja actividad ActD podría seleccionarse como marcador para detectar de forma precoz pacientes que podrían desarrollar menor respuesta a la TES.

En cuanto a la relación entre los marcadores de actividad y las variables clínicas, GauSSI-I mostró una correlación negativa y significativa con la Act₇₅, es decir, los valores bajos de la Act₇₅ están correlacionados con el Índice de Severidad de Gaucher más alto. Sin embargo, los pacientes incluidos en este estudio no se caracterizan por desarrollar una EG severa, ya que la puntuación de la escala GauSS-I fue 4,6 sobre 42 puntos (tabla 11). El resto de las variables clínicas presentaron una correlación lineal negativa no significativa con los Act₇₅ y la Act₇₅₋₀.

En conclusión, los resultados aportados en este estudio han permitido definir el marcador Act₇₅₋₀, calculado como la diferencia entre la actividad de la GCase medida 15 minutos después de la administración de la TES mediante perfusión IV durante 60 minutos de duración y la actividad GCase medida antes de la administración, que refleja la cantidad de enzima exógena captada por los leucocitos, y podría utilizarse como marcador de respuesta a la TES. Por otro lado, estos resultados han contribuido a explicar, al menos en parte, la respuesta no óptima a la TES observada en algunos pacientes, ya que debido a que la enzima exógena no entra en el sistema monocito-macrófago en concentraciones suficientes [132], no llega a los órganos diana y no revierte los síntomas característicos de la enfermedad. Si se conoce la cantidad de enzima dentro de los leucocitos tras la perfusión de TES (Act₇₅) que posteriormente se distribuye por el organismo mediante el sistema de monocito-macrófago, se podría predecir la respuesta clínica del paciente; por tanto la actividad enzimática Act₇₅ podría considerarse un marcador fácil acceso y de extremada utilidad para facilitar la individualización de la dosis de TES en pacientes con EG1.

4.2.3. Validación de la individualización terapéutica de TES

La validación de la utilización de los marcadores de ActE de GCase para la individualización de TES se ha desarrollado con el seguimiento de dos casos clínicos en los que se ha evaluado la respuesta clínica de los pacientes tras el ajuste posológico realizado que ha sido guiado con los valores analíticos de los marcadores.

4.2.3.1. Caso Clínico 1

Hombre de 49 años, diagnosticado de EG1 a los 40 años, con una actividad enzimática residual del 16%, y mutación genética GBA1 [N370S]/[N370S]; afectación ósea severa, esplenomegalia y trombopenia. Inicia tratamiento con TES (IMG) en 2009 a la dosis de 30U/kg (2.400 U) cada 2 semanas. En marzo de 2016 presenta respuesta no óptima a TES, con mayor dolor óseo, aumento volumen esplénico y disminución de plaquetas; escala GauSSI-I de 15 puntos. Se midieron los marcadores de actividad enzimática: Act₇₅ fue del 41% (respecto al 100% que tiene un individuo sano) y Act₇₅₋₀ del 29% (<58% del objetivo establecido). Se modificó el tratamiento con un aumento de dosis del 30%, (3200 U; 45U/kg cada 2 semanas). Tras un mes de tratamiento con la pauta individualizada, se analizaron de nuevo los marcadores de actividad enzimática: la Act₇₅ ascendió del 41% al 108% (es decir, la enzima que tendría un paciente sano) y la Act₇₅₋₀ del 29% al 61% alcanzando, por tanto, los valores establecidos como objetivo terapéutico. A los 9 meses de seguimiento el paciente presentó respuesta óptima al tratamiento con aumento de las plaquetas, disminución del dolor óseo (reducción en escala EVA) con reducción de la infiltración medular y reducción de CT.

4.2.3.2. Caso Clínico 2

Hombre de 53 años, diagnosticado de EG1 a los 15 años de edad, con una actividad enzimática residual previa al tratamiento del 6,8%, y mutación genética GBA1 [N370S]/[N188S]. Inicia tratamiento con TES (IMG) en 1996 a las dosis de 60 U/kg, con posterior disminución de dosis hasta 3600U (38U/kg; 95kg) cada 2 semanas. En abril de 2015 el paciente presenta sintomatología estable, con valores

de CT en el límite superior del valor objetivo y un marcado componente esquelético por osteonecrosis previas; presentando respuesta óptima al tratamiento con escala de GauSSI-I de 9 puntos. Se analizaron los marcadores de actividad enzimática: Act₇₅ fue del 134% (respecto al 100% que tiene un individuo sano) y Act₇₅₋₀ del 85% (superior al 58 marcado como objetivo terapéutico).

Ante la estabilidad clínica, y los valores de actividad enzimática determinados, se recomendó una reducción de la dosis de TES (reducción de un 25% de la dosis) 2800 U/2 semanas (29 U/kg; 105kg). Tras la modificación de dosis se analizaron los marcadores de actividad enzimática: Act₇₅ disminuyó al 75% y la Act₇₅₋₀ al 63% (manteniendo valor objetivo >58%). A los 8 meses de seguimiento el paciente mantuvo la respuesta óptima al tratamiento, incluso con mejoría de la CT (de 771 a 491 nmol/h/mL).

Los resultados obtenidos en estos dos casos clínicos demuestran la implicación clínica de los marcadores de GCase en la individualización de la TES en pacientes con EG1; por tanto, estos marcadores podrían utilizarse para tomar las decisiones terapéuticas encaminadas a obtener la respuesta óptima al tratamiento.

4.2.4. Modelo farmacocinético poblacional de glucocerebrosidasa

4.2.4.1. Población a estudio

El análisis para la determinación del modelo farmacocinético poblacional (popPK) se basó en los perfiles de actividad de GCase/tiempo obtenidos en 24 pacientes (64 mediciones de ActE de GCase). La tabla 12 resume las características de los pacientes incluidos en el estudio.

Tabla 12. Características demográficas de los pacientes en el estudio popPK

Parámetro (unidades)	Mediana (rango o número)
Edad (años)	49 (20-71)
Peso (kg)	67,5 (45,0-107,0)
Hombre/Mujer	14/11
ActD (%)	6,88 (0,14-18,75)
TES (IMG/VELA)	21/4
Dosis TES (U/kg)	32,9 (11,0-67,9)
Intervalo posológico (14/28días)	22/3
Monocitos (10 ⁹ cell/L)	0,45 (0,19-0,84)

ActD Actividad enzimática residual de *GBA1* endógena; *TES*: terapia enzimática sustitutiva; *IMG*: imiglucerasa; *VELA*: velaglucerasa

4.2.4.2. Modelo farmacocinético estructural

El modelo estructural que mejor describió los datos experimentales fue el modelo monocompartimental con eliminación de primer orden y constante de orden cero para caracterizar la síntesis endógena de GCase. Adicionalmente, se exploraron mecanismos de *feedback* usando los niveles de GCase endógena y otros modelos estructurales farmacocinéticos más complejos con diferentes procesos de eliminación. No obstante, no proporcionaron mejores ajustes ($p > 0,05$). La variabilidad interindividual (VII) se describió con el modelo de error exponencial y se incluyó en el aclaramiento total (CL) y en el parámetro cantidad endógena de GCase basal (BM), la VII del volumen (V) se fijó, resultando un modelo estructural y final estable; la variabilidad residual se modeló de manera aditiva en escala logarítmica.

4.2.4.3. Análisis de covariables

Estudios farmacocinéticos previos han observado una alta variabilidad en los parámetros farmacocinéticos después de la administración de TES [114, 128]. Para explicar, al menos en parte, la variabilidad interindividual de los parámetros farmacocinéticos se realizó el análisis de inclusión de covariables. En la tabla 13 se muestran los parámetros farmacocinéticos de los modelos inicial y final seleccionado:

Tabla 13. Parámetros farmacocinéticos de la enzima estimados para el modelo farmacocinético inicial y final.

modelo ESTRUCTURAL		modelo FINAL				
Parámetro	Estimación	Estimación	Bootstrap			
			Mediana	2,5 a 97,5th		
CL (L/d)	35,4	55,7	48,72	[24,66 a 59,94]		
V (L)	0,327	0,741	0,630	[0,169 a 1,308]		
BM (U)	145	539	469	[189 a 254]		
BM*ActD	-	0,137	0,134	[0,099 a 0,145]		
BM*TES	-	-0,760	-0,632	[-0,929 a 0,286]		
CL*MONOC	-	-1,340	-1,257	[-1,351 a -6,771]		
Variabilidad Interindividual						
	CV(%)	Shr(%)	CV(%)	Shr(%)	CV(%)	2,5 a 97,5th
ω^2 CL	47,4	34	51,0	25	52,98	[32,291 a 89,89]
ω^2 BM	134,5	3	85,3	9	78,14	[21,75 a 109,07]
Variabilidad Residual						
σ^2	FIX	28	FIX	23	-	-

CV: coeficiente de variación; Shr: shrinkage; 2,5 a 97,5th : percentiles del intervalo de confianza del 95%

En el modelo final se identificó como covariable predictora del CL, la cantidad de monocitos del paciente, de tal forma que a partir del modelo farmacocinético seleccionado se estima que el CL de los pacientes con niveles más altos de monocitos ($0,84 \times 10^9$ cel/L) disminuye un 59% en relación con el valor típico de CL obtenido para los pacientes con valores de monocitos en plasma equivalentes a la mediana del valor de la población ($0,45 \times 10^9$ cel/L), mientras que el CL de los individuos con bajo valor de monocitos ($0,19 \times 10^9$ cel/L) aumenta un 28% en relación con el valor típico de la población (55,7 L/d). Asimismo, ActD y el fármaco de TES administrado, se identificaron como covariables predictoras del parámetro utilizado para caracterizar la cantidad de enzima endógena basal del paciente (BM). La inclusión de estas covariables en el modelo farmacocinético permitió reducir la variabilidad interindividual de este parámetro un 50%. Respecto a la relación ActD y BM, se estimó un cambio del 13,7% en BM por aumento en una unidad en ActD. La inclusión de estas covariables se apoya en otros estudios publicados que han demostrado una regulación dependiente entre la GBA2 y la GBA1, que modifica la síntesis endógena de GCase [139, 140, 143]. Además, en estudios previos también se ha demostrado una correlación entre ActD y la respuesta óptima a la TES.

Con referencia a la relación fármaco TES y BM, los parámetros identificados en el modelo indican que los pacientes que recibieron VELA tuvieron un BM inferior (un 76%) que los pacientes que recibieron IMG. Estos resultados indican que el medicamento TES puede estar involucrado en la regulación de GCase endógena. Sin embargo, teniendo en cuenta el escaso número de pacientes incluido en este análisis es prudente interpretar los resultados obtenidos con cautela.

4.2.4.4. Evaluación del modelo final

Los gráficos de bondad de ajuste del modelo final muestran que tanto las predicciones poblacionales como las predicciones individuales se aproximan a las concentraciones observadas (Figura 11).

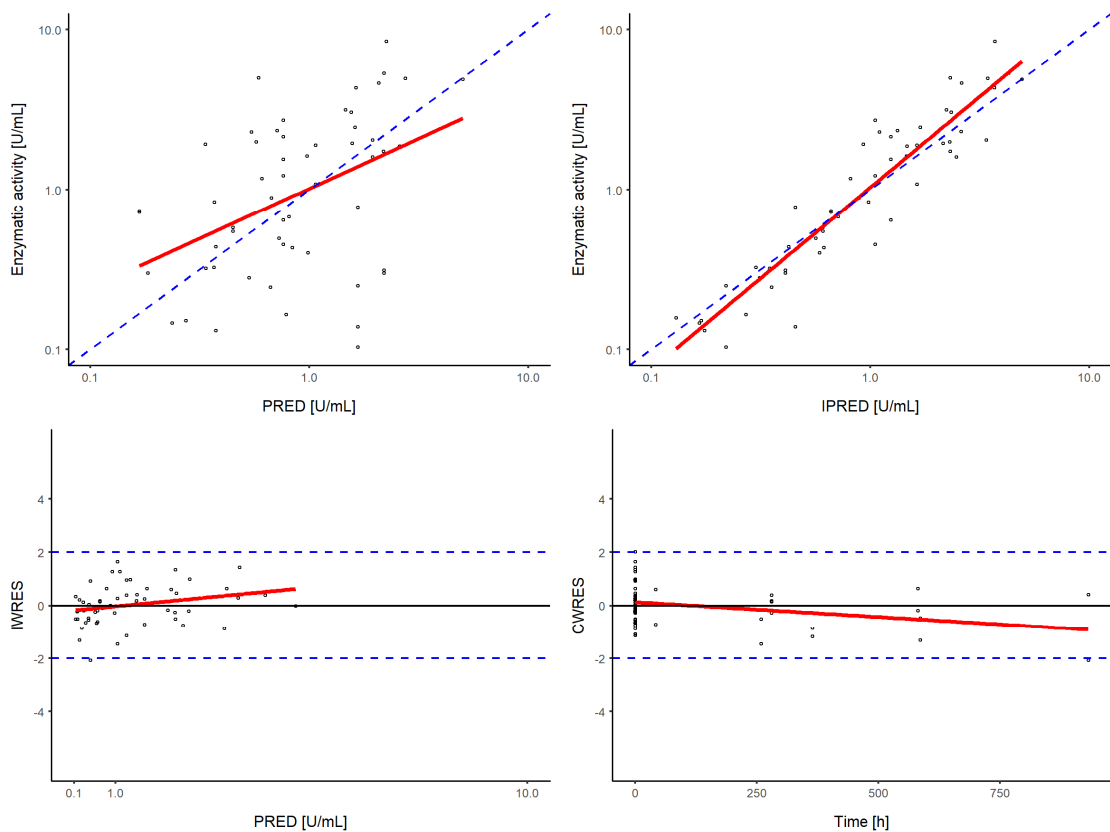


Figura 11. Gráficos de bondad de ajuste del modelo final. IPRED: predicciones individuales; PRED: predicciones poblacionales; enzymatic activity: actividad enzimática de GCase observada; CWRES: residuales condicionales ponderados; Time: tiempo transcurrido desde la primera administración de TES en horas (h).

En la tabla 13 se muestran los resultados del análisis bootstrap: los valores de los parámetros farmacocinéticos estimados con el modelo final están dentro de los IC95% definidos en el bootstrap, confirmando la estabilidad del modelo.

La gráfica pc-VPC (figura 12) muestra por inspección visual la capacidad predictiva del modelo. El modelo final fue capaz de describir las ActE observadas de GCase con adecuada exactitud y precisión.

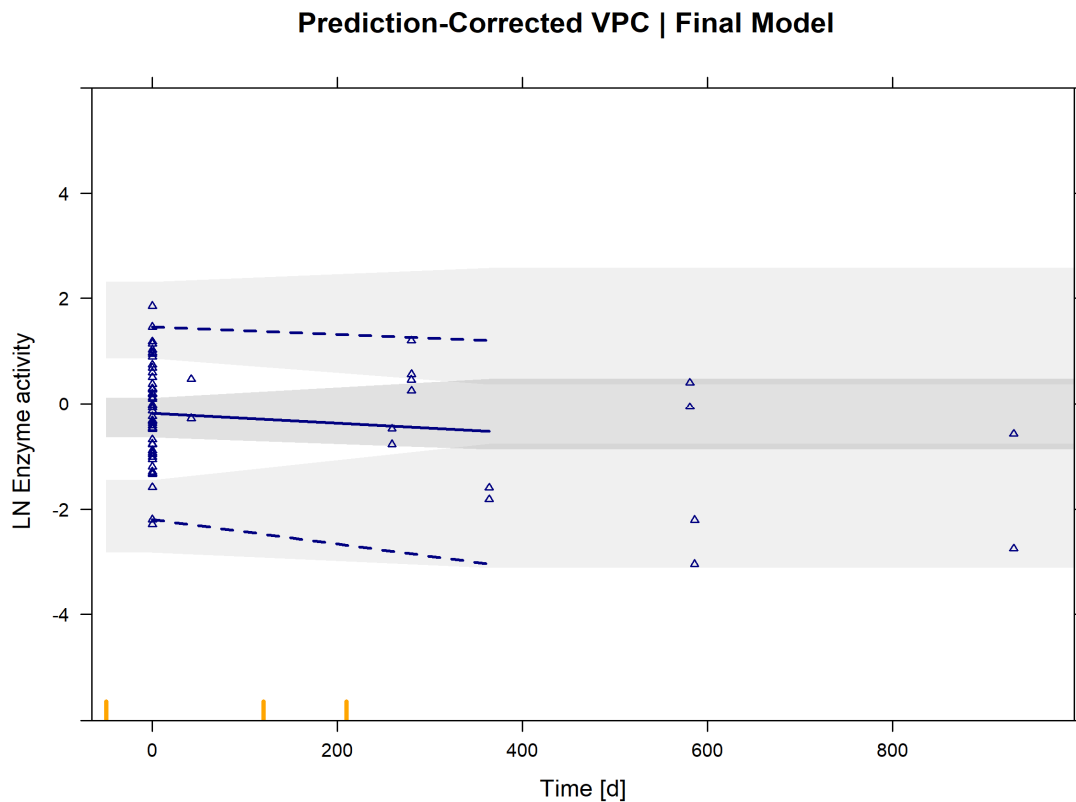


Figura 12. Prediction corrected visual predicted check (pc-VPC). Simulaciones realizadas: de 200; IC95% de la mediana de los datos simulados se muestra por la zona gris oscura; IC95 de los percentiles 2,5-97,5 de los datos simulados se muestra por las áreas gris claro. Los datos observados están representados por los triángulos. La mediana de los datos observados se muestra por una línea sólida. Los percentiles 2.5-97,5 de los datos observados se muestran por líneas discontinuas.

El modelo farmacocinético utilizado para describir la distribución de la ActE intraleucocito de Gcase después de la administración intravenosa de rGBA1 (IMG o VELA), consiste en la internalización de la enzima por los monocitos periféricos desde el plasma y posterior distribución a través de macrófagos tisulares a los órganos diana como hígado, bazo y hueso. Al mismo tiempo, rGBA1 también puede desaparecer del plasma debido a la escisión proteolítica por las proteasas o por la unión a otros receptores y proteínas endógenas, o debido al tránsito del fármaco a través la membrana endotelial hacia los fluidos intersticiales de los tejidos.

El valor típico del volumen de distribución de la enzima obtenido en este estudio es de 0,74 L, inferior al volumen del fluido extracelular (aproximadamente 15L en un individuo de 70Kg), probablemente debido a que en el modelo utilizado solo se considera la distribución celular de rGBA1 hacia los tejidos. A este respecto, la distribución de las proteínas terapéuticas suele restringirse al fluido extracelular debido al tamaño[144], lo que es acorde con los resultados obtenidos. Sin embargo, después de la infusión de rGBA1 en ratas, una gran parte (80%) fue recuperada en el hígado[126, 145], en bazo (1,9-2,6%)y en medula ósea (1,8-2,3%)[86]. Por tanto, a pesar de la internalización de rGBA1 a los monocitos periféricos y su posterior migración celular a través del endotelio para alcanzar los tejidos en forma de macrófago, la distribución del rGBA1 al hígado como fármaco libre no puede excluirse, debido a la alta tasa de irrigación de este órgano y al endotelio discontinuo presente en el hígado que permite el paso de moléculas de alto peso molecular [146]. De esta manera, se explicaría el valor de las altas concentraciones de rGBA1 alcanzadas en el hígado, en comparación con otros órganos, obtenidas en otros estudios [135].

Estudios farmacocinéticos previos han mostrado valores para el CL de rGBA1 comprendidos entre 20-30L y para la $t_{1/2}$ plasmática entre 10-15 min [114, 128]. Además, los estudios realizados con animales indican una fase de eliminación bifásica que corresponde a una fase de $t_{1/2}$ corta (45 min en suero) y otra fase de $t_{1/2}$ más larga en tejidos (12 horas) [126, 127]. Generalmente, las proteínas terapéuticas se eliminan a través de las mismas vías metabólicas que los péptidos endógenos, resultando aminoácidos para la síntesis proteica *de novo*[119]. En el caso de las rGBA1, debido a la proteólisis en la sangre y a la recaptación desde el plasma a los monocitos mediante el receptor de manosa, la actividad enzimática en plasma decae muy rápido [114, 117]. Ésta rápida disminución de las rGBA1 se ha atribuido a la descomposición proteolítica en los lisosomas[72, 135]. Alternativamente, la enzima exógena administrada podría disponerse de manera diferente a la GBA1 endógena, ya que no puede descartarse que la rGBA1 exógena se distribuya parcialmente por exocitosis endosomal o lisosomal de algunos tipos de células, o bien se someta a una degradación específica[126, 135]. Estos resultados en ratas parecen implicar un modelo bicompartimental, que podría

corroborarse en futuros estudios en los que se incluyera un mayor número de pacientes y fuera posible disponer de observaciones experimentales de la actividad enzimática tanto en plasma como en leucocitos. Sin embargo, basado en los resultados de esta investigación, la $t_{1/2}$ de GCase en leucocitos es aproximadamente 13 minutos, similar a $t_{1/2}$ de rGBA1 en plasma.

Este estudio es sin duda una aproximación inicial al modelado farmacocinético de la rGBA1 y para su aplicación en clínica es necesario tener en cuenta algunos aspectos que podrían considerarse limitaciones que restringirían la aplicabilidad del modelo farmacocinético poblacional propuesto. Entre estos aspectos es importante resaltar 1) el tamaño de la muestra de pacientes con EG1 reclutados y el número de observaciones por individuo y ciclo de tratamiento; 2) los estudios en animales han demostrado similitud en la distribución de las tres rGBA1 (IMG, VELA, TALI) [134, 135, 147]; sin embargo, en el modelo propuesto la rGBA1 modifica la síntesis endógena de GCase (caracterizada por el parámetro BM), particularmente IMG. Esta situación podría deberse a la diferente estructura de las enzimas. No obstante, la pequeña población tratada con el medicamento VELA (4/24 pacientes) incluida en este estudio pudo influir en los resultados; 3) la estimación de ϵ -shrinkage de los parámetros fue moderadamente alto (23%) y podría indicar que las predicciones individuales son de poco valor para evaluar la adecuación del modelo [59]. Asimismo, las observaciones en los macrófagos tisulares podrían mejorar la comprensión fisiológica de la cinética GBA1.

En conclusión, se ha desarrollado un modelo farmacocinético poblacional que permite explicar de manera adecuada los perfiles de actividad GCase/tiempo en los leucocitos de pacientes con EG1 tras la administración intravenosa de TES. El número de monocitos, la actividad endógena deficiente de GBA1 y el fármaco de TES administrado, se identificaron como covariables predictoras de los parámetros CL y actividad de glucocerebrosidasa endógena basal, respectivamente. La información obtenida en este estudio requiere su confirmación y validación posterior y podría tener importantes implicaciones clínicas en la individualización de la TES, ya que podría utilizarse en la toma de las decisiones terapéuticas en cuanto a la respuesta clínica y la estrategia de la dosificación de TES óptima.

5. CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado y validado un método analítico para la cuantificación específica de la actividad enzimática GBA1 en leucocitos humanos mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección ultravioleta visible que ha demostrado linealidad, exactitud, precisión, recuperación y selectividad.

2. La cuantificación de la actividad enzimática de GBA1 en leucocitos de pacientes con Enfermedad de Gaucher tipo I en tratamiento con terapia enzimática sustitutiva, muestra una correlación lineal con la dosis administrada y permite explicar la alta variabilidad interindividual en el comportamiento tanto de las enzimas exógenas como de la respuesta de los pacientes en la práctica clínica.

3. El proceso de captación leucocitario de GBA1 establece que la cantidad de la enzima internalizada por los leucocitos es inferior al 50% de la disponible en el plasma; la tasa de desaparición enzimática del plasma y la tasa de captación enzimática de los leucocitos muestran correlación lineal con la dosis administrada y elevada variabilidad interindividual, por tanto, permiten detectar de forma temprana a los pacientes no captadores como posibles no respondedores al tratamiento.

4. La actividad enzimática de las glucocerebrosidasas lisosomales y no lisosomales muestra correlación con la respuesta clínica, caracterizando la importante implicación de las glucocerebrosidasas no lisosomales en la clínica de la enfermedad de Gaucher.

5. La actividad enzimática exógena captada por los leucocitos (Act_{75-0}) y la actividad enzimática alcanzada en los leucocitos tras la perfusión de TES (Act_{75}) son marcadores predictivos de respuesta al tratamiento; alcanzar un valor de Act_{75-0} mayor al 58% y un valor de Act_{75} del 100%, comparados con la actividad de un individuo sano, proporcionan mayor probabilidad de obtener respuesta óptima a la TES.

6. El modelo farmacocinético que permite explicar de manera adecuada los perfiles de actividad enzimática/tiempo en los leucocitos de pacientes con EG1 tras la administración intravenosa de la TES, fue el modelo monocompartimental con eliminación de primer orden y constante de orden cero, que cuantifica el equilibrio homeostático de la glucocerebrosidasa endógena. La cantidad de monocitos, la actividad endógena deficiente de GBA1 y el medicamento administrado como TES se han identificado como covariables predictoras de los parámetros farmacocinéticos de la rGBA1, por lo que podrían utilizarse para la individualización posológica de la TES.

7. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral ponen de relieve una vez más el valor añadido de la selección de marcadores farmacocinéticos (actividad enzimática intraleucocitaria de glucocerebrosidasa) en la toma de decisiones terapéuticas, y se posicionan como herramientas útiles para la individualización posológica de la terapia enzimática sustitutiva en los pacientes con enfermedad de Gaucher tipo I.

6. BIBLIOGRAFIA.

- [1] M. de la Mata, D. Cotan, M. Villanueva-Paz, I. de Laverá, M. Alvarez-Cordoba, R. Luzon-Hidalgo, J.M. Suarez-Rivero, G. Tiscornia, M. Oropesa-Avila, Mitochondrial Dysfunction in Lysosomal Storage Disorders, *Diseases*, 4 (2016).
- [2] J. Stirnemann, N. Belmatoug, F. Camou, C. Serratrice, R. Froissart, C. Caillaud, T. Levade, L. Astudillo, J. Serratrice, A. Brassier, C. Rose, T. Billette de Villemeur, M.G. Berger, A Review of Gaucher Disease Pathophysiology, Clinical Presentation and Treatments, *International journal of molecular sciences*, 18 (2017).
- [3] W.L. Stone, Gaucher Disease, StatPearls, Treasure Island (FL), 2017.
- [4] M. Horowitz, M. Pasmanik-Chor, Z. Borochowitz, T. Falik-Zaccai, K. Heldmann, R. Carmi, R. Parvari, H. Beit-Or, B. Goldman, L. Peleg, E. Levy-Lahad, P. Renbaum, S. Legum, R. Shomrat, H. Yeager, D. Benbenisti, R. Navon, V. Dror, M. Shohat, N. Magal, N. Navot, N. Eyal, Prevalence of glucocerebrosidase mutations in the Israeli Ashkenazi Jewish population, *Hum Mutat*, 12 (1998) 240-244.
- [5] T.M. Cox, J.P. Schofield, Gaucher's disease: clinical features and natural history, *Baillieres Clin Haematol*, 10 (1997) 657-689.
- [6] P. Giraldo, P. Alfonso, P. Irun, L. Gort, A. Chabas, L. Vilageliu, D. Grinberg, C.M. Sa Miranda, M. Pocovi, Mapping the genetic and clinical characteristics of Gaucher disease in the Iberian Peninsula, *Orphanet J Rare Dis*, 7 (2012) 17.
- [7] P.J. Murray, Immune regulation by monocytes, *Seminars in immunology*, (2017).
- [8] E.G.G. Beutler, Scriver CR, Sly WS, Beaudet AL, Valle D, Gaucher Disease. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, NY, 2011, pp. 3635-3668.
- [9] R.E. Lee, The fine structure of the cerebroside occurring in Gaucher's disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 61 (1968) 484-489.
- [10] The Gauchers Association Ltd, The Gauchers Association, Gloucestershire 2018.
- [11] M. Saito, A. Rosenberg, The fate of glucosylceramide (glucocerebroside) in genetically impaired (lysosomal beta-glucosidase deficient) Gaucher disease diploid human fibroblasts, *J Biol Chem*, 260 (1985) 2295-2300.
- [12] S. van Weely, M. Brandsma, A. Strijland, J.M. Tager, J.M. Aerts, Demonstration of the existence of a second, non-lysosomal glucocerebrosidase that is not deficient in Gaucher disease, *Biochimica et biophysica acta*, 1181 (1993) 55-62.
- [13] H. Matern, H. Heinemann, G. Legler, S. Matern, Purification and characterization of a microsomal bile acid beta-glucosidase from human liver, *J Biol Chem*, 272 (1997) 11261-11267.
- [14] R.G. Boot, M. Verhoek, W. Donker-Koopman, A. Strijland, J. van Marle, H.S. Overkleeft, T. Wennekes, J.M. Aerts, Identification of the non-lysosomal glucosylceramidase as beta-glucosidase 2, *J Biol Chem*, 282 (2007) 1305-1312.
- [15] M. de Graaf, I.C. van Veen, I.H. van der Meulen-Muileman, W.R. Gerritsen, H.M. Pinedo, H.J. Haisma, Cloning and characterization of human liver cytosolic beta-glycosidase, *The Biochemical journal*, 356 (2001) 907-910.
- [16] N. Dekker, T. Voorn-Brouwer, M. Verhoek, T. Wennekes, R.S. Narayan, D. Speijer, C.E. Hollak, H.S. Overkleeft, R.G. Boot, J.M. Aerts, The cytosolic beta-glucosidase GBA3 does not influence type 1 Gaucher disease manifestation, *Blood Cells Mol Dis*, 46 (2011) 19-26.
- [17] Y. Hayashi, N. Okino, Y. Kakuta, T. Shikanai, M. Tani, H. Narimatsu, M. Ito, Klotho-related protein is a novel cytosolic neutral beta-glycosylceramidase, *J Biol Chem*, 282 (2007) 30889-30900.

- [18] K.S. Hruska, M.E. LaMarca, C.R. Scott, E. Sidransky, Gaucher disease: mutation and polymorphism spectrum in the glucocerebrosidase gene (GBA), *Hum Mutat*, 29 (2008) 567-583.
- [19] H. Matern, H. Boermans, F. Lottspeich, S. Matern, Molecular cloning and expression of human bile acid beta-glucosidase, *J Biol Chem*, 276 (2001) 37929-37933.
- [20] Y. Yildiz, P. Hoffmann, S. Vom Dahl, B. Breiden, R. Sandhoff, C. Niederau, M. Horwitz, S. Karlsson, M. Filocamo, D. Elstein, M. Beck, K. Sandhoff, E. Mengel, M.C. Gonzalez, M.M. Nothen, E. Sidransky, A. Zimran, M. Mattheisen, Functional and genetic characterization of the non-lysosomal glucosylceramidase 2 as a modifier for Gaucher disease, *Orphanet J Rare Dis*, 8 (2013) 151.
- [21] E. Beutler, L. Beutler, C. West, Mutations in the gene encoding cytosolic beta-glucosidase in Gaucher disease, *J Lab Clin Med*, 144 (2004) 65-68.
- [22] H.G. Korschen, Y. Yildiz, D.N. Raju, S. Schonauer, W. Bonigk, V. Jansen, E. Kremmer, U.B. Kaupp, D. Wachten, The non-lysosomal beta-glucosidase GBA2 is a non-integral membrane-associated protein at the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi, *J Biol Chem*, 288 (2013) 3381-3393.
- [23] T. Kolter, K. Sandhoff, Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids, *Annual review of cell and developmental biology*, 21 (2005) 81-103.
- [24] C.M. Ridley, K.E. Thur, J. Shanahan, N.B. Thillaiappan, A. Shen, K. Uhl, C.M. Walden, A.A. Rahim, S.N. Waddington, F.M. Platt, A.C. van der Spoel, beta-Glucosidase 2 (GBA2) activity and imino sugar pharmacology, *J Biol Chem*, 288 (2013) 26052-26066.
- [25] J. Sorge, C. West, B. Westwood, E. Beutler, Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82 (1985) 7289-7293.
- [26] G.A. Grabowski, S. Gatt, M. Horowitz, Acid beta-glucosidase: enzymology and molecular biology of Gaucher disease, *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 25 (1990) 385-414.
- [27] P.K. Mistry, J. Liu, M. Yang, T. Nottoli, J. McGrath, D. Jain, K. Zhang, J. Keutzer, W.L. Chuang, W.Z. Mehal, H. Zhao, A. Lin, S. Mane, X. Liu, Y.Z. Peng, J.H. Li, M. Agrawal, L.L. Zhu, H.C. Blair, L.J. Robinson, J. Iqbal, L. Sun, M. Zaidi, Glucocerebrosidase gene-deficient mouse recapitulates Gaucher disease displaying cellular and molecular dysregulation beyond the macrophage, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (2010) 19473-19478.
- [28] N. Dekker, L. van Dussen, C.E. Hollak, H. Overkleeft, S. Scheij, K. Ghauharali, M.J. van Breemen, M.J. Ferraz, J.E. Groener, M. Maas, F.A. Wijburg, D. Speijer, A. Tylki-Szymanska, P.K. Mistry, R.G. Boot, J.M. Aerts, Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response, *Blood*, 118 (2011) e118-127.
- [29] P.K. Mistry, J. Liu, L. Sun, W.L. Chuang, T. Yuen, R. Yang, P. Lu, K. Zhang, J. Li, J. Keutzer, A. Stachnik, A. Mennone, J.L. Boyer, D. Jain, R.O. Brady, M.I. New, M. Zaidi, Glucocerebrosidase 2 gene deletion rescues type 1 Gaucher disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (2014) 4934-4939.
- [30] R.O. Brady, J.N. Kanfer, D. Shapiro, Metabolism of Glucocerebrosides. Ii. Evidence of an Enzymatic Deficiency in Gaucher's Disease, *Biochemical and biophysical research communications*, 18 (1965) 221-225.
- [31] E. Sidransky, Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder, *Mol Genet Metab*, 83 (2004) 6-15.
- [32] O.A. Bodamer, C. Hung, Laboratory and genetic evaluation of Gaucher disease, *Wien Med Wochenschr*, 160 (2010) 600-604.
- [33] G.A. Grabowski, Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease, *Lancet*, 372 (2008) 1263-1271.

- [34] O. Goker-Alpan, K.S. Hruska, E. Orvisky, P.S. Kishnani, B.K. Stubblefield, R. Schiffmann, E. Sidransky, Divergent phenotypes in Gaucher disease implicate the role of modifiers, *J Med Genet*, 42 (2005) e37.
- [35] A.D. Klein, N.S. Ferreira, S. Ben-Dor, J. Duan, J. Hardy, T.M. Cox, A.H. Merrill, Jr., A.H. Futerman, Identification of Modifier Genes in a Mouse Model of Gaucher Disease, *Cell reports*, 16 (2016) 2546-2553.
- [36] E.H. Davies, E. Mengel, A. Tylki-Szymanska, G. Kleinotiene, J. Reinke, A. Vellodi, Four-year follow-up of chronic neuronopathic Gaucher disease in Europeans using a modified severity scoring tool, *J Inherit Metab Dis*, 34 (2011) 1053-1059.
- [37] T. Roshan Lal, E. Sidransky, The Spectrum of Neurological Manifestations Associated with Gaucher Disease, *Diseases*, 5 (2017).
- [38] D.A. Wenger, S. Roth, M. Sattler, Acute neuronopathic (infantile) and chronic nonneuronopathic (adult) Gaucher disease in full siblings, *J Pediatr*, 100 (1982) 252-254.
- [39] T.M. Cox, Gaucher disease: clinical profile and therapeutic developments, *Biologics : targets & therapy*, 4 (2010) 299-313.
- [40] D.I. Rosenthal, J.A. Scott, J. Barranger, H.J. Mankin, S. Saini, T.J. Brady, L.K. Osier, S. Doppelt, Evaluation of Gaucher disease using magnetic resonance imaging, *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 68 (1986) 802-808.
- [41] J. Stirnemann, N. Belmatoug, C. Vincent, O. Fain, B. Fantin, F. Mentre, Bone events and evolution of biologic markers in Gaucher disease before and during treatment, *Arthritis research & therapy*, 12 (2010) R156.
- [42] G.M. Pastores, S. Wallenstein, R.J. Desnick, M.M. Luckey, Bone density in Type 1 Gaucher disease, *J Bone Miner Res*, 11 (1996) 1801-1807.
- [43] D.W. Stowens, S.L. Teitelbaum, A.J. Kahn, J.A. Barranger, Skeletal complications of Gaucher disease, *Medicine*, 64 (1985) 310-322.
- [44] L. Gort, M.J. Coll, Diagnosis, biomarkers and biochemical alterations in Gaucher's disease, *Med Clin (Barc)*, 137 Suppl 1 (2011) 12-16.
- [45] E. Beutler, W. Kuhl, Detection of the defect of Gaucher's disease and its carrier state in peripheral-blood leucocytes, *Lancet*, 1 (1970) 612-613.
- [46] E. Beutler, A. Demina, K. Laubscher, P. Garver, T. Gelbart, D. Balicki, L. Vaughan, The clinical course of treated and untreated Gaucher disease. A study of 45 patients, *Blood Cells Mol Dis*, 21 (1995) 86-108.
- [47] A. Zimran, A. Kay, T. Gelbart, P. Garver, D. Thurston, A. Saven, E. Beutler, Gaucher disease. Clinical, laboratory, radiologic, and genetic features of 53 patients, *Medicine*, 71 (1992) 337-353.
- [48] M. Biegstraaten, T.M. Cox, N. Belmatoug, M.G. Berger, T. Collin-Histed, S. Vom Dahl, M. Di Rocco, C. Fraga, F. Giona, P. Giraldo, M. Hasanhodzic, D.A. Hughes, P.O. Iversen, A.I. Kiewiet, E. Lukina, M. Machaczka, T. Marinakis, E. Mengel, G.M. Pastores, U. Plockinger, H. Rosenbaum, C. Serratrice, A. Symeonidis, J. Szer, J. Timmerman, A. Tylki-Szymanska, M. Weisz Hubshman, D.I. Zafeiriou, A. Zimran, C.E.M. Hollak, Management goals for type 1 Gaucher disease: An expert consensus document from the European working group on Gaucher disease, *Blood Cells Mol Dis*, (2016).
- [49] M. Di Rocco, F. Giona, F. Carubbi, S. Linari, F. Minichilli, R.O. Brady, G. Mariani, M.D. Cappellini, A new severity score index for phenotypic classification and evaluation of responses to treatment in type I Gaucher disease, *Haematologica*, 93 (2008) 1211-1218.
- [50] P. Giraldo, [Guidelines for type 1 Gaucher's disease], *Med Clin (Barc)*, 137 Suppl 1 (2011) 55-60.
- [51] M. Maas, C. van Kuijk, J. Stoker, C.E. Hollak, E.M. Akkerman, J.F. Aerts, G.J. den Heeten, Quantification of bone involvement in Gaucher disease: MR imaging bone marrow burden score as an alternative to Dixon quantitative chemical shift MR imaging--initial experience, *Radiology*, 229 (2003) 554-561.

- [52] M. Maas, L.W. Poll, M.R. Terk, Imaging and quantifying skeletal involvement in Gaucher disease, *Br J Radiol*, 75 Suppl 1 (2002) A13-24.
- [53] M. Roca, J. Mota, P. Alfonso, M. Pocovi, P. Giraldo, S-MRI score: A simple method for assessing bone marrow involvement in Gaucher disease, *Eur J Radiol*, 62 (2007) 132-137.
- [54] M. Roca, J. Mota, P. Giraldo, J. Perez Calvo, R. Gomez Pereda, M. Giralt, [Magnetic resonance in the diagnosis of extent and osseous complications of Gaucher's disease type 1], *Revista clinica espanola*, 197 (1997) 550-554.
- [55] C.E. Hollak, S. van Weely, M.H. van Oers, J.M. Aerts, Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease, *J Clin Invest*, 93 (1994) 1288-1292.
- [56] J.M. Aerts, W.W. Kallemeijn, W. Wegdam, M. Joao Ferraz, M.J. van Breemen, N. Dekker, G. Kramer, B.J. Poorthuis, J.E. Groener, J. Cox-Brinkman, S.M. Rombach, C.E. Hollak, G.E. Linthorst, M.D. Witte, H. Gold, G.A. van der Marel, H.S. Overkleeft, R.G. Boot, Biomarkers in the diagnosis of lysosomal storage disorders: proteins, lipids, and inhibodies, *J Inherit Metab Dis*, 34 (2011) 605-619.
- [57] P.B. Deegan, M.T. Moran, I. McFarlane, J.P. Schofield, R.G. Boot, J.M. Aerts, T.M. Cox, Clinical evaluation of chemokine and enzymatic biomarkers of Gaucher disease, *Blood Cells Mol Dis*, 35 (2005) 259-267.
- [58] R.G. Boot, G.H. Renkema, M. Verhoek, A. Strijland, J. Blik, T.M. de Meulemeester, M.M. Mannens, J.M. Aerts, The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency, *J Biol Chem*, 273 (1998) 25680-25685.
- [59] R.G. Boot, M. Verhoek, M. de Fost, C.E. Hollak, M. Maas, B. Bleijlevens, M.J. van Breemen, M. van Meurs, L.A. Boven, J.D. Laman, M.T. Moran, T.M. Cox, J.M. Aerts, Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention, *Blood*, 103 (2004) 33-39.
- [60] K.L. Chang, W.L. Hwu, H.Y. Yeh, N.C. Lee, Y.H. Chien, CCL18 as an alternative marker in Gaucher and Niemann-Pick disease with chitotriosidase deficiency, *Blood Cells Mol Dis*, 44 (2010) 38-40.
- [61] J.M. Aerts, C.E. Hollak, M. van Breemen, M. Maas, J.E. Groener, R.G. Boot, Identification and use of biomarkers in Gaucher disease and other lysosomal storage diseases, *Acta Paediatr Suppl*, 94 (2005) 43-46; discussion 37-48.
- [62] L. van Dussen, E.J. Hendriks, J.E. Groener, R.G. Boot, C.E. Hollak, J.M. Aerts, Value of plasma chitotriosidase to assess non-neuronopathic Gaucher disease severity and progression in the era of enzyme replacement therapy, *J Inherit Metab Dis*, 37 (2014) 991-1001.
- [63] A. Rolfs, A.K. Giese, U. Grittner, D. Mascher, D. Elstein, A. Zimran, T. Böttcher, J. Lukas, R. Hübner, U. Gölnitz, A. Röhle, A. Dudesek, W. Meyer, M. Wittstock, H. Mascher, Glucosylsphingosine is a highly sensitive and specific biomarker for primary diagnostic and follow-up monitoring in Gaucher disease in a non-Jewish, Caucasian cohort of Gaucher disease patients, *PLoS One*, 8 (2013) e79732.
- [64] J.M. Aerts, C.E. Hollak, R.G. Boot, J.E. Groener, M. Maas, Substrate reduction therapy of glycosphingolipid storage disorders, *J Inherit Metab Dis*, 29 (2006) 449-456.
- [65] N. Belmatoug, M. Di Rocco, C. Fraga, P. Giraldo, D. Hughes, E. Lukina, P. Maison-Blanche, M. Merkel, C. Niederau, U. Plckinger, J. Richter, T.M. Stulnig, S. Vom Dahl, T.M. Cox, Management and monitoring recommendations for the use of eliglustat in adults with type 1 Gaucher disease in Europe, *European journal of internal medicine*, 37 (2017) 25-32.
- [66] A. Zimran, J. Goldblatt, J. Szer, Should eliglustat be first line therapy for patients with type 1 Gaucher disease? Definitions of safety and efficacy, *Blood Cells Mol Dis*, 68 (2018) 14-16.
- [67] R.O. Brady, P.G. Pentchev, A.E. Gal, S.R. Hibbert, A.S. Dekaban, Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified glucocerebrosidase in Gaucher's disease, *N Engl J Med*, 291 (1974) 989-993.

- [68] T.W. Doebber, M.S. Wu, R.L. Bugianesi, M.M. Ponpipom, F.S. Furbish, J.A. Barranger, R.O. Brady, T.Y. Shen, Enhanced macrophage uptake of synthetically glycosylated human placental beta-glucocerebrosidase, *J Biol Chem*, 257 (1982) 2193-2199.
- [69] S. Takasaki, G.J. Murray, F.S. Furbish, R.O. Brady, J.A. Barranger, A. Kobata, Structure of the N-asparagine-linked oligosaccharide units of human placental beta-glucocerebrosidase, *J Biol Chem*, 259 (1984) 10112-10117.
- [70] GenzymeEurope, Cerezyme (Imiglucerase) EPAR - Product Information, in: E.M. Agency (Ed.) EMEA/H/C/000157 -IA/0062, 1997.
- [71] Shire-Pharmaceuticals, Vpriv (Velaglucerase). EPAR- Product information, in: E.M. Agency (Ed.), 2010.
- [72] CHMP, Elelyso. Taliglucerase alfa. European Assessment Report in: C.f.M.P.f.H. Use (Ed.) London, 2012.
- [73] GenzymeEurope, Cerezyme (Imiglucerase) EPAR - Product Information, in: E.M. Agency (Ed.) EMEA/H/C/000157 -IA/0062, 1997.
- [74] D. Aviezer, E. Brill-Almon, Y. Shaaltiel, S. Hashmueli, D. Bartfeld, S. Mizrachi, Y. Liberman, A. Freeman, A. Zimran, E. Galun, A plant-derived recombinant human glucocerebrosidase enzyme--a preclinical and phase I investigation, *PLoS One*, 4 (2009) e4792.
- [75] A. Zimran, E. Brill-Almon, R. Chertkoff, M. Petakov, F. Blanco-Favela, E.T. Munoz, S.E. Solorio-Meza, D. Amato, G. Duran, F. Giona, R. Heitner, H. Rosenbaum, P. Giraldo, A. Mehta, G. Park, M. Phillips, D. Elstein, G. Altarescu, M. Szleifer, S. Hashmueli, D. Aviezer, Pivotal trial with plant cell-expressed recombinant glucocerebrosidase, taliglucerase alfa, a novel enzyme replacement therapy for Gaucher disease, *Blood*, 118 (2011) 5767-5773.
- [76] K. Traynor, Taliglucerase alfa approved for Gaucher disease, *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*, 69 (2012) 1009.
- [77] H. Ben Turkia, D.E. Gonzalez, N.W. Barton, A. Zimran, M. Kabra, E.A. Lukina, P. Giraldo, I. Kisinovsky, A. Bavdekar, M.F. Ben Dridi, N. Gupta, P.S. Kishnani, E.K. Sureshkumar, N. Wang, E. Crombez, K. Bhirangi, A. Mehta, Velaglucerase alfa enzyme replacement therapy compared with imiglucerase in patients with Gaucher disease, *Am J Hematol*, 88 (2013) 179-184.
- [78] N.J. Weinreb, J. Goldblatt, J. Villalobos, J. Charrow, J.A. Cole, M. Kerstenetzky, S. vom Dahl, C. Hollak, Long-term clinical outcomes in type 1 Gaucher disease following 10 years of imiglucerase treatment, *J Inher Metab Dis*, 36 (2013) 543-553.
- [79] R. Whittington, K.L. Goa, Alglucerase. A pharmacoeconomic appraisal of its use in the treatment of Gaucher's disease, *Pharmacoeconomics*, 7 (1995) 63-90.
- [80] J.T. Clarke, D. Amato, R.B. Deber, Managing public payment for high-cost, high-benefit treatment: enzyme replacement therapy for Gaucher's disease in Ontario, *CMAJ*, 165 (2001) 595-596.
- [81] G.M. Pastores, N.J. Weinreb, H. Aerts, G. Andria, T.M. Cox, M. Giralto, G.A. Grabowski, P.K. Mistry, A. Tylki-Szymanska, Therapeutic goals in the treatment of Gaucher disease, *Semin Hematol*, 41 (2004) 4-14.
- [82] E. Beutler, Economic malpractice in the treatment of Gaucher's disease, *Am J Med*, 97 (1994) 1-2.
- [83] B.R. Barton NW, Murray GJ, Argoff Ch E, Grewal RP, Kian-Ti Y, et al., Enzyme-replacement therapy for Gaucher's disease, *N Engl J Med*, 325 (1991) 1809-1811.
- [84] E. Beutler, Enzyme replacement in Gaucher disease, *PLoS Med*, 1 (2004) e21.
- [85] E. Beutler, Gaucher's disease, *N Engl J Med*, 325 (1991) 1354-1360.
- [86] P.K. Mistry, E.P. Wraight, T.M. Cox, Therapeutic delivery of proteins to macrophages: implications for treatment of Gaucher's disease, *Lancet*, 348 (1996) 1555-1559.

- [87] M.M. Hollak C, van Weely S, Aerts H, Maaswinkel P, Phoa S, et al. , Enzyme therapy for Gaucher's disease: long-term efficacy of individualized doses in adult patients, in: r.W.o.t.E.W.G.o.G. disease (Ed.)Lemnos, May 20-23, 1999.
- [88] E. Beutler, Modern diagnosis and treatment of Gaucher's disease, American journal of diseases of children, 147 (1993) 1175-1183.
- [89] M. de Fost, J.M. Aerts, J.E. Groener, M. Maas, E.M. Akkerman, M.G. Wiersma, C.E. Hollak, Low frequency maintenance therapy with imiglucerase in adult type I Gaucher disease: a prospective randomized controlled trial, Haematologica, 92 (2007) 215-221.
- [90] P.S. Kishnani, M. DiRocco, P. Kaplan, A. Mehta, G.M. Pastores, S.E. Smith, A.C. Puga, R.M. Lemay, N.J. Weinreb, A randomized trial comparing the efficacy and safety of imiglucerase (Cerezyme) infusions every 4 weeks versus every 2 weeks in the maintenance therapy of adult patients with Gaucher disease type 1, Mol Genet Metab, 96 (2009) 164-170.
- [91] Y.H. Chien, N.C. Lee, F.J. Tsai, M.C. Chao, W.L. Hwu, Reduction in imiglucerase dosage causes immediate rise of chitotriosidase activity in patients with Gaucher disease, Mol Genet Metab, 101 (2010) 90-91.
- [92] C.E. Hollak, S. vom Dahl, J.M. Aerts, N. Belmatoug, B. Bembi, Y. Cohen, T. Collin-Histed, P. Deegan, L. van Dussen, P. Giraldo, E. Mengel, H. Michelakakis, J. Manuel, M. Hrebicek, R. Parini, J. Reinke, M. di Rocco, M. Pocovi, M.C. Sa Miranda, A. Tylki-Szymanska, A. Zimran, T.M. Cox, Force majeure: therapeutic measures in response to restricted supply of imiglucerase (Cerezyme) for patients with Gaucher disease, Blood Cells Mol Dis, 44 (2010) 41-47.
- [93] J. Goldblatt, J.M. Fletcher, J. McGill, J. Szer, M. Wilson, Enzyme replacement therapy "drug holiday": results from an unexpected shortage of an orphan drug supply in Australia, Blood Cells Mol Dis, 46 (2011) 107-110.
- [94] D. Elstein, A. Abrahamov, I. Hadas-Halpern, A. Zimran, Withdrawal of enzyme replacement therapy in Gaucher's disease, Br J Haematol, 110 (2000) 488-492.
- [95] S. vom Dahl, L.W. Poll, D. Haussinger, Clinical monitoring after cessation of enzyme replacement therapy in M. Gaucher, Br J Haematol, 113 (2001) 1084-1087.
- [96] N.J. Weinreb, Interruption in enzyme replacement therapy for Gaucher disease, Br J Haematol, 113 (2001) 1087-1089.
- [97] M. de Fost, C.E. Hollak, J.E. Groener, J.M. Aerts, M. Maas, L.W. Poll, M.G. Wiersma, D. Haussinger, S. Brett, N. Brill, S. vom Dahl, Superior effects of high-dose enzyme replacement therapy in type 1 Gaucher disease on bone marrow involvement and chitotriosidase levels: a 2-center retrospective analysis, Blood, 108 (2006) 830-835.
- [98] M.L. Figueroa, B.E. Rosenbloom, A.C. Kay, P. Garver, D.W. Thurston, J.A. Koziol, T. Gelbart, E. Beutler, A less costly regimen of alglucerase to treat Gaucher's disease, N Engl J Med, 327 (1992) 1632-1636.
- [99] A. Zimran, How I treat Gaucher disease, Blood, 118 (2011) 1463-1471.
- [100] A. Zimran, D. Elstein, E. Beutler, Low-dose therapy trumps high-dose therapy again in the treatment of Gaucher disease, Blood, 108 (2006) 802-803.
- [101] I. Mahmood, M.D. Green, Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in the development of therapeutic proteins, Clin Pharmacokinet, 44 (2005) 331-347.
- [102] E. Beutler, W. Kuhl, The diagnosis of the adult type of Gaucher's disease and its carrier state by demonstration of deficiency of beta-glucosidase activity in peripheral blood leukocytes, J Lab Clin Med, 76 (1970) 747-755.
- [103] S.P. Peters, P. Coyle, R.H. Glew, Differentiation of beta-glucocerebrosidase from beta-glucosidase in human tissues using sodium taurocholate, Arch Biochem Biophys, 175 (1976) 569-582.
- [104] D.A. Wenger, C. Clark, M. Sattler, C. Wharton, Synthetic substrate beta-glucosidase activity in leukocytes: a reproducible method for the identification of patients and carriers of Gaucher's disease, Clin Genet, 13 (1978) 145-153.

- [105] L. Svennerholm, G. Hakansson, S. Dreborg, Assay of the beta-glucosidase activity with natural labelled and artificial substrates in leukocytes from homozygotes and heterozygotes with the Norrbottnian type (Type 3) of Gaucher disease, *Clin Chim Acta*, 106 (1980) 183-193.
- [106] S.S. Raghavan, J. Topol, E.H. Kolodny, Leukocyte beta-glucosidase in homozygotes and heterozygotes for Gaucher disease, *Am J Hum Genet*, 32 (1980) 158-173.
- [107] W.G. Johnson, A.E. Gal, A.F. Miranda, P.G. Pentchev, Diagnosis of adult Gaucher disease: use of a new chromogenic substrate, 2-hexadecanoylamino-4-nitrophenyl-beta-D-glucopyranoside, in cultured skin fibroblasts, *Clin Chim Acta*, 102 (1980) 91-97.
- [108] K. Michelin, A. Wajner, S. Goulart Lda, A.A. Fachel, M.L. Pereira, A.S. de Mello, F.T. Souza, R.F. Pires, R. Giugliani, J.C. Coelho, Biochemical study on beta-glucosidase in individuals with Gaucher's disease and normal subjects, *Clin Chim Acta*, 343 (2004) 145-153.
- [109] N.A. Chamoles, M. Blanco, D. Gaggioli, C. Casentini, Gaucher and Niemann-Pick diseases--enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards, *Clin Chim Acta*, 317 (2002) 191-197.
- [110] P. Olivova, E. Cullen, M. Titlow, H. Kallwass, J. Barranger, K. Zhang, J. Keutzer, An improved high-throughput dried blood spot screening method for Gaucher disease, *Clin Chim Acta*, 398 (2008) 163-164.
- [111] M. Lorincz, L.A. Herzenberg, Z. Diwu, J.A. Barranger, W.G. Kerr, Detection and isolation of gene-corrected cells in Gaucher disease via a fluorescence-activated cell sorter assay for lysosomal glucocerebrosidase activity, *Blood*, 89 (1997) 3412-3420.
- [112] B. Rudensky, E. Paz, G. Altarescu, D. Raveh, D. Elstein, A. Zimran, Fluorescent flow cytometric assay: a new diagnostic tool for measuring beta-glucocerebrosidase activity in Gaucher disease, *Blood Cells Mol Dis*, 30 (2003) 97-99.
- [113] Y. Hayashi, K. Zama, E. Abe, N. Okino, T. Inoue, K. Ohno, M. Ito, A sensitive and reproducible fluorescent-based HPLC assay to measure the activity of acid as well as neutral beta-glucocerebrosidases, *Anal Biochem*, 383 (2008) 122-129.
- [114] A. Zimran, K. Loveday, C. Fratazzi, D. Elstein, A pharmacokinetic analysis of a novel enzyme replacement therapy with Gene-Activated human glucocerebrosidase (GA-GCB) in patients with type 1 Gaucher disease, *Blood Cells Mol Dis*, 39 (2007) 115-118.
- [115] E.G. Colomer, M.A. Gomez, A.G. Alvarez, M.C. Marti, P.L. Moreno, M.F. Zarzoso, N.V. Jimenez-Torres, Development and application to clinical practice of a validated HPLC method for the analysis of beta-glucocerebrosidase in Gaucher disease, *J. Pharm Biomed Anal*, 91 (2014) 123-130.
- [116] L.B. Daniels, R.H. Glew, N.S. Radin, R.R. Vunnam, A revised fluorometric assay for Gaucher's disease using conduritol-beta-epoxide with liver as the source of Beta-glucosidase, *Clin Chim Acta*, 106 (1980) 155-163.
- [117] B. Friedman, C. Vaddi K Fau - Preston, E. Preston C Fau - Mahon, J.R. Mahon E Fau - Cataldo, J.M. Cataldo Jr Fau - McPherson, J.M. McPherson, A comparison of the pharmacological properties of carbohydrate remodeled recombinant and placental-derived beta-glucocerebrosidase: implications for clinical efficacy in treatment of Gaucher disease, *Blood*, (1999).
- [118] M. Pocovi, [Molecular basis of treatment in Gaucher's disease], *Med Clin (Barc)*, 137 Suppl 1 (2011) 32-38.
- [119] L. Tang, A.M. Persky, G. Hochhaus, B. Meibohm, Pharmacokinetic aspects of biotechnology products, *Journal of pharmaceutical sciences*, 93 (2004) 2184-2204.
- [120] D.E. Mager, Target-mediated drug disposition and dynamics, *Biochemical pharmacology*, 72 (2006) 1-10.
- [121] M.A. Martinez-Gomez, R.M. Villanueva-Camanas, S. Sagrado, M.J. Medina-Hernandez, Multivariate optimization approach for chiral resolution of drugs using human serum

albumin in affinity electrokinetic chromatography-partial filling technique, *Electrophoresis*, 26 (2005) 4116-4126.

[122] FDA, Guidance for Industry on Bioanalytical Method Validation. US Department of Health and Human Services, Federal Register, 66 (2001) 28526-28527.

[123] G.A. Grabowski, K. Osiecki-Newman, T. Dinur, D. Fabbro, G. Legler, S. Gatt, R.J. Desnick, Human acid beta-glucosidase. Use of conduritol B epoxide derivatives to investigate the catalytically active normal and Gaucher disease enzymes, *J Biol Chem*, 261 (1986) 8263-8269.

[124] C.E. Hollak, J.M. Aerts, R. Goudsmit, S.S. Phoa, M. Ek, S. van Weely, A.E. von dem Borne, M.H. van Oers, Individualised low-dose alglucerase therapy for type 1 Gaucher's disease, *Lancet*, 345 (1995) 1474-1478.

[125] E. Beutler, Treatment regimens in Gaucher's disease, *Lancet*, 346 (1995) 581-582.

[126] G.J. Murray, F.S. Jin, Immunoelectron microscopic localization of mannose-terminal glucocerebrosidase in lysosomes of rat liver Kupffer cells, *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 43 (1995) 149-158.

[127] Y.H. Xu, Y. Sun, S. Barnes, G.A. Grabowski, Comparative therapeutic effects of velaglucerase alfa and imiglucerase in a Gaucher disease mouse model, *PLoS One*, 5 (2010) e10750.

[128] R. Abbas, G. Park, B. Damle, R. Chertkoff, S. Alon, Pharmacokinetics of Novel Plant Cell-Expressed Taliglucerase Alfa in Adult and Pediatric Patients with Gaucher Disease, *PLoS One*, 10 (2015) e0128986.

[129] J. Berger, J. Stirnemann, C. Bourgne, B. Pereira, P. Pigeon, D. Heraoui, R. Froissart, C. Rapatel, C. Rose, N. Belmatoug, M.G. Berger, The uptake of recombinant glucocerebrosidases by blood monocytes from type 1 Gaucher disease patients is variable, *Br J Haematol*, 157 (2012) 274-277.

[130] M.K. Pandey, G.A. Grabowski, Immunological cells and functions in Gaucher disease, *Crit Rev Oncog*, 18 (2013) 197-220.

[131] J. Blanz, J. Groth, C. Zachos, C. Wehling, P. Saftig, M. Schwake, Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand beta-glucocerebrosidase, *Hum Mol Genet*, 19 (2010) 563-572.

[132] Y. Sato, E. Beutler, Binding, internalization, and degradation of mannose-terminated glucocerebrosidase by macrophages, *J Clin Invest*, 91 (1993) 1909-1917.

[133] B. Brumshtein, P. Salinas, B. Peterson, V. Chan, I. Silman, J.L. Sussman, P.J. Savickas, G.S. Robinson, A.H. Futerman, Characterization of gene-activated human acid-beta-glucosidase: crystal structure, glycan composition, and internalization into macrophages, *Glycobiology*, 20 (2010) 24-32.

[134] Y. Tekoah, S. Tzaban, T. Kizhner, M. Hainrichson, A. Gantman, M. Golembo, D. Aviezer, Y. Shaaltiel, Glycosylation and functionality of recombinant beta-glucocerebrosidase from various production systems, *Bioscience reports*, 33 (2013).

[135] W.W. Kallemeijn, S. Scheij, S. Hoogendoorn, M.D. Witte, D. Herrera Moro Chao, C.P. van Roomen, R. Ottenhoff, H.S. Overkleeft, R.G. Boot, J.M. Aerts, Investigations on therapeutic glucocerebrosidases through paired detection with fluorescent activity-based probes, *PLoS One*, 12 (2017) e0170268.

[136] A. Van Rossum, M. Holsopple, Enzyme Replacement or Substrate Reduction? A Review of Gaucher Disease Treatment Options, *Hospital pharmacy*, 51 (2016) 553-563.

[137] M. Elleder, Glucosylceramide transfer from lysosomes--the missing link in molecular pathology of glucosylceramidase deficiency: a hypothesis based on existing data, *J Inherit Metab Dis*, 29 (2006) 707-715.

[138] L.A. Boven, M. van Meurs, R.G. Boot, A. Mehta, L. Boon, J.M. Aerts, J.D. Laman, Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages, *American journal of clinical pathology*, 122 (2004) 359-369.

- [139] D.G. Burke, A.A. Rahim, S.N. Waddington, S. Karlsson, I. Enquist, K. Bhatia, A. Mehta, A. Vellodi, S. Heales, Increased glucocerebrosidase (GBA) 2 activity in GBA1 deficient mice brains and in Gaucher leucocytes, *J Inherit Metab Dis*, 36 (2013) 869-872.
- [140] S. Schonauer, H.G. Korschen, A. Penno, A. Rennhack, B. Breiden, K. Sandhoff, K. Gutbrod, P. Dormann, D.N. Raju, P. Haberkant, M.J. Gerl, B. Brugger, H. Zigdon, A. Vardi, A.H. Futerman, C. Thiele, D. Wachten, Identification of a feedback loop involving beta-glucosidase 2 and its product sphingosine sheds light on the molecular mechanisms in Gaucher disease, *J Biol Chem*, 292 (2017) 6177-6189.
- [141] K. Harzer, Y. Yildiz, High beta-glucosidase (GBA) activity not attributable to GBA1 and GBA2 in live normal and enzyme-deficient fibroblasts may emphasise the role of additional GBAs, *Biological chemistry*, 396 (2015) 1241-1246.
- [142] K. Harzer, Y. Blech-Hermoni, E. Goldin, U. Felderhoff-Mueser, C. Igney, E. Sidransky, Y. Yildiz, Beta-glucosidase 1 (GBA1) is a second bile acid beta-glucosidase in addition to beta-glucosidase 2 (GBA2). Study in beta-glucosidase deficient mice and humans, *Biochemical and biophysical research communications*, 423 (2012) 308-312.
- [143] M. Aureli, R. Bassi, N. Loberto, S. Regis, A. Prinetti, V. Chigorno, J.M. Aerts, R.G. Boot, M. Filocamo, S. Sonnino, Cell surface associated glycohydrolases in normal and Gaucher disease fibroblasts, *J Inherit Metab Dis*, 35 (2012) 1081-1091.
- [144] L. Diao, B. Meibohm, *Pharmacokinetics and Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Correlations of Therapeutic Peptides*, *Clin Pharmacokinet*, (2013).
- [145] M.K. Bijsterbosch, W. Donker, H. van de Bilt, S. van Weely, T.J. van Berkel, J.M. Aerts, Quantitative analysis of the targeting of mannose-terminal glucocerebrosidase. Predominant uptake by liver endothelial cells, *Eur J Biochem*, 237 (1996) 344-349.
- [146] W.C. Aird, Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms, *Circulation research*, 100 (2007) 158-173.
- [147] S.M. Van Patten, H. Hughes, M.R. Huff, P.A. Piepenhagen, J. Waire, H. Qiu, C. Ganesa, D. Reczek, P.V. Ward, J.P. Kutzko, T. Edmunds, Effect of mannose chain length on targeting of glucocerebrosidase for enzyme replacement therapy of Gaucher disease, *Glycobiology*, 17 (2007) 467-478.

CAPÍTULO I.

Development and application to clinical practice of a validated HPLC method for the analysis of β -glucocerebrosidase in Gaucher disease.

E. Gras Colomer, M.A. Martínez Gómez A. González Álvarez, M. Climente Martí, P. León Moreno, M. Fernández Zarzoso, N.V. Jiménez-Torres

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 91 (2014) 123–130

ABSTRACT

The main objective of our study is to develop a simple, fast and reliable method for measuring β -glucocerebrosidase activity in Gaucher patients leukocytes in clinical practice. This measurement may be a useful marker to drive dose selection and early clinical decision making of enzyme replacement therapy. We measure the enzyme activity by High-Performance Liquid Chromatography with ultraviolet detection and 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside as substrate.

A cohort of eight Gaucher patients treated with enzyme replacement therapy and ten healthy controls were tested; median enzyme activity values was 20.57 mU/ml (interquartile range 19.92 to 21.53 mU/ml) in patients and mean was 24.73 mU/ml (24.12 to 25.34 mU/ml) in the reference group, which allowed the establishment of the normal range of β -glucocerebrosidase activity.

The proposed method for leukocytes glucocerebrosidase activity measuring is fast, easy to use, inexpensive and reliable. Furthermore, significant differences between both populations were observed ($p = 0.008$). This suggests that discerning between patients and healthy individuals and providing an approach to enzyme dosage optimization is feasible. This method could be considered as a decision support tool for clinical monitoring.

Our study is a first approach to in depth analysis of enzyme replacement therapy and optimization of dosing therapies.

Keywords: Gaucher disease, HPLC, β -glucocerebrosidase, enzyme activity, imiglucerase.

Abbreviations: GD, Gaucher disease; GBA, β -glucocerebrosidase; GlcCer, glucocerebroside; FACS, fluorescence-activated cell sorter; PNP-Glc, 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside; PNP, p-nitrophenol; ERT, enzyme replacement therapy; IMG, Imiglucerase; EMA, European Medicines Agency; HPLC-UV, High Performance Liquid Chromatography with ultraviolet detection; Tris, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; ACN, acetonitrile; U, unit; MLR, Multiple linear regression; FDA, Food drugs and administration;

1. INTRODUCTION

Gaucher disease (GD) is an autosomal recessive, lysosomal storage disease caused by deficiency of acid β -glucocerebrosidase (GBA) which results in secondary accumulation of glucocerebroside within the macrophage lysosomes. This storage disease produces a multisystem disorder involving the liver, spleen, bone marrow, skeleton, lungs and occasionally the central nervous system. Three major clinical subtypes have been described: type I GD is the chronic nonneuropathic form which is the common clinical variant; type II is the infantile neuropathic form; and type III is the juvenile neuropathic form. [1].

Recently, two non-lysosomal neutral GBA have been identified: GBA2 [2, 3], known as a bile acid β -glucocerebrosidase and GBA3 [4] known as a klotho-related protein (KLRP). Physiological roles of the two enzymes remain to be elucidated.

Nowadays, GBA activity measurement is used for diagnosis of GD, showing tissue glucocerebrosidase deficiency, especially in leukocytes and fibroblasts [5]. Using a physiologic glycolipid substrate, glucocerebroside, radiolabeled in either glucose or the long-chain fatty acid moiety, makes the method to determine β -glucocerebrosidase (GBA) activity time-consuming, expensive and not readily applicable to usual clinical laboratory setting.

Beutler and Kuhl [6] were the first ones to demonstrate the usefulness of the fluorogenic, nonphysiologic substrate 4-methylumbelliferyl- β -D-glucopyranoside for the diagnosis of GD and carrier identification, using leukocytes as a source of glucocerebroside (GlcCer). Lorincz M et al.[7] developed a quantitative fluorescence-activated cell sorter (FACS) assay for the determination of relative GBA activity in monocytes by using CD14. The assay is easy to use, sufficiently sensitive to distinguish GBA activity found in gaucher patient monocytes from that in normal controls and shows excellent correlation with the standard method [6], but a FACS 's disposal is needed.

In an other study [8] an HPLC-based assay using fluorescent GlcCer analogs [glucosylceramide, (4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole)-GlcCer (C6-NBD-GlcCer) and (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene)-labeled GlcCer (C12-BODIPY-GlcCer)]

has been developed to detect GBA activity in human fibroblasts. This method for GBA activity determination is fast, reliable and specific and it clearly showed a decrease of GBA activity in GD patient fibroblasts and serum compared with healthy individuals, suggesting that the method is applicable for the GD diagnosis.

Recently, 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNP-Glc) has been proposed as synthetic substrate for GBA activity monitoring in GD type I human serum with a spectrophotometric analytical assay performed at Shire Human Genetic Therapies, Inc (Cambridge, MA)[9]; this assay releases p-nitrophenol (PNP), which has a characteristic absorbance at 315nm.

Additionally, macrophage-targeted enzyme replacement therapy (ERT)[10] ameliorates anaemia and thrombocytopenia, decreases organomegaly and may improve or prevent the progression of bone disease [11-13]. Two different recombinant β -glucocerebrosidase preparations are in use for treatment: Imiglucerase (IMG) (Cerezyme®, Genzyme Corporation, Cambridge, MA) is a recombinant infusible enzyme produced in chinese hamster ovary cells, approved by Food and Drug Administration (FDA) at 1994 [14]; Velaglucerase alfa is an investigational human enzyme produced in a human cell line using proprietary Gene Activation technology (Shire Human Genetic Therapies Inc, approval in February 2010)[15]. The initial recommended dose is 60U/kg body weight every two weeks. Nowadays, professional association guidelines, based on clinical experience, recommend to chose the initial dose based exclusively on the patient clinical situation [16]: bone or lung disease, 60 U/kg/ every other week; visceromegalies or anemia and/or thrombocytopenia only, 30-60 U/Kg/ every other week . It is not recommended to decrease dosing regimens below 15 U/kg/ every other week.

Therefore, dose selection and clinical decision making are based on clinical parameters and markers monitoring without clear evidence of the disease control grade. Accordingly, searching for new markers to help us in dose adjustment is an ongoing challenge for clinicians.

In an article about pharmacokinetic analysis of ERT based on serum levels [9], it was demonstrated that the maximum serum concentration and the area under the

curve were linearly proportional to dose, there was a proportionality between dose and enzyme activity in serum and there was individual variation between patients. The decision regarding the appropriateness of therapeutic drug monitoring is based on these considerations; therefore GBA activity in patients treated with ERT seems to be a good candidate for clinical pharmacokinetic monitoring. In that case GBA activity could be employed for ERT dose adjustment.

The objective of the current study is to develop a simple, fast and reliable method for estimation of GBA activity based on high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detection and PNP-Glc as substrate. We present the results of an HPLC-UV assessment of residual GBA activity in a cohort of patients with GD type I treated with ERT and healthy controls (reference group), to demonstrate that this method is an useful tool for therapeutic drug monitoring in clinical practice.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study

It is a prospective and observational study with paired groups carried out during two years (from January 2009 to December 2010).

The study was divided into two phases:

- *Phase I (research study)*: development and validation of the analytical method for measuring GBA activity in leukocytes by HPLC-UV.
- *Phase II (clinical study)*: establishment of the normal range of GBA activity in leukocytes of the reference group and monitoring the GBA of patients with GD type I before starting the infusion of IMG.

2.2 Patients and reference group

Healthy volunteers (reference group) without a known genetic or chronic disease were selected for the study in order to know the normal scope of GBA activity. They did not receive any medication during the time of the study.

Patients (test group) at least 18 years of age with confirmed diagnosis of Gaucher disease based on clinical and biochemical criteria (documented deficient of GBA by

enzyme assay) were eligible for this study if they met imiglucerase therapy with stable dose and interval at least 6 months prior to enrollment.

Research protocols and consent forms as well as the overall investigation were ethically and scientifically approved by the Medical research and Ethical Committee of Doctor Peset University Hospital (Code CEIC 50/10). All the members of reference and tested groups were previously informed about the study and consented to participate in it.

2.3.ERT with IMG

IMG (Cerezyme®) was supplied as a lyophilized product and shipped at 2°C to 8°C. The product was reconstituted with preservative-free sterile water for injection and slowly mixed with NaCl 0.9% to a final volume of 250 mL. The final solution of IMG was intravenously administered across a 0,2µm filter for 60 minutes.

Patients included in the study received a perfusion of IMG (Cerezyme®) with a stable dose of 20–60 U/kg every other week or every four weeks, for at least 6 month.

2.4. Reagents

4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (PNP-Glc), 4-nitrophenol (PNP), Conduritol-β-epoxide (CBE) and 0,5M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt solution were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). PBS buffer was purchased from Beckman Coulter (France). Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Tris) and sodium chloride (NaCl) were purchased from Scharlab (Barcelona, Spain). NaCl 0.9% was purchased from Baxter (Barcelona, Spain). Potassium dihydrogen phosphate was obtained from Merck (Germany); acetonitrile (ACN) and methanol were obtained from Carlo Erba Reagenti (Milan, Italy); orthophosphoric acid was obtained from Fluka (St. Louis, USA). Water for injection was purchased from Grifols (Barcelona, Spain). Sodium taurocholate (TAU) was purchased from VWR International Eurolab S.L. (Barcelona, Spain).

2.5. Human blood and leukocytes fraction from GD patients and reference group

An aliquot of 5 ml of blood was extracted in an EDTA tube for each member of the reference group and each patient with GD type I (before the beginning of IMG perfusion). In case of not processing blood samples immediately, blood in EDTA tube was preserved at room temperature maximum 48 h.

To obtain leukocytes, each blood sample was homogenized and centrifugated 10 min at 3500 rpm. Plasma was removed and the rest was centrifugated again. After that, liquid fraction was removed; PBS was added to the rest. Once the solution was mixed, liquid fraction was removed again; this cleaning step was done three times to finally obtain the pellet (layer containing leukocytes). This layer was stable at 4°C for 72 h. To analyze this fraction, 100 µl of leukocytes fraction were lysed by sonication, just before the analysis, with 500 µl of a solution composed of NaCl (0.4 M), Tris (0.1M) and EDTA (pH 8.2; 0.002 M) in water for injection.

2.6. HPLC-based assay using PNP-Glc as substrate

The analytical assay to measure GBA activity consisted of an acid hydrolysis reaction between enzyme and PNP-Glc. The product of the reaction is PNP, which has a characteristic absorbance at 315nm. One unit (U) of enzyme is the quantity of enzyme required to produce 1 µmol of PNP/min.

To carry out this reaction, 50 µl of lysed leukocytes fraction was added to 450 µl of PNP-Glc (100 mM) solution prepared in phosphate buffer (50 mM) at a specific pH value; mixture was homogenized and incubated at a specific temperature and for a defined time. The reaction was stopped by adding 100 µl of orthophosphoric acid solution (0.01M) and 400 µl of ACN. After vortexing for a few seconds, the reaction mixture was centrifuged. Supernatant was transferred to an amber glass vial in the autosampler of an HPLC (Agilent technologies, Madrid, Spain). An aliquot of sample (10 µl) was automatically loaded onto a reverse-phase column (Zorbax SB-C3 4.6x150 mm, 5 µm, Agilent technologies) and eluted with ACN/ orthophosphoric acid (0.01M) (from 20:80, v/v to 45:55 v/v in 7.5 min) at a flow rate of 1.5 ml/min; temperature of analysis was 35°C and wavelength was 315 nm.

The peak area of PNP was measured in each chromatogram. To correlate peak area with PNP concentration, calibration graphs (peak area vs. µmol of PNP) were

obtained by using working solutions of PNP containing different concentrations (between 0.0005 to 0.01 μmol) prepared by dilution of a stock standard solution of PNP (0.5 μmol) in methanol with phosphate buffer (50 mM).

2.7. Experimental design to optimize experimental conditions of enzymatic reaction

In order to select experimental conditions for enzymatic reaction assay where GBA activity was larger, a multivariate optimization procedure was used[17]. This procedure included the use of a Box–Behnken design for the three experimental variables (factors) more important in enzymatic reactions: buffer pH, incubation time (t) and temperature (T). For each factor a range was selected to study the effect on GBA activity: pH, 4.5-7.4; t, 5-60 min; T, 10-75°C. Fifteen experiments (reactions) were carried out at different values of the three factors, except 3 reactions that were done at similar conditions; GBA activity was the response variable. Experiments were randomized in order to provide protection against the nuisance factor effects (those that may affect the measured result, but are not of primary interest). In these conditions, the degrees of freedom for errors were 5. The three main factors were extended to the cross-products and square terms, totalling to nine effects to be tested for significance.

2.8. Protein determination

To examine the amount of protein for this assay, leukocytes from healthy volunteers were used as a GBA source. A method based on the spectrometric measurement of the turbidity produced in the reaction between proteins and benzethonium chloride, was used to determine the amount of protein in leukocyte fractions. It has been carried out in the automatic analyzer Architect c-System (Abbott Laboratories).

2.9. Specificity of GBA in HPLC-based assay

We test the enzymatic activity of GBA including sodium taurocholate as detergent (0.6%) to examine the contribution of the detergent to HPLC-based assay.

Leukocyte fractions were divided into 2 aliquots and TAU was added to one of them.

In the same way, we analyse the specificity of this assay by using conduritol-B-epoxide as a possible GBA1 inhibitor. Leucocytes were divided 1:3 every 3 days with fresh CBE added to a final concentration of 5mM and 10mM.

2.10. Statistical analysis

The standardized Pareto chart was carried out to study the significance of the main factors, as well as the corresponding cross-terms and squared effects of the Box-Behnken design. Multiple linear regression (MLR) was done to find the optimum experimental conditions for the enzymatic reaction.

The clinical study was designed essentially to compare two independent groups, reference and patients. Normal range of GBA activity was defined as mean and confidence interval of 95% of GBA activity values measured in reference group. The Shapiro-Wilks test was used to assess the non-normality of a data set. Comparison of medians was carried out with the non-parametric test of Mann-Whitney U. Significance was defined as $p < 0.05$ and it was used to assess equivalence.

3. THEORY

Last forty years enormous advances have been made in the development of sensitive and specific methods for the determination of drug and drug metabolite concentration in biologic fluids; in the mathematical description of the changes of these concentrations as a function of time after drug administration. As well, in the use of mathematical formulations and computers to predict the concentration-time profiles of drugs during chronic drug administration from information obtained in single dose studies.[18] Several studies reported that clinical pharmacokinetics significantly improved patient outcome and were cost-saving. The author's opinion is that therapeutic drug monitoring, in the near future, will be mainly dedicated to drugs used to treat life-threatening diseases, such as anti-HIV, anticancer and

immunosuppressive drugs, and maybe also biotechnological peptides or proteins, because of cost considerations[19].

Focusing on ERT, after its administration, enzyme rapidly distributed throughout the body by macrophages or monocytes, therefore measurement of GBA activity in these cells could explain the behaviour of the enzyme in the organism (probably more than in serum): exogenous enzyme is internalized by macrophages and then it is distributed throughout the body by means of macrophages to others tissues. It is currently thought that most of the enzyme is directly taken up by Gaucher cells in spleen, liver and bone marrow, but we have observed that there is a residual enzyme activity in peripheral monocytes, so it can indicate that there is a distribution equilibrium of the enzyme between serum and macrophages or that there are some macrophages that do not leave blood, consequently this activity could be a reflection of GBA quantity in targets organs.

4. RESULTS

4.1. Analytical features

The linearity, intra- and inter-day precision and accuracy of the proposed HPLC method to measure PNP was evaluated. Calibration graphs were obtained by triplicate injections of working solutions of PNP. Peak area was used as dependent variable. Calibration curves showed adequate regression coefficients ($R > 0.999$); the slope values but not the intercept values were statistically significant at 95% confidence level.

Intra- and inter-day precision, expressed as the relative standard deviation, were evaluated at three concentration levels of PNP. The intra-day precision was evaluated by injecting three times each independent working solution of PNP while the inter-day precision was evaluated by injecting each solution three times for 5 days. In both cases, relative standard deviation was lower or equal to 5%. The limit of detection and quantification, calculated according to the 3 s and 10 s criterion (being s, the residual standard deviation), were 0.5 and 1.3 mU/ml, respectively. Recovery, evaluated by spiking leukocytes fraction with PNP solution, was 100%.

Selectivity was adequate since there were not endogenous compounds eluted at the same time than PNP in leukocytes fraction.

So, since all the criteria were acceptable according to Bioanalytical Methods Validation for Human Studies of FDA [20], the proposed method is adequate to determine PNP. Figure 1 shows the HPLC profile and retention time of PNP.

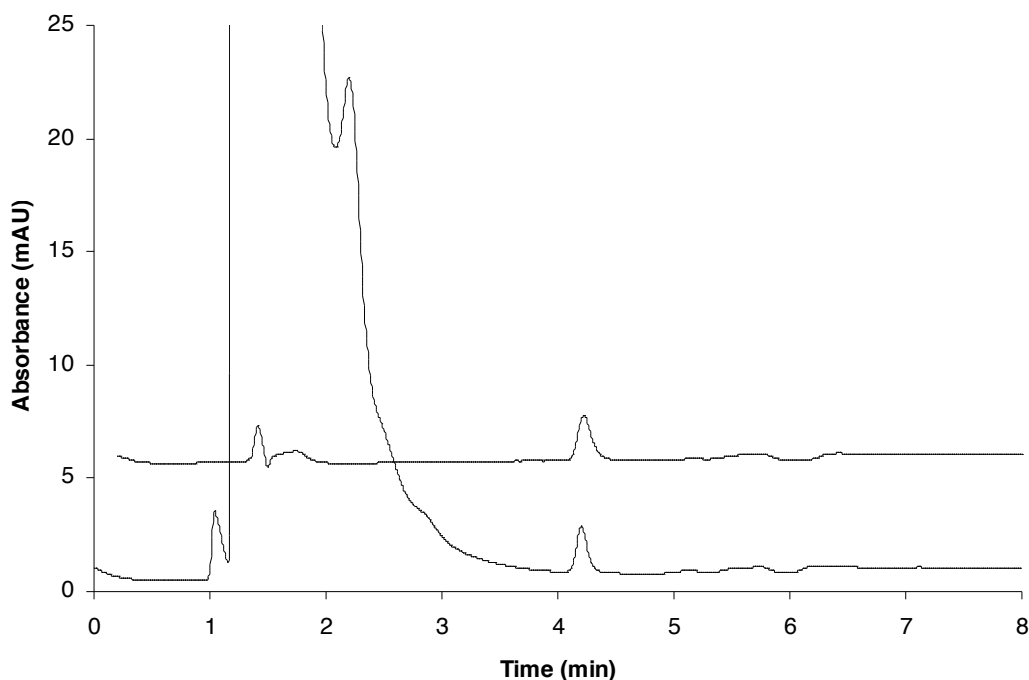


Figure 1.- Chromatograms obtained for: Standard solution of PNP (---) and lysed leukocytes fraction incubated with substrate (—) at 10°C for 6 min. PNP was separated on a reverse-phase column (Zorbax SB-C3 4.6x150 mm, 5 μ m, Agilent technologies) and eluted with ACN/orthophosphoric acid (0.01M) (from 20:80, v/v to 45:55 v/v in 7.5 min) at a flow rate of 1.5 ml/min; temperature of analysis was 35°C and wavelength was 315 nm.

4.2. Optimization of experimental conditions for enzymatic reaction

Figure 2 summarizes the main optimization results obtained. Fig. 2A shows the experimental design used and GBA values obtained from each experiment. Experiments 3, 9 and 10 were replicates (center-point condition); as it can be seen adequate repeatability in GBA values was obtained (relative standard deviation, 3.8%).

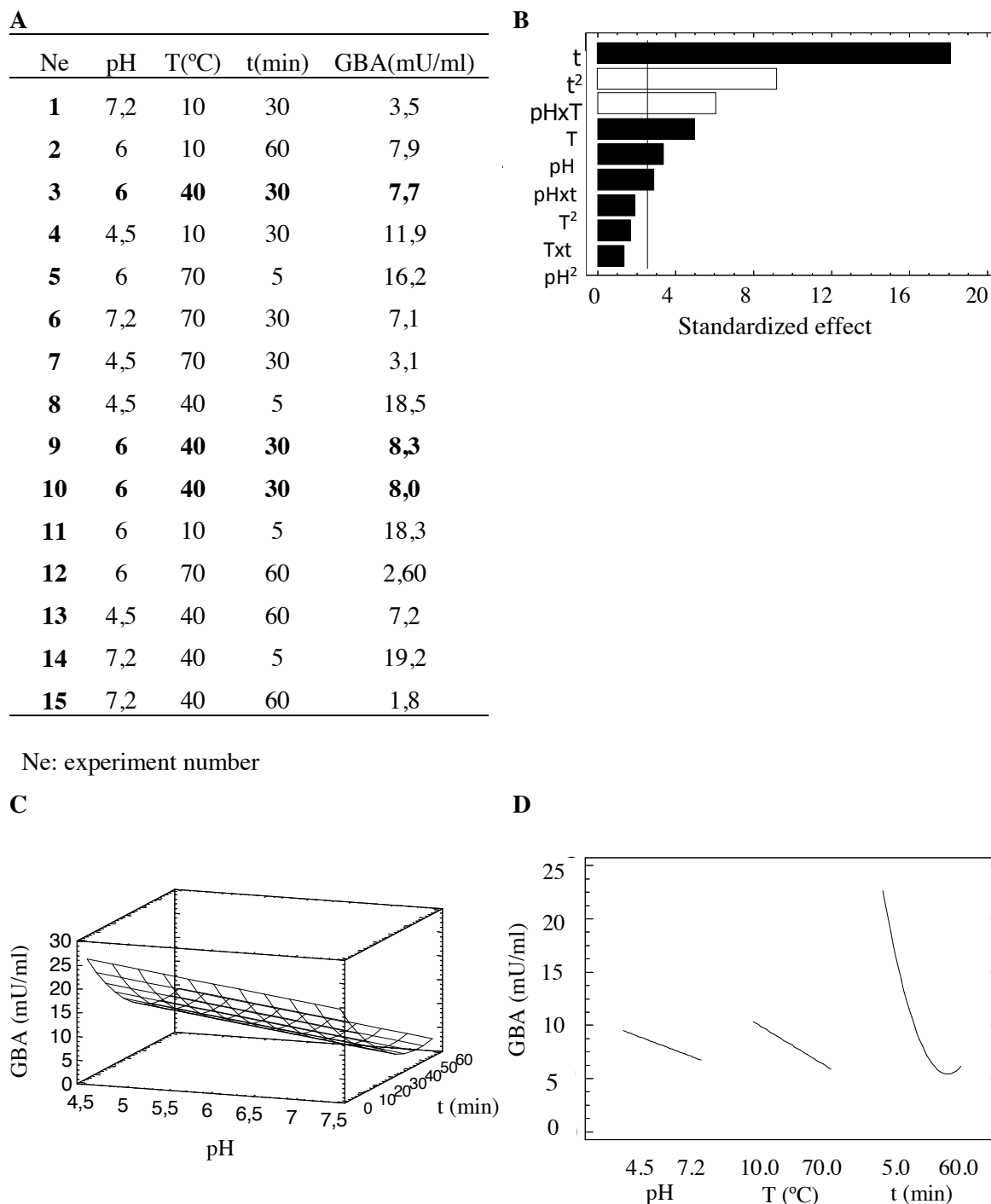


Figure 2.- Main optimization results obtained from the analysis of experiments carried out by considering the three most significant factors in enzymatic reactions (pH, temperature and incubation time) by using the Box-Behnken design: (A) Randomized experimental design and activity values obtained; (B) Standardized Pareto Charts for GBA activity values: black and white bars refer to negatively and positively effects to GBA values, respectively; (C) GBA activity response surface obtained for a T constant value of 10°C; (D) Effect of each factor (pH, temperature and incubation time) on GBA activity value.

The standardized Pareto chart (Fig. 2B) shows each of the estimated effects in decreasing order of magnitude, and the length of each bar is proportional to the standardized effect. The standardized effect is the estimated effect divided by its standard error, which is equivalent to computing a t-statistic for each effect. A vertical line on this plot indicates the significant effects (bars that extend beyond the line correspond to effects that are statistically significant at the 95% confidence level). As it can be seen in Figure 2B, the most significant effects for GBA activity was time (t and t²), pH×T and T.

After eliminating the less important effects according to Pareto analysis, MLR was used to: (i) find the optimal conditions for the enzymatic reaction; (ii) estimate GBA activity values in the selected experimental conditions; (iii) reveal the main trends (i.e., slope, curvature etc.) in the GBA activity -factor relationship.

The MLR model was statistically significant and explained 96% of GBA activity variance in cross-validation. Figure 2C shows the resolution response surface obtained for a T constant value of 10°C. As it can be observed (Figure 2C, 2D) GBA activity increased as the main factors pH, t and T decreased. Therefore, the optimum experimental conditions corresponded to the low-level values of the variables assayed: pH, 4.5; T: 10°C; t: 6 min.

4.3. Protein determination

Figure 3 shows the effect of leukocyte fraction protein amount on GBA activity. At the optimum experimental conditions obtained from the Box–Behnken design, a linear relationship ($r^2 = 0,951$) between the amount of leucocytes and the generation of PNP was observed from 0.50 µg to 25 µg of total protein in lysed leukocytes. Furthermore, a specific amount of protein is needed to perform the enzymatic reaction, therefore, there is no reaction below 0.5 mcg of protein. Consequently, to improve the specificity of the proposed method, protein amount selected was closed to 10 µg, which, in our experience, corresponds to 50 µl of leukocyte fraction in healthy donors.

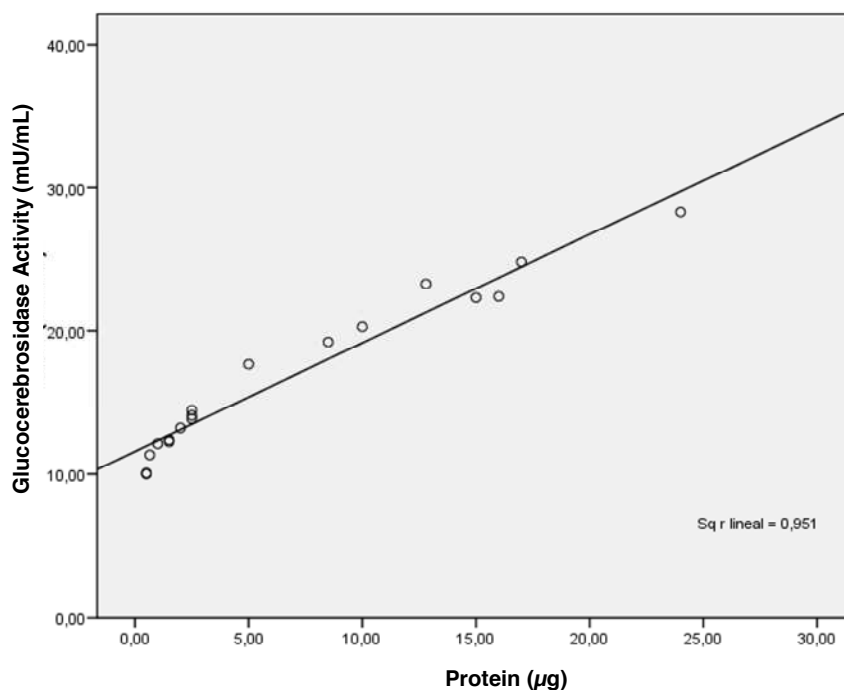


Figure 3.- Influence of total protein amount contained in leukocyte fraction in GBA activities. Experiments were carried out by incubating different protein amount with substrate at 10°C for 6 minutes and analysing them by HPLC-based assay. Proteins were previously determined by turbidimetry with benzethonium chloride.

4.4. Specificity of GBA in HPLC-based assay

The effect of TAU on leukocyte GBA activity was determined for the purpose of determining whether to include or not this reactive in the assay proposed. We tested four samples from healthy volunteers with and without TAU. TAU increased the enzyme activity in the four samples by 40.54 % (23.11 to 32.49 mU/mL); 30.05% (24.14 to 32.57 mU/mL), 31.09% (24.58 to 32.23 mU/mL) and 92.57% (23.56 to 45.38 mU/mL), respectively.

Regarding CBE effect on GBA activity, using 5mM of CBE: no inhibition was seen at 3 hours, enzyme activity decreased by 2% at 24 hours and total inhibition was seen at 48 hours. Using 10mM of CBE, enzyme activity decreased by 54% at 3 hours and 100% at 24hours.

4.5. Determination of GBA activity in Gaucher patients and reference group

The clinical and biological findings of patients are summarized in Table 1 and ERT characteristics in Table 2. Forty-one basal activity determinations in leukocytes from eight Gaucher patients and a determination for each ten healthy individual were done.

Table 1.- Patient baseline characteristics

Pat	Type (GD)	Gender	Age at diagnosis (years)	Hepatomegaly	Splenomegaly	Bone inv.	Hb	Plat	ChT
1	1	M	43	None	Moderate	+	14.0	84	1577
2	1	M	26	None	Splenectomized	+	15.2	184	1840
3	1	F	38	None	None	-	12.9	224	107
4	1	F	27	None	Splenectomized	+	12.5	274	127
5	1	M	48	None	Moderate	+	14.5	57	847
6	1	M	14	Moderate	Splenectomized	+	13.1	265	634
7	1	M	6	None	None	+	15.0	155	137
8	1	F	13	None	None	+	13.2	272	153

GD: Gaucher Disease; M: male; F: female; inv.:involvement; Hepatomegaly is defined as a liver mass greater than 1.25 times measured by Magnetic resonance imaging: moderate ≤ 1.25 , mild 1.25-2.5 and severe >2.5 ; Splenomegaly is defined as a splenic mass greater than 5 times measured by Magnetic resonance imaging: moderate >5 , mild 5-15 and severe >15 ; Hb: Hemoglobine (g/L); Plat: platelet count ($10^9/L$); ChT: chitotriosidase activity (mmol/ml/h).

Table 2.- Enzyme replacement therapy characteristics

Patient	Weight (kg)	Dose (U)	Dose/kg (U/kg)	Posologic range	U/Kg/30 days
1	69	2800	40.58	15	81.16
2	80	2800	35.00	15	70.00
3	45	800	17.78	30	17.78
4	80	800	10.00	30	10.00
5	75	800	10.67	15	21.34
6	100	3200	32.00	15	64.00
7	80	2400	30.00	30	30.00
8	47	800	17.02	30	17.02

For **test group**, median GBA activity value was 20.57 mU/ml; interquartile range (IQR) was 19.92 to 21.53 mU/ml; variation coefficient (VC) was 18.30 %. Mean values of GBA activity for each patient are specified in table 3.

Table 3.- Determination of GBA activity in test group.

Patient	n	Median (IQR)
1	6	21.60 (1.16)
2	7	31.16 (3.20)
3	5	19.89 (0.78)
4	1	21.30 (-)
5	5	20.40 (3.06)
6	10	20.75 (1.70)
7	4	20.01 (0.83)
8	3	18.28 (0.00)
Median 20.57 ; IQR 19.92 to 21.53		

GBA activity (mU/mL); n: number of determinations; IQR

For **reference** group, mean GBA activity value was 24.73 mU/ml; CI 95% was between 24.12 to 25.34 mU/ml; VC was 3.43 %. Value of GBA activity for each healthy control is specified in table 4.

Table 4.- Determination of GBA in reference group.

Control	GBA activity
1	24.00
2	25.30
3	25.10
4	25.00
5	25.00
6	24.80
7	22.80
8	24.21
9	25.30
10	25.80
Mean	24.73 (CI 95%, 24.12 to 25.34)

GBA activity (mU/mL); CI 95%: Confidence interval at 95%

Figure 4 shows graphically the results of the GBA activity assay, through a box plot, between test and reference groups. The value of basal activity in leukocytes showed significant differences between the two populations ($p = 0.008$).

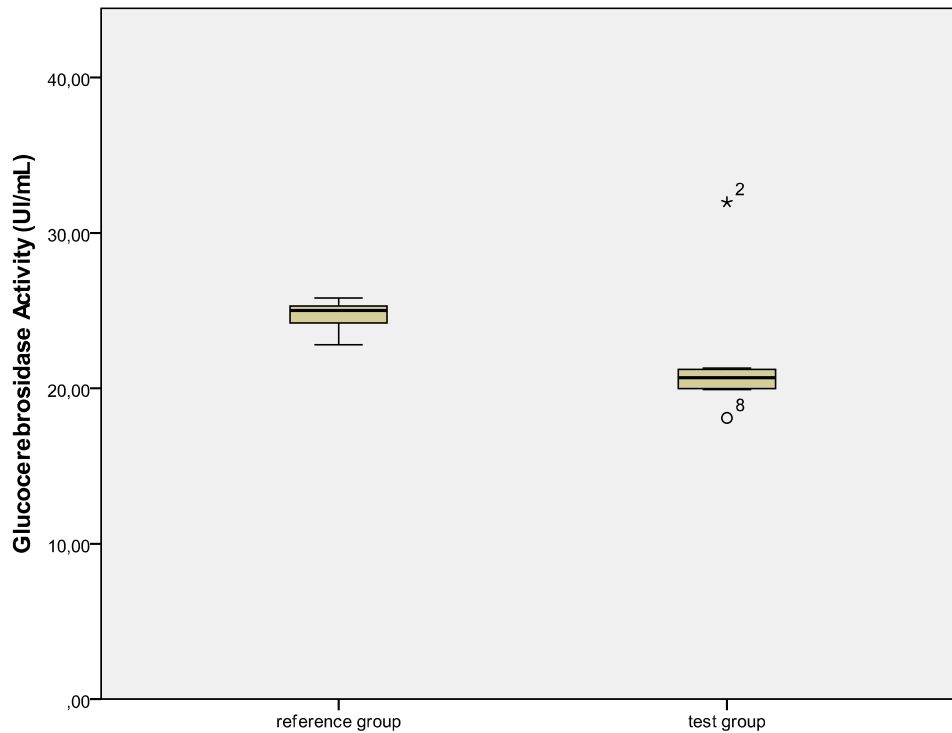


Figure 4.- Median GBA activity assay by box plot between test group (n=8; 41 determinations) and reference group (n=10; 10 determinations). The number indicates patient reference.

If we focus on the relationship between GBA activity mean by patient and ERT dose per month adjusted by patient weight (figure 5), we can see a large variability between patients.

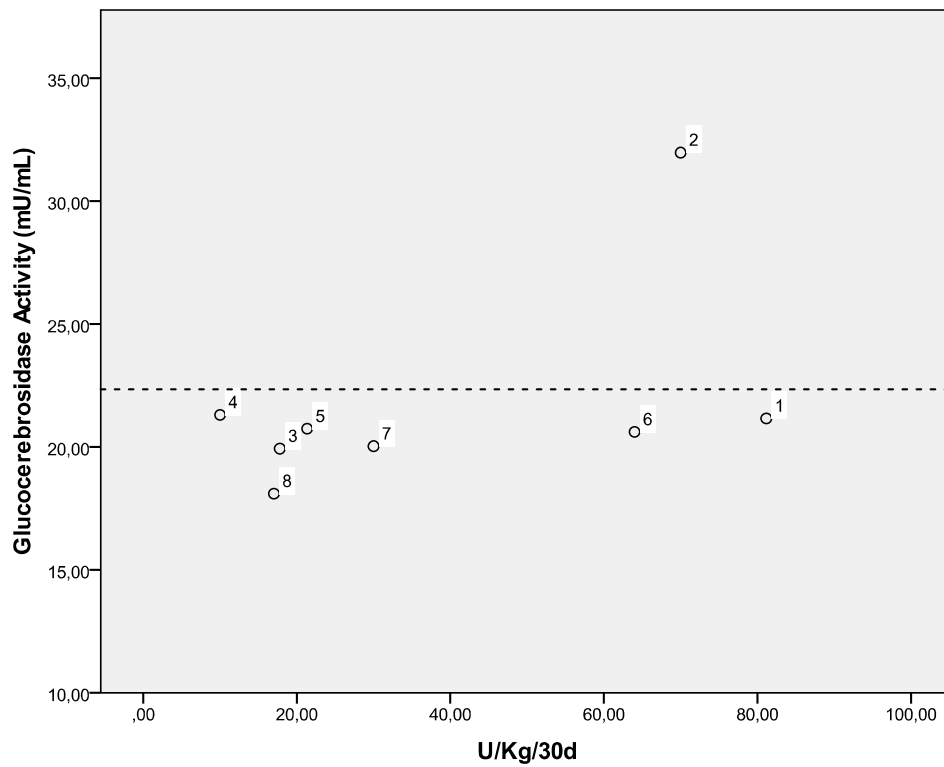


Figure 5- The relationship between medians GBA activity and doses administrated per month from 8 patients with Type I gaucher disease. Horizontal line indicates mean GBA activity in reference group.

5. DISCUSSION

The main goal of this study was to develop a method for measuring GBA activity in leukocytes of Gaucher patients in clinical practice in order to get individualized regimen of ERT.

The first step of this study was to develop the “in vitro” enzymatic reaction to measure GBA activity which we could use in hospital practice. Focused on the enzymatic reaction proposed by Zimran et al.[9] between β -glucocerebrosidase and 4-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, we developed an analytical assay that consisted of substrate incubation with leukocytes and analysis of the enzymatic product PNP by HPLC-UV-Vis. Firstly, the chromatographic method was developed and validated according to FDA[20]. Secondly, we investigated which were the experimental conditions that give us larger GBA activity; the adequate experimental conditions for the enzymatic reaction were determined by multivariate optimization of the most important variables in this type of reactions, pH, time and temperature of reaction by using a Box–Behnken design of 15 experiments. Box-Behnken design is one of the common designs used for response surface methodology and allows the development of a mathematical correlation between variables to obtain maximum response value (in this case, GBA activity value).

The experimental process was simplified with this type of optimization since less numbers of experiments were done compared with the ones required with univariate optimization; furthermore, there were not erroneous results since interactions between variables were taken into account. As can be seen in figure 2, the values of the variables at which maximum activity was achieved, correspond to the minimum values assayed, so it may be possible to decrease the lower limit of the experimental conditions, obtained higher GBA activity values.

On the first hand, in the optimized experimental conditions (pH, 4.5; T: 10°C; t: 6 min) at which enzymatic reactions were carried out (results obtained from Box-Behnken design), GBA activity mean value was 22.31 mU/mL and quantity of PNP, 0.00039 μ mol. On the second hand, an additional experiment (out of Box-Behnken

design) was carried out at conditions previously reported (pH, 4.5; T: 37°C t: 60 min), and GBA activity was 4.09 mU/mL and quantity of PNP, 0.00071 μ mol. A slight increase in the PNP formed amount was observed in the additional experiment. However, this increase is not proportional to reaction time. Since one unit (U) of enzyme is the quantity of enzyme required to produce 1 μ mol of PNP per min, GBA decreases with increasing time. So, there are two effects to take into account in this experiment: T and t.

Regarding incubation time, in experiment 8 and 13 of Box-Behnken design (pH, 4.5; T: 40°C; t: 6 min vs. pH, 4.5; T: 40°C; t: 60 min), we can see how GBA activity decreases with time (GBA activity was 18.5 mU/mL and quantity of PNP 0.00069 μ mol at 6 min and 7.2 mU/mL and quantity of PNP 0.00027 μ mol at 60 min). This (effect) could be explained by considering PNP oxidation in time.

Regarding incubation temperature, an additional experiment (out of Box-Behnken design) was carried out at pH, 4.5; T: 37°C t: 6 min. GBA activity obtained was 17.90 mU/mL compared with 22.31 mU/mL obtained at the optimized conditions (pH, 4.5; T: 10°C; t: 6 min). Therefore, incubation time seems to be more important than temperature in enzymatic reactions.

The method is simple and fast but could not exclude the contamination of other beta-glucosidases capable of degrading the artificial substrate but not others glucosidases, as GBA2 and GBA3. In this way, CBE has been reported to be a selective inhibitor of GBA1 activity and it has been used with the objective of distinguishing between GBA1 and GBA2, on the basis of the hypothesis that effects of CBE on GBA1 and GBA2 are mutually exclusive[3, 21, 22]. However, some researches [23, 24] have demonstrated that CBE inhibits both GBA1 as GBA2, although CBE inactivates GBA2 less efficiently than GBA1. We support this theory with our results in the CBE assay described, because we found that there was a total inhibition in a time-dependent fashion. In this sense, we find the use of CBE an unwise choice as an option in order to avoid the GBA1 inhibition.

TAU inhibits a non-specific glucosidases which cannot hydrolyze glucocerebrosidase and besides stimulate GBA1 activity, which is deficient in individuals with GD. We found in our experiments with healthy volunteers, an

increase of enzyme activity from 30 to 93% with respect to the non-TAU enzyme activity. On the one hand, enzyme activity in non-TAU samples is very similar (median 23.85 mU/mL; SD 0.64; CI 95% 22.83 to 24.88). On the other hand, TAU-samples produce an increased that is not proportional when comparing both groups (median 35.21 mU/mL; SD 6.56; CI 95% 25.25 to 45.97). Therefore, adding TAU to the HPLC-based assay complicates establishing a normal range of enzyme activity in clinical practice.

Some authors [5, 8, 25] use a biochemical test for GBA activity measurement that includes an analytical assay to measure sample's protein, in order to standardise GBA activity by proteins. However, we have not deemed necessary to utilize it in our assay. Nevertheless, we have examined the property protein amount for this assay, showing a linear relationship between protein amount and PNP generation as others substrates [8].

GBA assay has already been established by earlier papers, using a microplate reader. However HPLC-based assay with UV detector shows an important advantage, such as specificity, since it allows us to measure the exact PNP formed absorbance without interferences.

The second step was to measure GBA activity in leukocytes of Gaucher patients and healthy controls. The reference group had very similar GBA activity values as VC confirms, and presented a very narrow CI 95%. It shows a lower variability of amount of enzyme in healthy individuals. By contrast, patients with GD (test group) treated with exogenous enzyme, have greater heterogeneity in the GBA activity than healthy individuals (VC, 18.30 % vs 3.43 %). This higher variability in quantity enzyme activity in Gaucher patients points out that leukocyte activity levels is a reflection of amount of enzyme in the body.

Furthermore, different GBA activity between healthy individuals and Gaucher patients ($p=0.008$) suggests that the developed method is able to discern between them. If we set a CI 95% in reference group, we could establish a normal range of GBA activity (24.12 to 25.34 mU/ml) in healthy people. Therefore, presumably Gaucher patients with activities close to normal range, could be receiving the amount of enzyme that they need, and patients with GBA activity on top of normal

range could be receiving more exogenous enzyme that they require. As each patient has different degrees of enzyme deficiency, this is consistent with not all patients requiring same U/kg of ERT.

Literature shows that doses of ERT are controversial. On the one hand, Figueroa et al [26] concluded that treatment of GD reducing total dose and increasing frequency of administration yield satisfactory results and reduce the annual cost of treatment. Nowadays, Zimran[27] and Beutler[28] urge their colleagues to use small doses of enzyme in the treatment of patients with GD since previous results obtained from their investigations and exhaustive meta-analysis indicated there were not significant differences in clinical effect after administering 15 U/kg-30 U/kg and 130 U/kg per month, the largest dose most commonly administered. So Zimran consider it is more appropriate to start ERT with a lower effective dose (15-30 U / kg per month) than the maximum tolerated dose, and to increase dose in poor responders [29]. On the other hand, some guidelines[16] establish modification dose after 4 years with initial regimen.

It is noteworthy that there are patients who respond poorly and others who respond well to any dose [30], so an increase in ERT dose does not always increase the rate of response [31]. The poor and good responder theory is represented in our figure 5, as there are patients treated with low doses who achieve similar GBA activities than others with higher doses.

Therapeutic drug monitoring is applied to a wide range of drugs in clinical practice; dosage individualization has been demonstrated to be the best method to reduce inter-individual variability in therapeutic response. In this way, ERT individualization could also be performed using pharmacokinetic and pharmacodynamic models, making ERT more cost-effective. So, monitoring of GBA activity could provide an added value to the standard criteria for dosage optimization and could improve clinical practice in GD.

Possibly we have found the first pharmacokinetic biomarker in GD which can help us to drive dose selection and early clinical decision making, nevertheless our study is a first approach to study ERT and optimization of dosing regimens in depth, so more studies are needed.

6. CONCLUSION

The developed method is simple, rapid and reliable for estimation of GBA activity using HPLC-UV, and suitable in terms of linearity, accuracy, precision, recovery, selectivity, limit of detection and quantification.

The different GBA activity between healthy individuals and Gaucher patients suggests that the developed method is able to discern between them, and could be an useful tool for therapeutic drug monitoring in clinical practice.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patients with GD and health care personnel from Pharmacy and Hematology Service.

DISCLOSURE

The authors report no conflicts of interest in this work.

REFERENCES

- [1] N.W. Barton, R.O. Brady, J.M. Dambrosia, A.M. Di Bisceglie, S.H. Doppelt, S.C. Hill, H.J. Mankin, G.J. Murray, R.I. Parker, C.E. Argoff, et al., Replacement therapy for inherited enzyme deficiency--macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease, *N Engl J Med*, 324 (1991) 1464-1470.
- [2] Y. Yildiz, H. Matern, B. Thompson, J.C. Allegood, R.L. Warren, D.M. Ramirez, R.E. Hammer, F.K. Hamra, S. Matern, D.W. Russell, Mutation of beta-glucosidase 2 causes glycolipid storage disease and impaired male fertility, *J Clin Invest*, 116 (2006) 2985-2994.
- [3] R.G. Boot, M. Verhoek, W. Donker-Koopman, A. Strijland, J. van Marle, H.S. Overkleeft, T. Wennekes, J.M. Aerts, Identification of the non-lysosomal glucosylceramidase as beta-glucosidase 2, *J Biol Chem*, 282 (2007) 1305-1312.
- [4] Y. Hayashi, N. Okino, Y. Kakuta, T. Shikanai, M. Tani, H. Narimatsu, M. Ito, Klotho-related protein is a novel cytosolic neutral beta-glycosylceramidase, *J Biol Chem*, 282 (2007) 30889-30900.
- [5] L.B. Daniels, R.H. Glew, beta-Glucosidase assays in the diagnosis of Gaucher's disease, *Clin Chem*, 28 (1982) 569-577.

- [6] E. Beutler, W. Kuhl, The diagnosis of the adult type of Gaucher's disease and its carrier state by demonstration of deficiency of beta-glucosidase activity in peripheral blood leukocytes, *J Lab Clin Med*, 76 (1970) 747-755.
- [7] M. Lorincz, L.A. Herzenberg, Z. Diwu, J.A. Barranger, W.G. Kerr, Detection and isolation of gene-corrected cells in Gaucher disease via a fluorescence-activated cell sorter assay for lysosomal glucocerebrosidase activity, *Blood*, 89 (1997) 3412-3420.
- [8] Y. Hayashi, K. Zama, E. Abe, N. Okino, T. Inoue, K. Ohno, M. Ito, A sensitive and reproducible fluorescent-based HPLC assay to measure the activity of acid as well as neutral beta-glucocerebrosidases, *Anal Biochem*, 383 (2008) 122-129.
- [9] A. Zimran, K. Loveday, C. Fratazzi, D. Elstein, A pharmacokinetic analysis of a novel enzyme replacement therapy with Gene-Activated human glucocerebrosidase (GA-GCB) in patients with type 1 Gaucher disease, *Blood Cells Mol Dis*, 39 (2007) 115-118.
- [10] N.J. Weinreb, J. Charrow, H.C. Andersson, P. Kaplan, E.H. Kolodny, P. Mistry, G. Pastores, B.E. Rosenbloom, C.R. Scott, R.S. Wappner, A. Zimran, Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1028 patients with type 1 Gaucher disease after 2 to 5 years of treatment: a report from the Gaucher Registry, *Am J Med*, 113 (2002) 112-119.
- [11] A. Zimran, D. Elstein, E. Levy-Lahad, S. Zevin, I. Hadas-Halpern, Y. Bar-Ziv, J. Foldes, A.J. Schwartz, A. Abrahamov, Replacement therapy with imiglucerase for type 1 Gaucher's disease, *Lancet*, 345 (1995) 1479-1480.
- [12] D. Elstein, G.M. Cohn, N. Wang, M. Djordjevic, C. Brutaru, A. Zimran, Early achievement and maintenance of the therapeutic goals using velaglucerase alfa in type 1 Gaucher disease, *Blood Cells Mol Dis*, 46 (2011) 119-123.
- [13] G.M. Pastores, N.J. Weinreb, H. Aerts, G. Andria, T.M. Cox, M. Giralt, G.A. Grabowski, P.K. Mistry, A. Tylki-Szymanska, Therapeutic goals in the treatment of Gaucher disease, *Semin Hematol*, 41 (2004) 4-14.
- [14] G.A. Grabowski, N.W. Barton, G. Pastores, J.M. Dambrosia, T.K. Banerjee, M.A. McKee, C. Parker, R. Schiffmann, S.C. Hill, R.O. Brady, Enzyme therapy in type 1 Gaucher disease: comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources, *Ann Intern Med*, 122 (1995) 33-39.
- [15] A. Zimran, G. Altarescu, M. Philips, D. Attias, M. Jmoudiak, M. Deeb, N. Wang, K. Bhirangi, G.M. Cohn, D. Elstein, Phase 1/2 and extension study of velaglucerase alfa replacement therapy in adults with type 1 Gaucher disease: 48-month experience, *Blood*, 115 (2010) 4651-4656.
- [16] P. Giraldo, [Guidelines for type 1 Gaucher's disease], *Med Clin (Barc)*, 137 Suppl 1 (2011) 55-60.
- [17] M.A. Martinez-Gomez, R.M. Villanueva-Camanas, S. Sagrado, M.J. Medina-Hernandez, Multivariate optimization approach for chiral resolution of drugs using

human serum albumin in affinity electrokinetic chromatography-partial filling technique, *Electrophoresis*, 26 (2005) 4116-4126.

[18] W.E. Evans, *Applied Pharmacokinetics. Principles of therapeutic drug monitoring*, Applied Therapeutics, Vancouver, 1992.

[19] P. Marquet, [Therapeutic monitoring: analytic, pharmacokinetic and clinical aspects], *Acta Clin Belg Suppl*, 1 (1999) 2-12.

[20] FDA, *Guidance for Industry on Bioanalytical Method Validation*. US Department of Health and Human Services, Federal Register 66 (2001) 28526-28527.

[21] L.B. Daniels, R.H. Glew, N.S. Radin, R.R. Vunnam, A revised fluorometric assay for Gaucher's disease using conduritol-beta-epoxide with liver as the source of Beta-glucosidase, *Clin Chim Acta*, 106 (1980) 155-163.

[22] G.A. Grabowski, K. Osiecki-Newman, T. Dinur, D. Fabbro, G. Legler, S. Gatt, R.J. Desnick, Human acid beta-glucosidase. Use of conduritol B epoxide derivatives to investigate the catalytically active normal and Gaucher disease enzymes, *J Biol Chem*, 261 (1986) 8263-8269.

[23] C.M. Ridley, K.E. Thur, J. Shanahan, N.B. Thillaiappan, A. Shen, K. Uhl, C.M. Walden, A.A. Rahim, S.N. Waddington, F.M. Platt, A.C. van der Spoel, beta-Glucosidase 2 (GBA2) activity and imino sugar pharmacology, *J Biol Chem*, 288 (2013) 26052-26066.

[24] H. Matern, H. Heinemann, G. Legler, S. Matern, Purification and characterization of a microsomal bile acid beta-glucosidase from human liver, *J Biol Chem*, 272 (1997) 11261-11267.

[25] K. Michelin, A. Wajner, L.d.S. Goulart, Â.A. Fachel, M.L.S. Pereira, A.S. de Mello, F.T.S. Souza, R.F. Pires, R. Giugliani, J.C. Coelho, Biochemical study on β -glucosidase in individuals with Gaucher's disease and normal subjects, *Clinica Chimica Acta*, 343 (2004) 145-153.

[26] M.L. Figueroa, B.E. Rosenbloom, A.C. Kay, P. Garver, D.W. Thurston, J.A. Koziol, T. Gelbart, E. Beutler, A less costly regimen of alglucerase to treat Gaucher's disease, *N Engl J Med*, 327 (1992) 1632-1636.

[27] A. Zimran, D. Elstein, E. Beutler, Low-dose therapy trumps high-dose therapy again in the treatment of Gaucher disease, *Blood*, 108 (2006) 802-803.

[28] E. Beutler, Enzyme replacement in Gaucher disease, *PLoS Med*, 1 (2004) e21.

[29] A. Zimran, How I treat Gaucher disease, *Blood*, 118 (2011) 1463-1471.

[30] E. Beutler, Treatment regimens in Gaucher's disease, *Lancet*, 346 (1995) 581-582.

[31] E. Beutler, A. Demina, K. Laubscher, P. Garver, T. Gelbart, D. Balicki, L. Vaughan, The clinical course of treated and untreated Gaucher disease. A study of 45 patients, *Blood Cells Mol Dis*, 21 (1995) 86-108.

CAPÍTULO II.

Cellular Uptake of Glucocerebrosidase in Gaucher Patients Receiving Enzyme Replacement Treatment.

Elena Gras-Colomer, María Amparo Martínez-Gómez, Ana Moya-Gil, Miguel Fernandez-Zarzoso, Matilde Merino-Sanjuan, Mónica Climente-Martí.

Clinical Pharmacokinetic 2016 Sep;55(9):1103-13.

ABSTRACT

Enzyme Replacement Therapy (ERT) is currently the standard treatment of patients with Gaucher disease type I (GD1), but the pharmacokinetic has hardly been studied. The objective of this study is the quantification of the *in vivo* enzyme activity in peripheral leukocytes of patients with GD1 on chronic ERT and sets out to assess the enzymatic uptake process by the peripheral leukocytes.

A prospective semi-experimental study was conducted. Four time points for blood withdrawal were planned per patient to quantify the intra-leukocyte enzymatic activity. In order to assess the uptake process, was estimated the rate of cellular uptake of the enzyme by the leukocytes (Rupt) and the disappearance rate of the enzyme from plasma (Rdis).

Eight GD1 patients were included. Baseline intra-leukocyte activity was 24.31 mU/mL (SD 6.32 mU/mL; CV= 25.96%) and 15 minutes post perfusion was 27.14 mU/mL (SD 6.96 mU/mL; CV= 25.65%). Their relationships with the administered dose were linear. Rupt was 37.73 mU/mL/min (95%CI: 25.63 to 49.84) and shows a linear correlation with the enzyme administered dose ($p<0.05$) and the Rdis was 189.43 mU/mL/min (95%CI 80.31 to 298.55) and also shows a linear correlation with dose ($p<0.05$).

This is the first *in vivo* study, which quantifies the accumulated enzymatic activity in patients with GD1 and shows that baseline intra-leukocyte and 15 minutes post perfusion activity either might be used as a possible marker for therapeutic individualization in patients with GD1 on ERT treatment.

1. INTRODUCTION

Gaucher disease (GD) is the most frequent enzyme deficiency-associated disorder among the inherited lysosome storage diseases, with an overall prevalence of 1 per 100,000 [1]. This disease has its origin in the partial or total deficiency of the lysosomal beta-glucocerebrosidase (GCase), which leads to a decrease in glucocerebroside hydrolysis and its subsequent storage in cell lysosomes from the monocyte-macrophage system [2, 3]. The “European Working Group on Gaucher Disease” [4], classifies GD in three types: Non-neuropathic (type I), acute neuropathic (type II) and chronic neuropathic (type III) disease. Type I (GD1), the most common, presents with great heterogeneity in clinical symptomatology, time of onset, and the evolution of the disease. Patients with GD1 show clinical symptoms derived from the infiltration of macrophages loaded with glucocerebrosidase in different organs, with the following locations standing out: Infiltration of visceral organs showing as hepatosplenomegaly, bone marrow infiltration leading to cytopenia and bone infiltration with necrosis and acute pain crisis, which make up the symptomatology with greater impact on quality of life. Patients can also show, although less frequently, pulmonary, cardiac and renal symptoms or higher frequency of malignancies [5, 6].

GD diagnosis is currently based on the presence of these clinical signs and symptoms, although they are not very specific. Thus, the “gold standard” for GD diagnosis is accepted to be the detection of low GCase activity in peripheral blood cells, usually leukocytes, in patients as compared to the enzyme activity observed in healthy individuals [5, 7-9].

GD treatment has traditionally been based in palliative measures up until the introduction of Enzyme Replacement Therapy (ERT), which implies the exogenous introduction of the deficient enzyme. Currently there are two marketed ERT drugs for the treatment of patients with GD1: Imiglucerase (IMG; Cerezyme® Genzyme S.L.) and Velaglucerase (VELA; Vprip® Shire Pharmaceuticals S.L.) [10, 11].

The initial dose recommended by clinical guidelines [12] for ERT is 60U/kg/14 days. The continuous administration of either drug results in patient improvement, which can be objectively assessed by following the hematologic parameters, and leads to a stop or reduction in bone and visceral lesions. The maintenance dose is

individually adjusted according to the clinical status of the patient and to the therapeutic response observed after the administration of the initial doses. This individual posology consists in selecting the maintenance dose at levels ranging between the initial recommended dose (60U/kg/14days) and the minimum established effective dose, which is 15U/Kg/14 days. Despite the increase in the acceptance of this tendency, the most convenient dosage regimen design for ERT in patients with GD remains controversial in several aspects such as the differential effect of therapies in patients, the long-term effects of exogenous enzyme, the efficacy of a high-dose or a low-dose treatment schedule, the poor responders to treatment in which increasing doses do not increase the rate of response or the ERT infusion once every 4 weeks rather to once every 2 weeks in stable patients [5, 13-17].

The pivotal clinical trial of VELA vs IMG in naïve patients showed similar objective improvements in the established follow-up markers [18]. Other authors have observed stability, or even improvement, in response parameters after changing from IMG to VELA [19, 20]. However, there are no studies performing a direct comparison between both enzymes in patients with bone disease, which is the most disabling domain.

Published studies on the pharmacokinetic of both enzymes indicate that after ERT administration, the concentration of the circulating enzyme decreases rapidly in plasma [21, 22], since it is bound by the mannose-6-phosphate (M6P) receptors of the monocyte-macrophage system. Once the exogenous enzyme has been taken up by the peripheral monocytes, it is distributed by tissular macrophages to target organs such as liver, spleen and bone marrow [23]. Consequently, the half-life in alpha phase shows very short values, ranging between 1 and 6 minutes, and although the half-life values in beta phase are still lower than 24h. Although the kinetic parameters of both enzymes seem similar [10, 11], the enzyme structure is different: while IMG differs from the natural enzyme in the substitution of aminoacid 495, VELA is completely identical to the human protein. The main structural difference between the enzymes is based on their content in glycans, which is relevant, since it has been described that protein internalization by endocytosis in macrophage lysosomes is highly dependent on their content in

carbohydrates [24]. VELA has a total of 9 mannose residues as compared to IMG, which only has three residues. It has been postulated that a greater content in glycan might result in greater cellular uptake of VELA by peripheral monocytes [25], which, in turn, might determine the quantity of recombinant enzyme that gets to GD target organs.

However, the pharmacokinetics of either enzyme has hardly been studied. Available data come from the European Public Assessment Reports of the European Medicines Agency, based on studies published on animal models [10, 11, 22], and on one single human study (VELA phase I/II) from plasmatic samples of GD patients [21], in which 9 patients were treated with 60U/kg doses and 3 patients were on escalated doses from 15 to 60U/Kg. Furthermore, the only kinetics analysis published on the internalization of the two enzymes by the macrophages is an *in vitro* study [25]. On the other hand, the pharmacokinetic parameters currently published (phase alpha half-life in minutes and phase beta in hours) do not agree with the selection of the usually established therapeutic intervals (an infusion every two weeks), or with the suggestion of extending the treatment interval period to 3-4 weeks, according to the clinical response observed by some authors [17]. Moreover, nowadays the individualization based on therapeutic goals lead to wait 12-24 months to objectify optimal or suboptimal response to treatment with the economic cost that the treatment involves [2].

These situations justify the need to extend the pharmacokinetics knowledge on these enzymes, and particularly on the uptake process and distribution throughout the organism. In this sense, it would be of great interest the development of a pharmacokinetic marker that anticipates and predicts the likelihood of optimal response for each patient, allowing dosage adjustments to optimize the effectiveness of ERT.

Within this context, our study group developed an analytical method to measure the leukocyte GCase activity and shown its utility as a support tool for clinical decision on the individualization of ERT posology [26]. This study has as the main objective the quantification of the *in vivo* enzyme activity at different time points in order to know enzyme activity accumulated in peripheral leukocytes of patients with GD1 on ERT treatment (Imiglucerase and/or Velaglucerase). As the secondary

objective, the study sets out to assess the enzymatic uptake process by the peripheral leukocytes, by means of the comparative analysis between the rate of enzyme internalization from the plasma into the leukocytes and rate of disappearance of the enzyme from the plasma.

2. MATERIAL AND METHODS

Prospective semi-experimental study conducted between June and December 2010 at a tertiary hospital. The study was conducted with the approval of the Ethics Committee of Clinical Investigation. Eligible patients were adult patients (>18 years) with GD1 confirmed by enzymatic diagnosis, on ERT treatment (IMG or VELA) during at least the 6 months previous to study inclusion.

Blood samples (4 mL each) were collected in EDTA-K tubes at 0 minutes, prior to start the drug perfusion (Baseline activity; t₀), at 50 minutes since perfusion initiation (t₅₀), and at 5 minutes and 15 minutes post intravenous infusion of ERT (t₆₅ and t₇₅), respectively. An aliquot of leukocytes and an aliquot of plasma were extracted from each blood sample. The analysis to assess the enzymatic activity of GCase was performed by means of an acid hydrolysis reaction using 4-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (PNP-Glc) as a synthetic substrate. The reaction product, 4-nitrophenol (PNP), shows characteristic absorption spectra at wavelength 315 nm. We used an analytical method to measure specifically lysosomal GCase activity (not nonlysosomal Gcase) developed by our research group and previously published[26]. An enzyme unit (U) was defined as the quantity of enzyme required to produce one μmol of PNP/min, according to what was established in similar studies [21]. The enzymatic activity was expressed as the number of enzyme milliunits per milliliter of solution (mU/ml).

To quantify the intake of the enzyme by the leukocytes, the enzymatic activity was measured at t₀ and t₇₅, and the accumulated activity was measured at t₇₅ with respect to t₀. In order to assess the uptake process, the rate of cellular uptake of the enzyme by the leukocytes (R_{upt}) was estimated as the ratio between the variation of enzymatic activity measured from t₀ to t₇₅ and the time variation (75 minutes). The disappearance rate (R_{dis}) of the enzyme from plasma, which includes the rate of leukocyte uptake plus the elimination of the enzyme from the

blood, was estimated as the ratio between the variation of enzymatic activity in plasma measured from t65 to t75 and the time interval between both time points. In order to determine the influence of the dose administered on these rates the values of both rates were calculated using the enzymatic activities normalized by administered dose: RuptD and RdisD, respectively.

In addition, the inter-individual and intra-individual variability of the enzymatic activity and estimated rate parameters were assessed. Last, in order to find out the value of the enzymatic activity of leukocyte uptake with respect to the enzymatic activity in plasma elimination, the disposition factor (DF) of ERT was defined as the ratio between Rupt and Rdis, and its relationship with the ERT administered dose.

On the other hand, the differences between the two marketed enzymes were analyzed. The accumulated activities of both enzymes, normalized according to the ERT administered dose, and the baseline values of the enzymatic activity in leukocytes in patients treated with one or the other enzyme were compared; the modification of baseline activity and activity at t75 in patients treated with one or the other ERT were also analyzed; last, the difference between the mean enzymatic rates of one and the other enzyme was also assessed.

Statistical analyses were performed with the statistical program SPSS v17 (Chicago Inc.). The descriptive variables with normal distribution were represented by the mean and standard deviation (SD) and the variables with non-normal distribution by the median and interquartile range (IQR). To assess inter- and intra-patient variabilities, the coefficients of variation (CVs) were estimated. The Kolmorov-Smirnoff test was used to assess the normality of the variables and the parametric t-Student test or non-parametric U-MannWhitney, depending on the variables normality, with a 5% statistical significance level, to compare the uptake and accumulation rates of both drugs. A lineal adjustment between the assessed parameters and doses of the enzymes was performed, and the statistical signification of this correlation was obtained by means of the Pearson or Spearman correlation coefficient, depending on the normality, with a statistical significance of 5%.

3. RESULTS

Table 1 shows biometric and posological characteristics of the eight GD1 patients included in this study. Every patient was treated with IMG and, in addition, two patients were also treated with VELA. Fourteen curves of enzymatic activity/time (56 leukocytes aliquots and 56 plasma aliquots) were assessed after the administration of both ERTs. Ten of these curves corresponded to IMG dosing in 8 patients and four curves corresponded to VELA dosing in two patients. **Fig.1** shows the 10 curves of enzyme activity versus time in plasma and in leukocytes determined for every patient in treatment with IMG. 7 of 8 patients achieved statistically significant intra-leukocyte activity at t75 compared to baseline activity. Patients 1 and 2 initially received IMG and later on received ERT with VELA. There was no ERT dose modification throughout the study period, and each patient received always the same dose, which differed from that received by the other patients (**table 1**).

Table 1. Baseline characteristics of patients on treatment with Velaglucerase and Imiglucerase.

Pat	Sex	Age at diagn. (yrs.)	Genotype	Current age (yrs.)	Weight (kg)	ERT Time (yrs)	Dose (U)*	Dose/kg (U/kg)	Dosing Interv. (days)	Monthly dose U/Kg/28 days	ERT drug
1	M	43	N370S/?	45	69	1	2800	40.58	14	81.16	IMG and VELA
2	M	26	N370S/N370S	47	80	1	2800	35.00	14	70.00	IMG and VELA
3	F	38	N370S/N188S	51	45	12	800	17.78	28	17.78	IMG
4	F	27	L444P/Gly416Ser	67	80	11	800	10.00	28	10.00	IMG
5	M	48	LEU375Arg/N370S	75	75	3	800	10.67	14	21.34	IMG
6	M	14	N370S/N188S	48	100	12	3200	32.00	14	64.00	IMG
7	M	6	N370S/?	38	80	7	2400	30.00	28	30.00	IMG
8	F	13	N370S/?	33	47	12	800	17.02	28	17.02	IMG

M: Male; F: Female; Diagn.: Diagnosis; yrs: years; ?: unknown; ERT: enzyme replacement therapy; Interv.: Interval;

*Patients stayed with the same ERT dose throughout the study

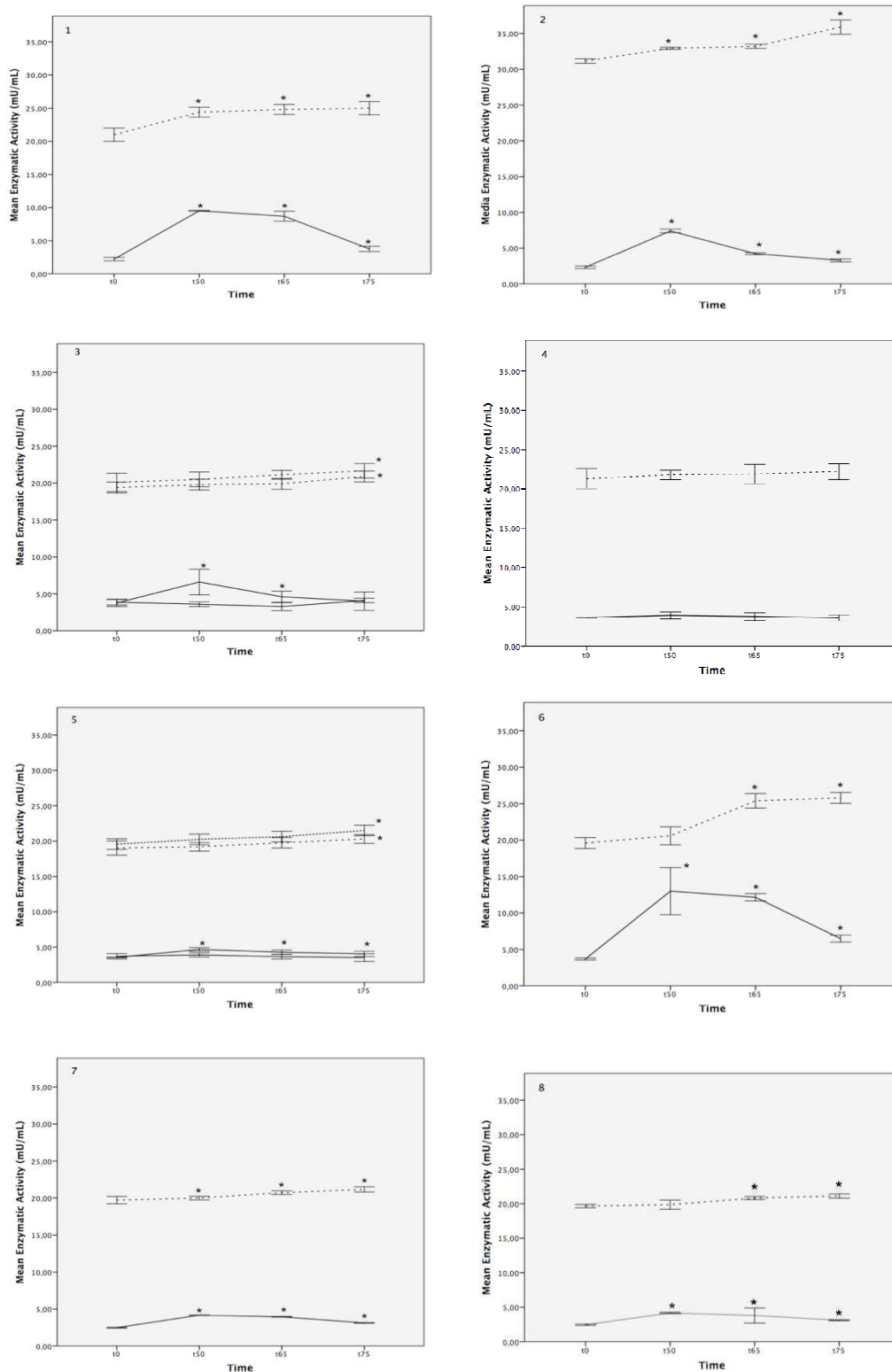


Fig.1. Enzyme activity vs. time of the eight patients on IMG treatment. Each graphic corresponds to one patient. Curve at the bottom of the graphic corresponds to enzyme activity in plasma (—) and curve at the top, to enzyme activity in leukocytes (.....) at the same time. Curves are shown with error bars (95%) of three repeated measurements in HPLC and statistical significance ($p < 0.05$) between the enzyme activity at t_0 and the other times.

3.1. Leukocyte enzymatic activity

Mean intra-leukocyte activity at t0, i.e., baseline enzymatic activity in leukocytes of patients in chronic treatment with ERT, was 24.31 mU/mL (SD 6.32 mU/mL; CV= 25.96%). **Fig.2a** represents the correlation between enzyme activity in leukocytes at time t0 and monthly dose, expressed in enzyme units administered per Kg of body weight, showing a statistically significant linearity for ERT ($R^2 = 0.587$; Pearson correlation = 0.766; $p < 0.05$). **Fig.2b** represents the relationship between the activity in leukocytes at t75 and the administered monthly dose, expressed in units per Kg of body weight, showing also a statistically significant linearity ERT ($R^2 = 0.720$; Pearson correlation = 0.849; $p < 0.05$). Mean intra-leukocyte activity at t75 was 27.14 mU/mL (SD 6.96 mU/mL; CV= 25.65%). As **fig.2c** shows, the relationship between baseline enzyme activity and activity at t75 was significantly linear ($R^2 = 0.946$; Pearson correlation 0.849; $p < 0.05$).

The mean accumulated enzymatic activity in leukocytes was 2.834 mU/mL (SD 1.577 mU/mL; CV= 55.64%), and its relationship with the administered dose, expressed in units per Kg of body weight, was also linear ($R^2 = 0.456$; Pearson correlation = 0.675; $p < 0.05$).

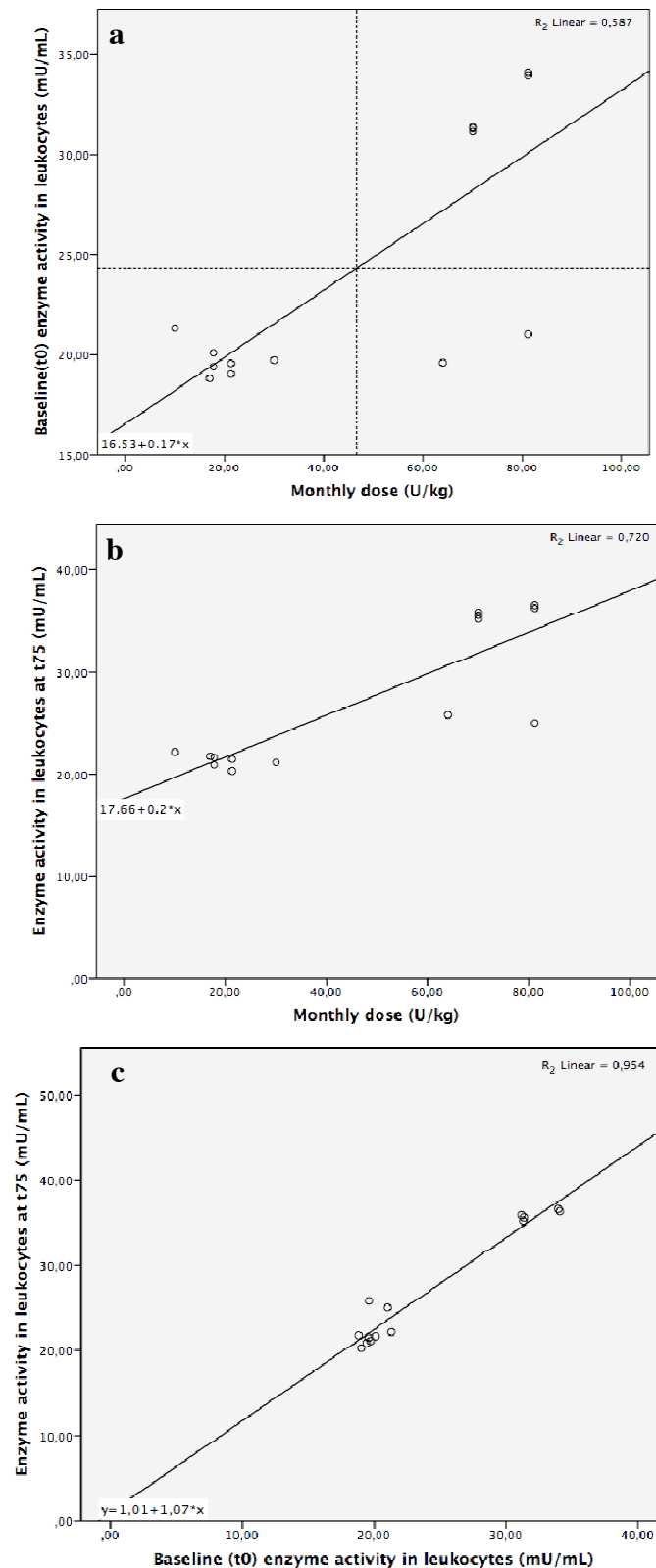


Fig.2. **a.** Correlation between baseline enzyme activity (mU/mL) in leukocytes and monthly dose (U/kg) administered to patients. The vertical line represents the mean dose per Kg of body weight administered to patients and the horizontal line represents the mean enzyme activity at t0; **b.** Correlation between enzyme activity at t75 (mU/mL) in leukocytes and monthly dose (U/kg) administered to patients; **c.** Correlation between enzyme activity in leukocytes at baseline (t0) and at t75.

3.2. Inter- and intra-individual enzymatic activity

In four out of the eight patients included in the study, experimental data available were obtained from one single drug administration; thus, the intra-patient variability was assessed with the information originated from the other 4 patients. Inter-patient variability was, however, estimated from the total sample of patients included in the study.

The inter-individual enzymatic activity measured and expressed as CV, was 30.30% and 25.67%, in plasma and leukocytes, respectively. On the other hand, the intra-individual variability of enzyme activities, also expressed as CV, was 17.09% and 7.03% in plasma and leukocytes, respectively.

3.3. Rate of enzyme uptake and enzyme disappearance

Rupt was 37.73 mU/mL/min (95%CI: 25.63 to 49.84) and Rdis was 189.43 mU/mL/min (95%CI 80.31 to 298.55). The inter-individual variability measures expressed as CV were 55.57% and 99.77% respectively. When Rupt and Rdis values were calculated from the enzymatic activity normalized by dose per Kg administered to patients (RuptD and RdisD) the values obtained were 0.980 (95%CI: 0.69 to 1.26) and 3.64 (95%CI 2.11 to 5.16) respectively. And inter-individual variability measures expressed as CV were 50.20% and 72.73%, respectively.

The relationship between Rdis and Rupt with respect to the administered dose is shown in **fig.3**. **Fig.3a** shows slow disappearance of the enzyme from the plasma (low Rdis) when low enzyme doses were administered, and as the dose increased, an increase in Rdis was also observed, obtaining a significant linear adjustment ERT ($R^2=0.507$; Pearson correlation= 0.712; $p<0.05$); **Fig.3b** shows that Rupt has a linear correlation with the dose of the administered enzyme ($R^2=0.456$; Pearson correlation = 0.675; $p<0.05$). **Fig.3c** and **3d** represent RdisD and RuptD obtained from each patient. The inter-individual variability is greater than the intra-individual variability, with the following estimated CVs: CVintra Rupt=18.22% and CVintra Rdis=50.72%.

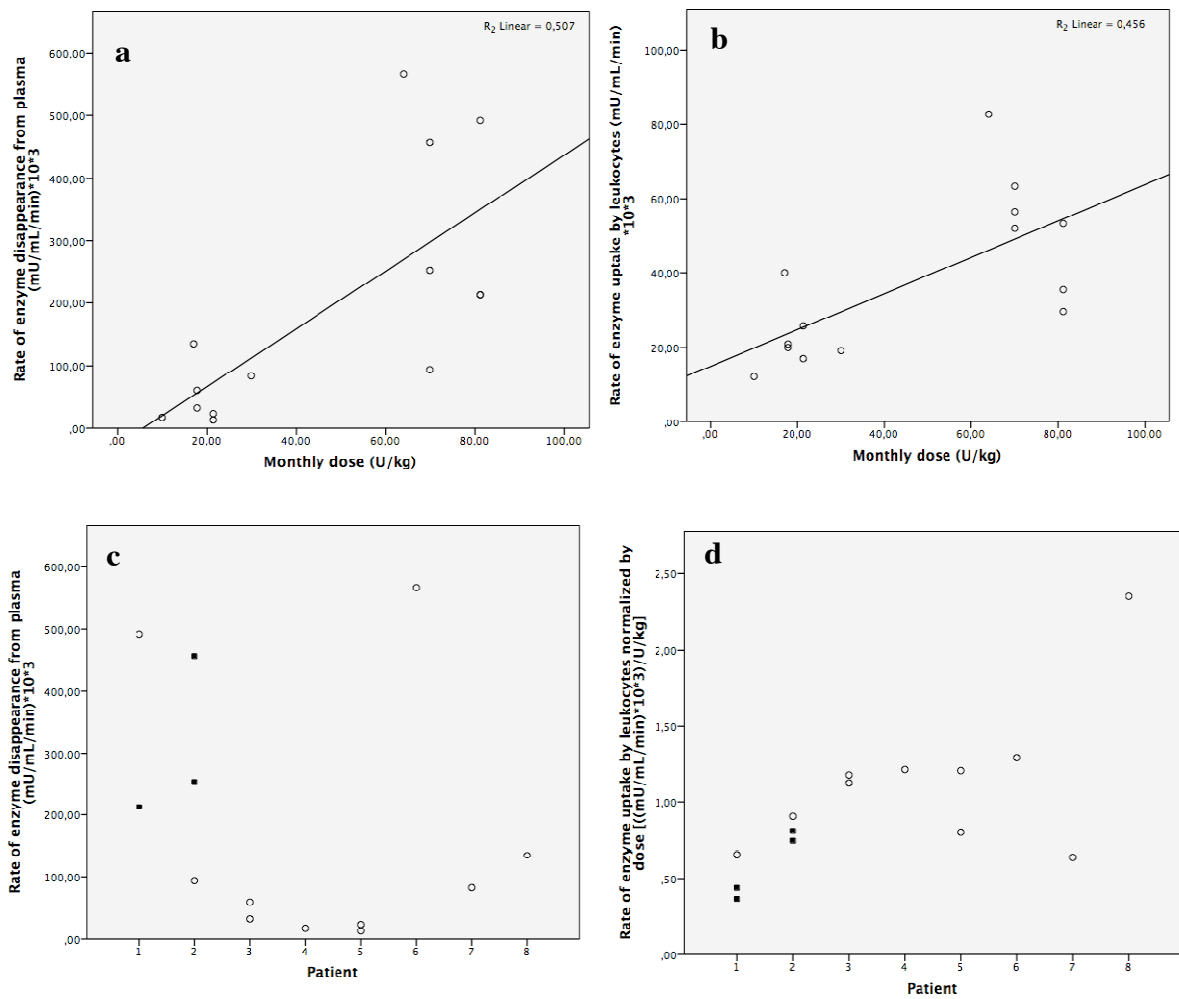


Fig.3. Relationship between R_{upt} versus R_{dis} estimated for every patient. A. represents rates obtained from enzymatic activity and B rates obtained from enzymatic activity normalized by dose administered at every patient (R_{uptD} and R_{uptD}).

Fig.4a shows the relationship between R_{upt} versus R_{dis} estimated for every patient, indicating the existence of a linear correlation between them (R^2 linear=0.658; Pearson correlation=0.811; $p<0.05$). However, such linear correlation disappeared completely when the parameters normalized by dose were represented, as **fig.4b** shows (R^2 linear=0.170; Pearson correlation=0.413; $p=0.142$).

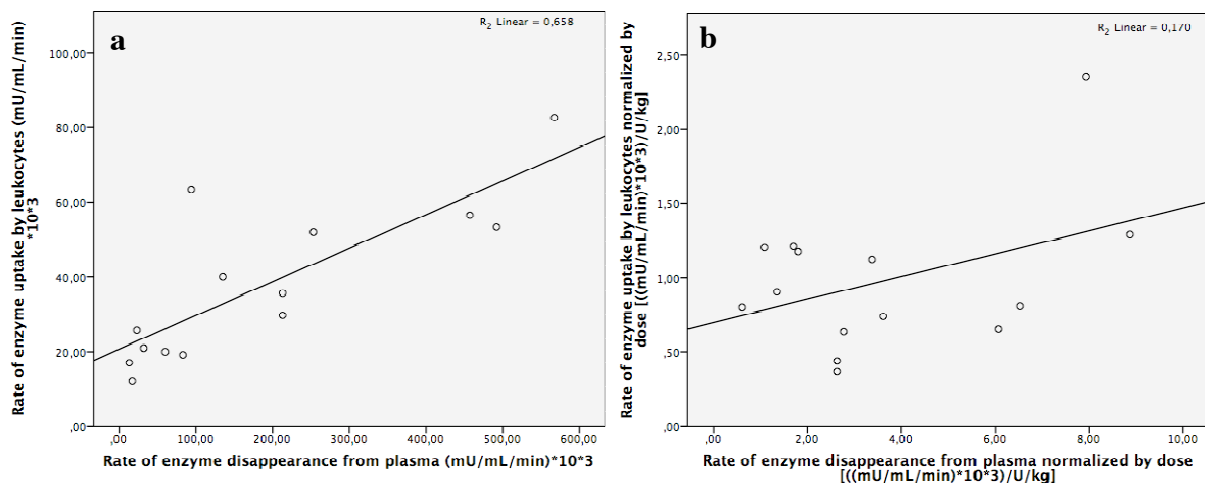


Fig.4. Relationship between R_{upt} versus R_{dis} estimated for every patient. A. represents rates obtained from enzymatic activity and B rates obtained from enzymatic activity normalized by dose administered at every patient (R_{uptD} and R_{disD}).

The mean disposition factor was 0.44 (SD 0.391; CVinter=87.99%; CVintra=41.81%), i.e., half of the enzyme activity that disappeared from the plasma was due to enzyme uptake by the leukocytes. **Fig.5** shows this factor versus dose, and two patient subgroups could be highlighted; those with DF greater than 0.4 who were treated with low enzyme doses and those with DF lower than 0.4 who received larger enzyme doses.

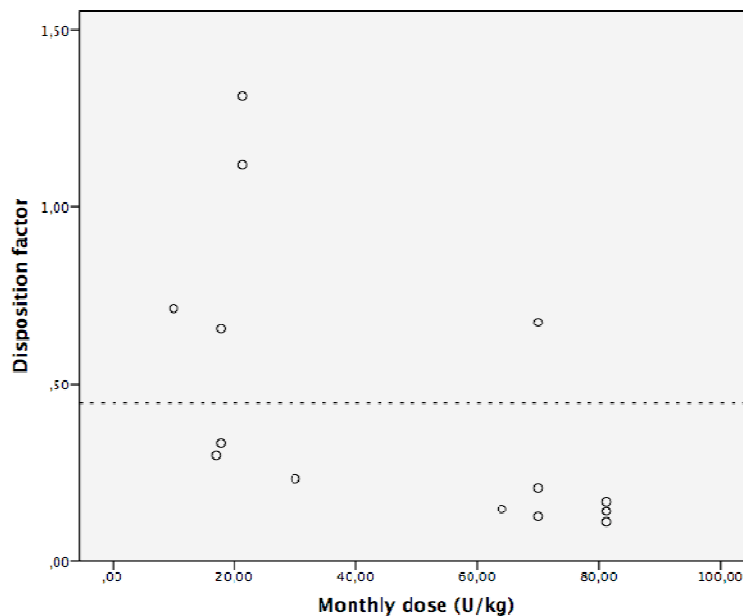


Fig.5. Relationship between dose and disposition factor (DF). The horizontal line represents the mean DF.

3.4. Differences in leukocyte enzymatic activity using IMG or VELA

Regarding differences between the enzymes, the baseline (t0) values of enzymatic activity in leukocytes after the administration of one or the other drug were significantly different ($p < 0.05$), with values 20.967 mU/mL (95% C.I. 18.346 to 23.588 mU/mL) and 32.665 mU/mL (95% C.I. 30.210 to 35.119 mU/mL) for IMG and VELA, respectively. However, differences were not statistically significant when the mean baseline enzymatic activity was normalized by the monthly-administered dose [0.89 for IMG (95% C.I. 0.50 to 1.28 mU/mL) vs. 0.43 for VELA (IC95% 0.41 to 0.46 mU/mL); $p > 0.05$]. Both patients on VELA treatment had

previously received IMG. Patient 1 showed different leukocyte enzymatic activity according to enzyme type received (t0: 21.60 mU/mL with IMG and 34.00 mU/mL with VELA; t75: 25.00 mU/mL with IMG and 36.45 mU/mL with VELA), despite receiving the same dose per Kg of body weight with either enzyme. However, patient 2 showed similar leukocyte enzymatic activity (t0: 31.16 mU/mL with IMG and 31.36 mU/mL with VELA; t75: 35.40 mU/mL with IMG and 35.90 mU/mL with VELA) after the administration of either drug at the same dose per Kg of body weight.

The mean enzymatic activity accumulated after the administration of one or the other drug showed no significant differences: 2.658 mU/mL (95%C.I. 1.388 to 3.927) for IMG and 3.260 mU/mL (95%C.I. 1.729 to 4.792 mU/mL) for VELA; $p > 0.05$. The enzymatic activities normalized by monthly-administered dose also did not show any significant difference between one and the other drug: 0.085 mU/mL/U/kg for IMG (95%C.I. 0.059 to 0.112 mU/mL/U/kg) and 0.044 mU/mL/U/kg for VELA (95%C.I. 0.018 to 0.070 mU/mL/U/kg); $p = 0.056$.

4. DISCUSSION

This is the first *in vivo* study, which quantifies the accumulated enzymatic activity in patients with GD1 and analyses the uptake of glucocerebrosidase by peripheral leukocytes from the plasma. Macrophages, a type of polymorphonuclear leukocytes, are the target cell in GD, and the clinical symptomatology of the disease derives from the accumulation of glucocerebroside in the lysosomes of these cells and later on in different tissues. The exogenous enzyme is internalized by peripheral monocytes and distributed by macrophages to other tissues. Currently, it is believed that the enzyme is, mostly, taken by the Gaucher cells in spleen, liver and bone marrow, but an earlier study [26] indicated that peripheral monocytes maintain a residual enzyme activity, which suggest that in GD there is a persistent equilibrium of enzyme distribution between the serum and macrophages. As a consequence, the enzyme activity measured in leukocytes might be a reflection of the magnitude of enzyme activity in target organs. In addition, the leukocyte enzymatic activity in patients treated with ERT shows high inter-individual variability. Therefore, the mean enzymatic activity in peripheral leukocytes might

be used as a surrogate marker to individualize ERT and thus, establish personalized more cost-effective treatments than those currently available. Within this context, the results obtained in the current study constitute essential data and justify the performance of the research conducted.

The current study was conducted in 8 patients, which might seem to limit the extracted conclusions. However, the patient study sample agrees with the status of rare disease of GD.

The experimental data used to assess the rate of enzyme uptake by the leukocytes were those obtained up to 15 minutes post-perfusion. The selection of this time interval for extracting the blood samples was performed taking into account the plasmatic half-life of both drugs ($t_{1/2_{\text{IMG}}}$ 7-8 min; $t_{1/2_{\text{VELA}}}$ 11min) [10, 11] and the results obtained in a previous study by our research group (non-published data), showing that the enzymatic activity in leukocytes reaches its maximum values at 15 minutes post-perfusion, remaining constant at least up to 30 minutes post-perfusion.

The average values of baseline enzyme activity in patients with GD on treatment with ERT increase to values similar to those observed in healthy subjects [mean 24.73mU/ml (95% C.I. 24.12-25.34mU/ml)] [26]. In **Fig.1**, one can observe that plasma enzymatic activity (curves at the bottom of each graph) shows higher inter-individual variability than leukocyte enzymatic activity. This behaviour may be the result of the influence of patient-related individual factors and of pharmacokinetic-related factors of the administered enzyme, since the time the enzyme stays in plasma will be very limited due to its fast uptake from the plasma by the monocytes. Due to this behaviour, it is required a high precision regarding the time points for blood sample extraction, since slight variations in these time points may entail significant changes in the determined plasma enzymatic activity. However, the leukocyte enzymatic activity shows slightly lower inter-individual variability and, what mainly stands out, low intra-individual variability. So the leukocyte enzymatic activity might be considered the election marker to assess the individual enzymatic activity. Moreover, leukocyte enzymatic activity in t75 is significantly higher than baseline in all patients except in patient 4 (patient with the lowest dosage/kg and an infusion interval of 28 days).

In **fig.2**, one can observe that the baseline (t_0) leukocyte enzymatic activity, as well as the leukocyte enzymatic activity determined at t_{75} , in patients on ERT treatment, have a linear correlation between them and with the dose administered to the patients. In addition, **fig.2a** shows that some patients treated with high doses of the enzyme do not reach, as it might be expected, high enzymatic activity in leukocytes, since their activity values are located in the lower right quadrant of the graph. These results agree with the theory that supports the existence of patients who respond well to treatment and patients who do not respond to treatment [16]. In addition, it can explain the therapeutic failure observed in patients who despite receiving high doses of enzyme do not reach the expected therapeutic objectives. In fact, these patients have more bone marrow infiltration and necrosis antecedents than the others, so it is probably the case that in these patients, the leukocyte enzymatic activity is insufficient and, as a consequence of this situation, an increase in enzyme dose will not result in an increase in response rate [5].

The analyses of rates of disappearance from the plasma and leukocyte uptake show greater inter- than intra-patient variability, and both show linearity with the dose. However, due to the small number of patients of the study and the inter-patient variability, we cannot rule out other type of relationship between R_{upt} and the administered dose, since, as **fig.3b** shows, R_{upt} tends to become stabilized in a threshold value after the administration of higher enzyme doses (higher than 70 U/Kg/month), which might involve receptor saturation[27]. The relationship between the rate of disappearance from the plasma and the rate of uptake by the leukocytes show a linear correlation (**fig.4a**), i.e., there is a linear proportion between the enzymatic activity that disappears from the plasma and that taken up by the leukocytes; in addition, the greater the activity disappearing from the plasma, the greater the activity taken up by the leukocytes. When the normalized by dose values are represented, the linear correlation completely disappears in R_{upt} , showing that the normalized by dose uptake rate remains constant and independent from the normalized by dose disappearance rate.

Data from leukocyte enzymatic activity and from uptake and disappearance rates and the variability of the curves in **fig.1** confirm the high inter-individual

variability in the distribution of both drugs [21]. The causes of this variability might be due, according to different authors, to the different immunophenotype of macrophages [28], M6P receptor variability [29] or the putative involvement of other receptors [27], which would modify the uptake rate of the enzyme by the leukocytes, the accumulated enzyme quantity inside the leukocytes, and thus, its later distribution throughout the organism.

The disposition factor (DF) defined in the current study, allows obtaining very useful information for the correct usage of these drugs. On one hand, it indicates that the quantity of the enzyme that is taken up by the leukocytes is not higher than 50% of that available in the plasma and, on the other hand, it also indicates that the patients receiving lower ERT doses are those with higher rate of enzyme uptake by the leukocytes (**fig.5**, FD greater than 0.44). These findings seem to indicate that patients showing greater enzyme uptake by the leukocytes require lower enzyme maintenance doses.

Last, the current *in vivo* study shows that the enzyme accumulates within the peripheral leukocytes after its administration, as it was already shown by a previous *in vitro* internalization study [25]. That study concluded that the internalization rate after the administration of VELA was at least two fold higher than IMG, and defends that these differences are probably due to the different composition of glycans, and that they might have clinical relevance. However, the reduced number of available patients to assess the differences in enzymatic activity might be the reason why this study was not able to show significant differences in the baseline leukocyte enzyme activity or in the accumulated enzyme activity between the drugs. The data resulting from this study allow obtaining objective criteria to explain the high inter-patient variability in the behavior of these exogenous enzymes observed in the clinical practice and reveal the need to perform well-designed comparative studies to assess the association of the evolution of the clinical variables with the disease magnitude; for example, the bone disease with the dose and the specific drug received by the patient.

5. CONCLUSIONS

The quantification of the enzymatic activity at t0 and t75 in leukocytes show a linear correlation with the administered dose and also show high inter-patient variability; thus, either variable might be used as a possible marker for therapeutic individualization in patients with GD1 on ERT treatment.

The rate of enzyme disappearance from the plasma and the rate of enzyme uptake by the leukocytes, as parameters which inform about the leukocyte ability to internalize the enzyme, show a linear correlation with the enzyme administered dose and also show high inter-patient variability.

After the administration of the enzyme by means of one or the other available drug, Imiglucerasa or Velaglucerasa, leukocyte enzymatic activity values and internalization rates by the leukocyte were similar.

KEY POINTS

1. The quantification of the enzymatic activity in leukocytes might be used as a marker for therapeutic individualization in patients with GD1 on ERT treatment.
2. The rate of enzyme disappearance from the plasma and the rate of enzyme uptake by the leukocytes, show a linear correlation with the enzyme administered dose and high inter-patient variability.
3. After the administration of Imiglucerasa or Velaglucerasa, leukocyte enzymatic activity values and internalization rates by the leukocyte were similar.

References

1. Grabowski, G.A., *Gaucher disease. Enzymology, genetics, and treatment*. Adv Hum Genet, 1993. **21**: p. 377-441.
2. Pastores, G.M., et al., *Therapeutic goals in the treatment of Gaucher disease*. Semin Hematol, 2004. **41**(4 Suppl 5): p. 4-14.
3. Beutler, E.G.G., Scriver CR, Sly WS, Beaudet AL, Valle D, ed. *Gaucher Disease. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 8th ed. Vol. volume III. 2011, McGraw-Hill: New York, NY. 3635-3668.
4. Vellodi, A., et al., *Management of neuronopathic Gaucher disease: a European consensus*. J Inherit Metab Dis, 2001. **24**(3): p. 319-27.
5. Beutler, E., et al., *The clinical course of treated and untreated Gaucher disease. A study of 45 patients*. Blood Cells Mol Dis, 1995. **21**(2): p. 86-108.
6. Brady, R.O., *Gaucher's disease: past, present and future*. Baillieres Clin Haematol, 1997. **10**(4): p. 621-34.
7. Bodamer, O.A. and C. Hung, *Laboratory and genetic evaluation of Gaucher disease*. Wien Med Wochenschr, 2010. **160**(23-24): p. 600-4.
8. Beutler, E. and W. Kuhl, *Detection of the defect of Gaucher's disease and its carrier state in peripheral-blood leukocytes*. Lancet, 1970. **1**(7647): p. 612-3.
9. Beutler, E. and W. Kuhl, *The diagnosis of the adult type of Gaucher's disease and its carrier state by demonstration of deficiency of beta-glucosidase activity in peripheral blood leukocytes*. J Lab Clin Med, 1970. **76**(5): p. 747-55.
10. Shire-Pharmaceuticals, *Vpriv (Velaglucerase)*. EPAR- Product information, E.M. Agency, Editor. 2010.
11. GenzymeEurope, *Cerezyme (Imiglucerase)* EPAR - Product Information, in EMEA/H/C/000157 -IA/0062, E.M. Agency, Editor. 1997.
12. Giraldo, P., *[Guidelines for type 1 Gaucher's disease]*. Med Clin (Barc), 2011. **137** Suppl 1: p. 55-60.
13. Zimran, A., *How I treat Gaucher disease*. Blood, 2011. **118**(6): p. 1463-71.
14. Zimran, A., D. Elstein, and E. Beutler, *Low-dose therapy trumps high-dose therapy again in the treatment of Gaucher disease*. Blood, 2006. **108**(3): p. 802-3.
15. Figueroa, M.L., et al., *A less costly regimen of alglucerase to treat Gaucher's disease*. N Engl J Med, 1992. **327**(23): p. 1632-6.
16. Beutler, E., *Treatment regimens in Gaucher's disease*. Lancet, 1995. **346**(8974): p. 581-2.
17. Kishnani, P.S., et al., *A randomized trial comparing the efficacy and safety of imiglucerase (Cerezyme) infusions every 4 weeks versus every 2 weeks in the maintenance therapy of adult patients with Gaucher disease type 1*. Mol Genet Metab, 2009. **96**(4): p. 164-70.
18. Ben Turkia, H., et al., *Velaglucerase alfa enzyme replacement therapy compared with imiglucerase in patients with Gaucher disease*. Am J Hematol, 2013. **88**(3): p. 179-84.
19. Elstein, D., et al., *Booster-effect with velaglucerase alfa in patients with Gaucher disease switched from long-term imiglucerase therapy: early Access Program results from Jerusalem*. Blood Cells Mol Dis, 2012. **48**(1): p. 45-50.
20. van Dussen, L., et al., *Effects of switching from a reduced dose imiglucerase to velaglucerase in type 1 Gaucher disease: clinical and biochemical outcomes*. Haematologica, 2012.
21. Zimran, A., et al., *A pharmacokinetic analysis of a novel enzyme replacement therapy with Gene-Activated human glucocerebrosidase (GA-GCB) in patients with type 1 Gaucher disease*. Blood Cells Mol Dis, 2007. **39**(1): p. 115-8.
22. Friedman, B., et al., *A comparison of the pharmacological properties of carbohydrate remodeled recombinant and placental-derived beta-glucocerebrosidase: implications for clinical efficacy in treatment of Gaucher disease*. Blood, 1999(0006-4971 (Print)).

23. Pocovi, M., [*Molecular basis of treatment in Gaucher's disease*]. *Med Clin (Barc)*, 2011. **137 Suppl 1**: p. 32-8.
24. Kornfeld, S., *Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states*. *J Clin Invest*, 1986. **77**(1): p. 1-6.
25. Brumshtein, B., et al., *Characterization of gene-activated human acid-beta-glucosidase: crystal structure, glycan composition, and internalization into macrophages*. *Glycobiology*, 2010. **20**(1): p. 24-32.
26. Colomer, E.G., et al., *Development and application to clinical practice of a validated HPLC method for the analysis of beta-glucocerebrosidase in Gaucher disease*. *J. Pharm Biomed Anal*, 2014(1873-264X (Electronic)).
27. CHMP. *Committee for Medicinal Products for Human Use. European Assessment Report (EPAR). Elelyso. Taliglucerase alfa* 2012 03 July 2012 [cited 2013 30 december]; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002250/WC500135112.pdf.
28. Pandey, M.K. and G.A. Grabowski, *Immunological cells and functions in Gaucher disease*. *Crit Rev Oncog*, 2013. **18**(3): p. 197-220.
29. Blanz, J., et al., *Disease-causing mutations within the lysosomal integral membrane protein type 2 (LIMP-2) reveal the nature of binding to its ligand beta-glucocerebrosidase*. *Hum Mol Genet*, 2010. **19**(4): p. 563-72.

CAPÍTULO III.

Relationship between Glucocerebrosidase Activity and clinical response to Enzyme Replacement Therapy in patients with Gaucher Disease type I

Gras-Colomer E, Martínez-Gómez MA, Climente-Martí M, Fernandez-Zarzoso M, Almela-Tejedo M, Giner-Galvañ V, Marcos-Rodríguez JA, Rodríguez-Fernández A, Torralba-Cabeza MÁ, Merino-Sanjuan M.

Basic Clinical Pharmacology & Toxicology. 2018 Feb 8. Doi: 10.1111/bcpt.12977

ABSTRACT

The quantification of enzyme activity in the patient treated with enzyme replacement therapy (ERT) has been suggested as a tool for dosage individualisation, so we conducted a study to evaluate the relationship between glucocerebrosidase activity and clinical response in patients with Gaucher disease type I (GD1) to ERT. The study included patients diagnosed with GD1 who were being treated with ERT and healthy individuals. Markers based on glucocerebrosidase activity measurement in patients' leukocytes were studied: enzyme activity at 15 minutes post-infusion (Act_{75}) reflects the amount of enzyme that is distributed in the body post ERT infusion, and accumulated glucocerebrosidase activity during ERT infusion (Act_{75-0}) indicates the total drug exposure during infusion. The clinical response was evaluated based on criteria established by Pastores et al. and Gaucher Severity Score Index. Statistical analysis included ROC analysis and area-under-curve test. Act_{75} and Act_{75-0} were found to be moderate predictive markers of an optimal clinical response (area under the ROC of Act_{75} was 0.733 and Act_{75-0} was 0.817). Act_{75-0} showed statistical significance in its discriminative capacity ($p < 0.05$) for obtaining an optimal response to ERT. The cut-off point was 58% (RR=1.800; CI95% 1.003 to 3.229; $p < 0.05$). Moreover, Act_{75} showed a significant and inverse correlation with the Gaucher Severity Score Index, and Act_{75} and Act_{75-0} presented a significant correlation with residual enzyme activity at diagnosis. Markers based on glucocerebrosidase activity have a good correlation with clinical response to ERT. Therefore, it could provide supporting clinical data for dose management in GD1 patients.

INTRODUCTION

Gaucher disease (GD) is a rare, inherited metabolic disorder caused by a partial or total deficiency of lysosomal beta-glucocerebrosidase (GCCase), which leads to a decrease in hydrolysis of glucocerebroside and its subsequent storage in cell lysosomes in the monocyte/macrophage system. Clinical symptomatology of the disease derives from accumulation of glucocerebroside in the lysosomes of these cells (named Gaucher cells) and later on in different tissues, producing a multi-systemic disorder[1]. The most common variant is the non-neuropathic form, Gaucher disease type I (GD1), whose diagnosis is currently based on the presence of clinical signs and symptoms, although the “gold standard” is detection of low GCCase activity intra-leukocyte [2-5].

Treatment for GD1 is based on the administration of enzyme replacement therapy (ERT), which improves haematological parameters and leads to a stabilisation or reduction of bone and visceral lesions[6]. The therapeutic enzyme is designed to be internalized by monocyte/macrophage through receptor-mediated endocytosis via mannosa receptors. This receptor is a member of the family type lectin receptor expressed in macrophages/monocytes, dendritic cells and hepatic cells and lymphatic endothelium[7].

There are currently three drugs marketed for ERT: imiglucerase (IMG;Cerezyme® Genzyme, Sanofi Company), velaglucerase (VELA;Vprip® Shire Pharmaceuticals SL) and taliglucerase (TAL; Elelyso®, Pfizer SLU)[8-11]. Nowadays, the selection of the appropriate dose to be used in ERT and other clinical decisions are based on recommendations published by Pastores et al., that define an optimal response (OR) if at least five of six therapeutic goals described in the six domains of GD1 (haemoglobin, platelets, splenic and hepatic volume, chitotriosidase and bone pain) are met and a non-optimal response (NOR) when they are not met[12]. Other important score that reflects variations in disease severity induced by treatment is the Gaucher Severity Score Index-type I (GauSSI-I). This score has a maximum of 42 points, distributed over six different domains (skeletal, hematologic, chitotriosidase, visceral, lung and neurological)[13]. Currently, dosage individualisation consists of selecting a maintenance dose at levels ranging between the initial recommended dose (60 U/kg/14days) and the minimum

established effective dose, which is 15 U/kg/14days. Despite an increase in the acceptance of this tendency, the most convenient dosage regimen design for ERT in patients with GD1 remains controversial in several aspects, such as the differential effect of enzymes in patients, the efficacy of a high-dose or a low-dose treatment schedule, the so-called poor responder patients in which increasing doses do not increase the rate of response, or administration of the ERT infusion once every 4 weeks in stable patients [6, 14-17].

Published studies on the pharmacokinetics of ERT[9, 10, 18, 19] have suggested that, after intravenous administration, the activity of circulating enzyme decreases rapidly in plasma because of the principal distribution model of the ERT is through uptake by mannose-6-phosphate (M6P) into peripheral monocytes and their distribution in tissues as macrophages. A direct extravasation to tissues through the vascular endothelium with subsequent uptake by macrophages is theoretically less important or null due to its high molecular weight (70KDa), which causes the tissue distribution of most proteins to be limited to the vascular or interstitial spaces[20].

Consequently, as monocyte/macrophage system, a type of polymorphonuclear leukocyte (monocytes in circulation and macrophages in tissues), are the target cells in GD1, hence the quantification of intra-leukocyte enzyme activity in patients treated with ERT could be used as a tool to monitor ERT. Moreover, intra-leukocyte enzymatic activity seems to show a linear correlation with the low or intermediate doses studied [21-23]. However, studies of high doses have suggested a non-linear pharmacokinetic[9, 10].

Thus, due to the variability in dose and frequency of ERT, the variability of response to ERT and the high cost of these therapies[24], this study was carried out in order to accurately assess the relative efficacy of treatment and to identify tools for ERT individualisation. For this purpose the relationship between GCase intra-leukocyte activity and clinical response in patients with GD1 treated with ERT was evaluated.

MATERIAL AND METHODS

A prospective follow-up, experimental multicentre study was conducted in four public hospitals from June 2014 to May 2015. The study was carried out with the approval of the Clinical Research Ethics Committee and after obtaining the informed consent of the patients.

Healthy individuals were included as controls to establish the normal cut-off points of GCase activity in peripheral blood leukocytes. Adult patients (>18 years) with GD1 confirmed by enzyme diagnosis who had been receiving stable doses (without changes of doses or frequencies) of ERT treatment for at least 12 months prior to inclusion in the study were included.

The ERT drugs (IMG, VELA and TALI) used in the study were prepared in 0.9% saline solution. Administration was carried out by nursing staff at each health centre for a period of 60 minutes according to the specifications of the Product Characteristics Summary[8-10].

Analytical assays

Two blood samples were taken from each patient in a tube with EDTA on two occasions: prior to the start of the infusion with the exogenous enzyme, this was done in order to calculate enzyme activity at time zero (Act_0); and 15 minutes post-infusion, to calculate enzyme activity at time 75 minutes (Act_{75}). An aliquot of leukocytes was extracted from each blood sample and analytical assay by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorometric detection were conducted: enzymatic reaction between GCase and the substrate 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside and sodium taurocholate as detergent with the product formed being 4-methylumbelliferone that is determined by HPLC with fluorimetric detection [25]. This analysis has an incubation time of 60 minutes. The enzymatic activity was expressed as the number of enzyme units per litre of solution (U/L).

Enzyme activity was measured in leukocytes (instead of monocytes) because activity of Gcase in monocyte represents 96% of total leukocyte approximately [26]. Analysing GCase in total leukocytes simplifies the analysis method for using

in routine clinical practice, allows comparing with the activity measure at diagnosis, which carries out in leukocytes [27].

Variables and GCCase-based markers

The variables studied were: monthly doses (U/kg/4w); ferritin (ng/mL); chitotriosidase (CT) (nmol/mL.h) or PARC/CCL18 (ng/mL) which are biomarkers secreted by the Gaucher cells and reflect the total body burden of storage cells in patients with GD1. GCCase-based markers were: ActD — endogenous enzyme activity measured at diagnosis and expressed as percentage with respect to the healthy individual activity — was quantified in a reference center at the time of diagnosis, using Raghavan's[28] and Chamoles[29] analytical methods for peripheral blood leukocytes and dried blood spot samples, respectively. These values were collected from medical history; Act₀ — enzyme activity from the residual exogenous enzyme in peripheral leukocytes after previous infusions plus each patient's own residual endogenous enzyme —, measured prior to ERT and analysed locally at our centre; Act₇₅ — enzyme activity measured as the maximum concentration reached in leukocytes after ERT—, measured 15 min after infusion and analysed locally at our centre; Act₇₅₋₀ — enzyme activity accumulated during the ERT—, calculated as the difference between Act₇₅ and Act₀. All the GCCase-based markers were expressed in raw value and in percentage with respect to the healthy individual activity.

Data on clinical variables that support patient follow-up were collected when patients entered the study using the following tools:

The clinical response to ERT was calculated based on criteria established by Pastores et al [12] that define an Optimal Response (OR) if 5/6 clinical criteria are met and a non-optimal response (NOR) when $\leq 4/6$ criteria are met. The 6 parameters considered to evaluate OR/NOR are: Haemoglobin ≥ 11.0 g/dL in women and ≥ 12.0 g/dL in men; Platelets $\geq 120 \cdot 10^9$ /L; Splenic volume < 5 times normal value; Hepatic volume < 1.25 times normal value; CT < 600 nmol/mL.h; bone involvement, valued as bone pain ≤ 2 on the EVA scale and without the appearance of bone crises in 6 months.

GauSSI-I is a reliable method for staging the severity of adult GD1, and sensitive method for measuring changes in disease severity caused by therapy. It has a maximum of 42 points, distributed over six different domains with unequally weighted parameters, skeletal (bone marrow infiltration and bone mineral component subdomains), hematologic and visceral domain represented 76% of points[13]. In this study we used several tools to measure clinical response, due to the different weight of each of the clinical domains in each one and because they are the most widely used scales in clinical practice for monitoring patients with GD.

Other clinical data collected were: physical and mental quality of life assessment using SF36 [30], the S-MRI scale for infiltration in the bone marrow [31] and the Zimran severity scale (SSI) [32] measured on diagnosis.

Statistical analysis

The statistical analysis was conducted using the SPSS v19 statistical software (IBM SPSS Inc., Chicago, USA). The receiver operating characteristic (ROC) curve was applied and the area under the curve (AUC) was studied according to the OR with the objective of detecting markers related to enzyme activity with the greatest discriminative capacity for obtaining the OR to the ERT. The AUC was used to distinguish whether a marker was non-predictive ($AUC \leq 0.5$), less predictive ($0.5 < AUC < 0.7$), moderately predictive ($0.7 < AUC < 0.9$), highly predictive ($0.9 < AUC < 1$)[33]. Sensitivity (Se), specificity (Sp) and cut-off points for the markers studied were analysed. The Chi-square (χ^2) test and relative risk of the cut-off point of markers was applied.

The mean difference in parameters studied according to the clinical response reached was analysed using non-parametric tests: the Mann-Whitney U-test.

The correlation studies for activity markers with GauSSI-I and other quantitative clinical variables and its cut-off point were conducted using the Spearman Rho correlation coefficient with bilateral signification.

RESULTS

Population and normal values

A total of 19 patients diagnosed with GD1 and 10 healthy individuals were included in the study. Mean total GCase intra-leukocyte activity in healthy patients measured by fluorometric detection was 121.84 U/L (CI95% 101.99 to 141.69; CV 8.2%). Table 1 shows the clinical, biometric and dosage characteristics of the 19 GD1 patients included in the study. Of the 19 GD1 patients, 4 of them had non-optimal response to ERT.

TABLE1. Baseline characteristics of patients receiving treatment with Enzyme replacement therapy

Patient nº	Sex	Genotype	Weight (kg)	Age at diagnosis (years)	Current age (years)	ActD (%)	Dose/kg (U/kg)	Dosing interval (days)	Time (years) in ERT	CT (nmol/ml.h)	ERT	GauSSI-I (0-44)	Response (items reached of 6)
1	M	N370S/G195W	55	6	26	2.94	17.00	28	20	1003	IMG	5	NOR (4/6)
2	W	N370S/L444P	67	15	33	0.14	23.88	14	19	641	IMG	6	OR (5/6)
3	W	N370S/L444P	75	21	52	2.00	32.00	14	16	380	IMG	7	NOR (4/6)
4	W	N370S/L444P	49	27	33	3.00	24.49	14	5	363	IMG	3	OR (6/6)
5	W	N370S/N370S	51	28	49	18.75	15.69	14	22	614	IMG	2	OR (5/6)
6	M	N370S/N370S	80	28	52	15.63	30.00	14	19	323	IMG	0	OR (6/6)
7	W	N370S/N370S	51	28	49	18.75	15.69	14	22	359	IMG	2	OR (6/6)
8	M	N370S/DELTA 55	90	8	20	15.00	26.67	14	13	321	IMG	2	OR (6/6)
9	W	N370S/L444P	63	20	49	6.25	31.75	14	14	29	VELA	4	OR (6/6)
10	W	N370S/unknown	53	21	64	27.00	67.92	14	12	1005	VELA	4	OR (5/6)
11	M	N370S/L444P	107	25	54	33.00	29.91	14	17	47	VELA	7	OR (5/6)
12	M	N370S/N370S	84	27	52	16.00	33.33	14	8	431	IMG	8	OR (5/6)
13	W	N370S/N188S	38	39	56	6.88	11.00	28	19	157	IMG	4	OR (5/6)
14	M	N370S/N188S	104	15	53	6.88	35.29	14	19	771	IMG	6	OR (5/6)
15	M	LEU375Arg/N370S	75	49	57	10.00	42.67	14	10	274	IMG	8	NOR (4/6)
16	W	L444P/Gly416Ser	77	27	71	2.50	20.78	14	18	40	IMG	9	NOR (4/6)
17	M	N370S/p.Arg159Trp	80	10	43	5.00	15.00	28	14	135	IMG	2	OR (5/6)
18	W	N370S/p.Arg159Trp	46	13	38	3.75	34.78	14	21	72	IMG	3	OR (6/6)
19	M	N370S/L444P	75	29	36	6.88	60.00	14	7	265	VELA	6	OR (6/6)

ERT: Enzyme replacement therapy; W:women; M: men; IMG: Imiglucerase; VELA: Velaglucerase; CT: chitotriosidase; GauSSI-I: the Gaucher Severity Score Index-type I; OR: optimal response; NOR: non optimal response

Relationship of GCase-based markers and variables with clinical response

The mean values of the GCase-based markers in percentage with respect to the healthy individual activity and variables studied, and the results of the ROC curve of the patients included in the study are shown in Table 2.

Similar results were observed in analysis with raw values and in analysis with percentage values; AUC were: $Act_0 = 0.505$ (CI95%: 0.254 a 0.757); $Act_{75} = 0.763$ (CI95%: 0.625 a 0.902); $Act_{75-0} = 0.837$ (CI95%: 0.635 a 0.938). The mean values according to optimal response were similar too: Act_0 was 69.59 (SD 67.07) and 38.18 (SD 50.92) for OR and NOR; Act_{75} was 189.35 (SD 140.21) and 71.47 (SD 75.89) for OR and NOR; Act_{75-0} was 119.76 (SD 103.98) and 33.28 (SD 28.56) for OR and NOR. As analysis with percentage values (table 2), the only marker with statistical significance was Act_{75-0} . Moderately predictive markers for optimal response (OR) were Act_{75} and Act_{75-0} but statistical significant differences on the AUC ROC curve were only detected for Act_{75-0} . Figure 1 represents ROC curve for Act_{75-0} .

The association between the cut-off point of 58% of the Act_{75-0} and OR to the treatment presented a Chi-square of 5.630 with statistical significance ($p=0.018$) and a relative risk of 1.800 (IC95% 1.003 to 3.229) representing a probability of 64% of obtaining an OR to ERT.

Table 2 also presents the average values and the dispersion (SD) of the variables and markers studied according to the OR/NOR of the patients and their statistical significance. Also the marker Act_{75-0} presented significant differences ($p<0.05$) between the mean values of patients with OR and NOR

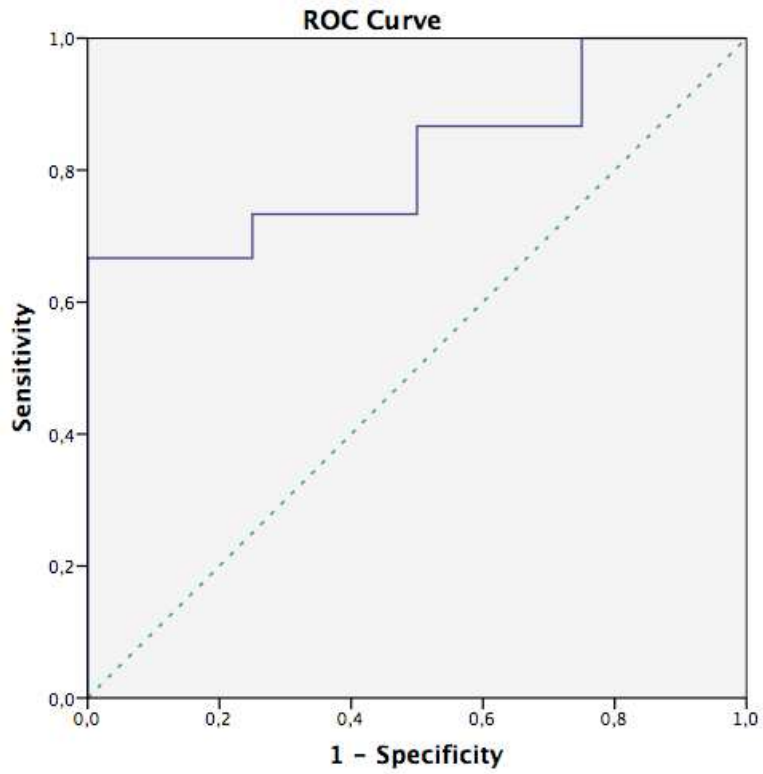


FIGURE.1 Receiver operating characteristic (ROC) curve for the Act₇₅₋₀ (in percentage value) with optimal response (shown by the solid lines). Diagonal reference line is showed by the dotted lines.

TABLE 2. Results of biomarkers studied according to the optimal response. Mean values and the dispersion of the variables and markers studied by fluorimetric detection according to the optimal or non-optimal response of the patients and its statistical significance

Parameter	Mean (SD)	Mean values according to Optimal Response			ROC CURVE			
		ERT Response	Mean (SD)	p-value	AUC (IC95%)	Cut off	Se (%)	Spe (%)
Clinical parameters								
Ferritin (ng/ml)	395.22 (410.37)	Optimal	405.79 (408.45)	0.845	0.536 (0.290-0.769)	270.00	57	75
		Non optimal	358.25 (478.52)					
ActD (%)	10.54 (9.07)	Optimal	12.19 (9.43)	0.057	0.807 (0.575-0.954)	2.97	93	75
		Non optimal	4.36 (3.78)					
CT (nmol/ml.h)	380.56 (310.91)	Optimal	368.87 (283.67)	0.733	0.483 (0.252- 0.719)	522.00	27	75
		Non optimal	424.00 (502.26)					
Therapy parameters								
Monthly doses (U/kg/4w)	57.51 (32.25)	Optimal	58.99 (33.78)	0.920	0.518 (0.190 -0.846)	45.00	73	50
		Non optimal	51.97 (29.38)					
Act ₀ (%) [†]	51.69 (52.58)	Optimal	57.12 (55.04)	0.230	0.700 (0.402-0.998)	22.00	73	75
		Non optimal	31.34 (41.79)					
Act ₇₅ (%) [‡]	135.04 (112.20)	Optimal	154.41 (115.07)	0.162	0.733 (0.484-0.906)	30.02	87	50
		Non optimal	58.65 (62.29)					
Act ₇₅₋₀ (%) [§]	83.35 (81.48)	Optimal	98.29 (85.34)	0.047*	0.817 (0.575-0.954)	57.98	67	100
		Non optimal	27.32 (23.44)					

† enzyme activity measured prior to ERT infusion; ‡ enzyme activity measured as the maximum concentration reached in leukocytes after ERT, measured 15 min after infusion; § enzyme activity accumulated during the ERT, calculated as the difference between Act₇₅ and Act₀. SD: Standard deviation; ROC receiver operating curve; AUC: area under curve; Se: sensitivity; Sp: specificity. * p<0.05 represents statistical significance of 5%.

Relationship of GCase-based markers with clinical variables

The correlation between the clinical variables and Act₇₅ and Act₇₅₋₀ (Table 3) was studied. Act₇₅ and Act₇₅₋₀ presented significant and positive correlation with ActD. GauSSI-I showed negative and significant correlation with Act₇₅. The rest of the clinical variables presented non-significant negative linear correlation with Act₇₅ and Act₇₅₋₀. Table 3 also shows the mean values of the individual clinical variables according to the cut-off point of 58% Act₇₅₋₀. ActD showed significant differences.

TABLE 3. The correlation of the quantitative clinical variables and the Act₇₅(%) and the Act₇₅₋₀(%) and the averages of the individual clinical variables according to the cut-off point of 58% Act₇₅₋₀.

Variable	Mean (SD)	Correlation with		Mean according Act ₇₅₋₀		
		Act ₇₅ , r (p-value)	Act ₇₅₋₀ , r (p-value)	≥58%	<58%	p-value
ActD	10.54 (9.07)	0.748 (0.0002)*	0.806 (0.00003)*	15.35	5.20	0.006*
ZimranDiag	7.45 (3.64)	-0.060 (0.861)	-0.060 (0.861)	7.83	7.00	0.662
Escala EVA	2.18 (2.46)	-0.104 (0.692)	-0.104 (0.692)	2.11	2.25	0.963
%SF36FIS	48.12 (8.47)	-0.248 (0.338)	-0.248 (0.338)	45.68	50.88	0.167
%SF36Ment	57.07 (8.70)	-0.103 (0.694)	-0.103 (0.694)	50.19	52.06	0.743
SMRI	6.16 (6.87)	-0.196 (0.421)	-0.266 (0.271)	5.60	6.78	0.400
GauSSI-I	4.63 (2.52)	-0.461 (0.044)*	-0.280 (0.246)	5.20	4.33	0.720

ZimDiag: Zimran severity scale (SSI) to the diagnosis; %SF36FIS y %SF36Ment are physical and mental quality of life assessment using SF36; GauSSI-I: the Gaucher Severity Score Index-type I; S-MRI: scale for infiltration in the bone marrow; r: correlation coefficient. (* p<0.05 represents statistical significance of 5%).

DISCUSSION

This was the first study to evaluate the relationship between intra-leukocyte enzymatic activity and clinical response in patients with GD1. It shows that GCase intra-leukocyte activity has correlation with clinical response: on the one hand, Act₇₅, the amount of enzyme inside the leukocyte 15-min post ERT infusion, has an inverse and significant relationship with GauSS-I, thus patients with low enzyme concentrations inside leukocyte post ERT infusion, have more severe Gaucher disease. Moreover Act₇₅ is a moderately predictive marker for optimal response based on criteria by Pastores et al. On the other hand, Act₇₅₋₀, representing the total drug exposure during infusion, is also a moderately predictive marker for optimal response showing statistical significant difference.

ERT for GD1 aims to replace deficient endogenous enzyme activity in patients. Therefore, it should be expected that ERT would achieve the resolution of clinical symptoms of the disease in all patients. However, there is evidence of high inter-individual variability in clinical response and patient evolution. It has been postulated that this is due to residual Gaucher cells that remain in the body and are associated with a highest risk of long-term complications[34, 35]. Results reported in this study could contribute to explain, at least in part, the non-optimal response to ERT observed in some patients, since due to the exogenous enzyme does not enter into the monocyte-macrophage system in sufficient concentrations and therefore does not reach the target organs and does not reverse the symptoms. A number of causes have been postulated for this low penetration of the exogenous enzyme into monocyte-macrophage of GD1 patients. These include different macrophage immunophenotypes[10], the high variability of the M6P receptor[36], the saturation of the mannose receptor at high doses[9] or that the enzyme is eliminated by peptidases or outside of the vascular endothelium at a faster rate than the rate of uptake by the monocyte[18, 37].

GCase activity measurement could give an answer to these questions because if the amount of enzyme inside the leukocyte post ERT infusion (endogenous plus exogenous enzyme) is known and that is distributed throughout the body by monocyte-macrophages system, it could predict the patient's clinical response. Results reported in this study suggest that Act₇₅ could act as this marker. Moreover, Act₇₅₋₀ calculated as the difference in GCase activity measured prior to ERT and 15 min post-infusion, reflects the amount of exogenous enzyme uptake by the leukocyte could be a tool to detect non-responders patients to ERT, because exogenous enzyme do not penetrate in leukocytes.

The mean values of Act₇₅₋₀ and Act₇₅ in patients who have OR to ERT have 98% (SD 85%) and 154% (SD 115%) of the enzyme activity of healthy individuals, while non-responding patients have much lower values as 27% (SD 23%) and 58% (SD 62%), respectively.

High between subjects variability in the maximum activity achieved after the infusion into the leukocytes, which is later distributed throughout the organism (Act₇₅) could be due to the patients have different values of endogenous enzyme and because the variability in the degree of exogenous enzyme uptake [18]. Therefore, the amount of enzyme that comes from the ERT (Act₇₅₋₀) in patients

with OR is virtually the same amount as healthy individuals have of endogenous enzyme. This data backs the postulated hypothesis that is based on a low response rate can be explained because patients' leukocytes take up less exogenous enzyme, thus this marker could detect and clarify non-responding patients.

The rising ROC curve reflects the trade-off existing between sensitivity and specificity and statistical significance was only observed with the marker Act₇₅₋₀ (fig.1) with a cut-off point of 58%. This result indicates that this marker is useful to detect patients who are poor responders although with a relatively low sensitivity. Thus 44% of the patients who have been defined as non-responders (<58%) will have OR and will, therefore, be false negatives. However, the relative risk of this marker with the OR is 1.8, thus patients with Act₇₅₋₀ over 58% have an increased probability of 64% of obtaining an OR to ERT.

Furthermore, analysis has been carried out with raw values and in percentage relative to the normal on in order to check the accuracy of data. Results are similar because the variability of enzyme in healthy individuals is very small in our study (CV 8%) and compared with others methods [(Raghavan CV=12,0%[28]; Peters CV=18,8%[25]; Beutler CV=21,4%[4]; Chamoles median 3.54U (min 2.16 and max5.29) [29]].

The current gold standard marker for diagnosis of GD1 is an ActD enzyme activity value in leukocytes under 30% of the mean value in leukocytes obtained from healthy individuals. This study shows that patients with accumulated activities in leukocytes that are greater than 58% have a higher probability of an optimal response to ERT. These results match, because GCase deficiency under 30% and an exogenous enzyme replacement of 58% give values close to those of a healthy individual.

In regard to the relationship between activity markers and the clinical variables, Act₇₅ showed a significant and negative correlation with GauSS-I, that is, low Act₇₅ values are correlated with greatest Gaucher Severity Score Index. However, patients included in this study have no a severe GD with mean GauSS-I of 4.6 of 42 points in the score (table 3).

Furthermore, Act₇₅ and Act₇₅₋₀ showed a significant and positive correlation with ActD. Similarly, Torralba et al. [38] have recently defined a new criterion for the prognosis of the disease in addition to the diagnosis based on ActD: low ActD values are correlated with the greatest severity of GD1. Results reported in this study indicate that ActD also shows correlation with the OR, although no statistical significance was obtained (Table 2), and there is a positive and linear correlation with Act₇₅₋₀ and Act₇₅ (Table 3), so that patients with low ActD also have low Act₇₅₋₀ and Act₇₅. In this sense, patients with an OR and NOR in our study have mean values of ActD of 12% and 4%, respectively. While these values do not reach statistical differentiation, probably due to the variability of the data and small population, it could be attributed that the patients with non-optimal response have much lower residual enzyme activities and a lower response to the ERT.

Based on the results of this study, if patients have low ActD even though high doses of ERT have been administered, Act₇₅₋₀ and Act₇₅ values will not increase sufficiently in patients, therefore, they will not achieve an OR to ERT.

Nevertheless, in this study there are three limitations, which must be taken into account; first, a small population, as is typical in rare diseases was included in the study, and all of them with a low to moderate severity of the disease, showing low score in GauSS-I. Second, the small number of NOR patients because the patients studied are being treated for a long time (mean 16 years) with ERT dose adjustments based on clinical guidelines. However, and despite of these limitations, reported results are the first and novel approach in this field and can be having important clinical implications in ERT individualization in GD patients; nowadays, time to optimal response could be delayed until 2 years with the economic cost that the treatment involves. These markers can lead to anticipate these decisions. Finally, a pharmacokinetic and pharmacodynamic modelling approach would allow understanding better the distribution of ERT in patients and confirming GCase enzymatic activity as a marker for therapeutic individualization.

In conclusion, the results of this study demonstrate that GCase-based activity markers (Act₇₅₋₀ and Act₇₅) have a good correlation with clinical response to ERT and therefore it is possible to hypothesize that it could provide supporting clinical data for dose management in GD1 patients.

FUNDING: This work was supported by Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research of Valencia, FISABIO (grant: UGP-15-222)

ACKNOWLEDGEMENTS: We thank the patients with GD1 and health care personnel from Pharmacy, Hematology and Internal Medicine departments.

REFERENCES

1. Beutler EGG, Scriver CR, Sly WS, Beaudet AL, Valle D, editor. Gaucher Disease. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2011.
2. Bodamer OA, Hung C. Laboratory and genetic evaluation of Gaucher disease. Wien Med Wochenschr. 2010;160:600-4.
3. Beutler E, Kuhl W. Detection of the defect of Gaucher's disease and its carrier state in peripheral-blood leucocytes. Lancet. 1970;1:612-3.
4. Beutler E, Kuhl W. The diagnosis of the adult type of Gaucher's disease and its carrier state by demonstration of deficiency of beta-glucosidase activity in peripheral blood leukocytes. J Lab Clin Med. 1970;76:747-55.
5. Beutler E, Demina A, Laubscher K, Garver P, Gelbart T, Balicki D, et al. The clinical course of treated and untreated Gaucher disease. A study of 45 patients. Blood Cells Mol Dis. 1995;21:86-108.
6. Beutler E. Enzyme replacement in Gaucher disease. PLoS Med. 2004;1:e21.
7. Martinez-Pomares L. The mannose receptor. Journal of leukocyte biology. 2012;92:1177-86.
8. Cerezyme (Imiglucerase) EPAR - Product Information. (1997).
9. Vpriv (Velaglucerase). EPAR- Product information. (2010).
10. CHMP. Eleyso. Taliglucerase alfa. European Assessment Report In: Use CfMPfH, editor. London; 2012.
11. Giraldo P. [Guidelines for type 1 Gaucher's disease]. Med Clin (Barc). 2011;137 Suppl 1:55-60.
12. Pastores GM, Weinreb NJ, Aerts H, Andria G, Cox TM, Giralto M, et al. Therapeutic goals in the treatment of Gaucher disease. Semin Hematol. 2004;41:4-14.
13. Di Rocco M, Giona F, Carubbi F, Linari S, Minichilli F, Brady RO, et al. A new severity score index for phenotypic classification and evaluation of responses to treatment in type I Gaucher disease. Haematologica. 2008;93:1211-8.
14. Figueroa ML, Rosenbloom BE, Kay AC, Garver P, Thurston DW, Koziol JA, et al. A less costly regimen of alglucerase to treat Gaucher's disease. N Engl J Med. 1992;327:1632-6.
15. Zimran A. How I treat Gaucher disease. Blood. 2011;118:1463-71.
16. Zimran A, Elstein D, Kannai R, Zevin S, Hadas-Halpern I, Levy-Lahad E, et al. Low-dose enzyme replacement therapy for Gaucher's disease: effects of age, sex, genotype, and clinical features on response to treatment. Am J Med. 1994;97:3-13.
17. Beutler E. Treatment regimens in Gaucher's disease. Lancet. 1995;346:581-2.
18. Gras-Colomer E, Martinez-Gomez MA, Moya-Gil A, Fernandez-Zarzoso M, Merino-Sanjuan M, Climente-Marti M. Cellular Uptake of Glucocerebrosidase in Gaucher Patients Receiving Enzyme Replacement Treatment. Clin Pharmacokinet. 2016;55:1103-13.
19. Colomer EG, Gomez MA, Alvarez AG, Marti MC, Moreno PL, Zarzoso MF, et al. Development and application to clinical practice of a validated HPLC method for the analysis of beta-glucocerebrosidase in Gaucher disease. J Pharm Biomed Anal. 2014;91:123-30.
20. Shah DK. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for the next generation protein therapeutics. Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics. 2015;42:553-71.
21. Zimran A, Loveday K, Fratazzi C, Elstein D. A pharmacokinetic analysis of a novel enzyme replacement therapy with Gene-Activated human glucocerebrosidase (GA-GCB) in patients with type 1 Gaucher disease. Blood Cells Mol Dis. 2007;39:115-8.
22. Abbas R, Park G, Damle B, Chertkoff R, Alon S. Pharmacokinetics of Novel Plant Cell-Expressed Taliglucerase Alfa in Adult and Pediatric Patients with Gaucher Disease. PLoS One. 2015;10:e0128986.

23. Gras-Colomer E, Martinez-Gomez MA, Moya-Gil A, Fernandez-Zarzoso M, Merino-Sanjuan M, Climente-Marti M. Cellular Uptake of Glucocerebrosidase in Gaucher Patients Receiving Enzyme Replacement Treatment. *Clin Pharmacokinet*. 2016.
24. Campillo-Artero C, Del Llano J, Poveda JL. Risk sharing agreements: with orphan drugs? *Farm Hosp*. 2012;36:455-63.
25. Peters SP, Coyle P, Glew RH. Differentiation of beta-glucocerebrosidase from beta-glucosidase in human tissues using sodium taurocholate. *Arch Biochem Biophys*. 1976;175:569-82.
26. Berger J, Lecourt S, Vanneaux V, Rapatel C, Boisgard S, Caillaud C, et al. Glucocerebrosidase deficiency dramatically impairs human bone marrow haematopoiesis in an in vitro model of Gaucher disease. *Br J Haematol*. 2010;150:93-101.
27. Aerts JM, Kallemeijn WW, Wegdam W, Joao Ferraz M, van Breemen MJ, Dekker N, et al. Biomarkers in the diagnosis of lysosomal storage disorders: proteins, lipids, and inhibitors. *J Inherit Metab Dis*. 2011;34:605-19.
28. Raghavan SS, Topol J, Kolodny EH. Leukocyte beta-glucosidase in homozygotes and heterozygotes for Gaucher disease. *Am J Hum Genet*. 1980;32:158-73.
29. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Gaucher and Niemann-Pick diseases--enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnoses in newborn-screening cards. *Clin Chim Acta*. 2002;317:191-7.
30. Alonso J, Prieto L, Anto JM. [The Spanish version of the SF-36 Health Survey (the SF-36 health questionnaire): an instrument for measuring clinical results]. *Med Clin (Barc)*. 1995;104:771-6.
31. Roca M, Mota J, Alfonso P, Pocovi M, Giraldo P. S-MRI score: A simple method for assessing bone marrow involvement in Gaucher disease. *Eur J Radiol*. 2007;62:132-7.
32. Zimran A, Kay A, Gelbart T, Garver P, Thurston D, Saven A, et al. Gaucher disease. Clinical, laboratory, radiologic, and genetic features of 53 patients. *Medicine*. 1992;71:337-53.
33. Greiner M, Pfeiffer D, Fawcett SM, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests.
34. van Dussen L, Hendriks EJ, Groener JE, Boot RG, Hollak CE, Aerts JM. Value of plasma chitotriosidase to assess non-neuronopathic Gaucher disease severity and progression in the era of enzyme replacement therapy. *J Inherit Metab Dis*. 2014;37:991-1001.
35. de Fost M, van Noesel CJ, Aerts JM, Maas M, Poll RG, Hollak CE. Persistent bone disease in adult type 1 Gaucher disease despite increasing doses of enzyme replacement therapy. *Haematologica*. 2008;93:1119-20.
36. Pandey MK, Grabowski GA. Immunological cells and functions in Gaucher disease. *Crit Rev Oncog*. 2013;18:197-220.
37. Xu YH, Sun Y, Barnes S, Grabowski GA. Comparative therapeutic effects of velaglucerase alfa and imiglucerase in a Gaucher disease mouse model. *PLoS One*. 2010;5:e10750.
38. Torralba MA, Olivera S, Bureo JC, Dalmau J, Nunez R, Leon P, et al. Residual enzymatic activity as a prognostic factor in patients with Gaucher disease type 1: correlation with Zimran and GAUSS-I index and the severity of bone disease. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 2016;109:449-52.

CAPÍTULO IV.

Glucocerebrosidase activity for enzyme replacement therapy monitoring in
Gaucher disease

Gras-Colomer E, Fernandez-Zarzoso M, Climente-Martí M, Merino-Sanjuan M.

Annals of Pharmacotherapy

Submitted

INTRODUCTION

Gaucher disease (GD) is a hereditary lysosomal storage disease caused by the deficiency of the β -glucocerebrosidase enzyme (GCase). The accumulation of glucocerebroside inside the lysosomes of macrophages infiltrates in the tissues producing a multisystemic disorder[1]. Treatment for GD is based on the administration of enzyme replacement therapy (ERT), which implies exogenous administration of the deficient enzyme. The best dosing schedule for ERT is still controversial, due to the variability in the selection of dose (between 15 U/kg to 60 U/kg) and in the frequency of administration (every 4 weeks or 2 weeks). Therefore, the selection of the appropriate dose and clinical decisions are based on clinical parameters[2], that define an Optimal Response (OR) or non-optimal response (NOR) to ERT, and a score that reflects variations in disease severity induced by treatment, named Gaucher Severity Score Index-type I (GauSSI-I)[3] (table 1).

Recent reports have described that quantification of intra-leukocyte GCase activity has demonstrated a good correlation with clinical response to ERT[4]; GCase-based markers are Act₇₅ (enzyme activity measured as the maximum concentration reached in leukocytes after ERT; the goal value is the same value than an healthy individual: 100%) and Act₇₅₋₀ (enzyme activity accumulated during the ERT; the goal value is $\geq 58\%$ with respect to the healthy individual activity). We report two cases of individualization of ERT thorough GCase-based markers.

CASE REPORTS

Subject 1: A 49-year-old man was diagnosed with GD at the age of 40 years with a residual enzyme activity at the diagnosis of 16% and genetic study GBA gene of [N370S]/[N370S]. He presented severe bone lesions (hip replacement and osteonecrosis), splenomegaly and thrombopenia. He began ERT treatment

(Imiglucerase) in 2009 at a dosage of 30U/kg (2,400 U) every other week. In March 2016, he presented deterioration (an increase of bone pain and splenic volume) with NOR to ERT (table 1) and GCCase-based markers were: Act₇₅ was 41% and Act₇₅₋₀ was 29%. Therefore dose increase was implemented to 3200 U (45U/kg) every other week (dose increase of 33%) as clinical guideline recommended[5]. After a dosage adjustment, GCCase-based markers were: Act₇₅ increased from 41% to 108% (reaching similar levels to a healthy individual) and the Act₇₅₋₀ increased from 29% to 61% (in goal value). At 9 months of follow-up, the patient showed an improvement in clinical response with increased platelets, an improvement in bone pain with reduced medullar infiltration, reduction in the EVA scale, and reduction of CT (table 1).

Subject 2: A 53-years-old man was diagnosed with GD1 at the age of 15 years with a residual enzymatic activity of 6.8% and genetic study of GBA gene of [N370S]/[N188S]. He began ERT treatment (Imiglucerase) in 1996 at dosage of 60U/kg, with later dosage individualization to 3600U (38 U/kg; 95Kg) every other week. At April 2015, the patient presented stable symptoms and OR to treatment only showed previous osteonecrosis but not reversible (table 1). GCCase-based markers were analysed: Act₇₅ was 134% and Act₇₅₋₀ was 85% (superior to therapeutic goal). Base on stability criteria and GCCase-based markers, dose was reduced to 2800 U/every other week (29 U/kg; 105Kg) as clinical guideline recommended[5]. After the dosage modification, 2, GCCase-based markers were analysed: Act₇₅ decreased to 75% and Act₇₅₋₀ to 63% (keeping goal value >58%). Clinical follow-up after 8 months showed stability and even improvement of clinical parameters (table 1).

Table 1. Results of case reports

		Subject 1		Subject 2		
Dates monitoring		Mar/2016	Dec/2016	Apr/2015	Dec/2015	
ERT doses		2400U (30U/kg)	3200U (45U/kg)	3600U (38U/kg)	2800U (29U/kg)	
Clinical Response		NOR	OR	OR	OR	
1	Haemoglobin \geq 11.0g/dL in women and \geq 12.0g/dL in men	✓	✓	✓	✓	
2	Platelets \geq 120·10 ⁹ /L	✗	✓	✓	✓	
3	Hepatic volume (< 1,5n normal value)	✓	✓	✓	✓	
4	Splenic volume (< 5n normal value)	✗	✗	✓	✓	
5	Prevent bone crises, osteonecrosis and subchondral joint collapse.	✗	✓	✓	✓	
	Lessen or eliminate bone pain (\leq 2 EVA scale)	7 ✗	4 ✓	0 ✓	0 ✓	
6	CT (nmol/h/mL) < 600	250 ✓	47 ✓	771 ✗	491 ✓	
GauSSI-I		15/42	12/42	9/42	7/42	
1	Skeletal (0-15)	12	10	8	7	
2	Hematologic (0-10)	2	1	0	0	
3	Biomarker (CT) (0-3)	0	0	1	0	
4	Visceral	Splenic (0-6)	1	1	0	0
		Hepatic (0-5)	0	0	0	0
5	Lung (0-4)	0	0	0	0	
6	Neurological 0-3	0	0	0	0	

Clinical response to ERT is defined as Optimal Response if 5/6 clinical criteria are met and a non-optimal response when \leq 4/6 criteria are met; GauSSI-I: Gaucher Severity Score Index-type I;

DISCUSSION

Nowadays, a clinician's decision to change the dose is implemented based on the history and objective evidence of disease status; this ERT individualization consists of modifying dose in small increments or reductions (15%–25%), and patients are closely monitoring. If patients fail to maintain or reach therapeutic goals, then an increase or return to previous dose is considered[5, 2]. Despite individualization based on therapeutic goals lead to wait 12-24 months to objectify optimal or suboptimal response to treatment[2]. Moreover, dose reduction to the minimum effective dose is further complicated for clinicians when patient has reached therapeutic goals, because patient could get worse. Thus, due to the variability of

response to ERT and the high cost of these therapies, identify early markers for ERT individualization is an important challenge. These are the first case reports of individualization of ERT in GD1 that demonstrate the measurement of enzyme activity in leucocytes through Act₇₅ and Act₇₅₋₀ markers allow the individualization of ERT and therefore will allow to establish personalized treatments and more cost effective in patients with GD1[6]

REFERENCES

1. Beutler EGG, Scriver CR, Sly WS, Beaudet AL, Valle D, editor. Gaucher Disease. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2011.
2. Pastores GM, Weinreb NJ, Aerts H, Andria G, Cox TM, Giral M et al. Therapeutic goals in the treatment of Gaucher disease. *Semin Hematol.* 2004;41(4 Suppl 5):4-14.
3. Di Rocco M, Giona F, Carubbi F, Linari S, Minichilli F, Brady RO et al. A new severity score index for phenotypic classification and evaluation of responses to treatment in type I Gaucher disease. *Haematologica.* 2008;93(8):1211-8. doi:10.3324/haematol.12379.
4. Gras-Colomer E, Martinez-Gomez MA, Climente-Marti M, Fernandez-Zarzoso M, Almela-Tejedo M, Giner-Galvan V et al. Relationship between Glucocerebrosidase Activity and clinical response to Enzyme Replacement Therapy in patients with Gaucher Disease type I. *Basic & clinical pharmacology & toxicology.* 2018. doi:10.1111/bcpt.12977.
5. Andersson HC, Charrow J, Kaplan P, Mistry P, Pastores GM, Prakash-Cheng A et al. Individualization of long-term enzyme replacement therapy for Gaucher disease. *Genet Med.* 2005;7(2):105-10.
6. Gras-Colomer E, Martinez-Gomez MA, Moya-Gil A, Fernandez-Zarzoso M, Merino-Sanjuan M, Climente-Marti M. Cellular Uptake of Glucocerebrosidase in Gaucher Patients Receiving Enzyme Replacement Treatment. *Clin Pharmacokinet.* 2016. doi:10.1007/s40262-016-0387-2.

CAPÍTULO V.

Pharmacokinetics of enzymatic activity in Gaucher disease patients treated with enzyme replacement therapy.

Gras-Colomer E, Mangas-Sanjuán V, Martínez-Moreno J, a Climente-Martí M, Merino-Sanjuan M.

Draft

ABSTRACT

Gaucher disease (GD) is a recessively inherited lysosomal storage disorder caused by deficiency of a lysosomal enzyme named glucocerebrosidase (GBA1). Recently, important implication of others non-lysosomal glucocerebrosidases (GBA2 and GBA3) has been identified in GD pathology. Treatment for GD is based on the administration of recombinant glucocerebrosidase (rGBA1), named enzyme replacement therapy (ERT), with wide variability in dose and frequency due to the variability of response. The aim of our study is to characterize the population pharmacokinetics of enzyme activity and identify factors, which could significantly impact the ERT pharmacokinetic characteristics in GD patients. Nonlinear mixed-effects modelling method was used to develop the population pharmacokinetic model with NONMEM software. Observed leucocytes enzyme activities were accurately described by 1-compartment PK model with first-order elimination and a zero-order rate constant of glucocerebrosidase activity. The final model included as significant covariates the number of monocytes at baseline on clearance and, ERT drug and endogenous GBA1 activity on baseline glucocerebrosidase activity. Thus, due to the absence of previous population pharmacokinetic models of enzymatic activity, the information obtained from this study could be important clinical implications in ERT individualization in GD patients.

INTRODUCTION

Gaucher disease (GD) is a recessively inherited lysosomal storage disorder caused by deficiency of a lysosomal enzyme, glucocerebrosidase (GBA1), which leads to insufficient elimination of cellular glucosylceramide[1] and its subsequent storage in cell lysosomes from the monocyte-macrophage system [2, 3]. Pathologic accumulation of glucosylceramide (or other substrates, such as glucosylsphingosine) in the lysosomes of tissue macrophages (Gaucher cells), results in splenomegaly, hepatomegaly and multiple forms of skeletal disease. Recently, it has been identified another metabolic pathway for substrate accumulation in GD, where GBA2 and GBA3 metabolize the accumulated substrates, which could have an important implication in GD[4, 5].

Traditionally three clinical phenotypes have been described: type 1 (GD1), the prevalent form usually defined by the absence of central nervous system impairment; and types 2 and 3, both rare and severe, resulting in central neurological involvement[6, 7]. GD1 diagnosis is confirmed by the detection of low GBA1 activity, usually less than 30% of the normal value in peripheral leukocytes[6, 8, 9].

Treatment for GD1 is based on the administration of recombinant glucocerebrosidase (rGBA1) named enzyme replacement therapy (ERT), which improves haematological parameters and leads to a stabilisation or reduction of bone and visceral lesions[10]. The therapeutic enzyme is designed to be internalized by monocyte/macrophage through receptor-mediated endocytosis via mannosa receptors. This receptor is a member of the family type lectin receptor expressed in macrophages/monocytes, dendritic cells and hepatic cells and lymphatic endothelium[11]. Biomarkers based on glucocerebrosidase activity in leucocytes have a good correlation with clinical response to ERT, allowing its use for therapeutic individualization during ERT treatment [12-14]. There are currently three drugs marketed for ERT: imiglucerase (IMG; Cerezyme® Genzyme, Sanofi Company), velaglucerase (VELA; Vprip® Shire Pharmaceuticals SL) and taliglucerase (TALI; Elelyso®, Pfizer SLU). Use of TALI in Europe is restricted [15-17]. The pivotal clinical trial of VELA vs IMG in naïve patients showed similar

objective improvements in the established follow-up markers [18]. Other authors have observed stability, or even improvement, in response parameters after changing from IMG to VELA [19, 20]. However, there are no studies performing a direct comparison between both enzymes in patients with bone disease, which is the most disabling domain.

Currently, dosage individualisation consists of selecting a maintenance dose at levels ranging between the initial recommended dose (60 U/kg/14days) and the minimum established effective dose, which is 15 U/kg/14days. However, the most convenient dosage regimen design for ERT in patients with GD1 remains controversial in several aspects, such as (i) the differential effect of enzymes in patients; (ii) the efficacy of a high-dose or a low-dose treatment schedule; (iii) the so-called poor responder patients, where the rate of response does not improve as increasing dose; and, (iv) administration of the ERT infusion once every 4 weeks in stable patients [10, 21-24]. Although the pharmacokinetics of either enzyme have been hardly studied in GD1 patients through non-compartmental analysis (NCA) [25, 26], the results would not justify the selection of the established posology (infusion every two weeks), or the suggestion of extending the treatment interval period to 3-4 weeks, according to the clinical response observed by some authors [27]. Conclusively, the lack of adequate consensus regarding individualization in GD1 promotes nowadays the individualization based on therapeutic goals lead to wait 12-24 months to objectify response to treatment with the economic cost that the treatment involves [2].

The use of non-linear mixed effects modelling (NLME) have been widely applied in the recent years on therapeutic drug monitoring (TDM), characterizing quantitatively the typical time-course profile and the different sources of variability observed in the target population in order to improve clinical outcome, particularly relevant for rare diseases[28-30], where sparse sampling and low number of patients recruited are expected. However, no population pharmacokinetic studies of GBA1 in GD patients have been published. Therefore, the aim of this study is to develop a population pharmacokinetic model of enzyme activity in GD1 patients after intravenous (IV) administration of IMG and VELA

and, to assess the relationship between patient characteristics and individual PK parameters in order to propose dose adjustments according to patient covariate values.

METHODS

1. Patient eligibility criteria and study design

A prospective follow-up, semi-experimental multicentre study was conducted in four public hospitals from June 2014 to December 2016. The study was conducted in accordance with principles for human experimentation as defined in the Declaration of Helsinki and was approved by the Clinical Research Ethics Committee of each study centre and by the Competent Authority of the country. Informed consent was obtained from each subject after being told about the potential risks and benefits, as well as the investigational nature of the study.

Adult patients (>18 years) with GD1 confirmed by enzyme diagnosis and in treatment with IMG, VELA for at least 12 months prior to inclusion in the study, were included. Patients with GD with neurological involvement (type II and III), positive for hepatitis B, antigen C or human immunodeficiency virus and pregnant or lactating women were excluded.

The ERT drugs (IMG or VELA) used in the study were prepared in 0.9% saline solution. Administration was carried out by nursing staff at each health centre for a period of 60 minutes according to the specifications of the Product Characteristics Summary[15, 16].

2. Analytical method

Two blood samples were collected in a tube with EDTA in two-stages: prior to the start of the infusion of the exogenous enzyme to calculate enzyme activity at start time (Act0) and at 15 minutes post-infusion to calculate enzyme activity at time 75 minutes (Act75). An aliquot of leukocytes was extracted from each sample and the analytical assay was conducted. Enzymatic reaction between enzyme and the substrate 4-methylumbelliferyl- β -D-glucoside and sodium taurocholate as detergent with the product formed being 4-methylumbelliferone that is

determined by HPLC with fluorimetric detection [14, 31]. This analysis have an incubation time of one hour and is not lisosomal glucocerebrosidase specific[32], measuring glucocerebrosidase activity (GCase) of GBA1 (endogenous GBA1 and rGBA1), GBA2 and GBA3.

3. Data analysis

Non-linear mixed-effects modelling by extended least squares regression using the first-order conditional estimation with interaction (FOCE+I) method was implemented with the NONMEM 7.3 software package (ICON, Hanover, MD, USA)[33]. GCase observations were logarithmically transformed for the analysis.

Model building process was performed sequentially. First, a base population PK model was developed in order to provide an adequate characterization of the time-course of glucocerebrosidase activity observations after IV administration of rGBA1. Secondly, a covariate assessment through stepwise procedure was performed to partially explain the inter-individual variability (IIV) in the PK parameters. Then, the final population PK model was properly evaluated and qualified through simulation-based methodologies.

Model selection was mainly based on the log-likelihood ratio test (for two nested models a decrease in 3.84 points in $-2 \times \log(\text{likelihood})$ ($-2LL$) for an extra added parameter was considered significant at the 5% level), and visual exploration of goodness of fit plots (GOF).

For graphical and statistical analysis, the R software (v2.15.2) (<http://cran.r-project.org>, version 2.6.0) and RStudio (v0.97.248; Boston, MA, USA) were used.

4. Population Pharmacokinetic model

GCase in leukocytes were described with compartmental models parameterized in apparent volumes of distribution, and first-order distribution and elimination clearances. A zero-order rate constant (k_0) was also considered in order to physiologically describe the endogenous synthesis of GCase humans.

IIV on PK model parameters was modeled exponentially, and residual variability was described with an additive model on the logarithmic scale. Covariance matrix structures including diagonal and blocked diagonal structures were evaluated after the completion of covariate model building, as deemed appropriate. Estimates of variability for exponential error models for the IIV were reported as % coefficient of variation (%CV) calculated as eq.1

$$\sqrt{\omega^2} * 100 . \text{Eq 1.}$$

5. Covariate analysis

The covariate analysis was carried out by the stepwise covariate modelling (SCM) implemented in PsN [24]. The significance of potential covariates was systematically evaluated in a stepwise forward selection ($\Delta\text{OFV} < 3.84$ points, $p < 0.05$) one at a time. A full model was determined when no additional improvement was detected by including additional covariates. Subsequently, selected covariate-parameter relationships were evaluated by backward deletion procedure; if the exclusion of a fixed effect resulted in an increase in of less 6.63 ($\Delta\text{OFV} < 6.63$ points, $p < 0.01$), the covariate was deleted from the model. This was repeated until no more relationships could be removed, at which point the SCM procedure finished.

All continuous covariates were normalized to the population median values, with continuous covariates modelled using the general equation (Eq. 2):

$$\theta_i = \theta_{\text{Pop}} (1 + \theta_{\text{cov}}(\text{COV}_i - \text{COV}_m)) \quad \text{Eq 2.}$$

where θ_i is the individual model-predicted pharmacokinetic parameter for an individual with covariate value COV_i , θ_{pop} represents the population central tendency for the pharmacokinetic parameter, COV_m represents the population median value of the covariate and θ_{cov} represents the covariate effect.

6. Model qualification

Model qualification was performed through prediction-corrected visual predictive checks (pc-VPC)[34]. For each study design, one thousand simulated datasets were generated. At specific sampling time periods, the 2.5th, 50th, and 97.5th percentiles of the simulated data were calculated. Then, the 95% prediction intervals of the 2.5th, 50th, and 97.5th percentiles were computed and displayed graphically together with the experimental data. Parameter precision was evaluated from the analysis of one thousand simulated non-parametric bootstrap datasets. The final model parameter estimates were compared to the mean and 95% confidence intervals (CI) of the non-parametric bootstrap replicates of the final model. If the final population PK parameter estimates fall into the 95% CI obtained from the bootstrap analysis and none of the 95% CI include the zero value, the model was considered unbiased. Pc-VPC and bootstrap analysis were performed using PsN[35] and Xpose version 4.5.3[36].

RESULTS

1. Population Pharmacokinetic model

A total number of 24 individuals with 64 GCase activities in leucocytes observations were included in the PK analysis (figure 1). Table 1 summarizes the baseline demographic and laboratory characteristics of the GD patients included in the dataset.

Table 1. Demographic characterization of patients

Parameter (unit)	Median (range or number)
Age (years)	49 (20-71)
Weight (kg)	67.5 (45.0-107.0)
Male/female	14/11
ActD (%)	6.88 (0.14-18.75)
ERT (IMG/TALI)	21/4
Dose ERT (U/kg)	32.9 (11.0-67.9)
Dosing interval (14/28days)	22/3
Monocyte (10^9 cell/L)	0.45 (0.19-0.84)

Results are expressed as median or range

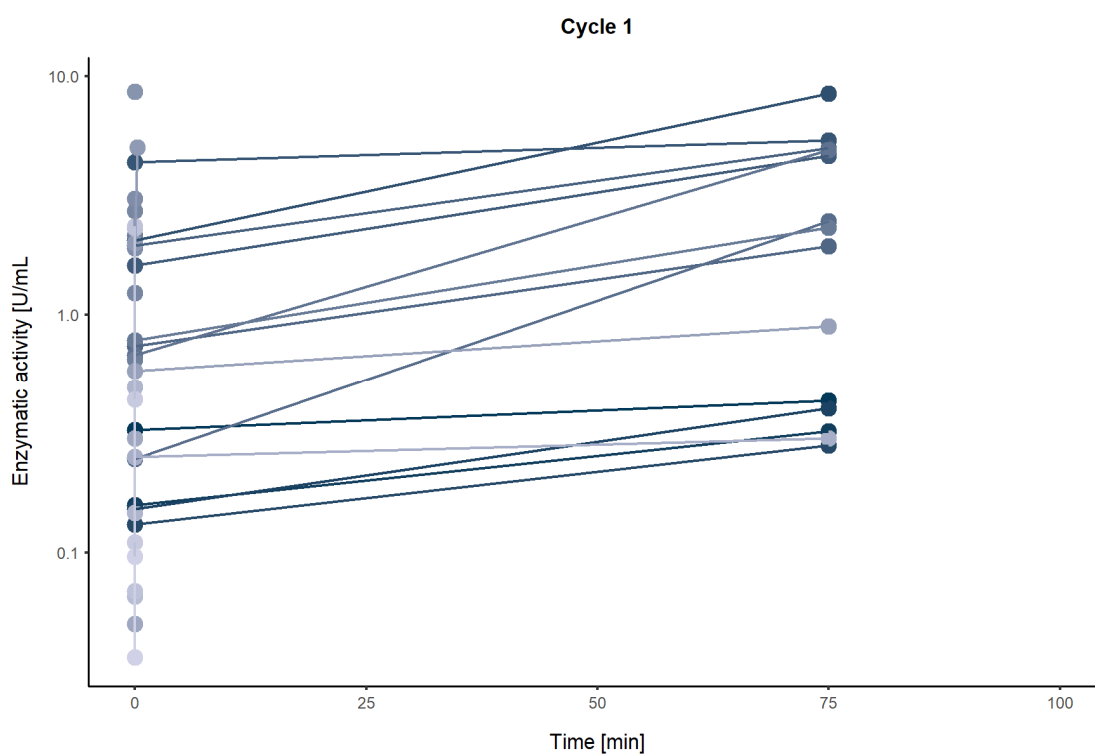


Figure 1. Scatter plot of enzyme activity of GCase versus time at first treatment cycle collected in this study.

The base population PK model was a one-compartment model with first-order elimination rate constant and a zero-order rate constant of GCase, which was implemented to describe leukocytes GCase activity time-course after 60 minutes IV perfusion administration of IMG and VELA in GD patients. A feedback mechanism using GCase levels were also explored on k_0 , but did not provided significant better fits ($p>0.05$). Additionally, other structural PK models were implemented, including two-compartment model and different elimination processes, but did not statistically improved the overall fit. IIV was included on total clearance (CL) and baseline endogenous GCase activity (BM). High IIV variability was estimated for CL (47%) and BM (134%). Low shrinkage values (<35%) were estimated for both parameters. The residual error was modelled additively in the log-scale. Final parameter estimates from the base population PK model and bootstrap results are summarized in Table 2. All parameters in the model were estimated with good precision based on the values of the results from the bootstrap analysis

Table 2. The parameter estimates of the structural and final model.

STRUCTURAL model		FINAL model				
Parameter	Typical value	Typical value	Bootstrap results			
			Median	2.5 , 97.5th		
CL (L/d)	35.4	55.7	48.72	[24.66, 59.94]		
V (L)	0.327	0.741	0.630	[0.169, 1.308]		
BM (U)	145	539	469	[189, 254]		
BM*ActD	-	0.137	0.134	[0.099, 0.145]		
BM*ERT	-	-0.760	-0.632	[-0.929, 0.286]		
CL*MONOC	-	-1.340	-1.257	[-1.351, -6.771]		
Inter-individual variability						
	VC(%)	Shr(%)	VC(%)	Shr(%)	VC(%)	2.5 , 97.5th
ω^2 CL	47.4	34	51.0	25	52.98	[32.291, 89.89]
ω^2 BM	134.5	3	85.3	9	78.14	[21.75, 109.07]
Residual variability						
σ^2	-	28	-	23	-	-

ERT: Enzyme replacement therapy; IMG: Imiglucerase; VELA: Velaglucerase;

2. Covariate analysis

The covariates tested in the base population PK model for their effects on CL and BM were sex, weight, ActD (endogenous GBA1 deficient activity, expressed as percentage with respect to the healthy individual activity, that was quantified in a reference center at the time of diagnosis previous ERT treatment[37, 38]), ERT (IMG or VELA), monocytes in blood sample (10^9 cell/L). An exploratory analysis was conducted in order to understand the likely relationships between the selected covariates and individual predicted population PK parameters (supplementary material Figures 1S and 2S). The final covariate-parameter relationships remaining after SCM procedure were monocyte levels on CL and, ActD and ERT drug on BM. The individual CL in patients with the highest levels of monocyte (0.84×10^9 cell/L) decreased a 59% compared to the typical CL, whereas individuals at the low range of monocytes (0.19×10^9 cell/L) showed an individual CL value 28% higher than the typical CL parameter (55.7 L/d). A 50% reduction of the IIV on BM compared to the base model was observed, indicating that a significant proportion of the variance on BM could be explained by the included covariates. The BM in GD patients receiving TES equal 2 (VELA) was 76% lower compared to TES equal 1 (IMG). A proportional relationship was established between ActD and BM, where a 13.7% BM change was estimated per unit of change in ActD.

3. Final population PK model

The final population PK model developed was able to describe the general tendency and individual profiles of GCase activity in GD patients recruited based on the GOF and individual experimental/predicted plots (Figures 2 and 3, respectively). Final parameter estimates were summarized in Table 2, including the results from the bootstrap analysis. None of the 2.5-97.5th percentiles included the null value, and the parameter values estimated are within the 2.5-97.5th percentiles from the bootstrap analysis, which indicates that all parameters were estimated with good precision. Figure 4 depicted the pc-VPC for longitudinal GCase activity observations, showing the adequacy of the final population PK model and

the lack of systemic bias. The typical values of V and CL were 0.74 L and 55.7 L/d, showing low distribution to deep peripheral compartments and high clearance from plasma compartment (half-life = 0.22 h). A zero-order rate constant of GBA1 was incorporated in the final model, as $CL/V \cdot BM$, to describe the homeostatic balance of the endogenous enzyme. IIV of CL and BM were 51% and 85%, respectively. The eta- and eps-shrinkage values remain low (<30%).

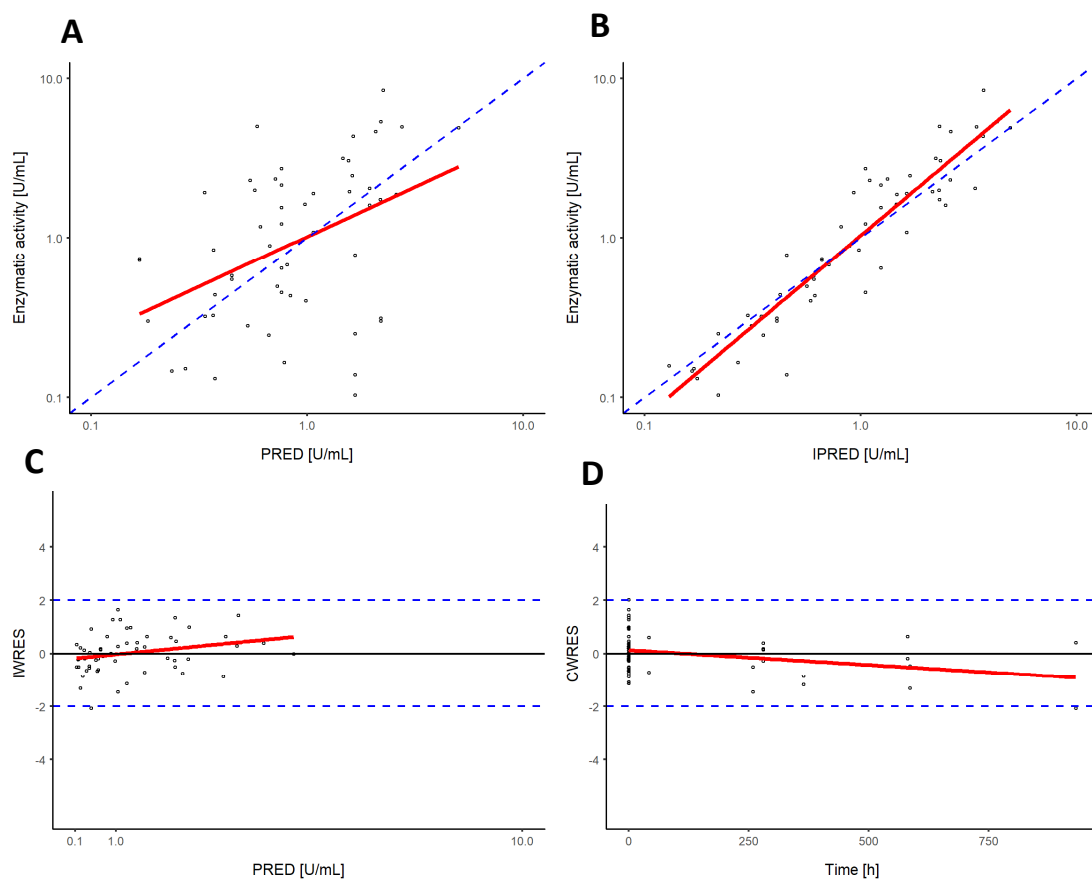


Figure 2. Final goodness-of-fit of the final population pharmacokinetic model. Scatter plot of the observed enzymatic activity (GCASE) vs. the population model predictions (upper left) and the individual model predictions (upper right), scatter plots of the individual weighted residual vs. individual predictions (lower left) and, conditional weighted residuals vs. time (lower right).

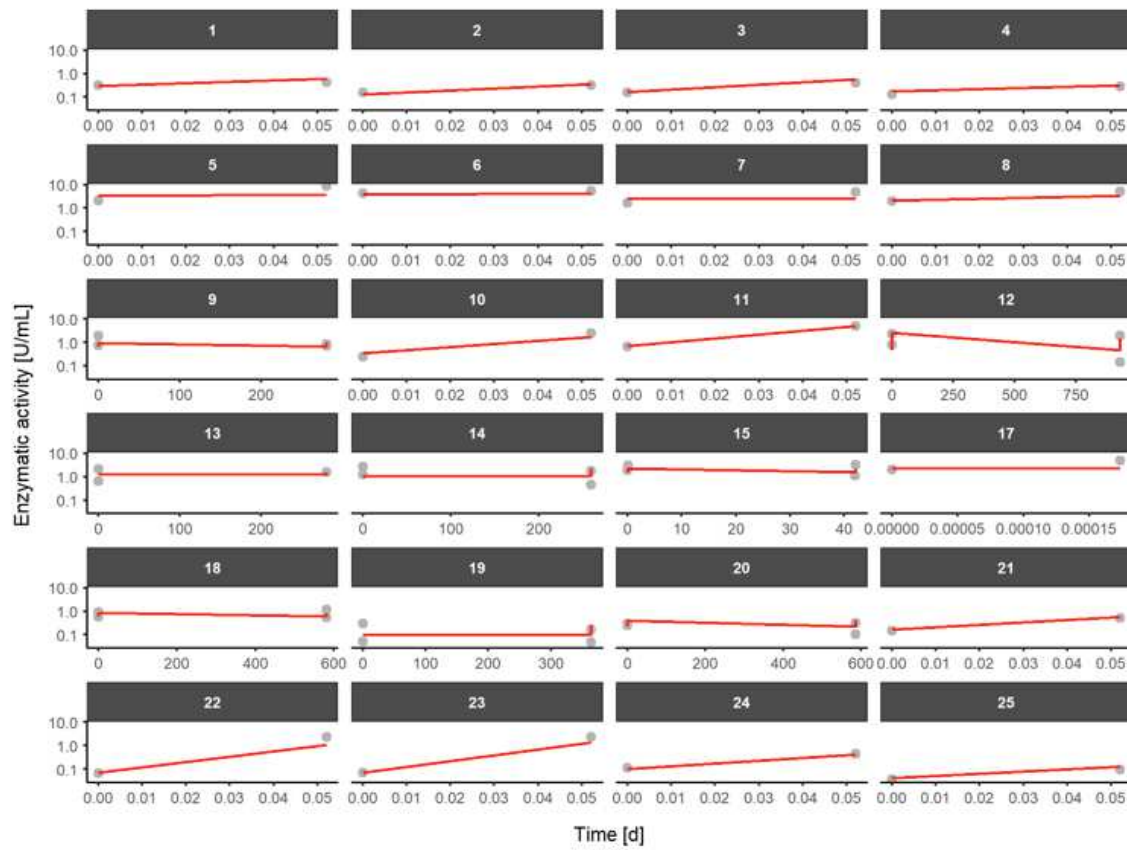


Figure 3. Model performance of the final pharmacokinetic model. Individual observed (dots) and predicted (red line) enzymatic activity profiles.

Prediction-Corrected VPC | Final Model

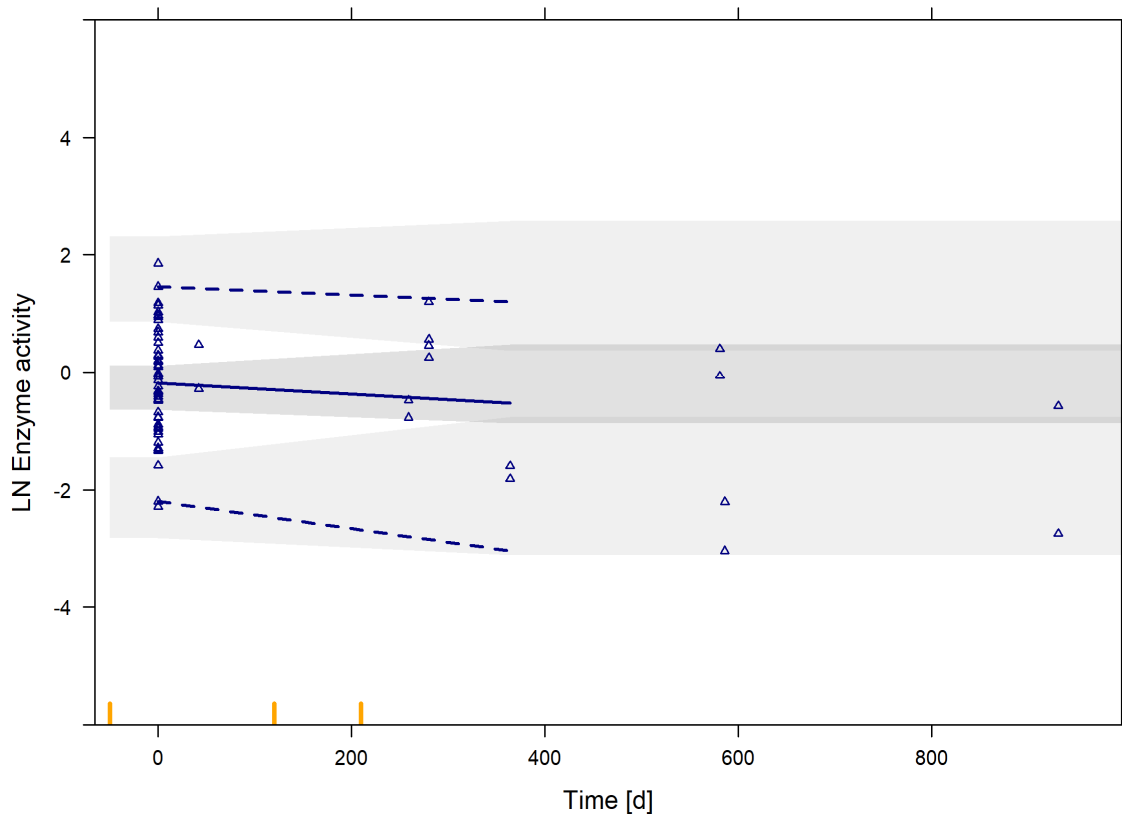


Figure 4. Prediction corrected visual predicted check from 1000 simulated data sets for the final population pharmacokinetic model. The 95% confidence interval (CI) of the median of the simulated data is represented by dark grey area. The 95%CI of the 2.5th and 97.5th percentiles of the simulated data are represented by the light grey areas. The observed data are represented by the triangles. The median of the observed data is represented by solid line. The 2.5th and 97,5th percentiles of the observed data are represented by dashed lines.

DISCUSION

In this article a population PK model has been developed to characterize the enzyme activity in leukocytes in GD patients treated with ERT. The observed enzymatic activity data were adequately described by a 1-compartment PK model with first-order elimination and a zero-order rate constant of GCase. The final model included as significant covariates the number of monocytes at baseline on clearance and, ERT drug and endogenous GBA1 activity on baseline GCase activity.

The distribution model considered for rGBA1 in our study consists of internalizing by peripheral leucocytes (monocyte is a type of leukocyte) from plasma and it is distributed by tissue macrophages to target organs such as the liver, spleen and bone [12, 13]; In this sense, rGBA1 also can disappear rapidly from plasma by proteolytic excision by plasma proteases or binding to cellular receptors and endogenous proteins and crossing the vascular barrier into interstitial fluid of tissues. In our study the typical value of the V was 0.741 L, fewer than extracellular fluid (approximately 15L in a 70-kg individual), probably because the model considers only the distribution of leukocytes because the enzyme is transported to the body tissues inside the leukocytes. It has been published the volume of peptides is usually small and limited to the extracellular space [39], which is in accordance with the current results. However, after rGBA1 infusion in rats, a large portion (80%) was recovered in the liver [40, 41], particularly in cells which are known to express the mannose-receptor (hepatic sinusoidal endothelial and kuppfer cells) [42]; in addition, spleen (1.9–2.6%) and bone marrow (1.8 –2.3%) contain the other part of the infused enzyme [43]. Therefore, despite the internalization of rGBA1 by peripheral monocytes through mannose receptor and subsequent cellular transit through the endothelium to reach the tissues in the form of macrophages, distribution of rGBA1 to the liver as a free drug cannot be exclude, due to the high irrigation rate and discontinuous endothelium in liver. Thus, this hypothesis would explain the high concentrations of rGBA1 reached in liver compared to other organ[44].

These previous PK studies showed ranges of rGBA1 for CL about 20-30L/h, and plasma $t_{1/2}$ between 10-15 min [25, 26]. Therapeutic peptides are generally eliminated through the same metabolic pathways as endogenous peptides, resulting in amino acids that are reutilized in the endogenous amino acid pool for de novo peptide synthesis [45]. Previous studies indicate that after ERT administration, enzyme activity decreases rapidly in plasma [25, 46], since it is bound by the mannose-6-phosphate (M6P) receptors of the monocyte-macrophage system with a biphasic decay with short $t_{1/2}$ of 45 min in serum [41, 47]. Then, GBA1 is distributed to target organs such as liver, spleen and bone marrow [48]. Additionally, this rapid decrease of GCase could be explained to regular proteolytic breakdown in lysosomes [17, 44]. These results in rats seem to involve a 2-compartment model, which could be checked in future studies with plasma and leucocytes observations. Nevertheless, based on the results obtained in this article, $t_{1/2}$ of GCase in leukocytes in GD patients was around 13 minutes, which is close to $t_{1/2}$ of rGBA1 in plasma previously reported [25, 26].

High IIV was observed in pharmacokinetic parameters after ERT administration in GD patients. In order to clarify some of the factors involved, a covariate analysis was applied on the base population PK model developed. Number of monocytes was identified to influence CL of GCase activity in leucocytes. An increased number of monocytes in the blood in GD patients tended to have lower CL. The change in CL on individuals with extreme monocyte values (0.19 and 0.84×10^9 cells/L) was clinically relevant (+29% and -59%, respectively). ActD and ERT drug were identified as covariates that allow to partially explain the IIV on BM in the final model. This result is in line with a previous article where a positive correlation between ActD and optimal response to ERT was established [14]. According to the covariates-BM relationship estimated, the range of baseline values after ERT=0 (IMG) administration varies from 64.92-1439 U, whereas patients receiving ERT=1 (VELA) showed BM values from 15.58-345 U.

Previous phase I/II clinical trials after VELA and TALI administration used plasma observations to characterize the pharmacokinetics of rGBA1 [25, 26]. In this work, enzymatic activity in leukocytes was selected in order to develop the population

PK model because plasma enzymatic activity has shown higher IIV than the leukocyte enzymatic activity, due to pharmacokinetics-related factors of the administered enzyme (short $t_{1/2}$ in plasma). So the leukocyte enzymatic activity is considered the election marker to assess the individual enzymatic activity[12].

Enzyme quantification through the catalytic power is the better analytical method for quantifies enzymes. Therefore, a method for quantifying enzymatic activity, instead of concentration of enzyme, was used [49]. The specificity of the analytical method for GBA1[13, 25] or GCase [31] has been guaranteed in several publications, which includes endogenous synthesis of GBA1, GBA2 and GBA3 and exogenous uptake of rGBA1 from ERT administration. In this work, the measurement of GCase activity was considered instead of GBA1, due to the relevant implication of GBA2 in GD1 [50].

Notwithstanding, the main limitations of the current work may restrict the applicability of the proposed population PK model. The sample size of GD1 patients recruited in this study and the number of observations per individual and cycle of treatment are low and it could increase the risk of biased estimation of parameters [32]. However, considering the low incidence of GD as rare disease and the time to optimal response to ERT is delayed until 2 years with the economic cost that the treatment involves prevents the use of rich datasets. On the other hand, animal's studies about affinity to the mannose-receptor, macrophage uptake, clearance and tissue-distribution have shown similar findings for all three rGBAs (IMG, VELA and TALI) [44, 51, 52]. Nevertheless, the drug ERT may be involved in the regulation of GCase, particularly IMG in more degree. This situation could be explained because the structure of both enzymes is different. However, the small population with administration of VELA drug (4/24 included patients) in this study could determine the results. Moreover, ϵ -shrinkage was moderately high (23%) and it could indicate that the individual predictions are of little value for assessing model adequacy[53], because model could be over-parameterized for the data that is available. The observations in tissue macrophages would enhance the physiological understanding of GBA1 kinetics.

In conclusion, a population pharmacokinetic model has been developed and successfully qualified to explain the leukocyte activity-time profiles of GCase following intravenous administration of ERT in GD patients. Number of monocytes, endogenous GBA1 activity and type of ERT treatment were identified as significant covariates on CL and baseline endogenous glucocerebrosidase activity, respectively. The information obtained from this study could be of high clinical relevance in ERT individualization in GD patients as it can lead to anticipate these decisions regarding clinical response and optimal dosing strategy. Further population pharmacokinetic or physiologically-based pharmacokinetic studies of GCase are encouraged to validate the structural model proposed and confirm the covariate-parameter relationships established.

SUPPLEMENTARY 1. FIGURES

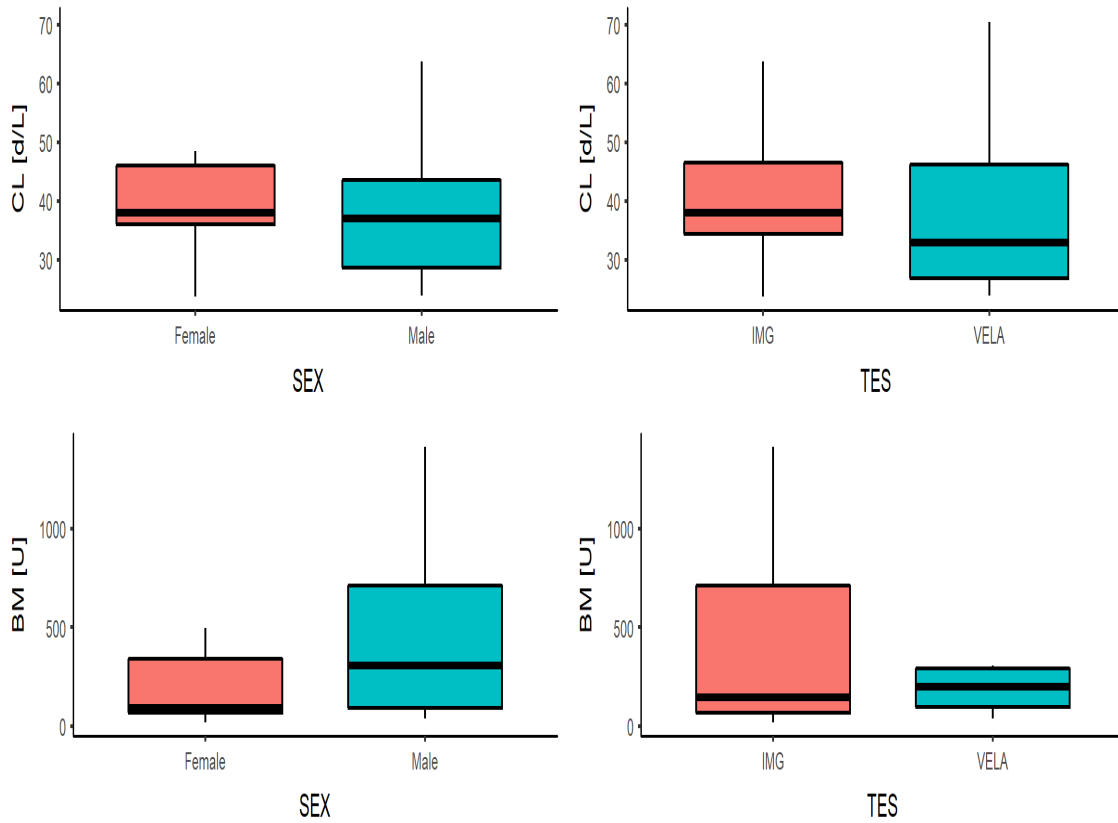


Figure 1S. Box plots between individual pharmacokinetic parameters (CL and BM) and categorical covariates: SEX (Female and male) and ERT (IMG, VELA).

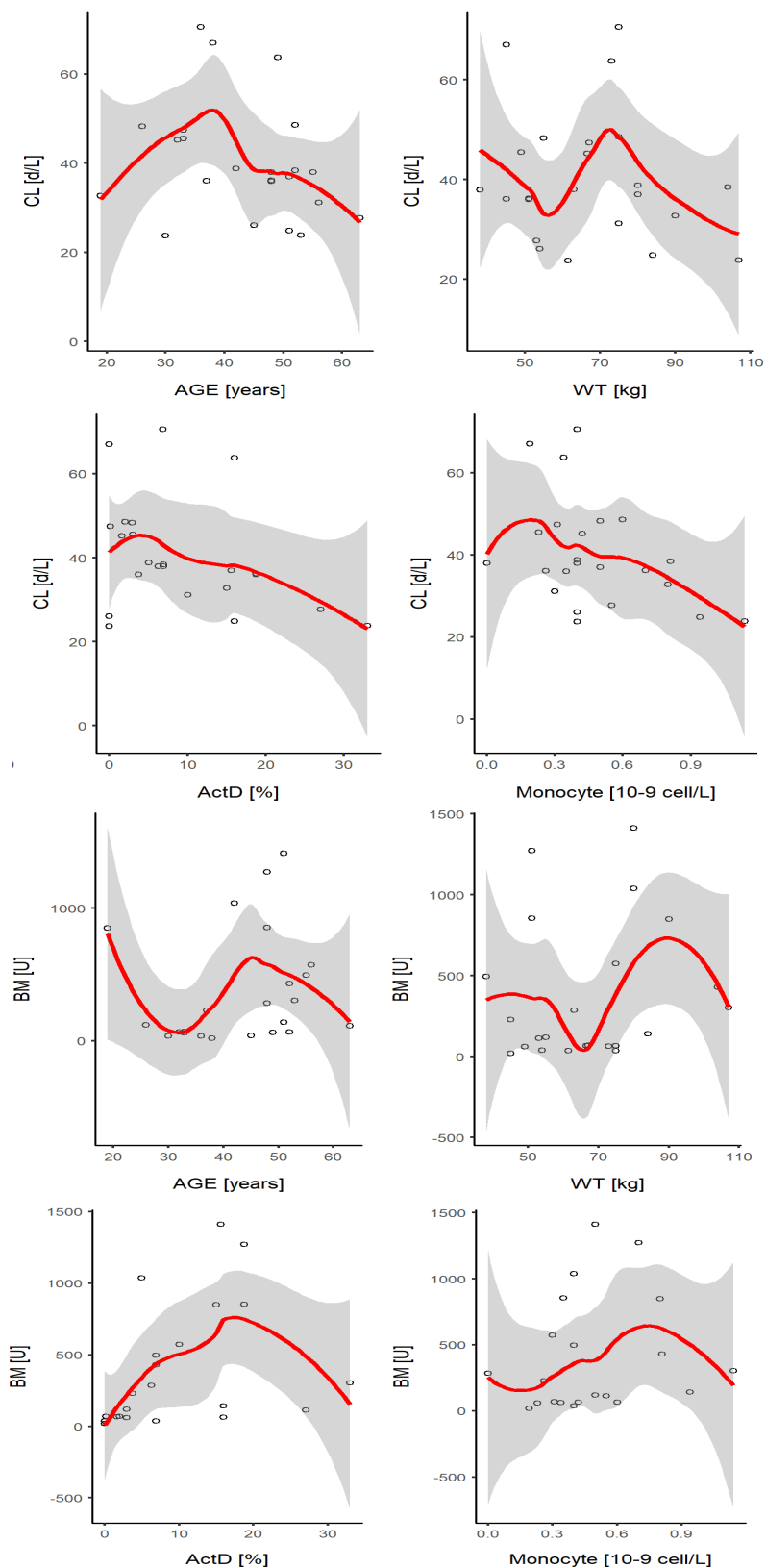


Figure 2S. Scatter plots showing the interdependence between individual pharmacokinetic parameters (CL and BM) and continuous covariates: age, weight, ActD, Monocyte (Female and male) and ERT (IMG, VELA). Red line represents the non-linear regression and the shaded area the 95% prediction interval.

SUPPLEMENTARY 2. NONMEM code for final model

```

;;-----;;
;;Modellers: Elena Gras & Víctor Mangas & Matilde Merino

;;Project Name: popPK/PD ERT Gaucher

;;Date: 2017-12-01
;;-----;;
$PROBLEM    PK GAUCHER
;;-----;;
$INPUT C ID DROP TIME DROP DROP AMT DROP CMT DVV DV DROP DROP MDV
        EVID RATE II DROP ADDL DROP OCC AGE WT SEX
        DROP DROP EACTD DROP DROP TES DROP ZDIAG MONOC DROP
;;-----;;
$DATA      gaucher_popPK.csv IGNORE=C
;;-----;;
$SUBROUTINE ADVAN13 TOL=6
;;-----;;
$MODEL      COMP=(MONOCITO)
;;-----;;
$PK
    ;;; CLMONOC-DEFINITION START
    CLMONOC = ( 1 + THETA(7)*(MONOC - 0.4))
    ;;; CLMONOC-DEFINITION END

    ;;; CL-RELATION START
    CLCOV=CLMONOC
    ;;; CL-RELATION END

    ;;; BMTES-DEFINITION START
    IF(TES.EQ.1) BMTES = 1 ; Most common
    IF(TES.EQ.2) BMTES = ( 1 + THETA(6))
    ;;; BMTES-DEFINITION END

    ;;; BMEACTD-DEFINITION START
    BMEACTD = ( 1 + THETA(5)*(EACTD - 6.56))
    ;;; BMEACTD-DEFINITION END

    ;;; BM-RELATION START
    BMCOV=BMEACTD*BMTES
    ;;; BM-RELATION END

    TVV = THETA(2)
    TVCL = THETA(3)

    TVCL = CLCOV*TVCL
    TVBM = THETA(4)

    TVBM = BMCOV*TVBM
    V = TVV *EXP(ETA(1))

```

```

CL = TVCL*EXP(ETA(2))
BM = TVBM*EXP(ETA(3))

KEL = CL/V
A_0(1)=BM
KO=KEL*BM
S1=V*1000

;;-----;;

$DES
C1=A(1)/S1
DADT(1)=KO-KEL*A(1)
;;-----;;

$THETA
(0, 0.5) ;RUV
(0, 0.4, 2) ;V [L]
(0, 38, 60) ;CL [L/d]
(0, 500) ;BM [U]
(-0.038, 0.136326, 0.152) ; BMEACTD1
(-1, -0.743866, 5) ; BMTES1
(-1.351, -0.421325, 2.500) ; CLMONOC1
;;-----;;

$OMEGA
0 FIX; CV V CV [%]
0.04 ; CV CL CV [%]
0.02 ; CV BM CV [%]
;;-----;;

$SIGMA 1 FIX
;;-----;;

$error
W=THETA(1) ; FACTOR DE PONDERACION
IPRED=LOG(F) ; PREDICION INDIVIDUAL
IRES=DV-IPRED ; RESIDUAL INDIVIDUAL
IWRES= IRES/W ; RESIDUAL INDIVIDUAL PONDERADO
Y=IPRED + W*EPS(1) ; PREDICION+VARIABILIDAD INTRA-INDIVIDUAL
;;-----;;

$ESTIMATION PRINT=5 MAXEVAL=9999 METHOD=1 INTERACTION NOABORT POSTHOC SIGDIG=3
;;-----;;

$COVARIANCE
;;-----;;

```

ANEXOS.

ANEXO I. LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Objetivos terapéuticos desde el inicio del tratamiento con TES

Tabla 2. Estratificación de la respuesta al tratamiento

Tabla 3. Variables relacionadas actividad enzimática de glucocerebrosidasa

Tabla 4. Variable combinada de criterios de respuesta

Tabla 5. Respuesta óptima al tratamiento

Tabla 6. Características clínicas de los pacientes incluidos en el periodo I

Tabla 7. Características de dosificación de TES de los pacientes incluidos en el periodo I

Tabla 8. Características basales de los pacientes incluidos en el periodo II

Tabla 9. Relación de los marcadores de GBA1 y GCase con la respuesta clínica

Tabla 10. Marcadores basados en GCase en función de la respuesta a la TES

Tabla 11. . La correlación entre las variables clínicas y la Act₇₅ y la Act₇₅₋₀, de las GCase, y las medias de las variables clínicas individuales según el punto de corte de la Act₇₅₋₀

Tabla 12. Características demográficas de los pacientes en el estudio popPK

Tabla 13. Parámetros farmacocinéticos de la enzima estimados para el modelo farmacocinético inicial y final.

ANEXO II. LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1. Reacción enzimática de la enzima lisosomal β -glucocerebrosidasa
- Figura 2. Aspecto de una célula Gaucher visualizado mediante microscopía electrónica
- Figura 3. Vía metabólica para la eliminación de GlcCer.
- Figura 4. Aproximaciones terapéuticas en la EG1
- Figura 5. Periodos del estudio y su relación con los capítulos de la presente Tesis Doctoral.
- Figura 6. Principales resultados de optimización del diseño Box-Behnken: (A) Diseño experimental aleatorizado y valores de actividad obtenidos; (B) Gráficos estandarizados de Pareto para valores de actividad GBA1; (C) Efecto de cada factor en el valor de actividad GBA1; (D) Superficie de respuesta de actividad GBA1 obtenida para un valor constante T de 10°C.
- Figura 7. Curvas de ActE/tiempo en pacientes en tratamiento con IMG.
- Figura 8. (A) Correlación entre Act0 (mU/mL) en leucocitos y la dosis mensual; (B) Correlación entre Act75 (mU/mL) en leucocitos y la dosis mensual (U/kg) administrada a los pacientes
- Figura 9. Relación entre la dosis y el factor de disposición leucocitario (FD).
- Figura 10. Curva receiver operating characteristics (ROC) que muestra la relación entre la Act75-0 con la respuesta óptima.
- Figura 11. Gráficos de bondad de ajuste del modelo final
- Figura 12. Prediction corrected visual predicted check (pc-VPC).

ANEXO III. ESCALAS DE VALORACIÓN

ANEXO III.1 Índice de Gravedad de Zimran

GRAVEDAD DE LA ENFERMEDAD	Puntuación
ECG Leve	1-10
ECG Moderado	11-25
ECG Grave	≥ 26
Citopenias	
No esplenectomizado	1
Esplenectomizado	
• Leucopenia	1
• Anemia	1
• Trombocitopenia	1
Esplenomegalia	
No	0
Mínima	1
Moderada	2
Masiva	3
Esplenectomía	3
Hepatomegalia	
No	0
Mínima	1
Moderada	2
Masiva	3
Enzimas hepáticas	
Normales	0
Alguna elevada	1
Todas elevadas	2
Signos clínicos de hepatopatía	4
Afectación del Sistema Nervioso Central (SNC)	20
Afectación de otros órganos	4
Afectación ósea por Rx convencional (escoger 1 por categoría)	
Objetiva	
• No signos ni síntomas	0
• Signos radiológicos	1
Subjetiva	
• No dolor	0
• Dolor ocasional moderado	2
• Dolor crónico	3
Fracturas	
• Postraumática	1
• Necrosis avascular o fractura patológica	5

ANEXO III.2 Índice de Puntuación de Severidad de la Enfermedad de Gaucher- Tipo I (GauSSI-I)

GauSSI-I	
Dominio Esquelético	
Infiltración de Médula ósea (basado en MRI o evaluación escintográfica)	
Ausente/Mínima	0
Leve	1
Intermedia	2
Grave	3
Deterioro del componente mineral (basado en DEXA o en rayos X de Her-	
Ausente o mínima	0
Leve	1
Intermedia	2
Grave	3
Osteonecrosis	
No	0
Infarto medular	1
Osteonecrosis	2
Prótesis	3
Fracturas patológicas	
Ausente	0
Reportada	2
Dominio Hematológico	
Concentración de hemoglobina	
> 12g/dl (hombres); > 11,5g/dl (mujeres)	0
Entre 10-12 g/dl	1
Entre 8-9,9 g/dl	2
<8 G/dl* (*): O necesidad de transfusión sanguínea	3
Recuento de leucocitos	
>4x10 ⁹ /l	0
Entre 2,5-4x10 ⁹ /l	1 a/b
<2,5x10 ⁹ /l	2 a/b
<1,9x10 ⁹ /l	3 a/b
Recuento de plaquetas	
>150x10 ⁹ /l	0
Entre 101-150x10 ⁹ /l	1 a/b
Entre 60-100x10 ⁹ /l	2 a/b
<60x10 ⁹ /l	3 a/b
Tiempo de sangrado	
< 8 Min	0
> 8 Min	1

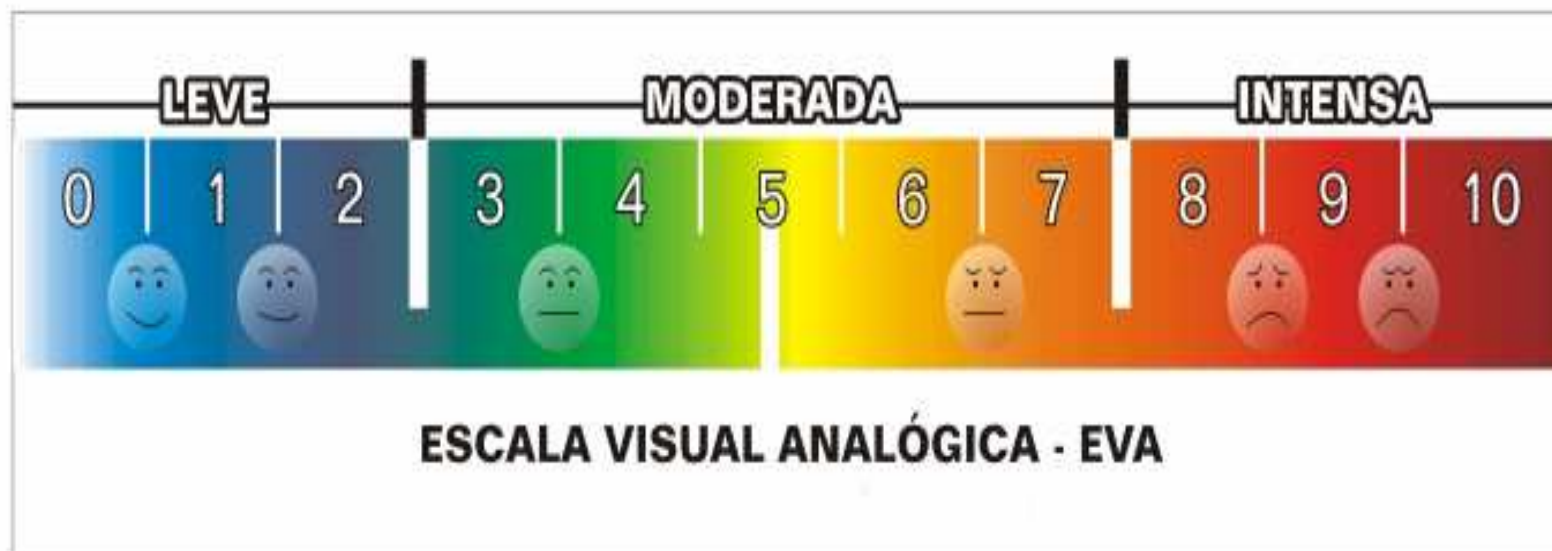
Dominio Biomarcadores	
Quitotriosidasa o CCL18 en suero	
Quitotriosidasa < 600 nmol/ml x h	Puntaje 0
Quitotriosidasa 600-4.000 nmol/ml x h	Puntaje 1
Quitotriosidasa 4001-15.000 nmol/ml x h	Puntaje 2
Quitotriosidasa > 15.000 nmol/ml x h	Puntaje 3
CCL18 < 72 ng/mL	Puntaje 0
CCL18 72-236 ng/mL	Puntaje 1
CCL18 237-1000 ng/mL	Puntaje 2
CCL18 > 1000 ng/mL	Puntaje 3
Dominio Visceral	
Bazo	
No lesiones en rm/us	0
Lesiones en rm/us	3 (como se define en el texto)
No esplenectomía	0
Esplenectomía	2
Volumen <5 n	0
Entre 5-9 n	1
Entre 10-15 n	2
Volumen > 15 n	3
Higado	
Sin enfermedad hepática	0 (como se define en el texto)
Enfermedad hepática	3 (como se define en el texto)
Volumen < 1,25 n	0
Entre 1,25-2,5n	1
Volumen > 2,5 n	2
Dominio Pulmonar	
Hipertensión pulmonar	
Ausente	0
Moderada	1
Grave	2
Fallo respiratorio	
Ausente	0
Moderado	1
Grave	2
Dominio neurológico	
No signos/síntomas	0
Neuropatía periférica	1
Enfermedad de Parkinson/parkinsonismo	3

MRI: magnetic resonance; US: ultrasound; n: normal

ANEXO III.3. Escala de valoración S-MRI de afectación de medula ósea.

S-MRI paciente	cuerpos vertebrales	Pelvis	Fémur
No afectación (0 ptos)			
No homogéneo			
Reticular (1 ptos)			
Moteado (2 ptos)			
Difuso (3 ptos)			
Homogéneo (4 ptos)			
Complicaciones (4 ptos por cada complicación y localización) Necrosis avascular, infarto óseo , aplastamiento vertebral			
Puntuación por cada área			
Puntuación total			

ANEXO III.4. Escala visual analógica (EVA) para la evaluación del dolor



INICIALES PACIENTE _____

PUNTUACIÓN _____

ANEXO III. 5. Escala de Calidad de Vida (SF36)

Versión española de SF-36v2™ Health Survey © 1996, 2000
adaptada por J. Alonso y cols 2003.

CUESTIONARIO DE SALUD SF-36**VERSIÓN ESPAÑOLA 2.0**

Las preguntas que siguen se refieren a lo que usted piensa sobre su estado de salud. Sus respuestas permitirán saber cómo se encuentra usted y hasta qué punto es capaz de hacer sus actividades habituales.

NÚMERO PACIENTE:

INICIALES PACIENTE:

Fecha: ____/____/____

Por favor conteste las siguientes preguntas. Algunas preguntas pueden parecerse a otras pero cada una es diferente.

Tómese el tiempo necesario para leer cada pregunta, y marque

Con la casilla que mejor describa su respuesta.

1. En general, usted diría que su salud es:

- 1 Excelente
- 2 Muy buena
- 3 Buena
- 4 Regular
- 5 Mala

2. ¿Cómo diría que es su salud actual, comparada con la de hace un año?

- 1 Mucho mejor ahora que hace un año
- 2 Algo mejor ahora que hace un año
- 3 Más o menos igual que hace un año
- 4 Algo peor ahora que hace un año
- 5 Mucho peor ahora que hace un año

3. Las siguientes preguntas se refieren a actividades o cosas que usted podría hacer en un día normal. Su salud actual, ¿le limita para hacer esas actividades o cosas? Si es así, ¿cuánto?

	Sí, me limita mucho	Sí, me limita un poco	No, no me limita nada
a <u>Esfuerzos intensos</u> , tales como correr, levantar objetos pesados, o participar en deportes agotadores_____	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
b <u>Esfuerzos moderados</u> , como mover una mesa, pasar la aspiradora, jugar a los bolos o caminar más de 1 hora_____	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
c Coger o llevar la bolsa de la compra_____	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
d Subir <u>varios</u> pisos por la escalera_____	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
e Subir <u>un sólo</u> piso por la escalera _____	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
f Agacharse o arrodillarse _____	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
g Caminar <u>un kilómetro o más</u> _____	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
h Caminar varios centenares de metros_____	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
i Caminar unos 100 metros_____	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3
j Bañarse o vestirse por sí mismo_____	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3

4. Durante las 4 últimas semanas, ¿con qué frecuencia ha tenido alguno de los siguientes problemas en su trabajo o en sus actividades cotidianas, a causa de su salud física?

	Siempre	Casi siempre	Algunas veces	Sólo alguna vez	Nunca
a Tuvo que reducir el tiempo dedicado al trabajo o sus actividades cotidianas?_____	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
b ¿Hizo menos de lo que hubiera querido hacer?_____	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
c ¿Tuvo que dejar de hacer algunas tareas en su trabajo o en sus actividades cotidianas?_____	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5
d ¿Tuvo dificultad para hacer su trabajo o sus actividades cotidianas (por ejemplo, le costó más de lo normal)?_____	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

5. Durante las 4 últimas semanas, ¿con qué frecuencia ha tenido alguno de los siguientes problemas en su trabajo o en sus actividades cotidianas, a causa de algún problema emocional (como estar triste, deprimido o nervioso)?

	Siempre	Casi siempre	Algunas veces	Sólo alguna vez	Nunca
	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4	<input type="checkbox"/> 5

a ¿Tuvo que reducir el tiempo dedicado al trabajo o a sus actividades cotidianas por algún problema emocional? _____

₁ --- ₂ --- ₃ --- ₄ --- ₅

b ¿Hizo menos de lo que hubiera querido hacer por algún problema emocional? _____

₁ --- ₂ --- ₃ --- ₄ --- ₅

c ¿Hizo su trabajo o sus actividades cotidianas menos cuidadosamente que de costumbre, por algún problema emocional? _____

₁ --- ₂ --- ₃ --- ₄ --- ₅

6. Durante las 4 últimas semanas, ¿hasta qué punto su salud física o los problemas emocionales han dificultado sus actividades sociales habituales con la familia, los amigos, los vecinos u otras personas?

Nada

₁

Un poco

₂

Regular

₃

Bastante

₄

Mucho

₅

7. ¿Tuvo dolor en alguna parte del cuerpo durante las 4 últimas semanas?

No, ninguno

₁

Sí, muy poco

₂

Sí, un poco

₃

Sí, moderado

₄

Sí, mucho

₅

Sí, muchísimo

₆

8. Durante las 4 últimas semanas, ¿hasta qué punto el dolor le ha dificultado su trabajo habitual (incluido el trabajo fuera de casa y las tareas domésticas)?

Nada

₁

Un poco

₂

Regular

₃

Bastante

₄

Mucho

₅

9. Las preguntas que siguen se refieren a cómo se ha sentido y cómo le han ido las cosas durante las 4 últimas semanas. En cada pregunta responda lo que se parezca más a cómo se ha sentido usted. Durante las últimas 4 semanas ¿con qué frecuencia...

Siempre Casi siempre Algunas veces Sólo alguna vez Nunca

a se sintió lleno de vitalidad? _____

₁ --- ₂ --- ₃ --- ₄ --- ₅

b estuvo muy nervioso? _____

₁ --- ₂ --- ₃ --- ₄ --- ₅

c se sintió tan bajo de moral que nada

podía animarle? _____ ₁ ₂ ₃ ₄ ₅

d se sintió calmado y tranquilo? _____ ₁ ₂ ₃ ₄ ₅

e tuvo mucha energía? _____ ₁ ₂ ₃ ₄ ₅

f se sintió desanimado y deprimido? _____ ₁ ₂ ₃ ₄ ₅

g se sintió agotado? _____ ₁ ₂ ₃ ₄ ₅

h se sintió feliz? _____ ₁ ₂ ₃ ₄ ₅

i se sintió cansado? _____ ₁ ₂ ₃ ₄ ₅

10. Durante las 4 últimas semanas, ¿con qué frecuencia la salud física o los problemas emocionales le han dificultado sus actividades sociales (como visitar a los amigos o familiares)?

Siempre

₁

Casi siempre

₂

Algunas veces

₃

Sólo alguna vez

₄

Nunca

₅

11. Por favor diga si le parece CIERTA o FALSA cada una de las siguientes frases:

a Creo que me pongo enfermo más
facilmente que otras personas _____

Totalmente cierta	Bastante cierta	No lo sé	Bastante falsa	Totalmente falsa
----------------------	--------------------	----------	-------------------	---------------------

₁ ₂ ₃ ₄ ₅

b Estoy tan sano como cualquiera _____ ₁ ₂ ₃ ₄ ₅

c Creo que mi salud va a empeorar _____ ₁ ₂ ₃ ₄ ₅

d Mi salud es excelente _____ ₁ ₂ ₃ ₄ ₅

ANEXO IV. PROCEDIMIENTOS ADMINISTRATIVOS

ANEXO IV.1. Dictamen CEIC del proyecto investigación periodo I.



A/A.: Dr. Victor Jiménez Torres
Servicio de Farmacia

Vicent Valentin Segura, Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Dr. Peset.

CERTIFICA:

Que este comité en su reunión celebrada el día 30 de Junio de 2010 ha evaluado y **ha aprobado** el estudio titulado: - "Individualización del tratamiento con Imiglucerasa. Valor añadido de la farmacocinética".

Proyecto de investigación
Código Ceic: 50/10

Valencia 6 de Julio de 2010



Fdo.: Vicent Valentin Segura
Presidente CEIC Hospital Universitario Dr. Peset

CS/01

ANEXO IV.2. Clasificación AEMPS del estudio de periodo II como estudio postautorización de seguimiento prospectivo (E PA-SP)



ASUNTO: RESOLUCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE CLASIFICACIÓN DE ESTUDIO CLÍNICO O EPIDEMIOLÓGICO

DESTINATARIO: D^a ELENA GRAS COLOMER

Vista la solicitud-propuesta formulada con fecha **26 de julio de 2012**, por D^a **ELENA GRAS COLOMER**, para la clasificación del estudio titulado **"MONITORIZACIÓN E INDIVIDUALIZACIÓN POSOLÓGICA DE GLUCOCEREBROSIDASA EN PACIENTES GAUCHER TIPO I"**, con código **FIS-IMI-2012-01** y cuyo promotor es **FISABIO (FUNDACION PARA LA INVESTIGACION SANITARIA Y BIOMEDICA DE LA COMUNITAT VALENCIANA)**., se emite resolución.

Se han tenido en cuenta en la presente resolución las respuestas remitidas por el solicitante con fecha **26 de julio de 2012**, en contestación a las aclaraciones solicitadas el **26 de julio de 2012**.

El Departamento de Medicamentos de Uso Humano de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), de conformidad con los preceptos aplicables, ⁽¹⁾ **RESUELVE** clasificar el estudio citado anteriormente como **"Estudio Posautorización de seguimiento prospectivo** (abreviado como EPA-SP).

El promotor del estudio deberá remitir solicitud de autorización del mismo ⁽²⁾ a todas aquellas Comunidades Autónomas en las que se pretenda llevar a cabo, incluyendo la siguiente documentación (una copia en papel y otra en formato electrónico) y enviando una copia de la misma (papel y formato electrónico) a la AEMPS en el momento de la primera solicitud de autorización:

- Carta de presentación dirigida a los responsables de esta materia en la Comunidad Autónoma⁽³⁾ en la que se solicite la autorización del estudio e indique la dirección y contacto del solicitante y la relación de documentos que se incluyen⁽⁴⁾.
- Resolución de la AEMPS sobre la clasificación del estudio
- Protocolo completo, incluidos los anexos, y donde conste el número de pacientes que se pretenden incluir en España, desglosado por Comunidad Autónoma.
- Dictamen favorable del estudio por un CEIC acreditado en España.

CORREO ELECTRÓNICO

farmacoepi@aemps.es

C/ CAMPEZO, 1 – EDIFICIO 8
28022 MADRID



- Listado de Centros Sanitarios donde se pretende realizar el estudio, desglosado por Comunidad Autónoma
- Listado de investigadores participantes en la Comunidad Autónoma.
- Si el estudio se pretende realizar en otros países, situación del mismo en éstos.
- Documento acreditativo de haber satisfecho las tasas correspondientes, en aquellas CC.AA. donde se exijan.

El plazo máximo establecido para emitir resolución por parte de cada CC.AA. será de 90 días naturales. Si transcurrido el mismo la CC.AA. no se hubiese pronunciado, se entenderá autorizado el estudio en esa CC.AA.

Contra la presente resolución que pone fin a la vía administrativa podrá interponerse Recurso Potestativo de Reposición, ante la Directora de la Agencia, en el plazo de un mes a contar desde el día siguiente a aquel en que tenga lugar la notificación de la presente resolución.⁽⁵⁾

Madrid, a 27 de julio de 2012

EL JEFE DE DEPARTAMENTO DE
MEDICAMENTOS DE USO HUMANO



César Hernández García

¹ Son de aplicación al presente procedimiento la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común; la Ley 12/2000, de 29 de diciembre, de medidas fiscales, administrativas y de orden social; la Ley 29/2006, de 26 de julio, de Garantías y Uso Racional de los Medicamentos y Productos Sanitarios; el Real Decreto 223/2004, de 6 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos; el Real Decreto 1275/2011, de 16 de septiembre, por el que se crea la Agencia estatal "Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios" y se aprueba su estatuto; el Real Decreto 1344/2007, de 11 de octubre, por el que se regula la farmacovigilancia de medicamentos de uso humano y la Orden SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las directrices sobre estudios posautorización de tipo observacional para medicamentos de uso humano.

² De acuerdo con la Orden SAS/3470/2009, de 16 de diciembre.

³ Directorio disponible en la página web de la AEMPS (<http://www.aemps.es/actividad/invClinica/estudiosPostautorizacion.htm>)

⁴ En el caso de que el promotor no sea quien presente la documentación, se deberá incluir en la misma un documento que indique las responsabilidades delegadas por el promotor a la persona o empresa que actúa en su nombre.

⁵ De conformidad con lo dispuesto en los artículos 116 y 117 de la Ley 30/1992, de 26 de noviembre, o Recurso Contencioso-Administrativo ante el Juzgado Central de lo Contencioso-Administrativo de Madrid, en el plazo de dos meses contados desde el día siguiente al de la notificación de la presente resolución, de conformidad con la Ley 29/1998, de 13 de Julio, reguladora de la Jurisdicción Contencioso-Administrativa, sin perjuicio de poder ejercitar cualquier otro recurso que se estime oportuno. En caso de interponerse recurso de reposición no podrá interponerse recurso contencioso-administrativo hasta la resolución expresa o presunta del primero.

CORREO ELECTRÓNICO

farmacoepi@aemps.es

C/ CAMPEZO, 1 – EDIFICIO B
28022 MADRID

ANEXO IV.3. Dictamen comité ético de investigación clínica estudio postautorización de seguimiento prospectivo (EPA-SP)

CONSELLERIA DE SANITAT

AGÈNCIA VALENCIANA DE SALUT
Departament de Salut València - Doctor Peset

Código de protocolo: FIS-IMI-2012-01
Promotor: FISABIO
Título: "Monitorización e individualización posológica de glucocerebrosidasa en pacientes gaucher tipo I"
Versión y fecha: v. 1 de 01/09/2012
Hoja de Información al Paciente y Consentimiento informado: versión 1 de 01/09/2012

DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DOCTOR PESET DE VALENCIA

Dña. Pilar Codoñer Franch, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia

CERTIFICA:

Que este Comité, en la reunión ordinaria celebrada el día 31 de octubre de 2012, ha evaluado la propuesta del promotor **FISABIO** para que se realice el Estudio arriba referenciado.

Y considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Son adecuados el procedimiento para obtener el consentimiento informado, y el modo de reclutamiento previsto, así como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el estudio.

Que las compensaciones económicas no interfieren con el respeto a los postulados éticos.

CS 31

Gaspar Aguilár, 90 - 46017 Valencia - Tel.: 96 162 23 00 - Fax 96 162 25 01

GOVERN DE VALÈNCIA
CONSELLERIA DE SANITAT

AGÈNCIA VALENCIANA DE SALUT
Departament de Salut València - Doctor Peset


Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Orden SAS 3470/2009 y la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa aplicable en función de las características del estudio.

Que en la precitada reunión y tras el estudio del protocolo, este Ceic Emite un Dictamen FAVORABLE a la realización de dicho estudio en este Centro y con la Dra. Elena Gras Colomer como investigadora principal.
Se acepta exención de tasas

Miembros Ceic Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia asistentes a la reunión del 31 de octubre de 2012

D. Vicent Valentín Segura.
D. José Luis Rodrigo Pérez
Dña. Pilar Codoñer Franch
D. Antonio Hernández Mijares.
D. Luis Pallardó Matéu.
Dña. Amparo Valero Doménech.
D. Daniel Almenar Cubells.
D. José Luis Catalán Arlandis.
D. Joaquín Esparza Tolosa.
D. Juan Soliveres Ripoll.
Dña. Reyes Balanzá Chancosa
Dña. Begoña Porta Oltra
D. Sebastià Longàs López
Dña Amparo Ybáñez García

Lo que firmo en Valencia a 5 de noviembre de 2012



Fdo. Dña. Pilar Codoñer Franch
Secretaria Ceic del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia

Gaspar Aguilar, 90 - 46017 Valencia - Tel.: 96 162 23 00 - Fax 96 162 25 01

ANEXO IV.4. Hoja información al paciente y consentimiento informado periodo I

HOSPITAL UNIVERSITARIO "DR.PESET"

**HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE MAYOR DE 18 AÑOS Y
AUTORIZACIÓN para la participación en el estudio sobre: Individualización
del tratamiento con Imiglucerasa. Valor añadido de la farmacocinética**

Don/Doña: _____

DECLARO QUE:

Don/Doña: _____

como Médico Especialista en _____

en presencia del testigo _____

con DNI _____

me comunica la posibilidad de participar en el estudio sobre individualización del
tratamiento con Imiglucerasa. Valor añadido de la farmacocinética

La inclusión en este estudio no conlleva riesgo alguno para el sujeto participante. Para poder realizar el estudio se necesitan extraer tres muestras de sangre que serán enviadas a la Unidad de Investigación clínica y del Servicio de Farmacia del Hospital Dr. Peset.

Este estudio nos permitirá obtener información sobre el medicamento, consiguiendo así para usted un tratamiento más individualizado.

Toda la información obtenida de los sujetos participantes será confidencial, cumpliendo en todo momento la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, que la desarrolla.

La participación en este proyecto es enteramente voluntaria, pudiendo abandonar el estudio cuando desee, sin tener que dar explicación alguna y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

_____, _____ de _____ de 2010

Fdo.: El paciente

Fdo.:El testigo

ANEXO IV. 5. Hoja información al paciente y consentimiento informado, periodo II.

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Versión 1.0 01/09/2012

TÍTULO: “MONITORIZACIÓN E INDIVIDUALIZACIÓN POSOLÓGICA DE GLUCOCEREBROSIDASA EN PACIENTES GAUCHER TIPO I”

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Elena Gras Colomer del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia.

PROMOTOR: Fundación para el fomento de la investigación sanitaria y biomédica de la Comunitat Valenciana (FISABIO)

La enfermedad de Gaucher es una enfermedad debido a la falta total o parcial de una proteína en el organismo, que produce un acúmulo de ciertas sustancias, que hacen que el organismo no funcione adecuadamente. El tratamiento es la reposición de esa proteína vía intravenosa con Imiglucerasa (Cerezyme®) o Velaglucerasa (Vprip®). Pero las dosis adecuadas para cada paciente todavía no están claras, por lo que deseamos llevar a cabo un estudio para investigar sobre el ajuste de la dosis de medicamento en pacientes con Enfermedad de Gaucher.

Considerando la enfermedad que usted padece, EL INVESTIGADOR/
RESPONSABLE CLÍNICO que le
informa.....del

HOSPITAL.....le invita a participar en este proyecto de investigación, para lo que solicitamos su consentimiento.

Su participación es totalmente voluntaria. Antes de decidir si quiere participar o no, le rogamos lea detenidamente este documento que incluye la información sobre este estudio. Queremos asegurarnos de que está perfectamente informado sobre el propósito y lo que implica para usted la participación en el mismo. Puede formular todas las preguntas que le surjan y solicitar aclaración sobre cualquier

aspecto para asegurar que entiende todos los procedimientos del estudio, incluyendo los posibles riesgos y/o los beneficios esperados. No firme antes de tener la seguridad de entender todos los aspectos y objetivos del estudio.

Propósito del estudio.

La posología actual de los fármacos empleados en la terapia enzimática sustitutiva en la enfermedad de Gaucher tipo I, está determinada de acuerdo al peso del paciente y se describen criterios para modificación de dosis basados en las situaciones clínicas del paciente. El objetivo del estudio es establecer dosis optimizadas en función de la cantidad de proteína del paciente y de su situación clínica, para obtener tratamientos personalizados y más coste-efectivos.

Procedimiento.

Para poder realizar el estudio usted NO tendrá que acudir más veces al hospital de las visitas establecidas por su médico para el seguimiento de su enfermedad.

Si desea participar, rellenará un cuestionario sobre su estado salud, y su médico recopilará su información médica necesaria para el estudio. Además se necesita extraer muestras de su sangre cuando acuda al hospital a ponerse la medicación. Será procesada en la Unidad de Investigación Clínica del Servicio de Farmacia y en la Unidad de Citometría del Servicio de Hematología del Hospital Dr. Peset de Valencia. Con la muestra, se procederá a la determinación de la actividad de proteína y se correlacionará con sus antecedentes clínicos, con la sintomatología actual, con las características de las células donde se acumula el medicamento, con la cantidad de dosis recibida y comparando esa actividad con la cantidad de proteína que tienen los individuos sanos.

Con toda esa información su médico podrá decidir si considera adecuado modificar las dosis de su tratamiento. Si fuera así, le extraeríamos otro tubo de sangre, cuando acuda al hospital a ponerse la medicación, para comprobar si se ha modificado la cantidad de proteína de su organismo.

Muestras a recoger.

Como parte de este proyecto y al reunir una serie de condiciones definidas en el protocolo aprobado por un Comité de Ética de Investigación, se le va a extraer una muestra de sangre para utilizarla con fines de investigación. La investigación con muestras biológicas tiene como objetivo aumentar los conocimientos sobre la patología o proceso objeto de estudio y la obtención y desarrollo de nuevas estrategias y terapias aplicables a pacientes

La extracción de sangre no conlleva más molestias que un simple pinchazo en la vena en el brazo. A veces, muy raramente, le puede ocasionar un pequeño hematoma o una leve inflamación que remitirán en pocos días. Además, en la medida de lo posible, coincidirá con alguna extracción de rutina que deba realizársele.

Beneficio y atención médica.

La participación en el estudio no conlleva ningún beneficio económico para el sujeto participante en el estudio y no le supone coste alguno. En cualquier caso, los datos recogidos en el mismo podrán derivar en un mayor conocimiento de su enfermedad y tratamiento.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria: Si usted decide no participar recibirá todos los cuidados médicos que pudiera necesitar y su relación con los equipos médicos que le atiendan no se verá afectada.

Aspectos Éticos.

La investigación se desarrollará con el máximo respeto de los derechos individuales, según los postulados aceptados internacionalmente por las Naciones Unidas y la Comisión Europea (Acta de Helsinki de 2008 y Convenio de Oviedo de 1997). Por ello, todas las investigaciones que se lleven a cabo contarán con la aprobación y supervisión de los diferentes Comités de Ética quienes velarán por el cumplimiento de los postulados anteriormente citados.

Tratamiento de los datos y confidencialidad.

Se solicita su consentimiento para la utilización de sus datos y su muestra para el desarrollo de este proyecto de investigación. Tanto los datos personales (edad, sexo, raza), como los datos de salud o la muestra para investigación, se recogerán empleando un procedimiento de codificación. Sólo su MEDICO RESPONSABLE podrá relacionar estos datos con usted, siendo responsable de custodiar el documento de consentimiento. Sólo a él/ella le corresponde garantizar el cumplimiento de su voluntad en relación al uso de la muestra biológica que usted cede para investigación.

La información será procesada durante el análisis de los datos obtenidos y aparecerá en los informes y/o memorias del Proyecto, aunque en ningún caso será posible identificarle, asegurando en todo momento el cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

En observancia a esta ley le informamos que los datos de carácter personal recogidos en este estudio pasarán a formar parte de un fichero automatizado que reúne las medidas de seguridad de nivel alto.

Asimismo, los resultados de esta investigación podrán publicarse en revistas científicas o presentarse en sesiones clínicas, pero siempre garantizando el

completo anonimato. El Hospital

_____ garantiza que en ningún caso saldrá del centro dato alguno que le identifique personalmente.

Se garantiza el respeto a la calidad de los proyectos de investigación biomédica y el respeto a la dignidad de las personas durante su consecución, en cumplimiento de la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, y la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica.

Revocación del consentimiento.

Puede revocar en cualquier momento su participación sin necesidad de dar explicaciones, sin que ello represente para usted ningún inconveniente y sin perder el derecho a recibir la atención médica necesaria para su estado de salud. No se procederá a recoger nuevos datos después del abandono del estudio. Si usted decidiera retirarse en cualquier momento del estudio o no desea participar en el mismo la relación con su médico NO se verá alterada en modo alguno.

Los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición puede ejercitarlos ante el

Dr./Investigador/Clínico que le informacuyo lugar de trabajo es_____.

Destino de la muestra tras su utilización en este proyecto de investigación.

Una vez finalizada la investigación, es posible que existan muestras sobrantes. En relación a las mismas, el investigador procederá a la destrucción de la muestra sobrante.

Información adicional.

Si usted precisa mayor información sobre este estudio puede contactar con el investigador principal Elena Gras Colomer (telf. 961622541) del Servicio de Farmacia del Hospital Universitario Dr. Peset.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

**“MONITORIZACIÓN E INDIVIDUALIZACIÓN POSOLÓGICA DE
GLUCOCEREBROSIDASA EN PACIENTES GAUCHER TIPO I”**

Don/doña de años de edad, con domicilio en....., DNI y nº de SIP

He tenido suficiente tiempo para evaluar y comentar con mi médico/farmacéutico mi inclusión en el proyecto, y he recibido una respuesta a todas mis preguntas. También he leído y acepto las condiciones que se explican en esta información. Recibiré una copia de esta hoja y el original se conservará junto con mi historia clínica para indicar mi participación en este estudio.

La participación en el estudio dará lugar a un tratamiento de datos de salud con el objetivo indicado en el proyecto.

Soy libre de retirarme del proyecto en cualquier momento por cualquier motivo, sin tener que dar explicaciones y sin que repercuta negativamente sobre mi tratamiento médico futuro. Tras ello se procederá a la destrucción de las muestras codificadas.

Declaro:

Que el Doctor/a me ha explicado y que he comprendido adecuadamente la información que me ha dado.

En a de de 20.....

Fdo.: Don /Doña

Fdo.: Dr/a

DNI

DNI

Colegiado nº:.....