

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 079**

51 Int. Cl.:

A61K 38/47 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.07.2010** **PCT/US2010/043586**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.02.2011** **WO11017177**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2010** **E 10806936 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018** **EP 2459212**

54 Título: **Composiciones y métodos para tratar la enfermedad de Gaucher**

30 Prioridad:

10.02.2010 US 303044 P

25.03.2010 US 317513 P

11.05.2010 US 333372 P

28.07.2009 US 229195 P

28.06.2010 US 359338 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.05.2018

73 Titular/es:

SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES (100.0%)

700 Main Street

Cambridge, MA 02139, US

72 Inventor/es:

DANIEL, PETER, F. y

HEARTLEIN, MICHAEL, W.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 668 079 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

Composiciones y métodos para tratar la enfermedad de Gaucher

Descripción

5 ANTECEDENTES

La enfermedad de Gaucher es un trastorno del almacenamiento lisosómico recesivo autosómico que se caracteriza por una deficiencia en la enzima lisosómica, la glucocerebrosidasa (GCB). La GCB hidroliza el glucocerebrósido glucolípido que se forma después de la degradación de glicoesfingolípidos en las membranas de los glóbulos blancos y los glóbulos rojos. La deficiencia de esta enzima hace que el glucocerebrósido se acumule en grandes cantidades en los lisosomas de las células fagocíticas localizadas en el hígado, el bazo y la médula ósea de los pacientes con Gaucher. La acumulación de estas moléculas provoca una variedad de manifestaciones clínicas que incluyen esplenomegalia, hepatomegalia, trastorno esquelético, trombocitopenia y anemia. (Beutler et al., Gaucher disease; In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease (McGraw-Hill, Inc, New York, 1995) pp.2625-2639))

Los tratamientos para los pacientes que padecen esta enfermedad incluyen la administración de analgésicos para aliviar el dolor óseo, transfusiones de sangre y plaquetas y, en algunos casos, esplenectomía. El reemplazo articular es a veces necesario para los pacientes que experimentan erosión ósea.

La terapia de reemplazo enzimático con GCB se ha usado como un tratamiento para la enfermedad de Gaucher. El tratamiento actual de pacientes con enfermedad de Gaucher incluye la administración de un GCB remodelado con carbohidratos derivado de placenta humana o células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con un constructo de expresión de GCB y conocidas como alglucerasa o imiglucerasa, respectivamente. Wadhwa et al. (J Immunol Methods. 2003; 278 (1-2): 1-17) describen estrategias para la detección, medición y caracterización de anticuerpos no deseados inducidos por productos biológicos terapéuticos. Rosenberg et al. (Blood, 1999; 93(6):2081-2088) describen la inmunosupervisión de la terapia de reemplazo de enzima alglucerasa para pacientes con Gaucher. Wang et al. (Nat Biotechnol. 2008; 26(8):901-908) describen anticuerpos neutralizantes para enzimas terapéuticas y consideraciones para pruebas, prevención y tratamiento. La entrada NCT00478647 del archivo ClinicalTrials.gov del 3 de agosto de 2008 describe un estudio de la terapia de reemplazo de enzimas GA-GCB en pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1 previamente tratados con imiglucerasa.

SUMARIO

La divulgación se basa, en parte, en el descubrimiento de que la velaglucerasa provoca menos respuesta inmune (por ejemplo, menos producción de anticuerpos neutralizantes) que la imiglucerasa tras la administración a un sujeto (por ejemplo, un sujeto con enfermedad de Gaucher) La invención se refiere, entre otros, a métodos para seleccionar un tratamiento para un sujeto con enfermedad de Gaucher y seleccionar sujetos para el tratamiento con velaglucerasa (por ejemplo, sola o en combinación con otra terapia).

La invención se refiere a un método para identificar un sujeto como adecuado para el tratamiento con una enzima glucocerebrosidasa alternativa, el método comprendiendo: (1) determinar si un anticuerpo neutralizante para una enzima glucocerebrosidasa está presente en una muestra de un sujeto que está tomando actualmente o ha recibido previamente la enzima glucocerebrosidasa para obtener un valor medido del anticuerpo; (2) comparar el valor medido con un estándar, en donde si el valor medido es mayor que el estándar, se identifica que el sujeto ha dado positivo para la producción de los anticuerpos; y (3) seleccionar un sujeto para la enzima glucocerebrosidasa alternativa sobre la base de que el sujeto ha dado positivo para la producción de los anticuerpos. La invención se refiere además a una enzima glucocerebrosidasa para uso en un método de tratamiento de la enfermedad de Gaucher, en donde el método comprende: (1) identificar un sujeto como adecuado para el tratamiento con una enzima glucocerebrosidasa alternativa de acuerdo con el método anterior; y (2) administrar la enzima glucocerebrosidasa alternativa al sujeto.

En algunas realizaciones, el reemplazo de la enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, velaglucerasa, imiglucerasa, uplyso) se administra más de una vez y cada dosis de la enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, velaglucerasa, imiglucerasa o uplyso) se administra por administración intravenosa durante un período menor de 2 horas, por ejemplo, 90 minutos, 80 minutos, 70 minutos, 60 minutos, 50 minutos o 45 minutos), al sujeto.

En algunas realizaciones, la enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, velaglucerasa, imiglucerasa, uplyso) se administra a una dosis de 15 a 60 U/kg (por ejemplo, de 30 U/kg a 60 U/kg, por ejemplo, 15 U/kg, 30 U/kg, 45 U/kg o 60 U/kg), a una dosis igual o inferior a 22,5 U/kg, a una dosis entre 22,5 y 37,5 U/kg, a una dosis entre 37,5 y 52,5 U/kg, o a una dosis igual o superior a 52,5 U/kg. En algunas realizaciones, la enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, velaglucerasa, imiglucerasa, uplyso) se administra a una dosis de 2,5 U/kg a 60 U/kg. En algunas realizaciones, la enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, velaglucerasa, imiglucerasa, uplyso) se administra cada dos semanas. En otras realizaciones, la enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, velaglucerasa, imiglucerasa, uplyso) se administra semanalmente. En algunas realizaciones, la velaglucerasa se administra tres veces a la

semana mediante infusión intravenosa, por ejemplo a una dosis de 2,5 U/kg.

En algunas realizaciones, la infusión de una o más dosis (por ejemplo, una dosis descrita en la presente) se produce durante 60 minutos.

En algunas realizaciones, la enzima glucocerebrosidasa es velaglucerasa que se administra reconstituyendo velaglucerasa liofilizada con un portador farmacéuticamente aceptable como agua estéril para inyección (por ejemplo, reconstituyendo un vial de 200 unidades con 2,2 ml de agua estéril para inyección o un vial de 400 unidades con 4,3 ml de agua estéril para inyección), formando de este modo una solución, por ejemplo, en la que el vial no se agita después de la adición del agua estéril para inyección; opcionalmente, inspeccionando la solución en los viales (y, por ejemplo, determinando opcionalmente si la solución está descolorida o si hay material particulado, y opcionalmente decidiendo no usar la solución si la solución está descolorida o si hay material particulado); retirando un volumen de solución para proporcionar una dosis preseleccionada (por ejemplo, una dosis descrita en la presente como 15 U/kg, 30 U/kg, 45 U/kg o 60 U/kg); diluyendo el volumen, por ejemplo, en 100 ml de solución de cloruro sódico al 0,9% adecuada para administración intravenosa, formando de este modo una solución diluida; opcionalmente balanceando la solución diluida suavemente, pero no agitando la solución diluida; y administrando la solución diluida al sujeto mediante infusión intravenosa, por ejemplo, en donde la solución diluida se administra durante una hora o a una velocidad de 1 U/kg/minuto.

En algunas realizaciones, la enzima glucocerebrosidasa se administra a una velocidad de infusión de 2 U/kg/minuto, 1,5 U/kg/minuto, 1 U/kg/minuto, o 0,5 U/kg/minuto.

En algunas realizaciones, la administración comprende terapia domiciliaria (por ejemplo, en el hogar, lugar de trabajo u otro entorno no clínico (por ejemplo, no hospitalario) del sujeto). En algunas realizaciones, la administración (por ejemplo, a través de infusión) es realizada por un profesional de la salud (por ejemplo, enfermera o asistente médico). Por ejemplo, si el sujeto no ha experimentado un evento adverso (AE) (por ejemplo, un AE serio relacionado con fármacos un AE relacionado con la infusión, por ejemplo, un evento descrito en la presente), por ejemplo, después de una, dos o tres administraciones (por ejemplo, a través de la infusión) de la terapia de reemplazo de la enzima glucocerebrosidasa, el sujeto es elegible para recibir terapia domiciliaria para administraciones posteriores.

El método para identificar un sujeto como adecuado para (por ejemplo, ser un candidato para) tratamiento con una enzima glucocerebrosidasa alternativa (por ejemplo, velaglucerasa) incluye evaluar (por ejemplo, medir, por ejemplo, mediante un método descrito en la presente como ELISA o ensayo de radioinmunoprecipitación (RIP)) una muestra para la presencia de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) (por ejemplo, anticuerpos IgE, IgM, IgG y/o IgA) para una enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, para la terapia que se administra actualmente al sujeto) (por ejemplo, imiglucerasa) o uplyso por ejemplo, y comparar el valor medido del anticuerpo para la terapia con un estándar (por ejemplo, un control negativo). Por ejemplo, si el sujeto ha medido valores de anticuerpos que son mayores que el valor medido para el control negativo (por ejemplo, un control negativo en un ELISA), se identifica al sujeto como que tiene anticuerpos para la enzima glucocerebrosidasa. El sujeto se identifica como adecuado para tratamiento con un tratamiento para la enfermedad de Gaucher alternativo (por ejemplo, tratamiento con velaglucerasa), por ejemplo, si el valor medido es mayor que el valor para el estándar, por ejemplo, por más del 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, o 90%

En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre o suero. En algunas realizaciones, la muestra ha sido modificada. Por ejemplo, los valores de anticuerpos medidos se obtuvieron poniendo en contacto la muestra con un reactivo analítico, por ejemplo, un reactivo marcado (por ejemplo, glucocerebrosidasa marcada), y/o un sustrato o célula, por ejemplo, un sustrato o célula que se une a un anticuerpo para la terapia de reemplazo de enzima glucocerebrosidasa. En algunas realizaciones, los valores de anticuerpos medidos se obtuvieron a partir de una muestra que se ha enriquecido para anticuerpos, por ejemplo, una porción concentrada de una muestra de sangre o suero. En algunas realizaciones, la evaluación se obtuvo mediante un método descrito en la presente.

En algunas realizaciones, el método incluye medir el valor de anticuerpos medido, por ejemplo, mediante un método descrito en la presente.

El método incluye seleccionar un sujeto sobre la base de que el sujeto ha dado positivo para la producción de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) para el tratamiento que el sujeto está tomando actualmente para la enfermedad de Gaucher, por ejemplo, por un método descrito en la presente, o sobre la base que el sujeto está en riesgo de desarrollar anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) para un tratamiento para la enfermedad de Gaucher (por ejemplo, imiglucerasa o uplyso) y administrar velaglucerasa al sujeto.

En algunas realizaciones, el sujeto dio positivo para la producción de anticuerpos IgE para el tratamiento que el sujeto está tomando actualmente para la enfermedad de Gaucher (por ejemplo, imiglucerasa o Uplyso).

En algunas realizaciones, el sujeto dio positivo para la producción de anticuerpos IgM para el tratamiento que el sujeto está tomando actualmente para la enfermedad de Gaucher (por ejemplo, imiglucerasa o Uplyso).

En algunas realizaciones, el sujeto dio positivo para la producción de anticuerpos IgG y/o IgA para el tratamiento que el sujeto está tomando actualmente para la enfermedad de Gaucher (por ejemplo, imiglucerasa o Uplyso). Cuando la enzima glucocerebrosidasa alternativa es velaglucerasa, la velaglucerasa se administra a una dosis de 15 a 60 U/kg (por ejemplo, de 30 U/kg a 60 U/kg, por ejemplo, 15 U/kg, 30 U/kg, 45 U/kg o 60 U/kg), a una dosis igual o inferior a 22,5 U/kg, a una dosis entre 22,5 y 37,5 U/kg, a una dosis entre 37,5 y 52,5 U/kg, o a una dosis igual o superior a 52,5 U/kg. En algunas realizaciones, la velaglucerasa se administra a una dosis de 2,5 U/kg a 60 U/kg. En algunas realizaciones, la velaglucerasa se administra cada dos semanas por infusión intravenosa. En otras realizaciones, la velaglucerasa se administra semanalmente por infusión intravenosa. En algunas realizaciones, la velaglucerasa se administrar tres veces a la semana por infusión intravenosa, por ejemplo, a una dosis de 2,5 U/kg.

En algunas realizaciones, la infusión de la dosis (por ejemplo, una dosis descrita en la presente) se produce durante menos de 2 horas, por ejemplo, 90 minutos, 80 minutos, 70 minutos, 60 minutos, 50 minutos o 45 minutos. En realizaciones preferidas, la infusión de la dosis se produce durante 60 minutos.

En algunas realizaciones, la velaglucerasa se administra a una velocidad de 2 U/kg/minuto, 1,5 U/kg/minuto, 1 U/kg/minuto, o 0,5 U/kg/minuto.

En algunas realizaciones, la administración comprende terapia domiciliaria (por ejemplo, en el hogar, lugar de trabajo u otro entorno no clínico (por ejemplo, no hospitalario) del sujeto). En algunas realizaciones, la administración (por ejemplo, a través de infusión) es realizada por un profesional de la salud (por ejemplo, enfermera o asistente médico). Por ejemplo, si el sujeto no ha experimentado un evento adverso (AE) (por ejemplo, un AE serio relacionado con fármacos o un AE relacionado con la infusión, por ejemplo, un evento descrito en la presente), por ejemplo, después de una, dos o tres administraciones (por ejemplo, a través de la infusión) de velaglucerasa, el sujeto es elegible para recibir terapia domiciliaria para administraciones posteriores.

Un método para seleccionar a un sujeto con la enfermedad de Gaucher para el tratamiento con una enzima glucocerebrosidasa alternativa incluye opcionalmente seleccionar un sujeto para dicho tratamiento sobre la base de que el sujeto necesita reacción en el sitio de infusión reducida (por ejemplo, reducida en comparación con la reacción asociada con o provocada por el tratamiento que el sujeto está tomando actualmente para la enfermedad de Gaucher, por ejemplo, imiglucerasa o uplyso). El método incluye evaluar (por ejemplo, medir) u obtener una evaluación del sujeto para detectar la reacción en el sitio de infusión (es decir, evento adverso relacionado con la infusión) (por ejemplo, durante o en las 12 horas de la infusión de la terapia de reemplazo con enzima glucocerebrosidasa), (por ejemplo, para la terapia que se administra actualmente al sujeto, por ejemplo, imiglucerasa o uplyso), por ejemplo, y comparar el nivel medido de la reacción en el sitio con un estándar (por ejemplo, un control negativo). Por ejemplo, si el sujeto tiene un valor medido de reacción en el sitio al tratamiento que el sujeto está tomando actualmente para la enfermedad de Gaucher que es mayor que (por ejemplo, mayor en más del 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90%) el valor medido para el control negativo (por ejemplo, la reacción en el sitio observada después de la infusión de placebo en el sujeto), el sujeto se selecciona para un tratamiento alternativo para la enfermedad de Gaucher (por ejemplo, tratamiento con velaglucerasa), por ejemplo, si el valor medido de la reacción en el sitio es mayor que el valor para el estándar (por ejemplo, control negativo), por ejemplo, en más de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, o 90%.

En algunas realizaciones, el método incluye medir el valor de anticuerpos, por ejemplo, mediante un método descrito en la presente.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para evaluar un sujeto, por ejemplo, un sujeto al que se le está administrando actualmente una terapia de reemplazo de enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, imiglucerasa, velaglucerasa o uplyso). El método incluye evaluar (por ejemplo, medir) u obtener una evaluación de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7) de los siguientes parámetros del sujeto:

concentración de hemoglobina, recuento de plaquetas, volumen del hígado (por ejemplo, como un porcentaje del peso corporal total), volumen del bazo (por ejemplo, como un porcentaje del peso corporal total), reacción en el sitio de infusión, parámetro esquelético o presencia de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) (por ejemplo, anticuerpos IgE, IgM, IgG y/o IgA) para una terapia de reemplazo de enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, el valor medio de uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7) de estos parámetros).

El parámetro esquelético puede ser, por ejemplo, la densidad mineral ósea (BMD) (por ejemplo, medida mediante un cambio (por ejemplo, mejora) en la puntuación Z). La BMD puede evaluarse, por ejemplo, mediante absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA). Otros parámetros esqueléticos que pueden evaluarse incluyen,

por ejemplo, puntuación T (por ejemplo, para determinar la clasificación de la OMS de hueso normal, osteopenia y osteoporosis), crecimiento de un sujeto (por ejemplo, un sujeto pediátrico); edad esquelética de un sujeto (por ejemplo, un sujeto pediátrico); y la carga de médula ósea (BMB) (por ejemplo, en un sujeto adulto).

La evaluación se puede realizar, por ejemplo, aproximadamente cada semana, aproximadamente cada dos semanas, aproximadamente cada tres semanas, aproximadamente cada cuatro semanas, aproximadamente cada dos meses, aproximadamente cada tres meses, aproximadamente cada cuatro meses, aproximadamente cada cinco meses, aproximadamente cada seis meses, aproximadamente cada siete meses, aproximadamente cada ocho meses, aproximadamente cada nueve meses, aproximadamente cada diez meses, aproximadamente cada once meses, o aproximadamente cada doce meses durante el curso del tratamiento. La evaluación también se puede realizar antes de comenzar el tratamiento (por ejemplo, para establecer un punto de referencia). La evaluación puede incluir comparar el valor del parámetro del sujeto con un estándar (por ejemplo, un estándar descrito en la presente, por ejemplo, un control negativo), y opcionalmente determinar si hay una diferencia entre el valor del parámetro del sujeto y el valor del estándar. El estándar puede ser, por ejemplo, un valor del parámetro medido en un sujeto con enfermedad de Gaucher que se trata con una terapia diferente para la enfermedad de Gaucher (por ejemplo, un tratamiento descrito en la presente), o un valor medio para una cohorte de dichos sujetos (por ejemplo, después de la misma duración de la terapia) o el punto de referencia para el sujeto (o un punto de referencia medio para una cohorte de sujetos con enfermedad de Gaucher) antes de comenzar la terapia (por ejemplo, antes del comienzo de una terapia de reemplazo con enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, imiglucerasa) o velaglucerasa)). Por ejemplo, un parámetro esquelético (por ejemplo, densidad mineral ósea) puede evaluarse para cambios a largo plazo, por ejemplo, después de 1, 2, 3, 4 o más años de terapia de reemplazo de enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, imiglucerasa, velaglucerasa o uplyso).

La evaluación puede incluir determinar si están presentes uno o más de los siguientes:

la diferencia entre una o más de concentración de hemoglobina, recuento de plaquetas, volumen del hígado, volumen del bazo o un parámetro esquelético y el de un estándar (para el parámetro dado) es mayor del 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90%. Alternativamente o adicionalmente, la evaluación puede incluir determinar si hay una reacción en el sitio de infusión (por ejemplo, durante o en las 12 horas después de la infusión) y/o anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) (por ejemplo, anticuerpos IgE, IgM, IgG y/o IgA) para una terapia de reemplazo de enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, Imiglucerasa o uplyso).

En algunas realizaciones, la evaluación puede ser de una o más de concentración de hemoglobina, recuento de plaquetas y determinar si hay anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) para una terapia de reemplazo de enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, imiglucerasa o uplyso). En algunas realizaciones, la evaluación para uno o más de estos parámetros se realiza en una muestra del sujeto, por ejemplo, una muestra de sangre o suero. En algunas realizaciones, la muestra se ha modificado. Por ejemplo, los valores se obtuvieron poniendo en contacto la muestra con un reactivo analítico y/o un sustrato o célula, por ejemplo, un sustrato o célula que se une a un anticuerpo para la terapia de sustitución de enzima glucocerebrosidasa. En algunas realizaciones, los valores se obtuvieron a partir de una muestra que se ha enriquecido para, por ejemplo, hemoglobina, plaquetas y/o anticuerpos, por ejemplo, una porción concentrada de una muestra de sangre o suero. En algunas realizaciones, la evaluación se obtuvo mediante un método descrito en la presente.

En base a la determinación, se puede tomar una decisión de tratamiento para el sujeto. Por ejemplo, si un sujeto que recibe un tratamiento para la enfermedad de Gaucher, como una terapia de reemplazo de enzima glucocerebrosidasa, por ejemplo, imiglucerasa o uplyso, tiene un valor para uno o más de los parámetros que difiere del valor de un estándar (por ejemplo, un sujeto con la enfermedad de Gaucher que está recibiendo una terapia diferente (velaglucerasa), se puede tomar la decisión de transferir al sujeto que actualmente recibe un tratamiento de reemplazo de enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, tratamiento con imiglucerasa) a un tratamiento de reemplazo de enzima glucocerebrosidasa diferente (por ejemplo, tratamiento de velaglucerasa). Por ejemplo, si se detectan anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) (por ejemplo, anticuerpos IgE, IgM, IgG y/o IgA) para la imiglucerasa en un sujeto sometido a tratamiento con imiglucerasa, el sujeto puede transferirse al tratamiento con velaglucerasa. Como otro ejemplo, si se detecta una reacción en el sitio de infusión durante o dentro de las 12 horas de la administración de imiglucerasa a un sujeto sometido a tratamiento con imiglucerasa, el sujeto puede transferirse al tratamiento con velaglucerasa. Como otro ejemplo, si el recuento de plaquetas medio en un sujeto sometido a tratamiento con imiglucerasa es menor (por ejemplo, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90% menos) que el valor medio de recuento de plaquetas obtenido para una cohorte de sujetos con enfermedad de Gaucher tratados con velaglucerasa para la misma duración a la misma dosis y la misma frecuencia de administración del tratamiento, el sujeto puede transferirse a tratamiento de velaglucerasa.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona el uso de una terapia de reemplazo de enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, velaglucerasa, imiglucerasa o uplyso), sola o en combinación con otro agente s)

descrito en la presente (por ejemplo, tartrato de isofagomina, miglustat o Genz112638), para su uso en el tratamiento.

5 En algunos aspectos, la divulgación proporciona el uso de una terapia de reemplazo de enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, velaglucerasa o imiglucerasa), sola o en combinación con otro agente(s) descrito en la presente (por ejemplo, tartrato de isofagomina, miglustat o Genz112638), para la preparación de un medicamento, por ejemplo, para tratar la enfermedad de Gaucher.

10 En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica de velaglucerasa. La composición comprende: velaglucerasa, un lioprotector (por ejemplo, un carbohidrato (por ejemplo, sacarosa)), una sal tampón (por ejemplo, citrato y/o ácido cítrico, por ejemplo, citrato de sodio y ácido cítrico) y un agente estabilizante (por ejemplo, polisorbato), por ejemplo, polisorbato 20).

15 En algunas realizaciones, la composición puede liofilizarse. En algunas realizaciones, el contenido de humedad de la composición liofilizada es del 1% al 6%, por ejemplo, del 1,3% al 6,2%. En algunas realizaciones, el contenido de humedad de la composición liofilizada es del 1% al 5%. En algunas realizaciones, el contenido de humedad de la composición liofilizada es del 3% al 5%. En algunas realizaciones, el contenido de humedad es mayor o igual al 3%. En algunas realizaciones, el contenido de humedad es del 3%.

20 En algunas realizaciones, la composición liofilizada puede evaluarse. Por ejemplo, la estructura secundaria de la composición liofilizada puede evaluarse, por ejemplo, mediante FT-IR.

25 En otras realizaciones, la composición puede ser una solución reconstituida. Por ejemplo, la composición es una solución reconstituida en un portador farmacéuticamente aceptable como agua estéril para inyección (por ejemplo, un vial de 200 unidades con 2,2 ml de agua estéril para inyección o un vial de 400 unidades con 4,3 ml de agua estéril para inyección). En algunas realizaciones, la composición puede comprender además, o consistir de, solución de cloruro sódico adecuada para administración intravenosa (por ejemplo, solución de cloruro sódico al 0,9% adecuada para administración intravenosa).

30 En algunas realizaciones, la solución reconstituida puede evaluarse, por ejemplo, para la degradación. Por ejemplo, la solución reconstituida puede evaluarse mediante SE-HPLC y/o RP-HPLC, por ejemplo, para la presencia de productos de degradación.

35 En algunas realizaciones, la solución reconstituida puede evaluarse para determinar la oxidación. Por ejemplo, la solución reconstituida puede evaluarse por mapeo de péptidos.

40 En algunos aspectos, la descripción presenta un ensayo (por ejemplo, método) para detectar un anticuerpo anti-glucocerebrosidasa en una muestra (por ejemplo, una muestra de un paciente, por ejemplo, sangre o suero). El método incluye:

45 proporcionar una glucocerebrosidasa (por ejemplo, velaglucerasa, imiglucerasa o uplyso) inmovilizada en una superficie (por ejemplo, un micropocillo) (por ejemplo, la superficie puede recubrirse con un agente de acoplamiento como estreptavidina y la glucocerebrosidasa (por ejemplo, velaglucerasa, imiglucerasa o uplyso) puede estar unida a un agente (por ejemplo, biotina) que se asocia, por ejemplo se une, al agente de acoplamiento, por ejemplo, la glucocerebrosidasa (por ejemplo, velaglucerasa, imiglucerasa o uplyso) se inmoviliza a la superficie a través de la unión por biotina a la estreptavidina;

50 poner en contacto la muestra con la glucocerebrosidasa inmovilizada (por ejemplo, velaglucerasa, imiglucerasa o Uplyso), bajo condiciones que permiten que un anticuerpo anti-glucocerebrosidasa en la muestra, si lo hay, se una a la glucocerebrosidasa inmovilizada, formando de este modo una mezcla;

55 realizar opcionalmente un paso de lavado para eliminar de la mezcla cualquier material en la muestra que no esté unido a la glucocerebrosidasa inmovilizada;

añadir glucocerebrosidasa marcada (por ejemplo, velaglucerasa o imiglucerasa), en donde la glucocerebrosidasa marcada se marca con un marcador detectable (por ejemplo, glucocerebrosidasa marcada con rutenio), a la mezcla bajo condiciones que permiten que la glucocerebrosidasa marcada se una al anticuerpo anti-glucocerebrosidasa (por ejemplo, que se una a la glucocerebrosidasa inmovilizada), si la hay, (preferiblemente, el marcador no es lo mismo que el agente de acoplamiento y/o el agente que se une al agente de acoplamiento, por ejemplo, si se usa biotina para inmovilizar la glucocerebrosidasa en la superficie, el marcador no es biotina);

60 realizar opcionalmente un paso de lavado para eliminar la glucocerebrosidasa marcada que no está unida al anticuerpo anti-glucocerebrosidasa de la mezcla; y

detectar (y opcionalmente cuantificar) el marcador en la mezcla, por ejemplo, en donde la detección del marcador indica que hay un anticuerpo anti-glucocerebrosidasa en la muestra.

65 En algunas realizaciones, el marcador detectado se cuantifica a un valor y se compara con un control, por ejemplo, un control negativo, en el que si el valor del marcador detectado es mayor que el control negativo, la

muestra contiene anticuerpo anti-glucocerebrosidasa. En algunas realizaciones, el control negativo es el valor de control negativo medio (por ejemplo, fondo) para una pluralidad de controles negativos. Por ejemplo, el control negativo puede ser suero humano normal (NHS), y el valor de control negativo medio puede ser la media para una pluralidad de lotes de NHS, o la media de los valores de control negativo obtenidos de una pluralidad de ensayos. Por ejemplo, el valor de control negativo puede ser un valor de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 ng/ml de anticuerpo, por ejemplo, un valor mayor que ese número para una muestra indica que hay un anticuerpo anti-glucocerebrosidasa en la muestra. Como otro ejemplo, el valor de control negativo puede ser 200, 250, 300 (por ejemplo, 306), 350, ó 400, por ejemplo, un valor mayor que ese número para una muestra indica que hay un anticuerpo anti-glucocerebrosidasa en la muestra

En algunas realizaciones, el ensayo es para detectar anticuerpos anti-velaglucerasa. En otra realización, el ensayo es para detectar anticuerpos anti-imiglucerasa. En algunas realizaciones, el ensayo es para detectar anticuerpos anti-uplyso.

En algunos aspectos, la descripción presenta un ensayo para detectar un anticuerpo anti-glucocerebrosidasa (por ejemplo, anticuerpo anti-glucocerebrosidasa IgG) en una muestra (por ejemplo, una muestra de un paciente, por ejemplo, sangre o suero). El método incluye:

poner en contacto la muestra con glucocerebrosidasa marcada (por ejemplo, velaglucerasa o imiglucerasa), en donde la glucocerebrosidasa está marcada con un marcador detectable (por ejemplo, la glucocerebrosidasa está marcada con ¹²⁵I), bajo condiciones que permiten que un anticuerpo anti-glucocerebrosidasa en la muestra, si lo hay, se una a la glucocerebrosidasa marcada, formando así una mezcla;

aplicar la mezcla a una resina (por ejemplo, resina de proteína G, proteína A, proteína A/G o proteína L) (por ejemplo, una columna de centrifugación de proteína G) bajo condiciones que permitan que el anticuerpo anti-glucocerebrosidasa, si lo hay, se una a la resina;

realizar opcionalmente un paso de lavado para eliminar la glucocerebrosidasa marcada que no está unida al anticuerpo anti-glucocerebrosidasa de la mezcla; y

detectar (y opcionalmente cuantificar) el marcador en la mezcla (por ejemplo, en la resina), por ejemplo, en donde la detección del marcador indica que hay anticuerpo anti-glucocerebrosidasa en la muestra.

En algunas realizaciones, el ensayo es para detectar anticuerpos anti-velaglucerasa. En otra realización, el ensayo es para detectar anticuerpos anti-imiglucerasa. En algunas realizaciones, el ensayo es para detectar anticuerpos anti-uplyso.

En algunas realizaciones, el marcador detectado se cuantifica a un valor y se compara con un control, por ejemplo, un control negativo, en donde si el valor del marcador detectado es mayor que el del control negativo, la muestra contiene anticuerpo anti-glucocerebrosidasa. En algunas realizaciones, el control negativo es el valor de control negativo medio (por ejemplo, fondo) para una pluralidad de controles negativos. Por ejemplo, el control negativo puede ser suero humano normal (NHS), y el valor de control negativo medio puede ser la media para una pluralidad de lotes de NHS, o la media de los valores de control negativo obtenidos de una pluralidad de ensayos.

En algunos aspectos, la divulgación presenta un ensayo para detectar un anticuerpo anti-glucocerebrosidasa humano en una muestra (por ejemplo, una muestra de un paciente, por ejemplo, sangre o suero). El método incluye:

suministrar glucocerebrosidasa (por ejemplo, velaglucerasa, imiglucerasa o uplyso) inmovilizada en una superficie (por ejemplo, un micropocillo) (por ejemplo, la superficie puede recubrirse con un agente de acoplamiento como estreptavidina y la glucocerebrosidasa se puede unir a un agente (por ejemplo, biotina)) que se asocia con, por ejemplo, se une al, agente de acoplamiento, por ejemplo, la glucocerebrosidasa se inmoviliza a la superficie a través de la unión de biotina a la estreptavidina);

poner en contacto la muestra con la glucocerebrosidasa inmovilizada, en condiciones que permitan que un anticuerpo anti-glucocerebrosidasa humano en la muestra, si lo hay, se una a la glucocerebrosidasa inmovilizada, formando de este modo una mezcla;

realizar opcionalmente un paso de lavado para eliminar de la mezcla cualquier material en la muestra que no esté unido a la glucocerebrosidasa inmovilizada;

añadir un anticuerpo que se una al anticuerpo anti-glucocerebrosidasa humano a la mezcla, en donde el anticuerpo que se une al anticuerpo anti-glucocerebrosidasa humano está marcado con un marcador detectable (por ejemplo, rutenio o biotina), bajo condiciones que permiten que el anticuerpo marcado que se une al anticuerpo anti-glucocerebrosidasa humano se una al anticuerpo anti-glucocerebrosidasa humano (por ejemplo, que se una a la glucocerebrosidasa inmovilizada), si lo hay, (preferiblemente, el marcador no es el mismo que el agente de acoplamiento y/o el agente que se une al agente de acoplamiento, por ejemplo, si se usa biotina para inmovilizar la glucocerebrosidasa a la superficie, el marcador no es biotina);

realizar opcionalmente un paso de lavado para eliminar el anticuerpo marcado que se une al anticuerpo anti-glucocerebrosidasa humano que no está unido al anticuerpo anti-glucocerebrosidasa humano de la mezcla; y

detectar (y opcionalmente cuantificar) el marcador en la mezcla, por ejemplo, en donde la detección del marcador indica que hay anticuerpo anti-glucocerebrosidasa humano en la muestra.

5 En algunas realizaciones, el ensayo detecta anticuerpos anti-velaglucerasa. En algunas realizaciones, el ensayo detecta anticuerpos anti-imiglucerasa. En algunas realizaciones, el ensayo detecta anticuerpos anti-uplyso.

10 En algunas realizaciones, el marcador detectado se cuantifica a un valor y se compara con un control, por ejemplo, un control negativo, donde si el valor del marcador detectado es mayor que el control negativo, la muestra contiene anticuerpo anti-velaglucerasa. En algunas realizaciones, el control negativo es el valor de control negativo medio (por ejemplo, fondo) para una pluralidad de controles negativos. Por ejemplo, el control negativo puede ser suero humano normal (NHS), y el valor de control negativo medio puede ser la media para una pluralidad de lotes de NHS, o la media de los valores de control negativo obtenidos de una pluralidad de ensayos.

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une al anticuerpo anti-glucocerebrosidasa humano es específico de isotipo, en donde el anticuerpo específico de isotipo que se une al anticuerpo anti-glucocerebrosidasa humano se une específicamente a un anticuerpo humano del isotipo para el que es específico.

20 En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une al anticuerpo anti-glucocerebrosidasa humano es un anticuerpo específico de IgA y se une a un anticuerpo anti-glucocerebrosidasa humano IgA en la muestra.

En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une al anticuerpo anti-glucocerebrosidasa humano es un anticuerpo específico de IgE y se une a un anticuerpo anti-glucocerebrosidasa humano IgE en la muestra.

25 En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une al anticuerpo anti-glucocerebrosidasa humano es un anticuerpo específico de IgM y se une a un anticuerpo IgM humano anti-glucocerebrosidasa en la muestra.

En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une al anticuerpo anti-glucocerebrosidasa humano es un anticuerpo específico de IgG y se une a un anticuerpo IgG humano anti-glucocerebrosidasa en la muestra.

30 En algunos aspectos, la divulgación presenta un método para determinar si un anticuerpo anti-glucocerebrosidasa (por ejemplo, en una muestra) neutraliza (por ejemplo, inhibe) la actividad de glucocerebrosidasa (por ejemplo, velaglucerasa o imiglucerasa). El método incluye:

35 proporcionar una célula (por ejemplo, una célula humana, por ejemplo, una célula de fibroblastos humanos) que expresa el receptor de manosa de macrófagos humana (MMR);
poner en contacto el anticuerpo anti-glucocerebrosidasa con la célula, formando de este modo una mezcla;
poner en contacto la glucocerebrosidasa marcada (por ejemplo, velaglucerasa, imiglucerasa o uplyso) con la mezcla, en donde la glucocerebrosidasa se marca con un marcador detectable (por ejemplo, la glucocerebrosidasa se marca con un marcador fluorescente, por ejemplo, un colorante fluorescente verde, como Alexa FLUOR®488 o isotiocianato de fluoresceína (FITC)), bajo condiciones que permiten que la glucocerebrosidasa marcada se una a la MMR en ausencia de un anticuerpo anti-glucocerebrosidasa (por ejemplo, en donde la unión de la glucocerebrosidasa a la SPR permite la captación celular de la glucocerebrosidasa);
40 eliminar la glucocerebrosidasa marcada no unida y la glucocerebrosidasa marcada unida a la superficie celular (por ejemplo, mediante digestión con tripsina); y
45 medir la cantidad de glucocerebrosidasa marcada en la célula.

50 En algunas realizaciones, los niveles de glucocerebrosidasa marcada se comparan con un control, por ejemplo, el nivel de glucocerebrosidasa marcada detectada en ausencia del anticuerpo anti-glucocerebrosidasa bajo condiciones idénticas.

En algunas realizaciones, las células no expresan un receptor de Fc (por ejemplo, receptor de Fc humano).

55 En algunas realizaciones, el método detecta si hay anticuerpos neutralizantes anti-velaglucerasa. En algunas realizaciones, el método detecta si hay anticuerpos neutralizantes anti-imiglucerasa. En algunas realizaciones, el método detecta si hay anticuerpos neutralizantes anti-uplyso.

60 En algunas realizaciones, el método detecta si un anticuerpo anti-imiglucerasa neutraliza la actividad de imiglucerasa. En algunas realizaciones, el método detecta si un anticuerpo anti-velaglucerasa neutraliza la actividad de velaglucerasa. En algunas realizaciones, el método detecta si un anticuerpo anti-uplyso neutraliza la actividad de uplyso.

65 En algunas realizaciones, el método detecta si un anticuerpo anti-imiglucerasa neutraliza la actividad de la velaglucerasa y/o la actividad de uplyso. En algunas realizaciones, el método detecta si un anticuerpo anti-velaglucerasa neutraliza la actividad de imiglucerasa y/o uplyso. En algunas realizaciones, el método detecta si un

anticuerpo anti-uplyso neutraliza la actividad de imiglucerasa y/o velaglucerasa.

En algunos aspectos, la divulgación presenta un método para determinar si un anticuerpo anti-velaglucerasa (por ejemplo, en una muestra) neutraliza (por ejemplo, inhibe) la actividad de imiglucerasa. El método incluye:

proporcionar una célula (por ejemplo, una célula humana, por ejemplo, una célula de fibroblastos humanos) que expresa el receptor de manosa de macrófagos humana (MMR);
poner en contacto el anticuerpo anti-velaglucerasa con la célula, formando así una mezcla;
poner en contacto la imiglucerasa marcada con la mezcla, en donde la imiglucerasa se marca con un marcador detectable (por ejemplo, la imiglucerasa se marca con un marcador fluorescente, por ejemplo, un colorante fluorescente verde, como Alexa FLUOR® 488 o isotiocianato de fluoresceína (FITC)), bajo condiciones que permiten que la imiglucerasa marcada se una a la MMR en ausencia de un anticuerpo anti-velaglucerasa (por ejemplo, en donde la unión de la imiglucerasa a la MMR permite la captación celular de la imiglucerasa);
eliminar la imiglucerasa marcada no unida y la imiglucerasa marcada unida a la superficie celular (por ejemplo, mediante digestión con tripsina); y
medir la cantidad de imiglucerasa marcada en la célula.

En algunas realizaciones, los niveles de imiglucerasa marcada se comparan con un control, por ejemplo, el nivel de imiglucerasa marcada detectada en ausencia del anticuerpo anti-velaglucerasa en condiciones idénticas.

En algunas realizaciones, las células no expresan un receptor de Fc (por ejemplo, receptor de Fc humano).

En algunos aspectos, la descripción presenta un método para determinar si un anticuerpo anti-imiglucerasa (por ejemplo, en una muestra) neutraliza (por ejemplo, inhibe) la actividad de velaglucerasa. El método incluye:

proporcionar una célula (por ejemplo, una célula humana, por ejemplo, una célula de fibroblastos humanos) que expresa el receptor de manosa de macrófagos humana (MMR);
poner en contacto el anticuerpo antiimiglucerasa con la célula, formando así una mezcla;
poner en contacto la velaglucerasa marcada con la mezcla, en donde la velaglucerasa se marca con un marcador detectable (por ejemplo, la velaglucerasa se marca con un marcador fluorescente, por ejemplo, un colorante fluorescente verde, como Alexa FLUOR® 488 o isotiocianato de fluoresceína (FITC)), bajo condiciones que permiten que la velaglucerasa marcada se una a la MMR en ausencia de un anticuerpo anti-imiglucerasa (por ejemplo, en donde la unión de velaglucerasa a la MMR permite la captación celular de la velaglucerasa);
eliminar la velaglucerasa marcada no unida y la velaglucerasa marcada unida a la superficie celular (por ejemplo, mediante digestión con tripsina); y
medir la cantidad de velaglucerasa marcada en la célula.

En algunas realizaciones, los niveles de velaglucerasa marcada se comparan con un control, por ejemplo, el nivel de velaglucerasa marcada detectada en ausencia del anticuerpo antiimiglucerasa en condiciones idénticas.

En algunas realizaciones, las células no expresan un receptor de Fc (por ejemplo, receptor de Fc humano).

Definiciones

El término "sujeto" se refiere a cualquier mamífero, incluyendo pero no limitado a, cualquier animal clasificado como tal, incluyendo humanos, primates no humanos, primates, mandriles, chimpancés, monos, roedores (por ejemplo, ratones, ratas), conejos, gatos, perros, caballos, vacas, ovejas, cabras, cerdos, etc. El término "sujeto" puede usarse indistintamente con el término "paciente".

El término "aislado" se refiere a una molécula que está sustancialmente libre de su entorno natural. Por ejemplo, una proteína aislada está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas de la fuente de células o tejidos de la que se deriva. El término se refiere a preparaciones donde la proteína aislada es lo suficientemente pura para administrarse como una composición terapéutica, o por lo menos de un 70% a un 80% (p/p) pura, más preferiblemente, por lo menos un 80% 90% (p/p) pura, aún más preferiblemente, de un 90 a un 95% pura; y, lo más preferible, por lo menos un 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8% o 100% (p/p) pura.

Como se usa en la presente, el término "aproximadamente" se refiere a hasta el $\pm 10\%$ del valor calificado por este término. Por ejemplo, aproximadamente 50 mM se refiere a $50 \text{ mM} \pm 5 \text{ mM}$; aproximadamente el 4% se refiere a $4\% \pm 0,4\%$.

Los términos "dosis terapéuticamente eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" se refieren a la cantidad de un compuesto que da como resultado la prevención de los síntomas (por ejemplo, prevención del 80%, 85%,

90%, 95%, 96%, 97% , 98% o 99% de los síntomas, por ejemplo, síntomas de la enfermedad de Gaucher en un sujeto diagnosticado con la enfermedad de Gaucher), retraso en la aparición de los síntomas o mejora de los síntomas de la enfermedad de Gaucher. Una cantidad terapéuticamente eficaz será, por ejemplo, suficiente para tratar, prevenir, reducir la gravedad, retrasar la aparición, y/o reducir el riesgo de aparición de uno o más síntomas de un trastorno asociado con la enfermedad de Gaucher. La cantidad eficaz puede determinarse por métodos bien conocidos en la técnica y como se describe en secciones posteriores de esta descripción.

Los términos "tratamiento" y "método terapéutico" se refieren al tratamiento de un trastorno existente y/o medidas profilácticas/preventivas. Aquellos con necesidad de tratamiento pueden incluir individuos que ya tienen un desorden médico particular, así como aquellos en riesgo o que tienen, o que pueden finalmente adquirir el desorden. La necesidad de tratamiento se evalúa, por ejemplo, mediante la presencia de uno o más factores de riesgo asociados con el desarrollo de un trastorno, la presencia o progresión de un trastorno, o la receptividad probable al tratamiento de un sujeto que tiene el trastorno. El tratamiento puede incluir ralentizar o revertir la progresión de un trastorno.

El término "tratar" se refiere a administrar una terapia en una cantidad, manera y/o modo eficaces para mejorar o prevenir una afección, síntoma o parámetro asociado con un trastorno (por ejemplo, un trastorno descrito en la presente) o para prevenir la aparición, progresión, o exacerbación del trastorno, ya sea en un grado estadísticamente significativo o en un grado detectable por un experto en la técnica. En consecuencia, el tratamiento puede lograr beneficios terapéuticos y/o profilácticos. Una cantidad, manera o modo eficaz puede variar dependiendo del sujeto y puede adaptarse al sujeto.

"Reacción en el sitio de infusión" como se usa en la presente se refiere a uno o más síntomas de hipersensibilidad desarrollados por un sujeto durante o poco después de una infusión de una terapia de reemplazo de enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, dentro de las 12 horas de la infusión de un tratamiento de reemplazo de enzima glucocerebrosidasa al sujeto). Los síntomas incluyen, por ejemplo, prurito, ardor, hinchazón o absceso en el sitio de infusión, enrojecimiento, urticaria/angioedema, molestias en el pecho, taquicardia, cianosis, síntomas respiratorios y parestesia.

El término "combinación" se refiere al uso de los dos o más agentes o terapias para tratar al mismo paciente, en donde el uso o la acción de los agentes o terapias se solapan en el tiempo. Los agentes o terapias pueden administrarse al mismo tiempo (por ejemplo, como una formulación única que se administra a un paciente o como dos formulaciones separadas administradas simultáneamente) o secuencialmente en cualquier orden.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos acompañantes y la descripción a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIG. 1 (a)-(f)** representa el % de cambio medio en valores hematológicos, valores de órganos y biomarcadores en la fase de prueba I/II.

La **FIG. 2** representa el % de cambio medio de los parámetros clínicos clave en la fase I/II y los ensayos de extensión.

La **FIG. 3** representa el cambio de los parámetros hematológicos medios de TKT025EXT (N=10) desde el punto de referencia en TKT025.

La **FIG. 4** representa el cambio de los volúmenes de órganos normalizados medios de TKT025EXT (N=10) desde el punto de referencia en TKT025.

La **FIG. 5** representa el cambio temporal de TKT025 y TKT025EXT en las puntuaciones Z medias de la columna lumbar desde el punto de referencia.

La **FIG. 6** representa el cambio temporal de TKT025 y TKT025EXT en la puntuación Z media del cuello femoral desde el punto de referencia.

La **FIG. 7** representa el cambio en la concentración de hemoglobina medio de TKT032 (N=25) desde el punto de referencia.

La **FIG. 8** representa el cambio en el recuento de plaquetas medio de TKT032 (N=25) desde el punto de referencia.

La **FIG. 9** representa el cambio del volumen del bazo normalizado medio de TKT032 (N=25) desde el punto de referencia.

La **FIG. 10** representa el cambio del volumen del hígado normalizado medio de TKT032 (N=25) desde el punto de referencia.

La **FIG. 11** representa el cambio en la concentración de hemoglobina medio de HGT-GCB-039 (N=34) desde el punto de referencia.

La **FIG. 12** representa el cambio del recuento de plaquetas medio HGT-GCB-039 (N=34) desde el punto de referencia.

La **FIG. 13** representa el cambio medio de HGT-GCB-039 (N=34) desde el punto de referencia del recuento de plaquetas en pacientes sin bazo.

La **FIG. 14** representa el cambio de volumen del hígado normalizado medio de HGT-GCB-039 (N=34) desde el punto de referencia.

La **FIG. 15** representa el cambio medio de TKT034 desde el punto de referencia en la concentración de hemoglobina.

La **FIG. 16** representa el cambio medio porcentual n de TKT034, desde el punto de referencia en el recuento de plaquetas.

La **FIG. 17** representa el porcentaje de cambio medio de TKT034 desde el punto de referencia en el volumen del hígado normalizado.

La **FIG. 18** representa el porcentaje de cambio medio de TKT034 desde el punto de referencia en el volumen de bazo normalizado.

La **FIG. 19** representa el porcentaje de cambio medio de TKT034 desde el punto de referencia en la quitotriosidasa plasmática.

La **FIG. 20** representa el porcentaje de cambio medio de TKT034 desde el punto de referencia en CCL18 en plasma.

La **FIG. 21** representa una evaluación de inmunogenicidad de pacientes en estudios clínicos de velaglucerasa alfa.

La **FIG. 22** representa una selección de anticuerpos anti-fármacos mediante inmunoensayo de electro-quimioluminiscencia (ECL).

La **FIG. 23** representa una curva de respuesta a la dosis del ensayo de selección.

La **FIG. 24** representa un ensayo confirmatorio de IgG ADA.

La **FIG. 25** representa una curva de respuesta a la dosis del ensayo RIP.

La **FIG. 26** representa ensayos confirmatorios de ADA de IgA, IgM e IgE.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La divulgación se basa, en parte, en el descubrimiento de que la velaglucerasa provoca menos respuesta inmune (por ejemplo, menos producción de anticuerpos, por ejemplo, menos producción de anticuerpos neutralizantes) que la imiglucerasa tras la administración a un sujeto (por ejemplo, un sujeto con enfermedad de Gaucher). Se ha descubierto que la velaglucerasa provoca menos reacción en el sitio de infusión tras la administración a un sujeto (por ejemplo, un sujeto con enfermedad de Gaucher) que la imiglucerasa y la velaglucerasa puede dar como resultado un aumento en el recuento de plaquetas cuando se administra a un sujeto (por ejemplo, un sujeto con enfermedad de Gaucher) que la imiglucerasa.

Velaglucerasa

La velaglucerasa es β -glucocerebrosidasa humana producida por activación génica en una línea celular humana. La activación génica se refiere a la recombinación dirigida con un promotor que activa el gen de β -glucocerebrosidasa endógeno en la línea celular humana seleccionada. La velaglucerasa se secreta como una glicoproteína monomérica de aproximadamente 63 kDa y está compuesta de 497 aminoácidos con una secuencia idéntica a la proteína humana natural. La secuencia de aminoácidos de velaglucerasa se describe en Zimran et al. (2007) Blood Cells Mol Dis, 39:115-118.

La glicosilación de velaglucerasa alfa se altera usando kifunensina, un inhibidor de manosidasa I, durante el cultivo celular, lo que da como resultado la secreción de una proteína que contiene principalmente glicanos de tipo manosa alta que tienen 6-9 unidades de manosa por glucano. A continuación se proporciona un resumen de la estructura de glucanos de la velaglucerasa.

Sitio de Glicosilación	Glucano predominante	Otros Glucanos
Asn19	<u>Manosa alta</u> (Man) ₉ (GlcNAc) ₂	<u>Manosa alta</u> (Man) ₆₋₈ (GlcNAc) ₂ <u>Manosa alta fosforilada</u> (Phos) ₁ (Man) ₈₋₉ (GlcNAc) ₂ fosfato capsulado GlcNAc (Phos) ₁ (Man) ₈₋₉ (GlcNAc) ₃ <u>Híbrido</u> (Hex) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁
Asn59	Hi2.h-manosa (Man) ₉ (GlcNAc) ₂	Manosa alta (Man) ₅₋₈ (GlcNAc) ₂ <u>Manosa alta fosforilada</u>

			(continuación)
	Sitio de Glicosilación	Glucano predominante	Otros Glucanos
5			(Phos) ₁ (Man) ₇₋₉ (GlcNAc) ₂ GlcNAc capsulado fosfato (Phos) ₁ (man) ₈₋₉ (GlcNAc) ₃
10			<u>Híbrido</u> (NeuAc) ₁ (Gal) ₁ (Man) ₅ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁ Complejo (NeuAc) ₀₋ z(Gal) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₄ (Fuc) ₁ (Gal) ₃ (Man) ₃ (GlcNAc) ₅ (Fuc) ₁
15	Asn146	<u>Manosa alta</u> (Man) ₉ (GlcNAc) ₂	<u>Manosa alta</u> (Man) ₆₋₈ (GlcNAc) ₂ <u>Manosa alta fosforilada</u> (Phos) ₁ (man) ₇₋₉ (GlcNAc) ₂ <u>fosfato capsulado GlcNAc</u> (Phos) ₁ (Man) ₉ (GlcNAc) ₃ <u>Híbrido</u> (NeuAc) ₁ (Gal) ₁ (Man) ₅ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁
20			
25	Asn270	<u>Manosa alta</u> (Man) ₉ (GlcNAc) ₂	<u>Manosa alta</u> (Man) ₆₋₈ (GlcNAc) ₂ <u>Manosa alta fosforilada</u> (Phos) ₁ (Man) ₆₋₉ (GlcNAc) ₂ fosfato capsulado GlcNAc (Phos) ₁ (Man) ₉ (GlcNAc) ₃ <u>Híbrido</u> Complejo (Gal) ₁ Man ₇ GlcNAc ₃ Fuc ₁ (NeuAc) ₁ (Gal) ₁ (Man) ₅ (GlcNAc) ₃ (Fuc) ₁ (NeuAc) ₂ (Gal) ₂ (Man) ₃ (GlcNAc) ₄ (Fuc) ₁
30			
35			
40	Asn462	No detectado	No detectado

La velaglucerasa tiene tres dominios no contiguos, con el sitio catalítico localizado en el dominio III (residuos 76-381 y 416-430), un barril (β/α) 8 (TIM).

La velaglucerasa (VPRIV™) está disponible comercialmente de Shire Human Genetics Therapies, Inc. Los métodos para elaborar velaglucerasa se describen en, por ejemplo, Patente U.S. N° 7.138.262.

Forma Farmacéutica. La velaglucerasa (también referida en la presente como velaglucerasa alfa) es un polvo liofilizado sin conservantes, blanco a blanquecino, estéril, para solución en viales de un solo uso para infusión intravenosa (IV) después de la reconstitución con agua estéril para inyección.

Composición Cualitativa y Cuantitativa. Tras la reconstitución con agua estéril para inyección, cada vial contiene aproximadamente 2.5 mg/ml (40 U/ml) de velaglucerasa alfa, 50 mg/ml de sacarosa, 12.9 mg/ml de dihidrato de citrato de sodio, 1.3 mg/ml de monohidratado de ácido cítrico y 0,11 mg/ml de polisorbato 20. Cada vial contiene un volumen extraíble de .0 ml para el vial de 200 U y de 4,0 ml para el vial de 400 U. La velaglucerasa se suministra en 200 U/vial (5 mg) o 400 U/vial (10 mg) de velaglucerasa alfa, una unidad (U) de actividad enzimática definiéndose como la cantidad de enzima requerida para convertir un micromol de p-nitrofenilo β -D-glucopiranosido a p-nitrofenol por minuto a 37° C.

Recipiente y Contenidos. La velaglucerasa es un polvo liofilizado, estéril para la solución suministrada en un vial de vidrio tipo I de 5 ml (presentación de 200 U/vial) o 20 ml (presentación de 400 U/vial). Cada vial contiene 200 U (5 mg) o 400 U (10 mg) de velaglucerasa alfa. Los viales se cierran con un tapón de goma de butilo con un recubrimiento de fluoro-resina y se sellan con un sello de aluminio con una tapa plástica de cierre flip-off.

Instrucciones de Uso. La velaglucerasa es un polvo liofilizado para solución destinada a infusión intravenosa. Los viales son viales de un solo uso. La velaglucerasa no se infunde con otros productos en la misma infusión. El volumen total de infusión se administra durante un periodo de 60 minutos. La velaglucerasa debe manejarse de la siguiente manera:

1. Determinar la cantidad de viales que se reconstituirán en función del peso del paciente individual y la dosis prescrita.
2. Retirar el número requerido de viales del refrigerador. Reconstituir viales de 200 unidades con 2,2 ml de agua estéril para inyección y viales de 400 unidades con 4,3 ml de agua estéril para inyección. No agitar.
3. Antes de la dilución, inspeccionar visualmente la solución en los viales. No usar si la solución está descolorida o si hay material particulado.
4. Retirar el volumen calculado de medicamento del número apropiado de viales.
5. Diluir el volumen total requerido en 100 ml de solución de cloruro sódico al 0,9% adecuada para administración IV, balancear suavemente, pero no agitar.

Dosis. La velaglucerasa se administra a dosis de entre (e incluyendo) 2,5 U/kg y 60 U/kg de peso corporal del sujeto, por ejemplo, de 15 U/kg a 60 U/kg (por ejemplo, 15 U/kg, 30 U/kg, 45 U/kg, o 60 U/kg). La velaglucerasa puede administrarse a una velocidad de 2 U/kg/minuto, 1,5 U/kg/minuto, 1 U/kg/minuto o 0,5 U/kg/minuto. La dosis de velaglucerasa se administra al sujeto cada dos semanas.

La velaglucerasa puede administrarse a una dosis de 15 a 60 U/kg (por ejemplo, de 30 U/kg a 60 U/kg, por ejemplo, 15 U/kg, 30 U/kg, 45 U/kg o 60 U/kg), en una dosis igual o inferior a 22,5 U/kg, a una dosis de entre 22,5 y 37,5 U/kg, a una dosis de entre 37,5 y 52,5 U/kg, o en una dosis igual o superior a 52,5 U/kg. En algunas realizaciones, la velaglucerasa puede administrarse a una dosis de 2,5 U/kg a 60 U/kg. En algunas realizaciones, la velaglucerasa puede administrarse cada dos semanas mediante infusión intravenosa. En otras realizaciones, la velaglucerasa puede administrarse semanalmente mediante infusión intravenosa. En algunas realizaciones, la velaglucerasa puede administrarse tres veces a la semana mediante infusión intravenosa, por ejemplo, a una dosis de 2,5 U/kg.

En algunas realizaciones, la infusión de la dosis (por ejemplo, una dosis descrita en la presente tiene lugar durante menos de 2 horas, por ejemplo, menos de 90 minutos, 80 minutos, 70 minutos, 60 minutos, 50 minutos o 45 minutos).

Glucocerebrosidasa humana producida recombinantemente. Otras formas de glucocerebrosidasa humana producida recombinantemente que pueden usarse en las composiciones, ensayos y métodos descritos en la presente. Por ejemplo, la imiglucerasa (Cerazyme®) se produce recombinantemente en células de ovario de hámster chino (CHO) y está disponible comercialmente. Además, también puede usarse una glucocerebrosidasa recombinante (prGCD) expresada en células vegetales. La glucocerebrosidasa recombinante vegetal puede obtenerse por métodos descritos, por ejemplo, en las Publicaciones U.S. N°: US 20090208477 y US 20080038232 y las Publicaciones del PCT N°: WO 2004/096978 y WO 2008/132743.

Dosis de mantenimiento

Tras la mejora de la condición de un sujeto, puede administrarse una dosis de mantenimiento de un tratamiento, si es necesario. Posteriormente, la dosificación o frecuencia de administración, o ambas, pueden reducirse, en función de los síntomas, a un nivel en el que se mantiene la condición mejorada. Los sujetos pueden, sin embargo, requerir tratamiento intermitente a largo plazo ante cualquier recurrencia de los síntomas de la enfermedad.

Los sujetos tratados con una dosis de 60 U/kg de velaglucerasa cada dos semanas, y después de aproximadamente 15-18 meses de tratamiento total con velaglucerasa, tras mostrar mejoras en 2 de los 4 criterios terapéuticos recomendados (concentración de hemoglobina, recuento de plaquetas, volumen del hígado, bazo volumen), se cambiaron a una dosis reducida de 30 U/kg cada dos semanas. A pesar de esta reducción de la dosis, estos sujetos mostraron cambios clínicamente significativos en los 4 parámetros (concentración de hemoglobina, recuento de plaquetas, volumen del bazo y volumen del hígado) y Biomarcadores (Quitotriosidasa y CCL18) en el transcurso de 48 meses.

La comparación cualitativa entre velaglucerasa e imiglucerasa indica un beneficio adicional potencial para los sujetos Gaucher porque, a pesar de una reducción de la dosis a casi la mitad de la de imiglucerasa, los pacientes continuaron mejorando clínicamente en los 4 parámetros que demostraron un incremento marcado en la concentración de hemoglobina, incremento continuado en el recuento de plaquetas después de 36 meses, y una tasa de disminución en el volumen de hígado/bazo.

Terapia alternativa

La administración de velaglucerasa (con o sin el agente adicional) puede usarse como un tratamiento alternativo, por ejemplo, para sujetos que han sido tratados previamente con otra terapia (es decir, una terapia distinta de velaglucerasa, por ejemplo, imiglucerasa, alglucerasa, uplyso, tartrato de isofagomina, miglustat o Genz112638). Por ejemplo, un sujeto que está recibiendo tratamiento para la enfermedad de Gaucher con otra terapia puede transferirse a tratamiento con velaglucerasa, por ejemplo, si el sujeto está experimentando un efecto secundario o efecto adverso de la otra terapia. Por ejemplo, un sujeto que está recibiendo tratamiento para la enfermedad de Gaucher con imiglucerasa puede transferirse al tratamiento con velaglucerasa, por ejemplo, la velaglucerasa puede administrarse a la misma dosis y con la misma frecuencia a la que se administró la imiglucerasa. Por ejemplo, el sujeto puede haber experimentado una reacción en el sitio de infusión durante o después de la administración de imiglucerasa y/o haber desarrollado anticuerpos anti-imiglucerasa (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes para imiglucerasa).

Terapia de Combinación

A un sujeto que tiene la enfermedad de Gaucher se le puede administrar una terapia que incluye velaglucerasa en una cantidad y durante un tiempo para proporcionar un efecto terapéutico general. La velaglucerasa puede administrarse sola o en combinación con un agente(s) adicional. En el caso de una terapia de combinación, las cantidades y los tiempos de administración pueden ser los que proporcionen, por ejemplo, un efecto terapéutico sinérgico o un efecto terapéutico aditivo.

En algunas realizaciones, la velaglucerasa puede usarse en combinación con otra terapia para la enfermedad de Gaucher, por ejemplo, una terapia distinta de la terapia de reemplazo de enzimas, por ejemplo, tartrato de isofagomina, miglustat o Gen112638.

Tartrato de isofagomina. El tartrato de isofagomina (AT-2101, HGT-34100, PLICERA®) ((3*R*, 4*R*, 5*R*)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)piperidinaL-(+)-tartrato; CAS N° 957230-65-8) se une selectivamente y estabiliza la glucocerebrosidasa y facilita el tráfico apropiado de la enzima a los lisosomas, los compartimentos en la célula donde se necesita para descomponer el glucocerebrósido. Ver también, Patente U.S. N° 7.501.439.

Miglustat. El Miglustat (Zavesca®) ((2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-1-butil-2-(hidroximetil)piperidin-3,4,5-triol; CAS N° 72599-27-0) es un imino-azúcar N-alquilado, un análogo sintético de la D-glucosa y un sólido cristalino blanco a blanquecino que tiene un sabor amargo. El Miglustat muestra un gran volumen de distribución y tiene la capacidad de acceder a órganos profundos como el cerebro, hueso y pulmones.

El Miglustat inhibe la glucosilceramida sintasa una enzima esencial para la síntesis de la mayoría de los glicoesfingolípidos. El Miglustat es un inhibidor de la glucosilceramida sintasa. Funciona bloqueando una enzima que reduce la formación de ciertas sustancias químicas en el cuerpo (glicoesfingolípidos basados en glucosilceramida). El Miglustat se usa para tratar a adultos con enfermedad de Gaucher tipo 1 de leve a moderada.

Genz112638. El Genz112638 es un análogo de la glucosilceramida administrado oralmente, y está diseñado para inhibir parcialmente la glucosilceramida sintasa, lo que da como resultado una producción reducida de glucosilceramida.

Adicionalmente, las moléculas pequeñas denominadas chaperonas farmacológicas pueden usarse para unirse selectivamente a una macromolécula objetivo y aumentar su estabilidad. Por ejemplo, la unión de una chaperona farmacológica puede ayudar a una molécula objetivo, como una proteína (por ejemplo, GCB) u otra macromolécula (por ejemplo, glucocerebrósido), a plegarse en su forma tridimensional correcta. Esto puede facilitar la actividad y la función celular de la molécula (por ejemplo, actividad enzimática en el caso de GCB). Adicional o alternativamente, la chaperona farmacológica puede facilitar el tráfico de la molécula con chaperona desde el ER a la localización apropiada en una célula. Una o ambas de estas funciones pueden reducir el estrés en las células.

Las chaperonas farmacológicas también pueden disminuir la agregación y/o la acumulación de macromoléculas mal plegadas. Adicionalmente, restaurar el tráfico de macromoléculas mal plegadas (por ejemplo, proteínas) y reducir su retención en el ER puede tener el beneficio adicional de aliviar los efectos tóxicos (por ejemplo, efectos proteotóxicos) asociados con la acumulación y/o agregación de macromoléculas mutantes.

En ciertas realizaciones, las terapias de combinación pueden incluir una, dos o más terapias de reemplazo de enzima glucocerebrosidasa, opcionalmente en combinación con una o más terapias de moléculas pequeñas, como tartrato de isofagomina, miglustat o Genz112638, y/o opcionalmente en combinación con uno o más chaperonas farmacológicas y/o otros agentes.

En algunas realizaciones, cuando la velaglucerasa se administra en combinación con un agente adicional, la combinación puede dar como resultado una dosis más baja del agente adicional o la velaglucerasa que se necesita, de manera que se reducen los efectos secundarios. La combinación puede dar como resultado una administración y eficacia mejoradas de uno o ambos agentes.

Los agentes o terapias pueden administrarse al mismo tiempo (por ejemplo, como una formulación individual que se administra a un paciente o como dos formulaciones separadas administradas concurrentemente) o secuencialmente en cualquier orden. Las administraciones secuenciales son administraciones que se dan en momentos diferentes. El tiempo entre la administración de un agente y otro agente puede ser de minutos, horas, días o semanas. El uso de velaglucerasa también puede usarse para reducir la dosificación de otra terapia, por ejemplo, para reducir los efectos secundarios asociados con otro agente que se está administrando, por ejemplo, para reducir los efectos secundarios de una terapia distinta de la terapia de reemplazo de enzimas. Por consiguiente, una combinación puede incluir administrar un segundo agente a una dosificación de por lo menos un 10, 20, 30 o 50% más baja que la que se usaría en ausencia de velaglucerasa.

Una terapia de combinación puede incluir la administración de un agente que reduce los efectos secundarios de otras terapias. Por ejemplo, se puede administrar un corticosteroide a un sujeto antes de la administración del tratamiento para la enfermedad de Gaucher para disminuir la reacción en el sitio de infusión. Como otro ejemplo, la terapia de suplemento de hierro puede administrarse durante el transcurso de la terapia de velaglucerasa.

Enfermedad de Gaucher

La enfermedad de Gaucher es la más común de las enfermedades de almacenamiento lisosómico. Está provocada por una deficiencia hereditaria de la enzima glucocerebrosidasa (también conocida como β -glucosidasa ácida). La enzima actúa sobre una sustancia grasa glucocerebrósido (también conocida como glucosilceramida). Cuando la enzima es defectuosa, la sustancia se acumula, particularmente en células del linaje celular mononuclear. El material graso puede acumularse en el bazo, el hígado, los riñones, los pulmones, el cerebro y la médula ósea. Los síntomas pueden incluir agrandamiento del bazo e hígado, mal funcionamiento del hígado, trastornos esqueléticos y lesiones óseas que pueden ser dolorosas, complicaciones neurológicas severas, inflamación de los ganglios linfáticos y (ocasionalmente) las articulaciones adyacentes, abdomen distendido, un tinte amarillado en la piel, anemia, plaquetas en sangre bajas y depósitos de grasa amarilla en el blanco del ojo (esclerótica). Las personas más seriamente afectadas también pueden ser más susceptibles a la infección. La enfermedad está provocada por un gen recesivo en el cromosoma 1 y afecta tanto a hombres como a mujeres.

La enfermedad de Gaucher tiene tres subtipos clínicos comunes:

Tipo I (o tipo no neuropático) es la forma más común de la enfermedad, que aparece en aproximadamente 1 en 50.000 nacimientos vivos. Tiene lugar más a menudo entre las personas de ascendencia judía asquenazí. Los síntomas pueden comenzar pronto en la vida o en la edad adulta e incluyen hígado agrandado y bazo gravemente agrandado (juntos hepatoesplenomegalia); el bazo puede romperse y causar complicaciones adicionales. La debilidad esquelética y la enfermedad ósea pueden ser extensas. El agrandamiento del bazo y el reemplazo de la médula ósea provocan anemia, trombocitopenia y leucopenia. El cerebro no se ve afectado, pero puede haber problemas pulmonares y, rara vez, insuficiencia renal. Los pacientes de este grupo generalmente tienen moratones fácilmente (debido a los bajos niveles de plaquetas) y experimentan fatiga debido al bajo número de glóbulos rojos. Dependiendo de la aparición y la gravedad de la enfermedad, los pacientes tipo 1 pueden vivir hasta la edad adulta. Muchos pacientes tienen una forma leve de la enfermedad o pueden no mostrar ningún síntoma. En algunas realizaciones, los métodos y composiciones descritos en la presente se usan para tratar la enfermedad de Gaucher tipo I.

Tipo II (o enfermedad de Gaucher neuropática infantil aguda) por lo general comienza dentro de los 6 meses de nacimiento y tiene una tasa de incidencia de aproximadamente 1 de cada 100.000 nacidos vivos. Los síntomas incluyen un agrandamiento del hígado y el bazo, daño cerebral extenso y progresivo, trastornos del movimiento ocular, espasticidad, convulsiones, rigidez de las extremidades y una mala capacidad para succionar y tragar. Los niños afectados generalmente mueren antes de los 2 años.

Tipo III (la forma neuropática crónica) puede comenzar en cualquier momento en la infancia o incluso en la edad adulta, y ocurre en aproximadamente 1 de cada 100.000 nacidos vivos. Se caracteriza por síntomas neurológicos lentamente progresivos pero más leves en comparación con la versión aguda o tipo 2. Los síntomas principales incluyen agrandamiento del bazo y/o del hígado, convulsiones, coordinación pobre, irregularidades esqueléticas, trastornos del movimiento ocular, trastornos sanguíneos incluyendo anemia y problemas respiratorios. Los pacientes a menudo viven en sus primeros años de adolescencia y edad adulta.

Densidad Mineral Ósea

Como se usa en la presente, densidad ósea (o densidad mineral ósea) se refiere a la cantidad de materia por centímetro cuadrado de huesos. La densidad ósea puede usarse en medicina clínica como un indicador indirecto de osteoporosis y/o riesgo de fractura. La BMD puede medirse mediante una serie de procedimientos, por ejemplo, absorciometría de rayos X de energía dual (DXA o DEXA), tomografía computarizada cuantitativa (QCT), ultrasonido cualitativo (QUS), absorciometría de fotón único (SPA), absorciometría de fotones duales (DPA), radiogrametría

digital de rayos X (DXR) y absorciometría de rayos X de energía única (SEXA). Se pueden hacer mediciones, por ejemplo, sobre la columna lumbar, la parte superior de la cadera o el antebrazo.

La densidad mineral ósea media se puede definir como BMC/W [g/cm^2], en donde se puede informar del contenido de BMC =contenido mineral óseo= g/cm , y W =anchura en los resultados de Densitometría de la línea escaneada en, por ejemplo, densidad medida en g/cm^3 , puntuación z y puntuación t . Las puntuaciones negativas indican una menor densidad ósea, y las puntuaciones positivas indican una mayor.

La puntuación z se refiere a la cantidad de desviaciones estándar por encima o por debajo de la media para la edad, el género y la etnia del paciente.

La puntuación t se refiere al número de desviaciones estándar por encima o por debajo de la media para un adulto sano de 30 años del mismo género y etnia que el paciente. Los criterios de la Organización Mundial de la Salud son:

- Normal es una puntuación t de -1,0 o superior.
- Osteopenia se define como menor que -1,0 y mayor que -2,5.
- Osteoporosis se define como -2,5 o menos, lo que significa una densidad ósea que es dos desviaciones estándar y media por debajo de la media de una mujer de treinta años.

Administración

La enzima glucocerebrosidasa descrita en la presente puede, por ejemplo, administrarse por inyección, por vía intravenosa, intraarterial, subdérmica, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea. Preferiblemente, la enzima glucocerebrosidasa se administra por vía intravenosa, con una dosificación que varía de aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 ó 80 U/kg, administrados cada dos semanas, o de acuerdo con los requisitos del compuesto particular. Los métodos de la presente contemplan la administración de una cantidad eficaz de compuesto o composición de compuesto para lograr el efecto deseado o indicado. Típicamente, la enzima glucocerebrosidasa puede administrarse como una infusión continua, por ejemplo, una infusión continua durante 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos o 150 minutos. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con los materiales portadores para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del huésped tratado y del modo particular de administración. Una preparación típica contendrá del 5% al 95% de compuesto activo (p/p). Alternativamente, dichas preparaciones contienen del 20% al 80% de compuesto activo.

Pueden requerirse dosis más bajas o más altas que las mencionadas anteriormente. La dosificación específica y los regímenes de tratamiento para cualquier sujeto particular dependerán de una variedad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, estado general de salud, género, dieta, tiempo de administración, velocidad de excreción, combinación de fármacos, la gravedad y el curso de la enfermedad, afección o síntomas, la disposición del sujeto a la enfermedad, afección o síntomas, y el juicio del médico tratante.

Tras la mejora de la condición de un sujeto, puede administrarse una dosis de mantenimiento de un compuesto, composición o combinación de esta invención, si es necesario. Posteriormente, pueden reducirse la dosificación o frecuencia de administración, o ambas, en función de los síntomas, a un nivel en el que se conserva la condición mejorada. Los sujetos pueden, sin embargo, requerir tratamiento intermitente a largo plazo ante cualquier reaparición de los síntomas de la enfermedad.

Un compuesto, composición o combinación divulgada en la presente puede administrarse como una terapia domiciliaria (por ejemplo, en el hogar, el lugar de trabajo u otro entorno no clínico (por ejemplo, no hospitalario) del sujeto). Puede administrarse (por ejemplo, a través de infusión) por un profesional de la salud (por ejemplo, enfermera o asistente médico). Por ejemplo, si el sujeto no ha experimentado un evento adverso (AE) (por ejemplo, un AE serio relacionado con un fármaco o un AE relacionado con la infusión, por ejemplo, un evento descrito en la presente), por ejemplo, después de una, dos o tres administraciones (por ejemplo, a través de infusión) del compuesto, composición o combinación, el sujeto es elegible para recibir terapia domiciliaria para administraciones posteriores.

Composiciones farmacéuticas

Se puede incorporar una enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, velaglucerasa) en una composición farmacéutica para administración a un sujeto. Tales composiciones incluyen típicamente la enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, velaglucerasa) y un portador farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en la presente, el término "portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable" incluye solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los compuestos activos

suplementarios también pueden incorporarse en las composiciones. El término "portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador o adyuvante que puede administrarse a un sujeto, junto con glucocerebrosidasa, y que no destruye la actividad farmacológica de la misma y no es tóxico cuando se administra en dosis suficientes para administrar una cantidad terapéutica de la glucocerebrosidasa.

Una composición farmacéutica se formula para ser compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica y subcutánea. Las soluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, aceites fijados, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes como ácido etilendiaminotetraacético; tampones como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede encerrar en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples hechos de vidrio o plástico.

Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen agua estéril para inyección, solución salina fisiológica, agua bacteriostática, CREMOPHOR EL™ (BASF, Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista facilidad de inyección. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares como sacarosa, polialcoholes como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede realizarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

La composición farmacéutica puede incluir, por ejemplo, agua estéril para inyección, sacarosa, citrato de sodio, ácido cítrico y polisorbato.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando la glucocerebrosidasa en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son el secado al vacío y secado por congelación que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

Es ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a ser tratado; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, paquete o dispensador junto con instrucciones para la administración.

Kit

Una enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, velaglucerasa) puede proporcionarse en un kit. El kit incluye (a) la enzima glucocerebrosidasa por ejemplo, una composición que incluye la enzima glucocerebrosidasa y (b) material informativo. El material informativo puede ser descriptivo, instructivo, de marketing u otro material que se relacione con los métodos descritos en la presente y/o el uso de la enzima glucocerebrosidasa para los métodos descritos en la presente. Por ejemplo, el material informativo describe métodos para administrar la enzima glucocerebrosidasa para tratar la enfermedad de Gaucher.

En una realización, el material informativo puede incluir instrucciones para administrar la enzima glucocerebrosidasa de una manera adecuada, por ejemplo, en una dosis, forma de dosificación o modo de administración adecuados (por ejemplo, una dosis, forma de dosificación o modo de administración descritos en la

presente). En otra realización, el material informativo puede incluir instrucciones para identificar un sujeto adecuado, por ejemplo, un ser humano. El material informativo de los kits no está limitado en su forma. En muchos casos, el material informativo, por ejemplo, las instrucciones, se proporciona en material impreso, por ejemplo, un texto, dibujo y/o fotografía impreso, por ejemplo, una etiqueta o una hoja impresa. Sin embargo, el material informativo también se puede proporcionar en otros formatos, como Braille, material legible por ordenador, grabación de video o grabación de audio. En otra realización, el material informativo del kit es un enlace o información de contacto, por ejemplo, una dirección física, dirección de correo electrónico, hipervínculo, página web o número de teléfono, donde un usuario del kit puede obtener información sustantiva sobre el modulador y/o su uso en los métodos descritos en la presente. Por supuesto, el material informativo también se puede proporcionar en cualquier combinación de formatos.

Además de la enzima glucocerebrosidasa, la composición del kit puede incluir otros ingredientes, como un solvente o tampón, un estabilizador o un conservante, y/o un segundo agente para tratar la enfermedad de Gaucher. Alternativamente, los otros ingredientes pueden incluirse en el kit, pero en diferentes composiciones o recipientes que la enzima glucocerebrosidasa. En tales realizaciones, el kit puede incluir instrucciones para mezclar la enzima glucocerebrosidasa y los otros ingredientes (por ejemplo, reconstituir una terapia liofilizada y/o diluir la terapia reconstituida antes de la administración), o para usar la enzima glucocerebrosidasa junto con los otros ingredientes.

La terapia con glucocerebrosidasa puede proporcionarse en cualquier forma, por ejemplo, en forma líquida, seca o liofilizada. Se prefiere que la enzima glucocerebrosidasa sea sustancialmente pura y/o estéril. Cuando la enzima glucocerebrosidasa se proporciona en una solución líquida, la solución líquida preferiblemente es una solución acuosa, prefiriéndose una solución acuosa estéril. Cuando la enzima glucocerebrosidasa se proporciona como una forma seca, la reconstitución generalmente es mediante la adición de un solvente adecuado. El solvente, por ejemplo, agua estéril o tampón, puede opcionalmente proporcionarse en el kit.

El kit puede incluir uno o más recipientes para la composición que contiene la enzima glucocerebrosidasa. En algunas realizaciones, el kit contiene recipientes, divisores o compartimentos separados para la enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, en una composición) y material informativo. Por ejemplo, la enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, en una composición) puede estar contenida en una botella, vial o jeringuilla, y el material informativo puede estar contenido en una funda o paquete de plástico. En otras realizaciones, los elementos separados del kit están contenidos dentro de un único recipiente no dividido. Por ejemplo, la enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, en una composición) está contenida en una botella, vial o jeringa que tiene unido al mismo el material informativo en forma de una etiqueta. En algunas realizaciones, el kit incluye una pluralidad (por ejemplo, un paquete) de recipientes individuales, conteniendo cada uno una o más formas de dosificación unitarias (por ejemplo, una forma de dosificación descrita en la presente) de la enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, en una composición). Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de jeringuillas, ampollas, paquetes de papel de aluminio o envases blíster, cada uno con una dosis unitaria individual de la enzima glucocerebrosidasa. Los recipientes de los kits pueden ser estancos al aire y/o impermeables.

La enzima glucocerebrosidasa (por ejemplo, en una composición) puede administrarse a un sujeto con la enfermedad de Gaucher. El método puede incluir evaluar a un sujeto, por ejemplo, como se describe en la presente y por lo tanto identificar a un sujeto que necesita tratamiento con la enzima glucocerebrosidasa.

Los siguientes ejemplos proporcionan realizaciones ilustrativas de la invención. Un experto en la técnica reconocerá las numerosas modificaciones y variaciones que pueden realizarse.

Los ejemplos no limitan en modo alguno la invención reivindicada.

EJEMPLOS

La introducción de la terapia enzimática ha tenido un impacto significativo en la historia natural de la enfermedad de Gaucher tipo 1. Desafortunadamente, la existencia de una única opción terapéutica representa una vulnerabilidad inherente en el tratamiento de pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1. Se ha informado que aproximadamente el 15% de los pacientes tratados con imiglucerasa desarrollan anticuerpos IgG y aproximadamente la mitad de estos pacientes informaron síntomas de hipersensibilidad (Starzyk K et al., *Molec Genet Metab.* 2007; 90:157-163). Globalmente, la dependencia de un único producto en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher se ha visto subrayada por la reciente escasez de imiglucerasa (Steinbrook R et al., *N Engl J Med.* 2009; 361:1525-1527). Entre los que reciben infusiones de imiglucerasa, un número desconocido de pacientes requieren pre-medicación para mitigar una potencial respuesta inmuno-mediada. En algunos casos los pacientes requieren hidrocortisona, que a su vez está asociada con riesgos médicos que incluyen AVN. Además, los datos recientemente publicados sugieren que el 59% de los pacientes con GD1 tratados con imiglucerasa no logran por lo menos un objetivo terapéutico después de un mínimo de 4 años de tratamiento independientemente de la dosis y la duración del tratamiento (Weinreb N et al., *Am J Hematol.* ; 83: 890 - 895).

La velaglucerasa alfa es una nueva terapia de reemplazo de enzimas (ERT) con características únicas (secuencia de aminoácidos del tipo salvaje y contenido de α -manosilo alto) que la distingue de la imiglucerasa. Algunos de los ejemplos proporcionados a continuación describen ensayos clínicos y estudios de extensión para evaluar la seguridad y la eficacia de la velaglucerasa alfa. Estos son los primeros ensayos clínicos que involucran un ERT para implementar reducción de la dosis y terapia domiciliaria.

Ejemplo 1: Estudios TKT025 y TKT025EXT

Sumario

Este ejemplo describe un ensayo unicentro, abierto de Fase I/II de nueve meses de velaglucerasa alfa (TKT025) y el estudio de extensión en curso (TKT025EXT), realizado para evaluar la seguridad y eficacia de la velaglucerasa alfa.

El objetivo principal del ensayo de Fase I/II fue evaluar la seguridad de la velaglucerasa alfa administrada por vía intravenosa a una dosis de 60 U/kg cada dos semanas durante nueve meses en pacientes adultos con enfermedad de Gaucher sintomática tipo 1 (no neuropática) (GD1). El objetivo secundario de esta prueba fue evaluar la actividad clínica de la velaglucerasa alfa en las características de la enfermedad clave (Barton NW et al., N Engl J Med. 1991; 324:1464-1470). El estudio de extensión se diseñó de manera similar para evaluar la seguridad a largo plazo y evaluar los efectos de la velaglucerasa alfa en cuatro medidas de la enfermedad, concentración de hemoglobina, recuento de plaquetas, volumen del hígado y volumen del bazo (Barton NW et al. N Engl J Med. 1991; 324:1464-1470).

Doce pacientes adultos sintomáticos con enfermedad de Gaucher tipo 1 y bazos intactos recibieron velaglucerasa alfa (60 U/kg/infusión) durante el estudio de Fase I/II. Originalmente se seleccionaron trece pacientes para participar en el estudio, pero uno fue excluido debido a la presencia de anticuerpos anti-imiglucerasa. Se ofreció un estudio de extensión a los pacientes que completaron la prueba y se instituyó una reducción de dosis gradual (a 30 U/kg/infusión). Once pacientes completaron la Fase I/II; diez ingresaron en el estudio de extensión; nueve pacientes alcanzaron 39 meses en la extensión. No se observaron eventos adversos serios o abstinencia relacionados con el medicamento y no se observaron anticuerpos. La terapia domiciliaria se implementó con éxito durante la extensión. Se observaron mejoras estadísticamente significativas ($p < 0,004$) en el cambio porcentual medio del punto de referencia hasta nueve meses y el punto de referencia hasta 48 meses para la hemoglobina (+19,2%, +21,7% respectivamente), recuentos de plaquetas (+67,6%, +157,8% respectivamente), volumen del hígado normalizado (-18,2%, -42,8%, respectivamente) y volumen de bazo normalizado (-49,5%, -79,3% respectivamente). Estos cambios clínicos significativos y el perfil de seguridad condujeron a los ensayos de Fase III y resaltan el potencial de la velaglucerasa alfa como terapia alternativa para la enfermedad de Gaucher tipo 1.

Métodos

La Fase I/II y el estudio de extensión se llevaron a cabo en un solo centro (Clínica Gaucher, Centro Médico Shaare Zedek, Jerusalén, Israel).

Pacientes: se seleccionaron pacientes adultos, sintomáticos, enzimáticamente confirmados con GD1. Los criterios de elegibilidad incluyeron edad ≥ 18 años, un bazo intacto, anemia relacionada con la enfermedad (valores de hemoglobina de por lo menos 1 g/dl por debajo del límite inferior de la normalidad (LLN) para el género), trombocitopenia (recuentos de plaquetas por debajo del LLN) y un resultado negativo para el antígeno de la hepatitis B y C y el virus de la inmunodeficiencia humana. Los pacientes eran elegibles si no habían recibido tratamiento para ERT o no habían recibido imiglucerasa en los 12 meses anteriores a la inclusión y eran negativos para el anticuerpo de imiglucerasa. Los pacientes fueron excluidos si habían recibido una terapia de investigación para cualquier otra indicación ≤ 30 días antes de la inclusión o si no podían cumplir con el protocolo por razones o médicas o no médicas.

Preparación y Dosificación: la velaglucerasa alfa fue suministrada por Shire HGT como un producto liofilizado y enviada a 2°-8° C. El producto se reconstituyó con agua estéril libre de conservantes para inyección. La cantidad apropiada de velaglucerasa alfa (basada en el peso corporal) se mezcló lentamente con solución salina normal para un volumen final de 100 ml. La velaglucerasa alfa diluida se administró por vía intravenosa a través de un filtro de 0,2 μ m durante un período de 60 minutos (velocidad máxima de 1,5 mg/kg/hora; 1U/kg/min).

Durante el estudio de Fase I/II, los primeros tres pacientes recibieron velaglucerasa alfa en un programa de cada dos semanas en el sitio de prueba. Se realizó un incremento escalonado de la dosis para los tres primeros pacientes, mediante el que la dosificación se duplicó de una dosis inicial de 15 U/kg hasta que se alcanzó una dosis final de 60 U/kg. El segundo y tercer paciente recibieron su infusión inicial de 15 U/kg solo después de que se hubo completado un período de observación de 7 días para el primer y el segundo paciente, respectivamente. Una vez que el tercer paciente recibió una dosis individual de 60 U/kg y se observó durante un período de 7 días, se inscribieron nueve pacientes adicionales y recibieron infusiones de 60 U/kg cada dos semanas para un total de 20

dosis. Los pacientes que se habían sometido a un incremento escalonado de la dosis continuaron en un programa de cada dos semanas para otras 17 infusiones a 60 U/kg para un total de 20 infusiones.

Durante el estudio de extensión, todos los pacientes continuaron a 60 U/kg/infusión cada dos semanas. Después de aproximadamente 6-9 meses del estudio de extensión, los pacientes que lograron por lo menos 2 de los 4 objetivos terapéuticos para mejorar en anemia, trombocitopenia, hepatomegalia y/o esplenomegalia (Pastores GM et al., Semin Hematol. 2004; 41:4-14) se transfirieron a 45 U/kg/infusión cada dos semanas durante tres meses y luego se transfirieron a 30 U/kg/infusión cada dos semanas. Esta convención de reducción de dosis basada en el logro de objetivos terapéuticos está de acuerdo con las recomendaciones para la individualización de ERT en pacientes en imiglucerasa (Andersson HC et al., Genet Med. 2005; 7:105-110).

Adicionalmente, los siete pacientes que residen en Israel se transfirieron a terapia domiciliaria durante la fase de extensión.

Evaluaciones de Seguridad: se evaluó la seguridad durante todo el estudio mediante evaluaciones cada dos semanas de los eventos adversos (incluidas reacciones relacionadas con la infusión), las medicaciones concomitantes y los signos vitales realizados antes, durante y después de las infusiones. Se realizaron evaluaciones de seguridad adicionales aproximadamente cada 12 semanas e incluyeron exámenes físicos, pruebas de laboratorio clínicas (hematología, química sérica, análisis de orina y prueba de embarazo), electrocardiogramas de 12 derivaciones y ecocardiogramas en el sitio de prueba. La determinación de la presencia de anticuerpos anti-velaglucerasa alfa se realizó a intervalos de 3 meses en Shire HGT.

Ensayos de anticuerpos: Todos los participantes fueron examinados para detectar anticuerpos anti-velaglucerasa alfa circulantes usando un ELISA indirecto validado. Se recubrieron placas de micropocillos con velaglucerasa alfa, se lavaron y se bloquearon con albúmina de suero bovino para limitar la unión de anticuerpos no específicos. Se incubaron con muestras de suero del paciente diluidas 100 veces en solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20 al 0,05% durante 60 minutos a 37° C. Los micropocillos se lavaron y luego se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Se sondearon por separado con los siguientes conjugados específicos del isotipo de anticuerpos HRP: 1) Fc de IgG de cabra antihumano, 2) cadena α de IgA de cabra antihumana, 3) cadena μ de IgM de cabra antihumano o 4) anticuerpos secundarios de cadena ϵ de IgE antihumanos. Los micropocillos se lavaron una vez final y se incubaron con el sustrato cromógeno de HRP 3, 3', 5, 5' tetrametil benzidina. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico 2N, y la absorbancia de cada pocillo se cuantificó a 450 nm (A_{450}) utilizando un lector de placas SPECTRAmax Plus384 de Molecular Devices y software SOFTMax PRO. Se obtuvieron muestras de suero positivas para anticuerpos de pacientes que habían recibido imiglucerasa. Estos anticuerpos de pacientes reaccionaron de forma cruzada con velaglucerasa alfa y se usaron como controles positivos humanos en el ensayo de detección de anticuerpos anti-velaglucerasa. Por lo tanto, estos sueros eran anti-imiglucerasa y anti-velaglucerasa alfa positivos. Se incluyeron controles de suero humanos negativos, así como positivos, en cada placa de ensayo.

Se estableció una absorbancia de punto de corte positiva para anticuerpos ELISA robusta para anticuerpos anti-velaglucerasa alfa de la absorbancia media de muestras de suero de pacientes con Gaucher no tratados con ERT (N=108). Se utilizó el análisis paramétrico de datos de absorbancia ELISA para calcular el límite inferior positivo para anticuerpos (media más 1,645 x desviaciones estándar; donde 1,645 es el percentil 95 de la distribución normal, por tanto aceptando potencialmente una tasa del 5% de falsos positivos) para cada isotipo de anticuerpo (Mire-Sluis AR et al., J Immunol Methods. 2004; 289:1-16). Se calculó que el fondo A_{450} de ELISA para muestras de suero de Gaucher no tratadas con ERT era de 0,040 para todos los ensayos de isotipo de anticuerpo anti-velaglucerasa alfa. El límite de corte positivo de anticuerpos ELISA se estableció como una proporción $\geq 2,0$ y una $A_{450} \geq 0,040$, donde la proporción es la A_{450} de una muestra de paciente tomada en cualquier punto temporal, dividida por la A_{450} de la muestra del paciente tomada en el punto de referencia del estudio antes del primer tratamiento de ERT. Cualquier muestra que exceda el límite de corte positivo de ELISA se habría confirmado mediante un ensayo de radioinmunoprecipitación cuantitativa y se habría probado para anticuerpos neutralizantes; sin embargo, ninguna muestra logró los criterios de límite de corte establecidos (Mire-Sluis AR et al., J Immunol Methods. 2004; 289:1-16).

Actividad Clínica: las principales evaluaciones de eficacia de la concentración de hemoglobina y los recuentos de plaquetas se evaluaron a intervalos trimestrales predeterminados. Los volúmenes de hígado y bazo se midieron usando MRI abdominal cuantitativa (en el mismo aparato de modelo) realizada al inicio del estudio, seis y nueve meses (en el Hadassah-Hebrew University Medical Center), y a los 24, 33 y 45 meses (en el unidad de imagen MOR-MAR) durante el estudio de extensión. Los volúmenes de hígado y bazo se evaluaron al final de la prueba por un radiólogo ciego para la identidad del paciente y la secuencia por la que se realizaron las resonancias magnéticas abdominales cuantitativas. La Quitotriosidasa y CCL18 se midieron en el Academic Medical Center; Ámsterdam, Países Bajos.

Análisis Estadístico: La población de seguridad, que también era la población con intención de tratar, se definió como todos los pacientes incluidos que recibieron por lo menos una infusión (parcial o total) de velaglucerasa alfa, y se usó para todas las actividades clínicas. No se utilizó ninguna imputación.

Para los parámetros de actividad clínica primarios de concentración de hemoglobina, recuento de plaquetas y volúmenes de hígado y bazo, la hipótesis nula es que no hay diferencia entre el punto de referencia y el valor final del estudio (nueve meses), y el punto de referencia y valor mensual al final de 48 meses (es decir, la diferencia entre los miembros de cada pareja de observación tiene un valor mediano de cero). Las comparaciones se realizaron utilizando pruebas de hipótesis de dos colas con un nivel de significancia del 5%. Las diferencias entre los valores del punto de referencia de referencia y final del período se analizaron usando la prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Se calcularon los cambios desde el punto de referencia y los cambios porcentuales desde el valor inicial se resumen usando estadísticas descriptivas.

Para los parámetros secundarios de la actividad clínica, los datos observados, el cambio desde el valor inicial y el cambio porcentual desde el valor inicial se resumieron mediante visita, incluyendo la media, el error estándar (SE) y la mediana. No se aplicaron pruebas estadísticas formales a estos conjuntos de datos.

Resultados del estudio TKT025 (9 M, 60 U/kg de velaglucerasa alfa)

La velaglucerasa alfa fue bien tolerada y ningún paciente desarrolló anticuerpos. Se observaron mejoras clínica y estadísticamente significativas en los parámetros hematológicos y el volumen de los órganos tan pronto como de 3 a 6 meses (**Tabla 1**).

Tabla 1 Resultados clínicos de TKT025 (N=12)

Parámetro de Actividad Clínica	Punto de referencia Medio	Cambio Medio desde el Punto de referencia $\pm$ desviación estándar		
		Mes 3	Mes 6	Mes 9
Concentración de hemoglobina (g/dl)	10.95	1.24 $\pm$ 0.90	1.92 $\pm$ 0.82	2.24 $\pm$ 0.89
Recuento de plaquetas ($\times 10^9/l$)	57.5	8.9 $\pm$ 11.20	23.4 $\pm$ 24.63	40.6 $\pm$ 30.68
Hígado (% de peso corporal)	4.43	NA	-0.67 $\pm$ 0.64	-0.79 $\pm$ 0.48
Bazo (% de peso corporal)	3.63	NA	-1.62 $\pm$ 0.67	-1.89 $\pm$ 0.75

Demografía y Disposición: Se evaluaron un total de trece pacientes y todos dieron su consentimiento para participar en este estudio; un paciente (0004) se excluyó debido a anticuerpos de imiglucerasa. Todos los pacientes no habían recibido tratamiento previo a la llegada de acuerdo con el protocolo en virtud de no haber estado expuestos a ninguna terapia específica de Gaucher en los 12 meses anteriores a la inclusión, aunque en el pasado más lejano, 2 pacientes (0008 y 0009) habían recibido cada uno 3 infusiones de imiglucerasa, un paciente (0003) había estado expuesto a miglustat y dos pacientes (0005 y 0007) habían estado expuestos tanto a miglustat como a imiglucerasa.

La población con intención de tratar (**Tabla 2**) incluía a 12 pacientes que recibieron por lo menos una dosis de velaglucerasa alfa; de estos, 11 pacientes (92%) completaron el estudio de Fase I/II (un paciente, 0006, se retiró después de una muerte repentina en la familia y retiró el consentimiento después de recibir tres infusiones).

En la inscripción de la prueba de Fase I/II, siete pacientes (58%) eran mujeres; la edad media era de 41,7 (SD $\pm$ 17,3, intervalo 19-70) años; el peso medio era de 59,6 (SD $\pm$ 9,1 intervalo 50-73) kg y la altura media era de 169 (SD $\pm$ 8,0, intervalo 160-184) cm. Dos pacientes (16,7%) tenían necrosis avascular (AVN) de la articulación de la cadera en el momento de la inscripción y otro tenía una lesión destructiva en cada tobillo. La **Tabla 2** proporciona las características demográficas, genotípicas y clínicas del punto de referencia, así como los descubrimientos clínicos de cada paciente con intención de tratar en puntos de recogida de datos clave dentro de los estudios de Fase I/II.

Tabla 2 Demografía y Características de los Pacientes

Paciente	Edad	Sexo	GEnotipo	Hemoglobina g/dl					Plaquetas, 10 ⁹ /l					Volumen de bazo normalizado múltiplo del normal					Volumen de hígado normalizado múltiplo del normal				
				BL	6 Mo	9 Mo	24 Mo	48 Mo	BL	6 Mo	9 Mo	24 Mo	48 Mo	BL	6 Mo	9 Mo	24 Mo	45 Mo	BL	6 Mo	9 Mo	24 Mo	45 Mo
1	24	F	N370S/N370S	10.8	12.2	12.5	12.4	12.7	80	123	149	155	130	17.5	11.0	10.0	8.0	6.5	2.3	1.8	1.9	1.5	1.2
2	62	M	N370S/L444P	12.7	14.1	14.8	14.3	14.2	69	74	90	127	142	11.0	7.5	6.0	4.0	3.0	1.0	1.0	0.9	1.0	0.8
3	35	M	N370S/Other	13.5	15.7	16.5	15.7	16.0	48	95	128	140	151	17.5	8.0	6.5	*	*	2.2	1.6	1.7	1.3	1.2
5	35	F	N370S/N370S	10.6	11.7	12.0			52	68	72			32.5	23.0	24.5			1.7	1.8	1.6		
6	44	F	N370S/IVS2+1	10.9					56					16.0					2.1				
7	42	F	N370S/N370S	10.5	12.5	12.5	13.8	13.0	37	32	39	42	95	21.0	13.5	13.0	7.0	4.0	1.8	1.7	1.6	1.4	1.0
8	23	F	N370S/RecNe1	10.0	12.1	11.8	12.7	14.2	65	137	150	154	203	19.0	9.0	7.0	3.5	3.5	2.2	1.6	1.6	1.2	1.2
9	25	M	N370S/RecNe1	12.6	15.8	15.9	15.8	15.1	69	97	120	178	183	28.0	12.5	10.0	4.0	2.5	2.0	1.4	1.4	1.1	0.9
10	60	F	N370S/N370S	10.1	11.1	12.5	12.4	12.4	48	60	86	121	139	19.0	11.0	8.5	3.5	3.0	1.4	1.2	1.0	0.8	0.8
11	18	F	N370S/Other	11.0	13.8	13.6	13.6	12.6	59	98	110	122	130	15.0	9.0	8.0	5.0	3.5	1.4	1.1	1.0	1.1	0.8
12	69	M	N370S/N370S	13.5	14.4	14.1			59	65	99			13.0	9.0	7.5			1.0	1.0	1.0		
13	56	M	N370S/V394L	12.9	15.9	16.6	15.4	16.0	46	40	36	111	135	19.5	10.0	8.0	4.5	2.5	1.0	0.8	0.8	0.8	0.7

La demografía y características de los pacientes del punto de referencia y en los puntos de evaluación seleccionados durante la Fase I/II y pruebas de extensión incluyendo los últimos valores recogidos para cada parámetro clínico para la cohorte. Los volúmenes de hígado y bazo normalizados se definen como 2,5% y 0,2% respectivamente del peso corporal total en kilogramos (Pastores GM et al., Semin Hematol. 2004; 41:4-14). Los múltiplos de normal es el volumen de órgano observado dividido por el volumen de órgano normalizado. A los 24 meses, todos los pacientes demostraron normalización de las concentraciones de hemoglobina y todos menos uno de los pacientes demostraron recuentos de plaquetas superiores a 100*10⁹/l, punto de referencia; Mo, mes; M, hombre; F, Mujer; * Volumen de bazo no interpretable debido a degradación técnica.

Los resultados de los escaneos de formación de imágenes por resonancia magnética (IRM) del hígado y el bazo eran ciegos y se interpretaron por un solo revisor para minimizar el margen de error. También se realizó la recogida de datos del punto de referencia de otros parámetros clínicos incluyendo PFT (pruebas de función pulmonar), MRI del fémur y la columna lumbar, y la densitometría ósea en varios puntos temporales largo del estudio.

El estudio se componía de 2 fases, una fase de incremento escalonado de la dosis y una fase de dosis continua. Durante la fase de incremento escalonado de la dosis, se inscribió al primer paciente y se le administró velaglucerasa intravenosa (IV) a 15 U/kg, luego se le siguió durante 7 días para la evaluación de la seguridad. Después de que se hubo confirmado la seguridad para el primer paciente, se inscribieron 2 pacientes adicionales y se les administró velaglucerasa alfa IV 15 U/kg y se les siguió durante 7 días para la evaluación de la seguridad. Después de que se hubo confirmado la seguridad de los 3 pacientes que recibieron la dosis de 15 U/kg, se administraron las siguientes dos dosis más altas (30 y 60 U/kg) de la misma manera. Una vez que se confirmó la seguridad de los 3 pacientes, se inscribieron 9 pacientes adicionales y se les administró la dosis de 60 U/kg. Luego, todos los pacientes recibieron la dosis de 60 U/kg cada dos semanas por un total de 20 dosis de velaglucerasa alfa.

Las farmacocinéticas (PK) en humanos se evaluaron en las semanas 1, 3, 5 y 37/39 en TKT025. Se realizaron estudios de PK adicionales en la semana 65 del estudio TKT025EXT. La velaglucerasa alfa se depuró rápidamente de la sangre con cinéticas de eliminación de primer orden en cada evaluación. Los valores de vida media de eliminación para los pacientes después de la exposición inicial a velaglucerasa alfa y después de la administración repetida de velaglucerasa alfa fueron similares. Por el contrario, los valores de depuración y volumen aparente de distribución se redujeron después de la administración repetida de velaglucerasa alfa.

Se observaron aumentos medios estadísticamente significativos del punto de referencia en la concentración de hemoglobina y el recuento de plaquetas 3 meses después del inicio de la dosificación bisemanal de 60 U/kg de velaglucerasa alfa en el estudio TKT025. Para la semana 25 (mes 6) en TKT025, las concentraciones de hemoglobina media eran de 13,57 g/dl (dentro del intervalo normal) y permanecieron dentro de los intervalos normales durante el resto del estudio. Al final del estudio, 10 de los 11 pacientes experimentaron la normalización de la concentración de hemoglobina. Se observaron aumentos estadísticamente significativos del punto de referencia (57,3 x 10³/mm³) en el recuento de plaquetas medio en la semana 13 (mes 3) y continuaron durante todo el estudio. En la semana 37, el recuento de plaquetas medio había aumentado a 98,1 x 10³/mm³.

Adicionalmente, se observaron reducciones estadísticamente significativas desde el punto de referencia en volúmenes del hígado y del bazo medios y normalizados (corregidos por el porcentaje de peso corporal) 6 (semana 25) y 9 meses (semana 37) después de iniciar el tratamiento con velaglucerasa alfa. Se observaron reducciones marcadas en los valores de biomarcadores (quitotriosidasa sérica y ligando 18 de Quimioquina (motivo CC) [CCL18]) en el mes 3. En general, la mejora media en todos estos parámetros fue continua durante el curso de la administración de velaglucerasa alfa. Además, cada paciente experimentó una mejora en por lo menos 2 de los 4 parámetros terapéuticos específicos para la enfermedad de Gaucher (por ejemplo, concentraciones de hemoglobina, recuentos de plaquetas y volúmenes de bazo e hígado).

En resumen, las **FIGS. 1A - 1F** presentan el cambio porcentual medio en los parámetros hematológicos,

volúmenes de órganos y biomarcadores para el estudio de Fase I/II. Se observó un incremento marcado en (a) la concentración de hemoglobina y (b) el recuento de plaquetas durante las semanas 25 y 37 junto con una marcada reducción en los volúmenes de (c) el hígado y (d) el bazo. Aunque el muestreo de biomarcadores para (e) quitotriosidasa y (f) CCL18 fue incompleto, se observa una disminución general en ambos biomarcadores en relación al punto de referencia por paciente a lo largo del tiempo. Se observaron mejorías estadísticamente significativas ($p < 0,003$) en el cambio porcentual medio desde el punto de referencia hasta nueve meses para la concentración de hemoglobina (+21,7%), recuentos de plaquetas (+67,6%), volumen del hígado normalizado (-18,2%) y volumen del bazo normalizado (-49.5%), **FIG. 2** En la **FIG. 2**, el cambio porcentual medio en la concentración de hemoglobina, recuentos de plaquetas, volumen del hígado y volumen del bazo se trazan a lo largo del tiempo y se demarcan tanto para la Fase I/II como para los estudios de extensión. Se observa un cambio estadísticamente significativo desde el punto de referencia hasta 9 meses ($p < 0,003$) para cada parámetro. Los cambios más marcados se observaron para el recuento de plaquetas y el volumen del bazo.

En TKT025, los 12 pacientes experimentaron 1 o más AEs (eventos adversos); en total, se informaron de 103 AE. Dos AE (mareos e hiperhidrosis) fueron informados por 1 paciente durante la dosis de 15 U/kg; los 101 AE restantes fueron informados por pacientes que recibieron la dosis de 60 U/kg. Los efectos adversos informados más frecuentemente fueron mareos, dolor de huesos y dolor de cabeza (5 pacientes cada uno, 41,7%). Artralgia, dolor de espalda, dolor en las extremidades, gripe, dolor abdominal superior y astenia tuvieron lugar en 3 pacientes (25%). Todos los AEs fueron leves (Grado 1) excepto 1 evento de dolor óseo, que fue de severidad moderada (Grado 2) y no relacionada con el fármaco del estudio. Ninguno de los 103 AEs se consideró grave o potencialmente mortal (Grado 3 ó 4). Ningún paciente fue retirado del estudio debido a un evento adverso.

La mayoría de los AEs observados durante TKT025 se determinaron por el investigador como no relacionados con la administración del fármaco del estudio (**Tabla 3A**.) Diez (10) pacientes experimentaron 22 AEs que se consideraron posiblemente o probablemente relacionados con el fármaco del estudio; más comúnmente mareos (3 pacientes); dolor de espalda, dolor de huesos, dolor de cabeza, temperatura corporal aumentada, y náuseas (cada 2 pacientes). Nueve (9) pacientes experimentaron un total de 17 eventos adversos relacionados con la infusión, que se definieron en el protocolo como un AE que tuvo lugar el día de la infusión, comenzó durante o después de la infusión y se consideró como posible o probablemente relacionado con el fármaco del estudio. Estos AEs incluyeron mareos, dolor de cabeza, dolor de espalda, dolor de huesos, temperatura corporal aumentada, cada uno teniendo lugar en 2 pacientes. Todos los eventos adversos relacionados con la infusión se informaron para pacientes que recibieron la dosis de 60 U/kg. Un paciente aumentó la dosis a 60 U/kg/infusión cada dos semanas durante los 24 meses siguientes a la reducción de la dosis debido al empeoramiento del dolor óseo pero no experimentó alivio después del aumento de la dosis. Por lo tanto, no hubo eventos adversos serios relacionados con el fármaco, independientemente de la configuración de la infusión. No se administraron pre-medicaciones y ningún paciente se retiró debido a un evento adverso. Ningún paciente desarrolló anticuerpos para velaglucerasa alfa.

Tabla 3A Eventos adversos emergentes del tratamiento que se determinaron como posible o probablemente relacionados con la administración de velaglucerasa alfa (GA-GCB) observados durante la prueba de fase I/II (TKT025)

5	Término preferido para la Clase de Órgano del Sistema	velaglucerasa alfa 60 U/kg EOW n=12 pacientes	
		Pacientes, n (%)	Eventos, n (%)
	Cualquier evento adverso	10 (83.3)	22 (21.8)
10	Trastornos del sistema nervioso		
	Mareo	3 (25.0)	4 (4.0)
	Dolor de cabeza	2 (16.7)	2 (2.0)
15	Sensación de quemazón	1 (8.3)	1 (1.0)
	Migraña	1 (8.3)	3 (3.0)
	Temblor	1 (8.3)	1 (1.0)
20	Trastornos Gastrointestinales		
	Náusea	2 (16.7)	2 (2.0)
	Dolor abdominal superior	1 (8.3)	1 (1.0)
25	Trastornos Musculo-esqueléticos y del Tejido Conectivo		
	Dolor de espalda	2 (16.7)	2 (2.0)
	Dolor de huesos	2 (16.7)	2 (2.0)
	Dolor en la extremidad	1 (8.3)	1 (1.0)
30	Trastornos generales y Afecciones del Sitio de Administración		
	Astenia	1 (8.3)	1 (1.0)
35	Investigaciones		
	Temperatura corporal aumentada	2 (16.7)	2 (2.0)

Los porcentajes de pacientes se basan en el número total de pacientes en el grupo de tratamiento. Los eventos adversos se codifican usando el diccionario MedDRA Versión 7.0. EOW: cada dos semanas.

Resultados de TKT025EXT (30-60 UI/Kg de Velaglucerasa Alfa, largo plazo)

Resumen: TKT025EXT es un estudio de extensión abierto de la terapia de velaglucerasa alfa en pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1 que completaron el estudio TKT025. El objetivo principal de TKT025EXT es evaluar la seguridad a largo plazo de la velaglucerasa alfa cuando se administra IV a una dosis de 30 o 60 U/kg cada dos semanas durante un total de 4 años. El objetivo secundario es continuar evaluando los efectos de la velaglucerasa alfa sobre la actividad clínica en estos pacientes medida en parámetros hematológicos y reducciones en los volúmenes de hígado y bazo. También se están evaluando la quitotriosidasa y CCL18 en plasma, así como las PFT, MRI del cuello femoral y la columna lumbar, examen esquelético y la densitometría ósea.

Se eligieron diez pacientes para participar en este estudio clínico. Después de 60 meses de tratamiento acumulativo (TKT025 + TKT025EXT) la velaglucerasa alfa fue bien tolerada y ningún paciente desarrolló anticuerpos. Se continúan observando mejoras continuas y sostenidas clínica y estadísticamente significativas en los parámetros hematológicos y los volúmenes de los órganos (**Tabla 4**). La **FIG. 3** muestra el aumento de la concentración de hemoglobina media y el recuento de plaquetas desde el valor inicial en los pacientes tratados con velaglucerasa alfa durante 60 meses. La **FIG. 4** muestra la disminución de los volúmenes medios de hígado y bazo desde el valor inicial en pacientes tratados con velaglucerasa alfa durante 60 meses.

Tabla 4 Resultados clínicos de TKT025EXT (N=10)

Parámetro de Actividad Clínica	Punto de referencia Medio	Cambio medio desde la punto de referencia [Intervalo de confianza del 95%]			
		Mes 24	Mes 36 ^a	Mes 48 ^a	Mes 60 ^a
Concentración de hemoglobina (g/dl)	10.90	2.30 [1.78, 2.82]	2.13 [1.59, 2.67]	2.31 [1.66, 2.96]	2.38 [1.60, 3.16]
Recuento de Plaquetas (x 10 ⁹ /L)	55.5	66.5 [45.3, 87.7]	71.1 [53.6, 88.6]	82.3 [60.1, 104.5]	85.1 [59.8, 110.4]
Hígado (% de peso corporal)	4.40	-1.29 [-1.91, -0.67]	-1.37 [-1.90, -0.84]	-1.74 [-2.40, -1.08]	-1.70 [-2.33, -1.07]
Bazo (% de peso corporal)	3.80	-2.63 [-3.44, -1.83]	-2.69 [-3.51, -1.87]	-2.88 [-3.72, -2.03]	-2.89 [-3.72, -2.06]
a - Los volúmenes de los órganos se evaluaron en los meses 33, 45 y 57 desde el inicio de TKT025					

Demografía y Disposición: Al completar las evaluaciones de la Semana 41 en TKT025, los pacientes fueron elegibles para participar en TKT025EXT. De los 11 pacientes que completaron el estudio TKT025, 10 pacientes ingresaron en el estudio TKT025EXT. Un paciente (0012) no consintió en ingresar en el estudio de extensión debido a la inconveniencia de asistir al hospital cada dos semanas, y un paciente (0005) se retiró del estudio de extensión debido a embarazo. La **Tabla 2** proporciona las características demográficas, genotípicas y clínicas de valor inicial del estudio, así como los descubrimientos clínicos de cada paciente con intención de tratar en puntos de recogida de datos clave dentro de los estudios de extensión.

Todos los pacientes incluidos inicialmente recibieron velaglucerasa alfa a 60 U/kg cada dos semanas. Las dosis se ajustaron hasta 30 U/kg, siempre que los pacientes tuvieran mejorías en los parámetros hematológicos (concentración de hemoglobina o niveles de plaquetas) y/o mejoras en los volúmenes de órganos (hígado o bazo) después de 1 año de tratamiento acumulativo. Los 10 pacientes inicialmente inscritos en TKT025EXT cumplieron los criterios de reducción de dosis requeridos y se transfirieron a la dosis de 30 U/kg.

Los 9 pacientes en TKT025EXT tenían datos de concentración de hemoglobina y recuento de plaquetas disponibles hasta el Mes 42, mientras que 3 pacientes tenían datos disponibles hasta el Mes 45. Los cambios medios (error estándar [SE]) en la hemoglobina desde el punto de referencia pre-tratamiento a los 42 meses fueron 2,18 (0,25) g/dl ($p=0,004$), correspondiente a cambios porcentuales medios desde el punto de referencia pretratamiento del 19,0%. Con respecto al recuento de plaquetas, el cambio medio (SE) desde el de valor referencia pretratamiento fue de 82,1 (8,4) x 10³/mm³ ($p=0,004$) en el Mes 42, correspondiente a un cambio porcentual medio desde el punto de referencia pretratamiento del 149,8%.

Los volúmenes de hígado y bazo normalizados para el porcentaje de peso corporal se analizaron hasta el Mes 33; los 9 pacientes tenían datos de hígado disponibles y 8 pacientes tenían datos de bazo disponibles para esta evaluación. El cambio medio (SE) desde el valor referencia pretratamiento en volúmenes normalizados de hígado y bazo en el Mes 33 fue de -1,5 (0,22) y -,8 (0,37), respectivamente. Los resultados correspondieron a cambios porcentuales medios del -34,0% y -73,5% medios desde el punto de referencia pretratamiento para los volúmenes normalizados de hígado y bazo, ($p=0,004$ y $p=0,008$, respectivamente). También se observaron mejoras adicionales para los parámetros de quitotriosidasa y CCL18 en plasma.

En resumen, la **FIG. 2** presenta el cambio porcentual medio en la concentración de hemoglobina, recuentos de plaquetas, volumen del hígado y el volumen del bazo que se trazan a lo largo del tiempo y se demarcan para los estudios de extensión. Se observa un cambio estadísticamente significativo desde el punto de referencia hasta 48 meses ($p < 0,004$) para cada parámetro. Los cambios más marcados se observaron para el recuento de plaquetas y el volumen del bazo. Los valores de hemoglobina se normalizaron para todos los pacientes a los 24 meses. Los volúmenes de hígado se aproximaron al normal. Se observó una mejora continua en estos parámetros clínicos a lo largo del estudio de extensión (**FIG. 2**) y se observó la normalización de la hemoglobina en todos los pacientes a los 24 meses (**Tabla 2**). El cambio porcentual medio desde el punto de referencia hasta los 48 meses fue estadísticamente significativo ($p < 0,004$) para la concentración de hemoglobina (+21,7%), recuentos de plaquetas (+157,8%), volumen del hígado (-42,8%) y volumen del bazo (-79,3%) .

Los datos de seguridad y actividad clínica para el estudio TKT025EXT disponibles se analizaron hasta una fecha determinada. Los pacientes inscritos en este estudio tenían una duración media acumulada de exposición de 43,2 meses (intervalo: 13,2-45,0 meses). Se informó de un total de 248 eventos adversos entre los 10 pacientes inscritos. La mayoría de los AEs fueron de intensidad leve a moderada. Se notificaron tres eventos adversos graves

(Grado 3), considerados no relacionados con el fármaco del estudio por el Investigador, para 2 pacientes (artralgia y necrosis aséptica ósea en 1 paciente y dolor de cabeza en 1 paciente). Se notificaron tres (3) SAEs (2 eventos de necrosis ósea aséptica en 1 paciente y 1 evento de cicatriz en 1 paciente). Cada uno de estos SAEs se consideró no relacionado con el fármaco del estudio por el investigador, y cada uno se resolvió sin secuelas. Los eventos adversos emergentes con el tratamiento informados con mayor frecuencia fueron gripe (8 pacientes, 24 eventos); artralgia (8 pacientes, 21 eventos); dolor de cabeza (6 pacientes, 13 eventos); dolor de espalda (6 pacientes, 10 eventos); dolor faringolaríngeo (5 pacientes, 7 eventos); dolor abdominal superior (5 pacientes, 7 eventos); y sangrado gingival, pirexia y fatiga (4 pacientes cada, 4 eventos).

La mayoría de los eventos adversos informados en TKT025EXT se consideraron por el Investigador como no relacionados con el fármaco del estudio (**Tabla 3B**). Se informó de un total de 7 eventos adversos relacionados con el tratamiento en 4 pacientes, incluyendo epistaxis (2 pacientes, 1 evento cada uno) dolor abdominal (1 paciente, 1 evento), dolor abdominal superior (1 paciente, 1 evento), fatiga (1 paciente, 1 evento) y dolor exacerbado (1 paciente, 1 evento). Dos pacientes experimentaron 1 AE relacionado con la infusión cada uno: dolor moderado (grado 2) en la extremidad en 1 paciente y temblor leve (Grado 1) en 1 paciente. Por lo tanto, no hubo eventos adversos serios relacionados con el fármaco, independientemente de la configuración de la infusión. Adicionalmente, ningún paciente tuvo un evento adverso relacionado con la infusión que requirió la interrupción de la administración de la velaglucerasa alfa.

Ningún paciente desarrolló anticuerpos contra velaglucerasa alfa. Durante el primer año del estudio de extensión, los siete residentes de Israel fueron transferidos con éxito a terapia domiciliaria.

Tabla 3B Eventos adversos emergentes del tratamiento que se determinó posiblemente relacionados con la administración de velaglucerasa alfa (GA-GCB) durante el estudio de extensión (TKT025 EXT)

Término Preferido para la Clase de Órgano del Sistema	velaglucerasa alfa 30 U/kg - 60 U/kg EOW	
	Pacientes, n (%) N=10	Eventos, n (%) N=311
Cualquier evento adverso relacionado	4 (40.0)	7 (2.8)
Trastornos del sistema nervioso		
Temblores	1 (10.0)	1 (0.32)
Trastornos respiratorios, torácicos o mediastínicos		
Epistaxis	2 (20.0)	2 (0.6)
Trastornos gastrointestinales		
Dolor abdominal	2 (20.0)	2 (0.6)
Trastornos musculo-esqueléticos y del tejido conectivo		
Dolor en la extremidad	1 (10.0)	1 (0.3)
Trastornos generales y afecciones del sitio de administración		
Fatiga	1 (10.0)	1 (0.3)

Los porcentajes de pacientes se basan en el número total de pacientes en la población de seguridad. Los porcentajes de eventos se basan en el número total de eventos experimentados por pacientes en la población de seguridad. Los eventos adversos se codifican usando el diccionario MedDRA Versión 9.0. EOW: cada dos semanas.

Resultados de la densidad mineral ósea en pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1 en TKT025 y TKT025EXT

Se evaluaron los cambios a largo plazo de la densidad mineral ósea (BMD) en pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1 tratados con velaglucerasa alfa. Los pacientes demostraron mejora significativa y continua en la BMD.

Evaluaciones: durante la inscripción de TKT025, se usaron estudios esqueléticos y absorciometría de rayos X de energía dual (DEXA) para evaluar la patología esquelética. Las puntuaciones Z de la columna lumbar y el

cuello femoral se analizaron en momentos predefinidos a lo largo del estudio. Para algunos pacientes, se realizaron escaneos DEXA, pero las puntuaciones Z no se pudieron evaluar a partir de los escaneos. Las puntuaciones Z faltantes incluyeron: un paciente - cuello femoral en el punto de referencia y el mes 9; un paciente - columna lumbar en el punto de referencia del estudio; y un paciente - cuello femoral en el mes 9. Las puntuaciones Z de la columna lumbar y el cuello femoral tampoco se evaluaron para dos pacientes después de que se retiraran del estudio: un paciente antes del mes 24 y un paciente antes del mes 57.

Las puntuaciones T se usaron para comparar la densidad ósea con un adulto de 30 años sano "joven, normal" con una densidad ósea máxima. El estado clínico del hueso se caracterizó en el punto de referencia y a los 69 meses de acuerdo con los criterios de la OMS para puntuaciones T: ≥ -1 es normal; $> -2,5$ y < -1 es osteopenia; $\leq -2,5$ es osteoporosis.

Métodos:

Población del análisis: el análisis principal se realizó en la población con intención de tratar (ITT) (N=10), definida como todos los pacientes que firmaron el consentimiento informado para participar en el estudio de extensión a largo plazo y recibieron ≥ 1 de dosis total o parcial de velaglucerasa alfa. El efecto de la velaglucerasa alfa en la BMD también se evaluó en subgrupos que recibieron o no bifosfonatos concomitantes con ERT.

Metodología estadística: las puntuaciones Z del punto de referencia faltantes fueron reemplazadas por el siguiente valor. Se usó el análisis de última observación realizada (LOCF) para las puntuaciones Z faltantes posteriores. Los modelos mixtos lineales se usaron como un análisis de medidas repetidas para analizar las puntuaciones Z a lo largo del tiempo. Se muestran la intersección con el eje-y y la estimación de la pendiente, que muestran el incremento anual en unidades de puntuación Z. Se registró y notificó un cambio de osteoporosis a osteopenia o normal, y de osteopenia a normal.

Resultados:

Características del punto de referencia: todos los pacientes inscritos en TKT025EXT tenían patología ósea relacionada con GD1. El estado clínico de la patología ósea de la columna lumbar (LS) fue: 1 paciente (10%) estaba en el intervalo normal; 8 pacientes (80%) tenían osteopenia; y 1 paciente (10%) tenía osteoporosis. El estado clínico de la patología ósea del cuello femoral (FN) fue: 1 paciente (10%) estaba en el intervalo normal; 5 pacientes (50%) tenían osteopenia; y 4 pacientes (40%) tenían osteoporosis. Las puntuaciones DXA Z fueron (mediana [intervalo]): LS, -1,8 [-2,9 a -0,4], FN -1,5 [-2,9 a -0,2]. Hasta los 69 meses la dosis media de velaglucerasa alfa fue de 40 U/kg. Cuatro de diez pacientes también fueron tratados con bisfosfonatos.

Puntuaciones Z: las puntuaciones Z del punto de referencia y varios puntos temporales para la población con ITT (n=10), los pacientes que recibieron bisfosfonatos concomitantes y los pacientes que no recibieron bisfosfonatos se muestran en las **Tablas 5-7**, respectivamente. Los cambios temporales en las puntuaciones Z medias de la columna lumbar y el cuello femoral también se muestran en las **Figs. 5 y 6**, respectivamente.

Tabla 5 puntuaciones Z; N=10, ITT

Momento	Puntuaciones Z	
	Media de la columna lumbar [IC 95%]	Media del fémur [IC del 95%]
Punto de referencia	-1.59 [-2.17, -1.01]	-1.46 [-2.11, -0.81]
Mes 9	-1.50 [-2.05, -0.95]	-1.39 [-2.06, -0.72]
Mes 24	-1.20 [-1.80, -0.60]	-1.23 [-2.04, -0.42]
Mes 33	-1.16 [-1.80, -0.52]	-1.07 [-1.82, -0.32]
Mes 45	-1.12 [-1.72, -0.52]	-1.14 [-1.86, -0.42]
Mes 57	-1.07 [-1.68, -0.46]	-1.10 [-1.89, -0.31]
Mes 69	-0.91 [-1.55, -0.27]	-1.06 [-1.83, -0.29]

Tabla 6 puntuaciones Z; n=4 [con bisfosfonatos]

Puntuaciones Z		
Momento	Media de la columna lumbar [IC 95%]	Media del fémur [IC del 95%]
Punto de referencia	-1.88 [-3.25, -0.50]	-1.70 [-3.13, -0.27]
Mes 9	-1.90 [-3.14, -0.66]	-1.68 [-3.15, -0.20]
Mes 24	-1.78 [-2.89, -0.66]	-1.75 [-3.52, 0.02]
Mes 33	-1.68 [-3.14, -0.21]	-1.45 [-3.19, 0.29]
Mes 45	-1.60 [-2.74, -0.46]	-1.48 [-3.23, 0.28]
Mes 57	-1.50 [-2.96, -0.04]	-1.40 [-3.25, 0.45]
Mes 69	-1.23 [-2.78, 0.33]	-1.48 [-3.22, 0.27]

Tabla 7 puntuaciones Z; n=6 [sin bisfosfonatos]

Z - Puntuaciones		
Momento	Media de la columna lumbar [IC 95%]	Promedio del fémur [IC del 95%]
Punto de referencia	-1.40 [-2.22, -0.58]	-1.30 [-2.30, -0.30]
Mes 9	-1.23 [-1.97, -0.50]	-1.20 [-2.22, -0.18]
Mes 24	-0.82 [-1.57, -0.06]	-0.88 [-2.03, 0.26]
Mes 33	-0.82 [-1.62, -0.02]	-0.82 [-1.91, 0.28]
Mes 45	-0.80 [-1.64, 0.04]	-0.92 [-1.95, 0.11]
Mes 57	-0.78 [-1.55, -0.01]	-0.90 [-2.07, 0.27]
Mes 69	-0.70 [-1.61, 0.21]	-0.78 [-1.91, 0.34]

Los cambios en las puntuaciones Z de la columna lumbar (LS) y el cuello femoral (FN) a partir de las puntuaciones Z del punto de referencia durante un ciclo de 69 meses se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8

Visita programada	Sin bisfosfonatos n=6	Bisfosfonatos * n=4	ITT Población N=10
Cambio de la columna lumbar desde las puntuaciones Z del punto de referencia (IC 95%)			
Mes 9	0.17 (-0.03, 0.36)	-0.03 (-0.18, 0.13)	0.09 (-0.04, 0.22)
Mes 24	0.58 (0.08, 1.09)	0.10 (-0.27, 0.47)	0.39 (0.06, 0.72)
Mes 33	0.58 (-0.06, 1.22)	0.20 (-0.14, 0.54)	0.43 (0.06, 0.80)
Mes 45	0.60 (0.03, 1.17)	0.28 (-0.12, 0.67)	0.47 (0.14, 0.80)
Mes 57	0.62 (0.05, 1.18)	0.38 (-0.04, 0.79)	0.52 (0.20, 0.84)
Mes 69	0.70 (0.16, 1.24)	0.65 (-0.04, 1.34)	0.68 (0.35, 1.01)
Cambio del cuello femoral desde las puntuaciones Z del punto de referencia (IC del 95%)			
Mes 9	0.10 (-0.03, 0.23)	0.03 (-0.18, 0.23)	0.07 (-0.02, 0.16)
Mes 24	0.42 (-0.04, 0.87)	-0.05 (-0.47, 0.37)	0.23 (-0.08, 0.54)
Mes 33	0.48 (0.10, 0.87)	0.25 (-0.13, 0.63)	0.39 (0.16, 0.62)
Mes 45	0.38 (0.18, 0.59)	0.23 (-0.15, 0.60)	0.32 (0.17, 0.47)
Mes 57	0.40 (0.06, 0.74)	0.30 (-0.20, 0.80)	0.36 (0.14, 0.58)
Mes 69	0.52 (0.22, 0.81)	0.23 (-0.25, 0.70)	0.40 (0.18, 0.62)
P≤0,05 frente al punto de referencia			

Como se muestra en la **Tabla 8**, la BMD para la población con intención de tratar mejoró significativamente en los meses 24 (LS: 0,39 (0,06, 0,72)) y en los meses 33 (FN: 0,39 (0,16, 0,62)). La BMD para los pacientes que no recibieron bisfosfonatos concomitantes mejoró significativamente en los meses 24 (LS: 0,58 (0,08, 1,09)) y meses 33 (FN: 0,48 (0,10, 0,87)).

Puntuaciones Z estimadas del modelo mixto lineales: las puntuaciones Z (población ITT, n=10, IC 95%) fueron significativamente más bajas que la población de referencia (intersección de y de LS=-1.56 [-2.09, -1.03]; $P<0.0001$) y intersección de y de FN= -1.42 [-2.06, -0.79]; ($P=0.0007$). Ambos parámetros mejoraron significativamente a lo largo del tiempo (pendiente de LS por mes=+0.011 [0.005, 0.017], $P=0.0021$ (pendiente +0.011 unidades de puntuación Z/mes corresponde a + 0.132/año); pendiente de FN por mes=+0.007 [0.004, 0.009], $P=0.0005$ (pendiente +0.007 unidades de puntuación Z/mes corresponde a + 0.084/año)).

Entre los pacientes que solo recibieron velagluclerasa alfa (n=6, IC 95%), la intersección de y de LS de puntuación Z fue -1.29 [-1.97, -0.62] ($P=0.0045$), la intersección de y de FN fue -1.24 [-2.21, -0.27] ($P=0.0216$) y se observó una mejoría significativa a lo largo del tiempo [pendiente de LS por mes=+0.013 [0.002, 0.024] ($P=0.028$) (corresponde a +0.158 por año), pendiente de FN por mes=+0.009 [0.004, 0.013] ($P=0.0055$) (corresponde a +0.103 por año)].

Entre los pacientes que recibieron bisfosfonatos concomitantemente (n=4, IC 95%), la intersección de y de LS de puntuación Z fue -1.97 [-3.06, -0.88] ($P=0.0104$), intersección de y de FN fue -1.71 [-3.02, -0.40] ($P=0.0252$) y se observó mejoría en el tiempo [pendiente de LS por mes=+0.009 [0.001, 0.017] ($P=0.0351$) (corresponde a +0.111 por año), pendiente de FN por mes=+0.004 [-0.001, 0.010] ($P=0.0867$) (corresponde a +0.048 por año)].

En un modelo mixto lineal basado en un análisis de una base de datos observacional (International Collaborative Gaucher Group Gaucher Registry), los pacientes con GD1 tratados con la ERT imiglucerasa tenían puntuaciones Z significativamente más bajas que la población de referencia al comienzo del seguimiento (n=340, intersección de Y -1.17, $P<0.001$) (Wenstrup et al., J Bone Min Res. 2007; 22: 119-26). Sin embargo, se observó una mejora de la respuesta a la dosis en las pendientes de la puntuación Z por año (15 U/kg [n=113]: +0.064; 30 U/kg [n=116]: +0.086; 60 U/kg [n=111]: +0.132; todos $P<0.001$) (Wenstrup et al., J Bone Min Res. 2007; 22:119-26).

Estado de BMD del punto de referencia y a los 69 meses: el estado clínico óseo del punto de referencia y a los 69 meses se caracterizó según los criterios de la OMS (normal=puntuaciones T: ≥ -1 ; osteopenia=puntuación T > -2.5 y < -1 ; osteoporosis=puntuación T ≤ -2.5). Se observó un cambio de estado en pacientes que recibieron velagluclerasa alfa sin bisfosfonatos concomitantes (n=6). A los 69 meses, dos pacientes con osteopenia de LS y uno de FN se normalizaron y un paciente con osteoporosis de FN se volvió osteopénico. Los cuatro pacientes con bifosfonatos no tuvieron cambios en la categoría de la OMS.

Estimaciones de pendiente de análisis de mediciones repetidas (longitudinales): en el análisis de mediciones repetidas, las estimaciones de puntuación Z [95% IC] para la población ITT (N=10) fueron: intersección de LS=-1.56 [-2.09, -1.03], $P<0.0001$; Pendiente de LS (por mes)=0.011 [0.005, 0.017], $P=0.0021$; Intersección der FN=-1.42 [-2.06, -0.79], $P=0.0007$; Pendiente de LS (por mes)=0.007 [0.004, 0.009], $P=0.0005$. Una pendiente de la columna lumbar de 0.011 aumentos por mes corresponde a un aumento de 0.132 por año, y una pendiente del cuello femoral de 0.007 aumentos por mes equivale a un aumento de 0.084 por año.

Las estimaciones de puntuación Z [IC 95%] para los pacientes que no recibieron bisfosfatos (N=6) fueron: intersección de LS=-1.29 [-1.97, -0.62], $P=0.0045$; Pendiente de LS (por mes)=0.013 [0.002, 0.024], $P=0.0280$; Intersección de FN=-1.24 [-2.21, -0.27], $P=0.0216$; Pendiente de LS (por mes)=0.009 [0.004, 0.013], $P=0.0055$. Una pendiente de la columna lumbar de 0.013 aumentos por mes corresponde a un aumento de 0.158 por año, y una pendiente del cuello femoral de 0.009 aumentos por mes equivale a un aumento de 0.103 por año.

Las estimaciones de puntuación Z [IC 95%] para los pacientes que recibieron bisfosfatos (N=4) fueron: intersección de LS=-1.97 [-3.06, -0.88], $P=0.0104$; Pendiente de LS (por mes)=0.009 [0.001, 0.017], $P=0.0351$; Intersección der FN=-1.71 [-3.02, -0.40], $P=0.0252$; Pendiente de LS (por mes)=0.004 [-0.001, 0.010], $P=0.0867$. Una pendiente de la columna lumbar de 0.009 aumentos por mes corresponde a un aumento de 0.111 por año, y una pendiente del cuello femoral de 0.004 aumentos por mes corresponde a un aumento de 0.048 por año.

El modelo estadístico utilizó todos los datos disponibles y no se usó la imputación de datos.

Conclusiones: en pacientes con enfermedad de Gaucher y osteopenia/osteoporosis en el punto de referencia que fueron tratados con velagluclerasa alfa, la BMD mejoró tanto en la columna lumbar (mes 24) como en el cuello femoral (mes 36). Como la dosis de velagluclerasa alfa se redujo de 60 a 30 unidades/kg/infusión durante el año 2, la mejoría en la patología ósea no dependió de la terapia de dosis alta continua.

Logro de objetivos terapéuticos a largo plazo

Se han descrito objetivos terapéuticos para monitorizar el logro, mantenimiento y continuidad de la respuesta terapéutica en pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1 que reciben ERT (Pastores G et al., (2004) *Seminars in Hematology*, 41 (suppl 5): 4-14)

Para comparar el impacto del tratamiento de velaglucerasa alfa con objetivos terapéuticos para 5 parámetros clínicos clave de la enfermedad de Gaucher tipo 1 (anemia, trombocitopenia, hepatomegalia, esplenomegalia y patología esquelética), la proporción de pacientes con objetivo para anemia, trombocitopenia, hepatomegalia y esplenomegalia en el punto de referencia del estudio se comparó con la proporción que alcanzó cada uno de estos objetivos a los 4 años. Los datos completos para anemia, trombocitopenia, hepatomegalia, esplenomegalia y patología esquelética en el punto de referencia y a los 4 años están disponibles para 8 pacientes (3 hombres, 5 mujeres). La proporción que alcanzó el objetivo de patología esquelética a los 4 años se determinó sobre la base de la mejora de la puntuación Z desde el punto de referencia hasta los 4 años. Además, la proporción de pacientes que lograron los 5 objetivos a los 4 años se comparó con la proporción en el objetivo para los 5 parámetros del punto de referencia.

En el punto de referencia, ningún paciente estaba en el objetivo para todos los parámetros clínicos (**Tabla 9**). Después de 1 año de tratamiento, todos los pacientes mantuvieron los objetivos presentes del punto de referencia, y todos lograron ≥ 2 objetivos. Los 8 pacientes comenzaron la reducción de dosis escalonada para velaglucerasa alfa 30 U/kg EOW entre 15 y 18 meses. Para el año 4 de tratamiento, todos los pacientes cumplieron el objetivo para los 5 parámetros clínicos; por lo tanto, se observó un logro del 100% para cada una de los 5 objetivos terapéuticos a largo plazo (**Tabla 9**).

Tabla 9

	Punto de referencia	Año 4
Anemia	4/8 (50%)	8/8 (100%)
Trombocitopenia	0/8 (0%)	8/8 (100%)
Hepatomegalia	4/8 (50%)	8/8 (100%)
Esplenomegalia	0/8 (0%)	8/8 (100%)
Patología esquelética	-----	8/8 (100%)
Los 5 objetivos	0/8 (0%)	8/8 (100%)

La patología esquelética se midió como una mejora en la densidad mineral ósea (BMD) en el año 4 en relación con el punto de referencia.

En este estudio de Fase I/II y de extensión de velaglucerasa alfa, se observó el logro clínicamente significativo de cada objetivo terapéutico a largo plazo para cada paciente, a pesar de la reducción de la dosis después de 1 año. Este es el primer informe de una cohorte donde todos los pacientes que recibieron ERT para la enfermedad de Gaucher tipo 1 alcanzaron los 5 objetivos terapéuticos a largo plazo en los 4 años posteriores al comienzo del tratamiento.

Resumen de resultados de TKT025 y TKT025EXT

Los descubrimientos informados en la presente demuestran que los eventos adversos asociados con la velaglucerasa alfa fueron generalmente leves en gravedad y en su mayoría no se relacionaron con la terapia. Los eventos adversos emergentes del tratamiento fueron de leves a moderados y en su mayoría no estuvieron relacionados con el fármaco. Ningún paciente inscrito en estos estudios desarrolló anticuerpos, no se observaron eventos adversos serios relacionados con el fármaco, independientemente del ajuste de la infusión o la duración de la exposición, y ningún paciente se retiró del estudio debido a los eventos adversos. Después de un período inicial de observación en el sitio de estudio, los pacientes elegibles se transfirieron con éxito a velaglucerasa alfa, domiciliaria administrada por enfermeras.

La velaglucerasa alfa demostró eficacia en los cuatro parámetros de la enfermedad estudiados con mejoras estadísticamente significativas y clínicamente significativas desde el punto de referencia observado en los primeros seis meses de tratamiento y durante el transcurso de la prueba y el estudio de extensión. En los 24 meses posteriores al inicio de la terapia, todos los pacientes alcanzaron la normalización del nivel de hemoglobina, todos los pacientes menos uno lograron recuentos de plaquetas de más de 100.000/mm³, todos los pacientes lograron

casi la normalización en los volúmenes de hígado, y todos los pacientes menos uno mostraron una reducción de más del 50% en el volumen del bazo. Además, estas mejoras se observaron a lo largo de la duración de los estudios, incluida la fase de reducción de la dosis. El único paciente que volvió a la dosis original de 60 U/kg/cada dos semanas lo hizo a los 39 meses secundario al dolor óseo después de una reducción inicial de la dosis a los 15 meses. Esta paciente presentaba lesiones destructivas óseas en ambos tobillos en el momento de la inscripción (la patología de imágenes no descartaba AVN) y tenía antecedentes de osteomielitis. El investigador principal (AZ) atribuyó el empeoramiento del dolor a la lesión destructiva preexistente y la patología previa, y probablemente no estuviese relacionado con la reducción de la dosis o el fracaso del tratamiento.

El perfil de seguridad observado que incluye la transición a tratamiento domiciliario y los cambios significativos observados en los parámetros clínicos a pesar de la reducción de la dosis, han llevado a otras tres pruebas experimentales posteriores de Fase III para velaglucerasa alfa (que permitan niños), así como un programa de acceso temprano global y un protocolo de tratamiento aceptado por la FDA.

Ejemplo 2: Estudio TKT032 (12 M, 45 o 60 U/kg de velaglucerasa alfa)

Ejemplo 2.1: Resumen

Este ejemplo describe una prueba experimental multicéntrica global para evaluar la eficacia y seguridad de la velaglucerasa alfa en GD tipo 1. Veinticinco pacientes con GD tipo 1 anémica y sin tratamiento previo (edad 4-62 años) fueron aleatorizados a velaglucerasa alfa por vía intravenosa 60 U/kg (n=12) o 45 U/kg (n=13) cada dos semanas durante 12 meses.

Los pacientes se aleatorizaron en una proporción de 1:1 para recibir 45 U/kg (N=13) o 60 U/kg (N=12) de velaglucerasa alfa. Los factores de estratificación incluyeron la edad (2-17; ≥ 18) y el género (masculino; femenino). Las características del punto de referencia de los pacientes se enumeran en la **Tabla 10**. Se observaron mejoras clínica y estadísticamente significativas, en los parámetros hematológicos y volúmenes de bazo a los 12 meses (**Tabla 11**). Las **FIGS. 7 y 8** muestran el aumento de la concentración media de hemoglobina y el recuento de plaquetas, respectivamente, desde el punto de referencia en los pacientes tratados con 45 U/kg o 60 U/kg de velaglucerasa alfa durante 12 meses. Las **FIGS. 9 y 10** muestran la disminución del volumen del bazo y el volumen del hígado normalizado medio, respectivamente, desde el punto de referencia en pacientes tratados con 45 U/kg o 60 U/kg de velaglucerasa alfa durante 12 meses.

Tabla 10 Características basales de TKT032

Factor del Valor de referencia	Velaglucerasa alfa 45 U/kg N=13	Velaglucerasa alfa 60 U/kg N=12	Total N=25
2 a 17 años n (%)	3 (23.1)	4 (33.3)	7 (28.0)
2 a 4 años n (%)	0	1 (8.3)	1 (4.0)
5 a 17 años n (%)	3 (23.1)	3 (25.0)	6 (24.0)
≥ 18 años n (%)	10 (76.9)	8 (66.7)	18 (72.0)
Hombre n (%)	8 (61.5)	7 (58.3)	15 (60.0)
Mujer n (%)	5 (38.5)	5 (41.7)	10 (40.0)
Concentración de hemoglobina (g/dl) Mediana [Min, Max]	10.90 [8.45, 12.85]	10.83 [7.05, 12.25]	10.85 [7.05, 12.85]
Recuento de plaquetas (x10⁹/l) Mediana [Min., Máx.]	58.00 [13.0, 264.0]	66.75 [47.0, 438.0]	65.50 [13.0, 438.0]

Tabla 11 Resultados clínicos TKT032 (N=25)

	n	Mediana de punto de referencia	Cambio medio desde el punto de referencia hasta el mes 12	95% IC	valor P
Variable principal					
Hemoglobina 60 U/kg	12	10.83	2.43	[1.72, 3.14]	<0.0001
Variables secundarias					
Hemoglobina 45 U/kg	13	10.90	2.44	[1.49, 3.39]	0.0001
Plaquetas 60 U/kg	12	66.75	50.88	[23.97, 77.78]	0.0016
Plaquetas 45 U/kg	13	58.00	40.92	[11.20, 70.64]	0.0111
Bazo 60 U/kg	12	2.80	-1.92	[-3.04, -0.79]	0.0032
Bazo 45 U/kg	13	2.90	-1.87	[-3.17, -0.57]	0.0085
Hígado 60 U/kg	12	3.65	-0.84	[-1.58, -0.11]	0.0282a
Hígado 45 U/kg	13	3.50	-0.30	[-0.92, 0.32]	0.3149
a - No es estadísticamente significativo después de ajustar para múltiples pruebas.					

La Velaglucerasa alfa fue bien tolerada. Un paciente desarrolló anticuerpos al final del estudio (12 meses). La **Tabla 12** resume los resultados de la prueba de seguridad TKT032.

Tabla 12 Seguridad de TKT032

DESCRIPCIÓN	Pacientes n (%)		
	velaglucerasa alfa 45 U/kg N=13	velaglucerasa alfa 60 U/kg N=12	Total N=25
No experimentados eventos adversos	2 (15.4)	0	2 (8.0)
Experimentado por lo menos 1 evento adverso	11 (84.6)	12 (100.0)	23 (92.0)
Experimentado por lo menos 1 evento adverso relacionado con el fármaco	9 (69.2)	6 (50.0)	15 (60.0)
Experimentado por lo menos 1 evento adverso relacionado con la infusión	8 (61.5)	6 (50.0)	14 (56.0)
Experimentado por lo menos 1 evento adverso grave o potencialmente mortal	2 (15.4)	0	2 (8.0)
Experimentado por lo menos 1 evento adverso serio	0	1 (8.3)	1 (4.0)
Descontinuado debido a un evento adverso	0	0	0
Muertes	0	0	0
Desarrollados anticuerpos anti-velaglucerasa alfa	1 (7.7)	0	1 (4.0)

A los 12 meses, la concentración media de hemoglobina aumentó (60 U/kg: + 23%; + 2,4 g/dl [intervalo de confianza del 95% [IC]: 1,5; 3,4; P <0,001]; 45 U/kg: +24 %; + 2,4g/dl [IC 95%: 1,5, 3,4; P <0.001]), al igual que el recuento de plaquetas medio (60 U/kg: + 65.9%; +51×10⁹/L [IC 95%: 24] , 78; P=0.002]; 45 U/kg: +66%; +41×10⁹/L [IC 95%: 11, 71; P=0.01]). El volumen medio del bazo disminuyó (60 U/kg: -50% [IC 95%: -62, -39%] de 14,0 a 5,8 múltiplos de la normalidad [MN] [P=0,003]; 45 U/kg: -40% [IC 95%: -52, -28%], de 14.5 a 9.5 MN [P=0.009]); como lo hizo el volumen del hígado medio (60 U/kg: -17% [IC 95%: -27, -7%], de 1.5 a 1.2 MN [P=0.03]; 45 U/kg: -6% [IC 95%] : -18, 6%], de 1.4 a 1.2 MN [P=0.32]. No se observaron eventos adversos serios retiradas relacionados con el fármaco o. Un paciente desarrolló anticuerpos.

Objetivos del estudio

El objetivo principal de este estudio es determinar la eficacia de la dosificación cada dos semanas de

velaglucerasa alfa a una dosis de 60 U/kg en pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1 medida por aumentos en la concentración de hemoglobina.

Los objetivos secundarios de este estudio son evaluar la seguridad de la dosificación cada dos semanas de velaglucerasa alfa a dosis de 60 y 45 U/kg; evaluar la eficacia de la dosificación cada dos semanas de velaglucerasa alfa a una dosis de 45 U/kg, medida por incrementos en la concentración de hemoglobina; evaluar la eficacia de la dosificación cada dos semanas de velaglucerasa alfa a dosis de 60 y 45 U/kg evaluando aumentos en el recuento de plaquetas, disminuciones en los volúmenes de bazo e hígado, y disminuciones en los niveles de ligando 18 de quitotriosidasa y quimiocina (motivo CC) (CCL18) en plasma; evaluar el efecto de la dosificación cada dos semanas de velaglucerasa alfa a dosis de 60 y 45 U/kg sobre la calidad de vida general (QoL); y evaluar las farmacocinéticas de dosis individuales y repetidas de la dosificación cada dos semanas de velaglucerasa alfa cuando se administra a dosis de 60 y 45 U/kg.

Los objetivos terciarios de este estudio son determinar el tiempo desde el punto de referencia para alcanzar una respuesta de hemoglobina, definida como un aumento en la concentración de hemoglobina de ≥ 1 g/dl, después de la dosificación cada dos semanas de velaglucerasa alfa a dosis de 60 ó 45 U/kg; evaluar el efecto de la dosificación cada dos semanas de velaglucerasa alfa a dosis de 60 y 45 U/kg en pruebas de función pulmonar (PFT) en pacientes de ≥ 18 años; evaluar la velocidad de crecimiento y la estadificación de Tanner en pacientes entre 2 y 17 años; evaluar los cambios en la edad esquelética en pacientes entre 2 y 17 años mediante radiografía de la mano y la muñeca izquierdas; establecer un punto de referencia para evaluar la enfermedad ósea en pacientes entre 2 y 17 años mediante formación de imágenes por resonancia magnética (MRI) de la columna lumbar y el cuello femoral; y establecer un punto de referencia a partir del cual evaluar el efecto a largo plazo de la terapia de velaglucerasa alfa en la enfermedad ósea local y sistémica relacionada con Gaucher en pacientes de ≥ 18 años de edad mediante: DXA de la columna lumbar y el cuello femoral (incluyendo formación de imágenes coronales); y fosfatasa alcalina sérica, enlaces cruzados de N-telopéptidos (NTx) y enlaces cruzados de C-telopéptidos (CTX).

Diseño General del Estudio

Este es un estudio multicéntrico, aleatorizado de Fase III, doble ciego, de grupos paralelos, de 2 dosis diseñado para evaluar la eficacia y seguridad de la terapia de velaglucerasa alfa para pacientes con enfermedad de Gaucher tipo I.

Este estudio se compone de 5 fases de la siguiente manera: (1) Selección: Día -21 a Día -4; Punto de referencia: Día -3 a Día 0 (antes de la primera dosis); Fase de tratamiento: Semana 1 (Día 1, primera dosis) hasta la Semana 51 (se administraron un total de 26 infusiones por paciente); Final de Visita de Estudio: Semana 53; Seguimiento: 30 días después de la infusión final (para los pacientes que la suspenden/se retiran antes de la evaluación de la Semana 53, o para los pacientes que completan este estudio pero no eligen inscribirse en el estudio clínico a largo plazo posterior).

En la selección, los pacientes que proporcionaron el consentimiento informado por escrito para participar en este estudio se revisaron según los criterios de ingreso del estudio para determinar la elegibilidad del estudio y se sometieron a evaluaciones de selección. En particular, los pacientes proporcionaron una muestra de sangre para medir la concentración de hemoglobina. Solo aquellos pacientes que tenían una concentración de hemoglobina que era de por lo menos 1 g/dl por debajo del límite inferior de lo normal para la edad y el género fueron elegibles para continuar en la fase del punto de referencia. Para fines de análisis estadístico, se recogió una muestra de sangre adicional en la selección para la evaluación de la concentración de hemoglobina.

Los pacientes que eran elegibles para la participación en el estudio después de completar las evaluaciones de selección se sometieron a procedimientos y evaluaciones del punto de referencia (es decir, días -3 a 0) antes de la primera dosis. Para confirmar que su concentración de hemoglobina era por lo menos 1 g/dl por debajo del límite inferior del normal para la edad y el género, los pacientes proporcionaron una muestra de sangre al punto de referencia. La concentración de hemoglobina fue analizada e informada. Solo aquellos pacientes que tenían una concentración de hemoglobina que era de por lo menos 1 g/dl por debajo del límite inferior del normal para la edad y el género tanto en la selección como en el punto de referencia fueron elegibles para la aleatorización. Para fines de análisis estadístico, se recogió una muestra de sangre adicional en el punto de referencia para la evaluación de las concentraciones de hemoglobina. Se realizaron procedimientos y evaluaciones del punto de referencia adicionales antes de la administración de la primera dosis.

Tras completar las evaluaciones del punto de referencia y la confirmación de la elegibilidad, los pacientes fueron aleatorizados en una proporción de 1:1 para recibir o velaglucerasa alfa 60 U/kg o velaglucerasa alfa 45 U/kg mediante un programa de aleatorización generado por ordenador.

Los pacientes recibieron un total de 26 infusiones IV de medicamentos de estudio de doble ciego en el sitio clínico una vez cada dos semanas durante un total de 51 semanas. Las evaluaciones de seguridad y eficacia se realizaron a intervalos regulares durante el período de tratamiento. Las evaluaciones finales de seguridad y eficacia

se realizaron en las visitas de la semana 51 y la semana 53. La seguridad se evaluó a lo largo del estudio mediante evaluaciones de los eventos adversos (incluyendo efectos adversos relacionados con la infusión), las medicaciones concomitantes y los signos vitales. Se realizaron evaluaciones de seguridad adicionales, que incluían electrocardiogramas de 12 derivaciones, exploraciones físicas, pruebas de laboratorio clínico (hematología, química sérica y análisis de orina) en las semanas 13, 25, 37 y 53. Se llevó a cabo la determinación de la presencia de anticuerpos anti-velaglucerasa alfa y anticuerpos neutralizantes de enzimas aproximadamente cada 6 semanas hasta la semana 53.

La eficacia se evaluó mediante la concentración de hemoglobina y el recuento de plaquetas, el volumen del hígado y bazo, y la concentración de quitotriosidasa y CCL18 en plasma. Las evaluaciones de eficacia adicionales incluyeron velocidad de crecimiento y estadificación de Tanner, indicadores de QoL, crecimiento esquelético y pruebas de función pulmonar.

También se evaluaron durante el estudio los perfiles farmacocinéticos de velaglucerasa alfa de dosis individual y de dosis repetidas. Se recogieron muestras de sangre en la semana 1 (día 1) y la semana 37, respectivamente, para estos análisis.

A los pacientes que completaron este estudio se les dio la oportunidad de inscribirse en un estudio clínico a largo plazo posterior. Para los pacientes que eligieron inscribirse en este estudio a largo plazo, se usaron ciertas evaluaciones desde la visitas de la semana 51 y de la semana 53 en TKT032 como evaluaciones del punto de referencia; los pacientes recibieron su primera infusión de velaglucerasa alfa para el estudio clínico a largo plazo en la visita de la semana 53, después de que se completaran los procedimientos programados de la semana 53 para TKT032. Por lo tanto, se pretendía que los pacientes recibieran tratamiento continuo de velaglucerasa alfa a lo largo de los 2 estudios. Los pacientes que completaron este estudio y no eligieron inscribirse en el posterior estudio clínico a largo plazo tuvieron una evaluación de seguridad por visita al sitio o por teléfono 30 días después de su última infusión de velaglucerasa alfa.

Selección de Población del Estudio

De los 39 pacientes evaluados, 14 no fueron elegibles para la aleatorización (12 no cumplieron los criterios de inclusión, 2 no cumplieron los criterios de exclusión). Se aleatorizaron veinticinco participantes a velaglucerasa alfa a una dosis de 45 U/kg (n=13) o 60 U/kg (n=12). Todos los pacientes aleatorizados que recibieron por lo menos 1 infusión (o infusión parcial) se incluyeron en la población de pacientes con intención de tratar (ITT).

Los participantes elegibles eran hombres o mujeres de ≥ 2 años de edad con enfermedad de Gaucher tipo 1 diagnosticada (actividad de glucocerebrosidasa deficiente en leucocitos o por análisis de genotipo) y anemia relacionada con la enfermedad (niveles de hemoglobina ≥ 1 g/dl por debajo del límite inferior del laboratorio local normal para la edad y el género). Los participantes también tenían 1 o más de los siguientes: esplenomegalia por lo menos moderada (2 a 3 cm por debajo del margen costal izquierdo) por palpación; trombocitopenia relacionada con la enfermedad (recuento de plaquetas $< 90 \times 10^3$ plaquetas/mm³); o hígado agrandado fácilmente palpable. Los participantes no podían haber recibido tratamiento para la enfermedad de Gaucher en los 30 meses anteriores a la entrada en el estudio.

Los participantes fueron excluidos si tenían una esplenectomía; tenían (o se sospechaba que tenían) enfermedad de Gaucher tipo 2 ó 3; eran positivos para anticuerpos o habían experimentado un shock anafiláctico a la imiglucerasa. Otros criterios de exclusión incluyeron el tratamiento con cualquier fármaco o dispositivo de investigación no relacionado con la enfermedad de Gaucher en los 30 días anteriores a la entrada en el estudio; prueba positiva para VIH, o hepatitis B o C; anemia exacerbada (vitamina B12, ácido fólico o relacionada con deficiencia de hierro) o cualquier co-morbilidad significativa que pudiese afectar a los datos del estudio. Las mujeres embarazadas o lactantes fueron excluidas y a las mujeres en edad fértil se les requirió usar un método anticonceptivo médicamente aceptable en todo momento.

Tratamientos de estudio

Asignación de tratamiento: los pacientes fueron aleatorizados en una proporción de 1:1 para recibir: velaglucerasa alfa 60 U/kg cada dos semanas durante 51 semanas (12 pacientes, 26 infusiones); o velaglucerasa alfa 45 U/kg cada dos semanas durante 51 semanas (12 pacientes, 26 infusiones).

Aleatorización: después de completar las evaluaciones del punto de referencia y la confirmación de la elegibilidad, los pacientes fueron aleatorizados en una proporción de 1:1 a través de un programa de aleatorización generado por ordenador para recibir infusiones de velaglucerasa alfa 45 U/kg o 60 U/kg cada dos semanas durante 51 semanas.

La búsqueda del equilibrio en los factores pronósticos fue importante en las pruebas pequeñas sobre la base de la eficiencia estadística para los análisis principales. Para lograr este equilibrio a través de una serie de

factores de pronóstico (por ejemplo, edad y género) se utilizaron técnicas de asignación dinámica. Para el procedimiento de aleatorización dinámica, la asignación de pacientes se vio influenciada por el equilibrio actual en los factores de estratificación para el paciente en cuestión. Esta técnica usó el enfoque sugerido por Pocock y Simon y fue muy consistente con la guía proporcionada en ICH-9 (Pocock et al., Biometrics, 1975; 31:105-115).

Programa de tratamiento: los pacientes recibieron su primera infusión en la semana 1. Todos los pacientes se trataron cada dos semanas durante 12 meses (51 semanas); por lo tanto, se administraron un total de 26 infusiones de velaglucerasa alfa.

Cálculo de la dosis: la dosis real del fármaco del estudio se calculó en base al peso del paciente en el punto de referencia. Un cambio en el peso de $\geq 5\%$ observado en las semanas 13, 25 o 37 de la evaluación previa habría requerido volver a calcular la dosis de la medicación del estudio.

Administración de Velaglucerasa alfa: la velaglucerasa alfa se administró como una infusión IV continua en ambos niveles de dosis de 60 y 45 U/kg. Todas las infusiones se administraron durante 1 hora de duración. Todas las infusiones se reconstituyeron en 4,3 ml de agua estéril libre de conservantes para inyección, y luego se diluyeron en solución salina normal (cloruro sódico al 0,9%) para producir un volumen total de 100 ml. Las infusiones de fármacos del estudio se realizaron aproximadamente el mismo día de la semana, pero pueden realizarse cada 14 días (± 3 días) del día programado para facilitar la programación del paciente.

Procedimientos de estudio y métodos de recopilación de datos

Genotipado: Todos los pacientes proporcionaron una muestra de sangre en la selección para el genotipado de la enfermedad de Gaucher y el genotipado de quitotriosidasa en plasma.

Historia Médica : en la selección, se registró el historial médico completo del paciente. Esto incluyó una revisión de los sistemas corporales, documentación de procedimientos médicos actuales y anteriores, y documentación del uso actual y previo de medicamentos concomitantes, y documentación de que el paciente no había sido tratado para la enfermedad de Gaucher en los 30 meses anteriores al ingreso en el estudio.

Signos vitales: los parámetros de los signos vitales que se registraron incluyeron pulso, presión arterial, frecuencia respiratoria, y temperatura. Se siguió el siguiente programa para registrar los signos vitales en las visitas de infusión: comienzo de la infusión (10 minutos antes de comenzar la infusión), durante la infusión (30 minutos (± 5 minutos)), después de la infusión (dentro de 5 minutos, 30 minutos (± 5 minutos) y 60 minutos (± 5 minutos) después de completar la infusión). En la Selección, Punto de referencia y Semana 53, se recogieron los signos vitales solo en un punto temporal.

Exámenes físicos: se realizaron exámenes físicos en la Selección, Punto de referencia y en las Semanas de Estudio 13, 25, 37 y 53. Los exámenes físicos incluyeron lo siguiente: apariencia general, endocrina, cabeza y cuello, cardiovascular, ojos, abdomen, oídos, genitourinario, nariz, piel, garganta, músculo-esquelético, tórax y pulmones, y neurológicos. Además, se realizaron palpaciones hepáticas y del bazo durante la Selección para confirmar que el paciente tenía esplenomegalia moderada (2 a 3 cm por debajo del margen costal izquierdo) y un hígado agrandado relacionado con la enfermedad de Gaucher.

Altura y peso: la altura y el peso se registraron en el Punto de referencia y en las Semanas de Estudio 13, 25, 37 y 53.

Electrocardiogramas de 12 derivaciones: se realizó un ECG de 12 derivaciones en el Punto de referencia y en las Semanas de Estudio 13, 25, 37 y 53. Cada ECG de 12 derivaciones incluyó la evaluación de los intervalos PR, QRS, QT y QTc y la frecuencia cardíaca.

Pruebas de laboratorio clínico: se recogieron muestras de sangre y orina como se describe a continuación para pruebas de laboratorio clínico. Todas las muestras de sangre se recogieron mediante venopunción.

Hematología: se tomaron muestras de sangre en la Selección, el Punto de referencia y las Semanas 13, 25, 37 y 53 para pruebas hematológicas completas. Se evaluaron los siguientes parámetros hematológicos: hemograma completo (CBC) con diferencial, tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), recuento de reticulocitos (analizado e informado por el laboratorio local del sitio clínico), recuento de plaquetas y tiempo de protrombina (PT). En la Selección, el Punto de referencia y cada visita al estudio (excepto en la visita de la Semana 1), se recogieron muestras de sangre para medir la concentración de hemoglobina y el recuento de plaquetas.

Química del Suero: Se tomaron muestras de sangre para la prueba de química del suero en la Selección, Punto de referencia, y en las Semanas de estudio 13, 25, 37 y 53. Se evaluaron los siguientes parámetros de química del suero: sodio, alanina aminotransferasa, potasio, aspartato aminotransferasa, glucosa, lactato

deshidrogenasa, calcio total, gammaglutamiltransferasa, proteínas totales, fosfoquinasa de creatinina, albúmina, NTx*, creatinina, CTx*, nitrógeno de urea, ácido fólico (selección solamente), bilirrubina total, vitamina B₁₂ (selección solamente), fosfatasa alcalina* (* los resultados se usaron para evaluaciones de biomarcadores óseos).

5 **Análisis de orina:** se recogieron muestras de orina para análisis de orina en la Selección, Punto de referencia y en las Semanas de Estudio 13, 25, 37 y 53. Se evaluaron los siguientes parámetros del análisis de orina: pH, evaluación macroscópica, evaluación microscópica.

10 **Determinación de anticuerpos anti-imiglucerasa en suero:** a todos los pacientes se les recogió una muestra de sangre durante la Selección solo para la determinación de anticuerpos anti-imiglucerasa en suero. Los pacientes con un resultado positivo fueron excluidos del estudio.

15 **Determinación de anticuerpos anti-velaglucerasa alfa en suero:** los pacientes proporcionaron muestras de sangre para medir anticuerpos anti-velaglucerasa alfa en suero en el punto de referencia y aproximadamente cada 6 semanas durante la fase de tratamiento (semanas 7, 13, 19, 25, 31, 37, 43 y 49), y en la semana 53. Durante la fase de tratamiento, estas muestras de sangre se recogieron antes de la infusión.

20 **Eventos adversos:** los eventos adversos se monitorizaron durante el estudio desde el consentimiento/asentimiento informado hasta los 30 días después de la última infusión para los pacientes que completaron el estudio y no eligieron inscribirse en el estudio clínico a largo plazo del estudio antes de la visita de la Semana 53. Para los pacientes que completaron este estudio y eligieron inscribirse en el estudio clínico a largo plazo, los eventos adversos se monitorizaron desde el consentimiento/asentimiento informado hasta la visita de la Semana 53.

25 **Enfermedades Previas y Concomitantes:** las enfermedades adicionales presentes en el Punto de referencia se consideraron como enfermedades concomitantes y se documentaron en las páginas apropiadas del CRF del historial médico. Las enfermedades que tuvieron lugar o se detectaron por primera vez durante el estudio, o el empeoramiento de una enfermedad concomitante durante el estudio, se consideraron AE y se documentaron como tales en el CRF.

30 **MRI del hígado y el bazo:** los pacientes tuvieron una MRI del hígado y el bazo en el Valor Inicial, Semana 25 y Semana 51. El tamaño del hígado y el bazo se midieron mediante MRI abdominal cuantitativa.

35 **Niveles de Quitotriosidasa en Plasma:** Se tomaron muestras de sangre (aproximadamente 2,5 ml) para la evaluación de los niveles de quitotriosidasa en plasma en el Punto de referencia, Semanas 13, 25, 37 y en la Semana 53.

40 **Niveles de CCL18 en plasma:** se tomaron muestras de sangre (aproximadamente 2,5 ml) para la evaluación de los niveles de CCL18 en plasma en el Punto de referencia, Semanas 13, 25, 37 y en la Semana 53.

45 **Pruebas de Calidad de Vida:** en el Punto de referencia y en la Semana 53, se evaluó la calidad de vida de los pacientes mediante cuestionarios validados, incluidos el Formulario abreviado 36 (SF-36), versión 2 (para pacientes ≥ 18 años) y el Cuestionario de salud infantil (CHQ), PF50 (para pacientes de 5 a 17 años).

50 **Velocidad de Crecimiento y Estadificación de Tanner:** para pacientes de 2 a 17 años, el crecimiento se evaluó en el Punto de referencia y en las Semanas 13, 25, 37 y 53. La velocidad de crecimiento se calculó usando mediciones de altura y peso, registradas en puntos temporales regulares durante este estudio. Las tasas de crecimiento de los pacientes en este estudio se midieron frente a tasas de crecimiento para individuos normales de edades comparables obtenidos de los datos de altura y peso de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. El estadio de Tanner se registró en el Valor Inicial y en las Semanas 13, 25, 37 y 53.

Crecimiento Esquelético: los pacientes entre 2 y 17 años se sometieron a radiografía de la mano y la muñeca izquierda en el Punto de referencia y la Semana 51 para la evaluación de la edad esquelética.

55 **Pruebas de Función Pulmonar:** en el Punto de referencia y en la Semana 53, los pacientes de ≥ 18 años que se inscribieron en los sitios de estudio con la capacidad de realizar espirometría tenían PFP.

60 La espirometría se realizó de acuerdo con las directrices publicadas por la American Thoracic Society o European Respiratory Society para la estandarización de la espirometría (American Thoracic Society. Standardization of Spirometry. Am J Respir Crit Care Med. 1995; 152:1107-1136 ; Quanjer et al. Respir J. 1993; 16 (Suppl):5-40) Tanto la Capacidad Vital Forzada (FVC) como el Volumen Espiratorio Forzado/segundo (FEV₁) se expresaron como valores absolutos y % previsto del normal, que se calcularon en base al punto de referencia publicados para adultos (Hankinson et al., Am J Respir. Crit Care Med. 1999; 159: 179-187). Se usó para los cálculos la altura de pie actual.

65

Las determinaciones de volumen pulmonar y capacidad de difusión (DL_{CO}) se realizaron al mismo tiempo que las pruebas de espirometría. Las mediciones del volumen pulmonar incluían la Capacidad Pulmonar Total (TLC) y el volumen residual (RV), que se registraron como valores absolutos y % previsto del normal en base al punto de referencia publicados. La DL_{CO} también se expresó como valores absolutos y % previsto del normal en función del punto de referencia publicados.

Evaluaciones farmacocinéticas: para pacientes de ≥ 18 años, se tomaron muestras de sangre en los siguientes momentos en la Semana 1 (Día 1) y la Semana 37: inmediatamente antes de la primera dosis, durante la infusión (muestra recogida a 5, 10, 15, 20, 40 y 60 (final de la infusión) minutos) y después de la infusión (muestra recogida a los 65, 70, 80, 90, 105 y 120 minutos).

Para pacientes de 2 a 17 años, las muestras de sangre se recogieron en los siguientes momentos en la Semana 1 (Día 1) y Semana 37: inmediatamente antes de la primera dosis, durante la infusión (muestra recogida a 10, 20, 40 y 60 (final de la infusión) minutos) y después de la infusión (muestra recogida a los 70, 80 y 90 minutos).

Las muestras de suero se evaluaron para la presencia de velagucerasa alfa administrada usando un inmunoensayo de antígeno de glucocerebrosidasa. Se evaluaron los siguientes parámetros PK: AUC (área debajo de la curva), C_{max} (concentración en suero máxima), T_{max} (tiempo hasta la concentración en suero máxima), CL (ml/min/kg) (depuración de suero, normalizada para el peso corporal), V_{ss} (ml) (volumen de distribución aparente en estado estable), V_{ss} (%BW) (V_{ss} normalizado para el peso corporal), MRT (tiempo de residencia medio) y $T_{1/2}$ (vida media de eliminación (analizado con los modelos PK apropiados)

Biomarcadores Óseos: solo en el punto de referencia, los pacientes de ≥ 18 años de edad se sometieron a DXA de la columna lumbar y el cuello femoral, incluyendo formación de imágenes coronales, para determinar la enfermedad ósea local y sistémica relacionada con Gaucher. La pérdida ósea y la desmineralización también se evaluaron midiendo la fosfatasa alcalina sérica, NTx y CTx. Los resultados para estos parámetros se obtuvieron a partir de muestras de sangre recogidas para pruebas de laboratorio clínico solamente en el punto de referencia.

Para pacientes de 2 a 17 años, la MRI del cuello femoral y la columna lumbar se obtuvo en el Punto de referencia (es decir, al mismo tiempo que los pacientes se sometieron a una MRI del hígado y el bazo). No se esperaba que ningún efecto del tratamiento fuera aparente para estos parámetros durante este estudio; por lo tanto, las mediciones se recogieron en el Punto de referencia sólo para establecer un punto de referencia desde el cual monitorizar estos biomarcadores durante el estudio clínico a largo plazo.

Eventos adversos

Definición de evento adverso: un evento adverso (AE) es cualquier cambio nocivo, patológico o involuntario en la función anatómica, fisiológica o metabólica según lo indicado por los signos físicos, los síntomas y/o los cambios de laboratorio que se producen en cualquier fase de una prueba clínica, y si se considera o no relacionado con el estudio del fármaco. Esto incluye una exacerbación de una condición preexistente. Los eventos adversos se obtuvieron del consentimiento/asentimiento informado hasta los 30 días después de la última dosis del medicamento del estudio y/o hasta que el evento se resolvió/estabilizó o se alcanzó a un resultado, lo que ocurriera primero. Para los pacientes que completaron este estudio y eligieron inscribirse en el estudio clínico a largo plazo posterior, los eventos adversos se monitorizaron desde el momento en que el paciente proporcionó el consentimiento informado a través de la visita de la Semana 53 de TKT032.

Los AE incluyen: empeoramiento (cambio en la naturaleza, gravedad o frecuencia) de las afecciones presentes al inicio del estudio; enfermedades intercurrentes; interacciones con fármacos; eventos relacionados o posiblemente relacionados con medicaciones concomitantes; valores de laboratorio anormales (esto incluye cambios significativos del punto de referencia dentro del intervalo del normal que el investigador considera clínicamente importante); anomalías clínicamente significativas en el examen físico, los signos vitales, el peso y el ECG.

Adicionalmente, los eventos adversos también pueden incluir valores de laboratorio inesperados que se vuelven significativamente fuera del intervalo y el investigador determinó que eran clínicamente significativos.

Definición de Evento Adverso Relacionado con la Infusión: Un evento adverso relacionado con la infusión se define como un evento adverso que 1) comienza o durante o en las 12 horas después del inicio de la infusión, y 2) se juzga como posible o probablemente relacionados con la medicación del estudio. Otros AEs que tuvieron lugar antes de la infusión, junto con AEs asociados con pruebas y evaluaciones definidas por el protocolo (por ejemplo, pruebas de laboratorio, ECGs, y exámenes físicos) que se realizaron antes de la infusión, no se definen como eventos adversos relacionados con la infusión.

Definición de Evento Adverso Serio: Un AE serio (SAE) es cualquier AE que tiene lugar en cualquier dosis que da como resultado cualquiera de las siguientes consecuencias: muerte, es peligroso para la vida, requiere la hospitalización del paciente, requiere prolongación de la hospitalización existente, una discapacidad/incapacidad

persistente o significativa y una anomalía/defecto de nacimiento congénito.

Eventos médicos importantes que pueden no dar como resultado la muerte, ser peligrosos para la vida, o que requieren hospitalización pueden ser considerado como SAEs cuando, en base de un juicio médico apropiado, pueden poner en peligro al paciente y pueden requerir intervención médica o quirúrgica para evitar una de las consecuencias enumeradas anteriormente.

Un AE que es peligroso para la vida se define como un AE que coloca al paciente, a juicio del informador inicial, en riesgo inmediato de muerte por el AE tal como tuvo lugar (es decir, no incluye un AE que, si hubiera tenido lugar en un forma más grave, podría haber causado la muerte).

Clasificación de Eventos Adversos y Eventos Adversos Serios: La escala de calificación del National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI CTC) Versión 3.0 fue referenciada al evaluar la gravedad de un AE. Si un AE no estaba descrito en la NCI CTC, la gravedad se registró en base a la escala siguiente. La gravedad de todos los AEs/SAEs se registró en la página de CRF apropiada como Grado 1, 2, 3 ó 4 correspondientes, respectivamente, a una gravedad de leve, moderada, grave o peligrosa para la vida. Grado 1 (leve) se define como la ausencia de actividades habituales. Grado 2 (moderado) se define como una limitación de las actividades habituales; Grado 3 (grave) se define como la incapacidad para llevar a cabo las actividades habituales; y Grado 4 (peligrosa para la vida) se define como el riesgo inmediato de muerte.

La relación de un evento adverso o un evento adverso serio con la medicación del estudio ciego se determinó por el investigador en base a las siguientes definiciones. "No relacionado" se define como no relacionado con el fármaco del estudio. "Posiblemente relacionado" se define como un evento clínico/anormalidad de laboratorio con una secuencia temporal razonable para la administración del fármaco del estudio, pero que también podría explicarse por una enfermedad concurrente u otras drogas/productos químicos. "Probablemente relacionado" se define como un evento clínico/anomalía de laboratorio con una secuencia temporal razonable para la administración del fármaco del estudio, poco probable que sea atribuible a una enfermedad concurrente u otros fármacos y productos químicos y que siga una respuesta clínicamente razonable en el desafío. La asociación del evento clínico/anormalidad de laboratorio también debe tener cierta plausibilidad biológica, por lo menos bases teóricas.

Aclaración entre Severo y Grave: el término "grave" se usa a menudo para describir la intensidad (gravedad) de un evento específico (como en un infarto de miocardio leve, moderado o grave); el evento en sí, sin embargo, puede tener un significado médico relativamente menor (como un dolor de cabeza grave). Esto no es lo mismo que "serio", que se basa en los criterios de resultado o acción habitualmente asociados con eventos que representan un peligro para la vida o el funcionamiento. La seriedad (no gravedad) y la causalidad sirven como guía para definir las obligaciones de información reglamentarias.

Monitorización de Eventos Adversos y Período de Observación: para los propósitos de este estudio, el período de observación se extendió desde el consentimiento/consentimiento informado hasta la evaluación final del paciente del estudio. Por razones de seguridad, la evaluación final se definió como la evaluación de seguridad posterior al estudio realizada aproximadamente 30 días después de la última infusión para los pacientes que completaron el estudio y no eligieron inscribirse en el estudio a largo plazo. Para los pacientes que completaron este estudio y eligieron inscribirse en el estudio clínico a largo plazo, los eventos adversos se monitorizaron desde el momento en que el paciente proporciona el consentimiento informado a través de la visita de la Semana 53 de TKT032.

Métodos Estadísticos

Metodología Estadística General: los análisis estadísticos se basaron en el principio ITT para todas las variables de eficacia. El análisis ITT se basó en todos los pacientes aleatorizados que recibieron por lo menos una infusión (infusión total o parcial). Se proporcionaron estadísticas de resumen para cambios y cambios porcentuales desde el Punto de referencia para cada parámetro por grupo de tratamiento. Se presentaron los intervalos de confianza del 95% bilateral en los cambios medios y los cambios porcentuales medios desde el Punto de referencia por grupo de tratamiento para cada criterio de valoración.

Se resumieron los datos continuos recopilados en el Punto de referencia y en las visitas de estudio posteriores, y se tabularon la media, desviación estándar, valores mínimos, máximos y medianos para cada variable para facilitar la búsqueda de tendencias a lo largo del tiempo que pudieran atribuirse al fármaco del estudio. Las variables categóricas se presentaron en términos de frecuencias y porcentaje. En los cambios del grupo se examinaron usando pruebas t emparejadas. La significancia estadística se definió en el nivel 0,05.

La características demográficas y del punto de referencia se resumieron como frecuencias y porcentajes, y los datos se presentaron utilizando estadísticas descriptivas. Se realizaron análisis adicionales específicamente para pacientes entre 2 y 17 años.

En general, se usaron estadísticas descriptivas y gráficos para la presentación de los resultados del estudio, incluyendo, si era relevante, gráficos que muestran el desarrollo a lo largo del tiempo para los pacientes individualmente y para cada grupo de tratamiento.

La seguridad se evaluó en base a los AEs informados, datos de laboratorios clínicos, registros de ECG, historias clínicas, signos vitales y exámenes físicos. Adicionalmente, se analizaron muestras de sangre para determinar la presencia de anticuerpos de anti-velaglucerasa alfa.

Prueba de Hipótesis: Toda la prueba de hipótesis fue de dos lados y se realizó con un nivel de significancia de 0,05. Cada variable se cuantificó como un cambio medio desde el Punto de referencia o cambio porcentual medio desde el Punto de Referencia. La hipótesis nula para cada variable que se estaba probando es que, en la semana 51 o la semana 53, no hay cambio desde el punto de referencia. La hipótesis alternativa es que hay un cambio en cualquier dirección desde el punto de referencia.

Fallos en la Selección: se tabuló la disposición de todos los pacientes seleccionados para el ingreso en el estudio junto con las razones para el fallo de la selección. La disposición de todos los pacientes aleatorizados se tabuló mediante tratamiento y visita, y las razones para la interrupción se tabularon por tratamiento.

Justificación del Tamaño de la Muestra: El tamaño de muestra para este estudio se eligió para tener un alto potencial para detectar una diferencia clínicamente significativa en las concentraciones de hemoglobina medias desde el punto de referencia hasta los 12 meses. Se requirieron un total de 12 pacientes por grupo de tratamiento para el análisis principal. Este número se basó en los resultados del Estudio de Fase I/II TKT025, que examina el cambio dentro del paciente de los resultados del Punto de referencia. Se observó que en la semana 25, el aumento de hemoglobina medio desde el punto de referencia fue de 1,92 g/dl con una desviación estándar de 0,824. La suposición era que la desviación estándar del cambio medio era aproximadamente la misma. Usando un nivel alfa de dos lados de 0,05 y asumiendo que un cambio de 1 unidad en la hemoglobina se considera clínicamente significativo, la desviación estándar del cambio desde el punto de referencia es de 0,824, entonces se necesitarían 10 pacientes para que la prueba tenga un potencial del 90%. Suponiendo una tasa de abandono del 20%, se necesitarían 12 pacientes por grupo de tratamiento. Para reunir datos de seguridad adicionales y protegerse contra posibles abandonos de pacientes, y para lograr la población de pacientes objetivo, podrían inscribirse hasta 30 pacientes en este estudio.

Poblaciones de análisis: la población principal para el análisis de los datos de eficacia fue la población de pacientes ITT, definida como todos los pacientes inscritos y tratados que reciben por lo menos una infusión de velaglucerasa alfa (o infusión parcial). Se anticipó que la tasa de abandono de la muestra aleatoria original debido a la falta de datos posteriores al punto de referencia sería lo suficientemente pequeña (5% o menos) como para minimizar las preocupaciones con respecto al sesgo debido a la exclusión de tales pacientes.

La población de seguridad consistió en todos los pacientes aleatorizados que recibieron por lo menos una infusión del estudio (o infusión parcial). Cualquier paciente en la población de seguridad que no recibió la infusión del estudio al que se había aleatorizado de acuerdo con la infusión que recibieron predominantemente en lugar del tratamiento aleatorizado. Dichos pacientes fueron excluidos de la población de pacientes por protocolo (PP). La población de pacientes PP se define como todos los pacientes aleatorizados que han recibido $\geq 80\%$ de las infusiones programadas, y que tienen evaluaciones válidas del punto de referencia y Semana 51 y/o Semana 53.

Análisis de eficacia: se tabuló la disposición de todos los pacientes seleccionados para el ingreso en el estudio, junto con la razón(es) para el fracaso de la selección. La disposición de todos los pacientes aleatorizados se tabuló por grupo de tratamiento y visita, y se tabularon la razón(es) para la interrupción.

La variable principal de la actividad clínica es la concentración de hemoglobina en los pacientes aleatorizados a 60 U/kg de velaglucerasa alfa. El objetivo principal es demostrar la eficacia mostrando un cambio medio en la hemoglobina desde el Punto de referencia hasta los 12 meses en pacientes aleatorizados a 60 U/kg de velaglucerasa alfa. Con propósitos de análisis, los valores de hemoglobina recogidos en la Selección y el punto de referencia se promediaron para establecer el punto de referencia usado para calcular el cambio. La hipótesis nula es que no habrá ningún cambio desde el punto de referencia en las concentraciones de hemoglobina a los 12 meses. La diferencia media desde el punto de referencia hasta los 12 meses se probó usando una prueba t emparejada o una prueba de rangos con signo de Wilcoxon. También se presentó un intervalo de confianza del 95% para la diferencia media.

Las variables de actividad clínica secundarias y terciarias son: las concentraciones de hemoglobina (el cambio desde el punto de referencia hasta los 12 meses (semana 53) se evaluó para el grupo de 45 U/kg); recuento de plaquetas (se evaluó el cambio desde el punto de referencia hasta los 12 meses (semana 53) para ambos grupos de tratamiento); volumen del bazo (el cambio porcentual desde el punto de referencia hasta 12 meses (semana 51) se evaluó para ambos grupos de tratamiento, además de los valores observados, los volúmenes del bazo se normalizaron por el peso corporal y también se presentaron en múltiplos de lo normal); volumen de hígado (el

cambio porcentual desde el punto de referencia hasta 12 meses (semana 51) se evaluó para ambos grupos de tratamiento, además de los valores observados, los volúmenes de hígado se normalizaron por el peso corporal y también se presentaron en múltiplos de lo normal); se evaluó la quitotriosidasa en plasma (cambio desde el punto de referencia hasta los 12 meses (semana 53) para ambos grupos de tratamiento; una disminución estadísticamente significativa esperada después de 12 meses de tratamiento); se evaluó el CCL18 en plasma (cambio desde el punto de referencia hasta 12 meses (Semana 53) para ambos grupos de tratamiento, se esperaba una disminución estadísticamente significativa después de 12 meses de tratamiento); calidad de vida (SF-36 y CHQ) (se evaluó el cambio desde el punto de referencia hasta los 12 meses (semana 53) para ambos grupos de tratamiento); respuesta a hemoglobina (se evaluó el tiempo para lograr una respuesta de hemoglobina, definida como un aumento en la concentración de hemoglobina de ≥ 1 g/dl para ambos grupos de tratamiento); velocidad de crecimiento y estadificación de Tanner (se evaluó el cambio desde el punto de referencia hasta los 12 meses (semana 53) para ambos grupos de tratamiento en pacientes entre 2 y 17 años); edad esquelética (se evaluó el cambio desde el punto de referencia hasta los 12 meses (semana 51) para ambos grupos de tratamiento, según se mide por radiografía de la mano y la muñeca izquierdas, en pacientes de 2 a 17 años); y PFP (se evaluó el cambio desde el punto de referencia hasta 12 meses (Semana 53) para ambos grupos de tratamiento en pacientes de ≥ 18 años).

Para el objetivo secundario usado para demostrar un cambio medio en la hemoglobina desde el punto de referencia hasta los 12 meses (semana 53) en pacientes aleatorizados a 45 U/kg de velaglucerasa alfa, la hipótesis nula es que no habrá cambios desde el punto de referencia hasta los 12 meses (semana 51 o Semana 53). Para propósitos de análisis, los valores de hemoglobina recogidos en la selección y el punto de referencia se promediaron para establecer el punto de referencia usado para calcular el cambio. La diferencia media desde el punto de referencia hasta los 12 meses (semana 51 o semana 53) se probó usando una prueba t emparejada o prueba de rangos con signo de Wilcoxon. También se presentó un intervalo de confianza del 95% para la diferencia media.

Para los parámetros secundarios restantes, la hipótesis nula es que no habrá cambios desde el punto de referencia hasta los 12 meses (semana 51 o semana 53) para cada grupo de tratamiento. Con propósitos de análisis, se promediaron los valores de plaquetas recogidos en la selección y el punto de referencia para establecer el punto de referencia usado para calcular el cambio para ambos grupos de tratamiento. La diferencia media desde el punto de referencia hasta los 12 meses (semana 51 o semana 53) se probó usando una prueba t emparejada o prueba de rangos con signo de Wilcoxon. También se presentó un intervalo de confianza del 95% para la diferencia media.

Para el tiempo hasta la respuesta de la hemoglobina, se presentaron las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (límite del producto) para cada grupo de tratamiento. Se obtuvieron el tiempo mediano y el intervalo de confianza del 95%. Los pacientes que no experimentaron el evento al final del estudio (es decir, en la semana 53) fueron censurados en la semana 53. Además, se presentó la proporción de pacientes que alcanzaron un nivel de hemoglobina dentro del intervalo normal durante este estudio.

Para los parámetros terciarios restantes que examinan el cambio desde el punto de referencia, la hipótesis nula es que no habrá ningún cambio desde el punto de referencia hasta 12 meses (semana 51 o semana 53) para cada grupo de tratamiento. La diferencia media entre el punto de referencia y los 12 meses (semana 51 o semana 53) se probó mediante una prueba t emparejada o una prueba de rangos con signo de Wilcoxon. También se presentó un intervalo de confianza del 95% para la diferencia media.

Análisis de seguridad: a todos los pacientes que recibieron por lo menos una dosis del fármaco del estudio (o dosis parcial) se les evaluó para seguridad clínica y la tolerabilidad. No se realizaron pruebas estadísticas formales sobre los parámetros de seguridad. Se enumeraron los signos vitales, ECG de 12 derivaciones, química clínica, hematología y la monitorización de seguridad del análisis de orina para cada paciente y se marcaron los valores anormales. Para las variables categóricas, como los AEs, se tabularon el número y el porcentaje de pacientes que experimentaron cada AE. Los AEs se resumieron por gravedad del evento. También se mostró el número y el porcentaje de pacientes que experimentaron AEs relacionados con fármacos, así como AEs que no se consideraron relacionados con el fármaco del estudio.

Se utilizaron evaluaciones de laboratorio clínico (hematología, química sérica, análisis de orina y determinación de anticuerpos anti-velaglucerasa alfa) para evaluar la seguridad de la velaglucerasa alfa.

Análisis de Subgrupos: se realizaron análisis adicionales específicamente para pacientes entre 2 y 17 años. También, en el análisis se consideró la gravedad de la enfermedad respecto al punto de referencia de hemoglobina.

Análisis Farmacocinéticos: Los perfiles farmacocinéticos de dosis individual y repetida para velaglucerasa alfa se establecieron analizando los parámetros PK estándar en la semana 1 y la semana 37, respectivamente.

Resultados

A los 12 meses, la concentración media de hemoglobina aumentó en ambos grupos (60 U/kg: aumento del 23,3%, $+2,4 \pm 0,3$ g/dl, $P=0,0001$; 45 U/kg: aumento del 23,8%, $+2,4 \pm 0,5$ g/dl, $P=0,0001$), al igual que el recuento de plaquetas medio (60 U/kg: 66% de aumento, $+51 \pm 12 \times 10^9/l$, $P=0,0016$; 45 U/kg: aumento del 66%, $+41 \pm 12 \times 10^9/l$; $P=0,0111$). El volumen medio del bazo disminuyó en ambos grupos (60 U/kg: disminución del 50%, $-1,9 \pm 0,5\%$ del peso corporal, $P=0,0032$, desde 14,0 múltiplos del normal [MN] al punto de referencia hasta 5,6 MN; 45 U/kg: 40% de disminución, $-1,9 \pm 0,6\%$ del peso corporal, $P=0,0085$; de 14,5 a 9,5 MN) al igual que el volumen del hígado (60 U/kg: 17% de disminución, $0,8 \pm 3\%$ del peso corporal, $P=0,0282$, de 1,5 a 1,2 MN; 45 U/kg: disminución del 6%, $-0,3 \pm 0,3\%$ del peso corporal, $P=0,3149$, de 1,4 a 1,2 MN).

En ambos grupos, tres cuartas partes de los pacientes alcanzaron un aumento de ≥ 1 g/dl en la concentración de hemoglobina en la semana 15; en el grupo de 60 U/kg, todos los pacientes alcanzaron un aumento de ≥ 1 g/dl en la semana 27 frente a la semana 37 en el grupo de 45 U/kg.

Los pacientes se excluyeron del análisis de quitotriosidasa si tenían 2 copias de la mutación de quitotriosidasa (paciente 6, 45 U/kg) o si tenían actividad de quitotriosidasa de valor de referencia menor de 5700 (paciente 4, 60 U/kg; paciente 15, 45 U/kg). Después de 12 meses de tratamiento, la actividad de la quitotriosidasa en plasma media disminuyó desde el punto de referencia para ambos grupos de tratamiento: en un 83% (IC 95%: -91,15, -74,08%; $N=11$; $p < 0,001$) en el grupo de 60 U/kg y en un 60% (IC 95%: -73,26, -46,63%; $N=11$; $p < 0,001$) en el grupo de 45 U/kg. Los niveles de CCL18 medios también disminuyeron durante 1 año de tratamiento con velaglucerasa alfa 60 U/kg y 45 U/kg en un 66% (IC 95%: -77,81, -54,22; $p < 0,001$) y un 47% (IC 95%: -63,37, -30,15%; $p < 0,001$), respectivamente.

La velaglucerasa alfa fue generalmente bien tolerada sin AEs serios relacionados con el fármaco, y ningún paciente se retiró debido a un AE. Los AEs más comunes fueron dolor de cabeza, nasofaringitis, lesiones, artralgia, tos y pirexia. Un único paciente desarrolló anticuerpos.

En conclusión, en este estudio multicéntrico, global, la velaglucerasa alfa a 60 U/kg y 45 U/kg fue generalmente bien tolerada y efectiva como tratamiento de primera línea para adultos y niños con la enfermedad de Gaucher tipo 1. Ambas dosis se asociaron con una mejora rápida en los valores de hemoglobina, y la mayoría de los pacientes respondieron tan pronto como a las 15 semanas. Todos los parámetros clínicos medidos demostraron mejoras clínicamente significativas después de 12 meses, con una mayor respuesta observada con velaglucerasa alfa a 60 U/kg.

Ejemplo 3: HGT-GCB-039 (9 M, 60 U/kg de velaglucerasa alfa o imiglucerasa)

Resumen

Este ejemplo describe un estudio multicéntrico, de Fase III, aleatorizado, doble ciego, de grupos paralelos diseñado para comparar la seguridad y la eficacia de la terapia de reemplazo de enzima de velaglucerasa alfa con imiglucerasa en el tratamiento de pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1.

El objetivo principal de este ejemplo es demostrar que la velaglucerasa alfa no es inferior a la imiglucerasa medida por un cambio desde el punto de referencia en la concentración de hemoglobina hasta la semana 41 (9M). El objetivo secundario clave es demostrar que no hay diferencias en los aumentos en los recuentos de plaquetas o reducciones en los volúmenes del hígado/bazo a la semana 41 entre los dos grupos.

Los pacientes fueron aleatorizados en una proporción de 1:1 para recibir 60 U/kg de velaglucerasa alfa ($N=17$) o imiglucerasa ($N=17$). Las características de referencia de los pacientes se enumeran en las **Tablas 13 y 14**. Los factores de estratificación incluyeron la edad (2-17; ≥ 18) y el estado de esplenectomía (Y; N). Se cumplieron tanto los objetivos principales como los secundarios. Los resultados para las evaluaciones de eficiencia principal y secundaria se muestran en las **Tablas 15 y 16**, respectivamente. Las **Figs. 11 y 12** muestran el aumento comparable de la concentración media de hemoglobina y el recuento de plaquetas, respectivamente, desde el punto de referencia en los pacientes tratados con 60 U/kg de velaglucerasa alfa o imiglucerasa durante 41 semanas. La **FIG. 13** muestra el aumento comparable del recuento de plaquetas medio desde el punto de referencia en los pacientes sin bazo tratados con 60 U/kg de velaglucerasa alfa o imiglucerasa durante 41 semanas. La **FIG. 14** muestra la disminución comparable del volumen del hígado normalizado medio desde el punto de referencia en los pacientes tratados con 60 U/kg de velaglucerasa alfa o imiglucerasa durante 41 semanas. No hubo diferencias significativas en la seguridad entre la velaglucerasa alfa y la imiglucerasa. Los eventos adversos emergentes del tratamiento se resumen en la **Tabla 17**. Ningún paciente que recibió velaglucerasa alfa desarrolló anticuerpos (**Tabla 18**). Cuatro pacientes que recibieron imiglucerasa desarrollaron anticuerpos anti-imiglucerasa (**Tabla 18**).

Tabla 13 Características de punto de referencia de HGT-GCB-039 o ITT

Factor de punto de referencia		velaglucerasa alfa 60 U/kg N=17	imiglucerasa 60 U/kg N=17
2 a 17 años	n (%)	4 (23.5)	5 (29.4)
2 a 4 años	n (%)	0	4 (23.5)
5 a 17 años	n (%)	4 (23.5)	1 (5.9)
≥ 18 años	n (%)	13 (76.5)	12 (70.6)
Hombre	n (%)	8 (47.1)	8 (47.1)
Mujer	n (%)	9 (52.9)	9 (52.9)
Esplenectomizado		10(58.8)	10(58.8)
Con bazo intacto		7(41.2)	7 (41.2)
Concentración de hemoglobina BL (g/dl) Mediana [Min, Max]		11.40 [9.65, 14.35]	10.60 [8.10, 13.05]
Recuento de plaquetas BL (x 10 ⁹ /l) Mediana [Mín., Máx.]		172.00 [44.0, 310.5]	188.00 [63.0, 430.5]

Tabla 14 Características de punto de referencia por grupo de edad de HGT-GCB-039

Factor de referencia		2-4 años N=4	> 5 años N=30
Hombre	n (%)	4 (100.0)	12 (40.0)
Mujer	n (%)	0	18 (60.0)
Esplenectomizado		1 (25.0)	19 (63.3)
Con bazo intacto		3 (75.0)	11 (36.7)
Concentración de hemoglobina BL (g/dl) Mediana [Min, Max]		9.275 [8.10, 9.70]	11.300 [8.95, 14.35]
Recuento de plaquetas BL (x 10 ⁹ /l) Mediana [Mín., Máx.]		70.75 [63.0, 188.0]	176.25 [44.0, 430.5]
Volumen de bazo BL (% de peso corporal) Mediana [Mín., Máx.]		8.90 [7.3, 8.9]	1.70 [0.6, 6.3]
Volumen de hígado BL (% de peso corporal) Mediana [Mín., Máx.]		5.8 [5.4, 7.0]	3.85 [1.7, 12.2]

Tabla 15 Evaluaciones de eficacia principal de HGT-GCB-039 - Cambio medio en la semana 41 desde el punto de referencia en IC unilateral Hgb para no inferioridad (velaglucerasa alfa - imiglucerasa)

Diferencia de tratamiento en el cambio desde el valor de referencia hasta la semana 41						
Población ITT				Por población de protocolo		
Parámetro/criterio de valoración	n	Diferencia media de tratamiento	Límite inferior de un IC unilateral del 97.5%	n	Diferencia media de tratamiento	Límite inferior de un IC unilateral del 97.5%
Concentración de hemoglobina (g/dl)	34	0.135	-0.596	30	0.157	-0.599

Tabla 16 Evaluaciones de eficacia secundarias de HGT-GCB-039 - Diferencia en el cambio medio en la semana 41 desde el punto de referencia (velaglucerasa alfa - imiglucerasa)

Parámetro	Cambio desde el punto de referencia a la semana 41		
	n	Diferencia media de tratamiento	95% CI
Plaquetas ^a (x10 ⁹ /l)	34	-38.71	(-88.42, 10.99)
Volumen de hígado normalizado ^a (% del peso corporal)	34	-0.07	(-0.43, 0.29)
Volumen ^c de bazo normalizado ^b (% del peso corporal)	14	0.08	(-0.52, 0.68)
Quitotriosidasa ^d (nmol/ml/h)	21	-703.6	(-11762.3, 10355.1)
Ligando de quimiocina 18 (motivo C-C) (ng/ml)	34	145.7	(-188.6, 480.0)
a - Basado en un modelo mixto ajustado para la edad al consentimiento informado, el estado de la esplenectomía y el punto de referencia. b - Hay 20 pacientes esplenectomizados excluidos (10 velaglucerasa alfa 60 U/kg; 10 imiglucerasa 60 U/kg). c - Basado en un modelo mixto ajustado para la edad al consentimiento informado y el punto de referencia. d - Hay 13 paciente(s) deficientes en actividad de quitotriosidasa excluidos (7 velaglucerasa alfa 60 U/kg; 6 imiglucerasa 60 U/kg).			

Tabla 17 Resumen general eventos adversos emergentes del tratamiento de HGT-GCB-039

DESCRIPCIÓN	Pacientes n (%)	
	velaglucerasa alfa 60 U/kg N=17	imiglucerasa 60 U/kg N=17
No experimentados eventos adversos	1 (5.9)	1 (5.9)
Experimentado por lo menos 1 evento adverso	16 (94.1)	16 (94.1)
Experimentado por lo menos 1 evento adverso relacionado con el fármaco	8 (47.1)	6 (35.3)
Experimentado por lo menos 1 evento adverso relacionado con la infusión	5 (29.4)	4 (23.5)
Experimentado por lo menos 1 evento adverso grave o peligroso para la vida	3 (17.6)	2 (11.8)
Experimentado por lo menos 1 evento adverso serio	3 (17.6)	0
Experimentado por lo menos 1 SAE relacionado con el fármaco	1 (5.9)	0

Tabla 18 Anticuerpos de HGT-GCB-039

Resultado de Anticuerpos Anti- imiglucerasa	velaglucerasa alfa 60 U/kg N=17 n (%)	imiglucerasa 60 U/kg N=17 n (%)
Negativo	17 (100.0)	13 (76.5)
positivo ^a	0	4 (23.5)
IgG	0	4 (23.5)
IgA	0	0
IgM	0	0
IgE	0	0
Anticuerpos neutralizantes	0	1 (5.9)
Resultado de Anticuerpos Anti-velaglucerasa alfa		
Negativo	17 (100.0)	16 (94.1)
Positivo	0	1 (5.9)
IgG	0	1 (5.9)
IgA	0	0
IgM	0	0
IgE	0	0
Anticuerpos neutralizantes	0	1 (5.9)

Objetivos del Estudio

El objetivo principal de este estudio fue comparar los efectos de la velaglucerasa alfa y la imiglucerasa en la concentración de hemoglobina en pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1.

Los objetivos secundarios de este estudio fueron: comparar los efectos de velaglucerasa alfa e imiglucerasa en el recuento de plaquetas; comparar los efectos de la velaglucerasa alfa y la imiglucerasa en los volúmenes de hígado y bazo (por MRI); comparar los efectos de la velaglucerasa alfa y la imiglucerasa en los biomarcadores específicos de la enfermedad de Gaucher (niveles de quitotriosidasa y CCL18 en plasma); evaluar la seguridad de la velaglucerasa alfa y la imiglucerasa en pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1, medida según las evaluaciones estándar de laboratorios clínicos (incluyendo tasas de formación de anticuerpos y actividad de anticuerpos neutralizantes de enzimas) y las evaluaciones de seguridad (incluyendo tasas de eventos adversos relacionados con la infusión y la proporción de pacientes que requieren uso de premedicación para gestionar los eventos adversos relacionados con la infusión) para cada grupo de tratamiento; y comparar los efectos de la velaglucerasa alfa y la imiglucerasa en el tiempo de respuesta más temprano para la hemoglobina (definido como una mejora de ≥ 1 g/dl en los niveles de hemoglobina en relación al punto de referencia).

Los objetivos terciarios de este estudio son: evaluar los efectos de la velaglucerasa alfa y la imiglucerasa sobre la velocidad de crecimiento y la estadificación de Tanner en pacientes entre 2 y 17 años; evaluar los efectos de la velaglucerasa alfa y la imiglucerasa sobre los cambios en la edad esquelética en pacientes de entre 2 y 17 años mediante radiografía de la mano y la muñeca izquierdas; evaluar los efectos de la velaglucerasa alfa y la imiglucerasa sobre los cambios en la QoL general, medida por SF-36 para pacientes ≥ 18 años y el CHQ PF-50 para pacientes de 5 a 17 años; evaluar los efectos de la velaglucerasa alfa y la imiglucerasa en las respuestas inmunes e inflamatorias en pacientes de ≥ 18 años medidas por evaluaciones de citoquinas seleccionadas (TNF- α , IL6, IL1b, IL8, IL13, CD14 y GM-CSF); establecer un punto de referencia a partir del cual evaluar la enfermedad ósea en pacientes entre 2 y 17 años por RMI de la columna lumbar y el cuello femoral; y establecer un punto de referencia del que evaluar el efecto a largo plazo de la terapia de velaglucerasa alfa en la enfermedad ósea local y sistémica relacionada con Gaucher en pacientes de ≥ 18 años mediante: absorciometría de rayos X de energía dual (DXA) de la columna lumbar y cuello femoral, incluyendo formación de imágenes coronales; y fosfatasa alcalina en suero, enlaces cruzados de N-telopéptido (NTx) y enlaces cruzados de telopéptido C (CTx).

Criterios de valoración del estudio

El criterio de valoración principal de este estudio es medir el cambio medio desde el punto de referencia hasta la semana 41/Final del estudio (EOS) en la concentración de hemoglobina entre los dos grupos de tratamiento.

Los criterios de valoración secundarios de este estudio son: evaluar la seguridad de la velaglucerasa alfa y la imiglucerasa, evaluada por eventos adversos y eventos adversos relacionados con la infusión (y la proporción de pacientes que requieren premedicación para gestionar eventos adversos relacionados con la infusión), valores de laboratorios clínicos, signos vitales, electrocardiogramas de 12 derivaciones (ECG), formación de anticuerpos y actividad de anticuerpos neutralizantes de enzimas; comparar los cambios medios y porcentuales desde el Punto de referencia en el recuento de plaquetas entre los grupos de tratamiento; comparar los cambios medios y porcentuales desde el Punto de referencia en volúmenes de hígado y bazo por MRI entre grupos de tratamiento; comparar los cambios medios y porcentuales desde el punto de referencia en los niveles de quitotriosidasa en plasma y CCL18 en plasma entre los grupos de tratamiento; y comparar el tiempo de respuesta par ala concentración de hemoglobina (definida como una mejora de ≥ 1 g/dl en los niveles de hemoglobina en relación al Punto de referencia) entre los grupos de tratamiento.

Los criterios de valoración terciarios de este estudio son: evaluar el cambio desde el punto de referencia en la velocidad de crecimiento y la estadificación de Tanner para pacientes entre 2 y 17 años dentro de cada grupo de tratamiento; para evaluar el cambio desde el punto de referencia en los parámetros SF-36 para pacientes ≥ 18 años dentro de cada grupo de tratamiento; evaluar los efectos de la velaglucerasa alfa y la imiglucerasa en las respuestas inmunitarias e inflamatorias en pacientes de ≥ 18 años medidas por evaluaciones de citoquinas seleccionadas (TNF- α , IL6, IL1b, IL8, IL13, CD14 y GM-CSF); evaluar el cambio desde el punto de referencia en los parámetros CHQ (PF-50) para pacientes de 5 a 17 años dentro de cada grupo de tratamiento; y evaluar el cambio desde el punto de referencia en la edad esquelética, medida por radiografía de la mano y la muñeca izquierdas para pacientes entre 2 y 17 años dentro de cada grupo de tratamiento.

Diseño General del Estudio

Este estudio se compone de 5 fases de la siguiente manera: Selección: Día -21 a Día -4; Punto de referencia: Día -3 a Día 0 (a través de la aleatorización de pacientes); Tratamiento: Semana 1 (Día 1, es decir, día de la primera dosis) hasta la Semana 39; Fin de Visita de estudio: Semana 41; Contacto de seguimiento: 30 días después de la infusión final (para pacientes que suspenden/se retiran antes de la evaluación de la Semana 41, o para pacientes que no eligen inscribirse en el estudio clínico a largo plazo).

En la Selección, los pacientes que proporcionaron consentimiento informado escrito para participar en este estudio se revisaron según los criterios de ingreso en el estudio para determinar la elegibilidad. Los pacientes proporcionaron muestras de sangre para medir la concentración de hemoglobina. Solo aquellos pacientes que tenían una concentración de hemoglobina que estaba por debajo del límite inferior del normal para la edad y el género eran elegibles para la inscripción. Con propósitos de análisis estadístico, se recogió una muestra de sangre adicional en la selección para la evaluación de la concentración de hemoglobina.

Los pacientes que fueron elegibles para la participación en el estudio después de completar las evaluaciones de selección se sometieron a procedimientos y evaluaciones de punto de referencia (es decir, Días -3 a 0). Para confirmar que su concentración de hemoglobina estaba por debajo del límite inferior del normal para la edad y género, los pacientes proporcionaron una muestra de sangre en el punto de referencia. La concentración de hemoglobina se analizó e informó. Solo aquellos pacientes que tenían una concentración de hemoglobina que estaba por debajo del límite inferior del normal para la edad y el género tanto en la evaluación de Selección como en el punto de referencia fueron elegibles para la inscripción. Con propósitos de análisis estadístico, se recogió una muestra de sangre adicional en el Punto de referencia para la evaluación de las concentraciones de hemoglobina. Se realizaron procedimientos y evaluaciones de punto de referencia adicionales antes de la administración de la primera dosis de medicación de estudio ciego.

Una vez completados los procedimientos de Selección y punto de referencia y la confirmación de la elegibilidad del paciente, los pacientes se aleatorizaron en una proporción de 1:1 para recibir la medicación del estudio doble ciego (velaglucerasa alfa 60 U/kg o imiglucerasa 60 U/kg). La aleatorización se realizó mediante un procedimiento centralizado. Se utilizó un programa de aleatorización generado por ordenador para asignar pacientes a los grupos de tratamiento. Se intentó obtener grupos de tratamiento que fueran comparables en ciertas variables pronósticas, como la edad, la concentración de hemoglobina y si el paciente se había sometido a una esplenectomía. El programa de aleatorización se preparó antes del estudio.

Los pacientes recibieron un total de 20 infusiones IV de medicaciones del estudio doble ciego en el sitio clínico una vez cada dos semanas durante un total de 39 semanas. Las evaluaciones de seguridad y eficacia se realizaron a intervalos regulares durante la fase de tratamiento. Las evaluaciones finales de seguridad y eficacia se realizaron en la visita de la semana 41 (2 semanas después de la última infusión).

La seguridad se evaluó a lo largo del estudio mediante evaluaciones de los eventos adversos (incluidos los efectos adversos relacionados con la infusión), las medicaciones concomitantes y los signos vitales. Se realizaron evaluaciones de seguridad adicionales, que incluían electrocardiogramas de 12 derivaciones, exámenes físicos, pruebas de laboratorios clínicos (hematología, química sérica y análisis de orina) en las semanas 13, 25 y 41. La determinación de la presencia de anticuerpos anti-velaglucerasa alfa o anti-imiglucerasa y anticuerpos neutralizantes de enzimas se realizó aproximadamente cada 6 semanas hasta la semana 41.

La eficacia se evaluó mediante la concentración de hemoglobina y el recuento de plaquetas, el volumen de hígado y bazo, y la concentración de quitotriosidasa y CCL18 en plasma. Las evaluaciones de eficacia adicionales incluyeron velocidad de crecimiento y estadificación de Tanner, indicadores de QoL, crecimiento esquelético. Se midió la respuesta inmune e inflamatoria (medida por los parámetros de citoquina seleccionados) en pacientes de ≥ 18 años al ingreso en el estudio.

La duración del tratamiento en este estudio fue de 39 semanas y la duración de la participación del paciente en este estudio fue de hasta 11 meses (desde la selección hasta el seguimiento). Los pacientes que completaron este estudio tuvieron la oportunidad de inscribirse en un estudio clínico a largo plazo abierto, en el cual todos los pacientes recibirían velaglucerasa alfa. Para los pacientes que eligieron inscribirse en el estudio clínico a largo plazo abierto posterior, se utilizaron ciertas evaluaciones de la visita de la Semana 41 como las evaluaciones de punto de referencia para ese estudio clínico; los pacientes recibirían su primera infusión de velaglucerasa alfa para el estudio clínico a largo plazo una vez completados los procedimientos de la Semana 41 y las evaluaciones programadas para este estudio. Por lo tanto, se pretendía que los pacientes recibieran tratamiento continuo a lo largo de los 2 estudios. Los pacientes que completaron este estudio y no eligieron inscribirse en el estudio clínico a largo plazo tendrían una evaluación de seguridad por visita en el sitio o telefónica 30 días después de su última infusión en este estudio.

Selección de Población de Estudio

Se inscribieron 34 pacientes (17 pacientes asignados a cada grupo de tratamiento).

Los participantes elegibles eran hombres o mujeres de ≥ 2 años con enfermedad de Gaucher tipo 1 diagnosticada (actividad de glucocerebrosidasa deficiente en leucocitos, o por análisis de genotipo) y anemia relacionada con la enfermedad (niveles de hemoglobina por debajo del límite inferior normal del laboratorio para edad y género). Los participantes también tenían 1 o más de los siguientes: esplenomegalia por lo menos moderada (2 a 3 cm por debajo del margen costal izquierdo) por palpación; trombocitopenia relacionada con la enfermedad (recuento de plaquetas $< 120 \times 10^3$ plaquetas/mm³); o hígado agrandado fácilmente palpable. Los participantes no podían haber recibido tratamiento para la enfermedad de Gaucher en los 12 meses anteriores al ingreso en el estudio.

Los participantes se excluyeron si tenían una esplenectomía; tenían (o se sospechaba que tenían) enfermedad de Gaucher tipo 2 o 3; eran positivos para anticuerpos o habían experimentado un shock anafiláctico a la imiglucerasa. Otros criterios de exclusión incluían el tratamiento con cualquier fármaco o dispositivo de investigación no relacionado con la enfermedad de Gaucher en los 30 días antes del ingreso en el estudio; prueba positiva para VIH, o hepatitis B o C; anemia exacerbada (vitamina B12, ácido fólico o relacionada con la deficiencia de hierro) o cualquier co-morbilidad significativa que pudiera afectar los datos del estudio. Las mujeres embarazadas o lactantes fueron excluidas y a las mujeres en edad fértil se les requirió usar un método anticonceptivo médicamente aceptable en todo momento.

Tratamientos del Estudio

Asignación de tratamiento: los pacientes se aleatorizaron en una proporción de 1:1 antes de la administración de la primera dosis de: velaglucerasa alfa 60 U/kg cada dos semanas durante 39 semanas (hasta 16 pacientes, 20 infusiones) o imiglucerasa 60 U/kg cada dos semanas durante 39 semanas (hasta 16 pacientes, 20 infusiones). Todos los medicamentos del estudio se administraron por IV durante 1 hora para mantener el tratamiento ciego.

Administración del Tratamiento

Infusiones de Medicaciones del estudio: las infusiones de medicaciones de estudio doble ciego se administraron en el sitio clínico como una infusión IV continua de 1 hora para mantener el tratamiento ciego. Las infusiones de medicaciones del estudio tuvieron lugar aproximadamente el mismo día de la semana, pero tuvieron lugar cada 14 días (± 3 días) para facilitar la programación del paciente.

Cálculo de la dosis: la primera dosis de la medicación del estudio doble ciego se basó en el peso del paciente en el Valor inicial. Un cambio en el peso de $\geq 5\%$ desde el punto de referencia o desde la medición registrada más reciente (semana 13 o semana 25) requeriría un nuevo cálculo de la dosis de la medicación del estudio.

Descripción de las Medicaciones del Estudio

VELAGLUCERASA ALFA: La velaglucerasa alfa es un producto liofilizado que se suministró y se envió al sitio de estudio clínico para almacenarse de 2 a 8 ° C.

Imiglucerasa (Cerezyme®): se suministró la imiglucerasa (Cerezyme) como un producto liofilizado, blanco a blanquecino, estéril, no pirógeno.

Procedimientos del Estudio y Métodos de Recopilación de Datos

Criterios de ingreso en el estudio: en la selección, se revisó a los pacientes para su elegibilidad según los criterios de entrada en el estudio. Los pacientes que no cumplían los criterios de entrada en el estudio se consideraron fallos de Selección.

Confirmación de la elegibilidad: en la Selección, los pacientes proporcionaron muestras de sangre para medir la concentración de hemoglobina para determinar su elegibilidad para el estudio. Solo aquellos pacientes que tenían una concentración de hemoglobina que estaba por debajo del límite inferior del laboratorio local del normal para la edad y el género eran elegibles para la inscripción.

En el Punto de referencia, los pacientes proporcionaron una muestra de sangre para confirmar que su concentración de hemoglobina estaba por debajo del límite inferior del laboratorio local del normal para la edad y el género. Solo aquellos pacientes que tenían una concentración de hemoglobina que estaba por debajo del límite inferior del normal para la edad y el género tanto en la Selección como en el Punto de referencia se consideraron elegibles para este estudio.

Genotipado: Todos los pacientes proporcionaron una muestra de sangre en el selección para el genotipado de la enfermedad de Gaucher y el genotipado de quitotriosidasa en plasma.

Historia médica: en la Selección, se registró el historial médico completo del paciente. Esto incluyó una revisión de los sistemas corporales, documentación de procedimientos médicos actuales y anteriores, y documentación del uso de medicaciones concomitantes actual y anterior, y documentación de que el paciente no había sido tratado para la enfermedad de Gaucher en los 12 meses anteriores al ingreso en el estudio.

Signos vitales: los parámetros de los signos vitales que se registraron incluyeron pulso, presión arterial, frecuencia respiratoria, y temperatura. Se siguió el siguiente programa para registrar los signos vitales en las visitas de infusión: inicio de la infusión (en los 10 minutos antes de comenzar la infusión), durante la infusión (30 minutos ($\pm$ 5 minutos)), después de la infusión (en los 5 minutos, 30 minutos ($\pm$ 5 minutos) y 60 minutos ($\pm$ 5 minutos) después de completar la infusión). En la Selección, Punto de referencia y Semana 41, los signos vitales se recopilaban solo en un punto temporal.

Exámenes Físicos: se realizaron exámenes físicos en la Selección y en las Semanas de estudio 13, 25 y 41. Los exámenes físicos incluyeron los siguientes: apariencia general, endocrina, cabeza y cuello, cardiovascular, ojos, abdomen, orejas, genitourinario, nariz, piel, garganta, musculo-esquelético, tórax y pulmones, y neurológico. Cualquier cambio anormal en los descubrimientos físicos se registró como un evento adverso en la página(s) de CRF apropiadas.

Altura y peso: la altura y el peso se registraron en el Punto de referencia y en las Semanas de estudio 13, 25 y la semana 41. Para pacientes pediátricos (es decir, de 2 a 17 años), se usaron evaluaciones de altura y peso para determinar la velocidad de crecimiento.

Electrocardiogramas de 12 derivaciones: se realizó un ECG de 12 derivaciones en el Punto de referencia y en las Semanas de estudio 13, 25 y 41, e incluyó la evaluación de los intervalos PR, QRS, QT y QTc, y la frecuencia cardíaca.

Pruebas de Laboratorio Clínico: se tomaron muestras de sangre y orina como se describe a continuación para las pruebas de laboratorio clínico.

Hematología: se tomaron muestras de sangre durante el selección y en el Punto de referencia para medir los niveles de hemoglobina para el análisis estadístico. Las muestras de sangre también se recogieron en la Selección, Punto de referencia, y las Semanas 13, 25 y 41 para prueba hematológica completa. Se evaluaron los siguientes parámetros hematológicos: recuento sanguíneo completo (CBC) con diferencial, recuento de plaquetas, tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), recuento de reticulocitos (analizado e informado por el laboratorio local del sitio clínico) y tiempo de protrombina (PT). Las muestras de sangre se recogieron en la Selección, el Punto de referencia y en cada visita al estudio (excepto en la visita de la Semana 1) para medir la concentración de hemoglobina y el recuento de plaquetas.

Química sérica: se tomaron muestras de sangre para prueba química sérica en la Selección, el Punto de referencia, y en las Semanas de estudio 13, 25 y 41. Se evaluaron los siguientes parámetros de química sérica: sodio, alanina aminotransferasa, potasio, aspartato aminotransferasa, glucosa, lactato deshidrogenasa, calcio total, gammaglutamiltransferasa, proteínas totales, creatinina fosfoquinasa, albúmina, NTx*, creatinina, CTx*, nitrógeno ureico, ácido fólico (para determinar la elegibilidad del estudio), bilirrubina total, vitamina B₁₂ (solo selección), fosfatasa alcalina* (* los resultados se usaron para evaluaciones de biomarcadores óseos). Los pacientes que en la Selección tenían anemia relacionada con deficiencia de ácido fólico y/o vitamina B₁₂, y por lo tanto no cumplieron los criterios de ingreso en el estudio, se consideraron un fallo de selección.

Análisis de orina: se recogieron muestras de orina para análisis de orina en la Selección, Punto de referencia y en las semanas de estudio 13, 25 y 41. Se evaluaron los siguientes parámetros de análisis de orina: pH, evaluación microscópica y evaluación macroscópica.

Anticuerpos anti-velaglucerasa en suero: los pacientes proporcionaron muestras de sangre para medir los anticuerpos anti-velaglucerasa alfa en suero en la selección y aproximadamente cada 6 semanas durante la fase de tratamiento (Semanas 7, 13, 19, 25, 31 y 37), y en la Semana 41. Durante la fase de tratamiento, estas muestras de sangre se recogieron antes de la infusión de la medicación del estudio doble ciego.

Se evaluaron las muestras de sangre recogidas para la determinación de anticuerpos anti-velaglucerasa alfa. Estas muestras se seleccionaron usando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), y todas las muestras positivas se confirmaron positivas usando un ensayo de radioinmunoprecipitación (RIP). Las muestras positivas se isotiparon (IgG, IgA, IgM o IgE). Además, las muestras positivas se probaron para actividad neutralizante enzimática usando un ensayo *in vitro*.

Determinación de Anticuerpos anti-imiglucerasa en suero: los pacientes proporcionaron muestras de sangre en la selección para medir los anticuerpos anti-imiglucerasa. Los análisis de anticuerpos anti-imiglucerasa se realizaron usando las mismas muestras obtenidas para los análisis de anticuerpos anti-velaglucerasa alfa.

Estas muestras de sangre se evaluaron para determinar la presencia de anticuerpos anti-imiglucerasa. Estas muestras se seleccionaron usando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), y todas las muestras positivas se confirmaron positivas usando un ensayo de radioinmunoprecipitación (RIP). Las muestras positivas se isotiparon (IgG, IgA, IgM o IgE). Además, las muestras positivas se probaron para actividad de neutralizante enzimática usando un ensayo *in vitro*.

Los pacientes que dieron positivo para anticuerpos anti-imiglucerasa en la selección no fueron elegibles para este estudio.

La prueba de reactividad cruzada de anticuerpos (para velaglucerasa alfa) se realizó para pacientes que desarrollan anticuerpos anti-imiglucerasa durante este estudio.

Pruebas de respuesta Inmune e Inflamatoria: Los pacientes que tenían ≥ 18 años de edad proporcionaron muestras de sangre para las pruebas de respuesta inmune e inflamatoria en los Valores iniciales y en las Semanas 13, 25 y 41. Se obtuvo una muestra en los Valores iniciales. En las semanas 13, 25 y 41, se obtuvieron muestras antes, inmediatamente después y 1 hora después de cada infusión con el fármaco del estudio.

Eventos adversos: los eventos adversos se monitorizaron durante todo el estudio desde el momento en que el paciente proporcionó el consentimiento informado hasta 30 días después de la última infusión para los pacientes que completaron el estudio y no eligieron inscribirse en el estudio clínico abierto a largo plazo, o para los pacientes que abandonan o abandonan el estudio antes de la visita de la semana 41. Para los pacientes que completaron este estudio y eligieron inscribirse en el estudio clínico abierto a largo plazo posterior, los eventos adversos se controlaron desde el consentimiento informado hasta la finalización de la visita de la semana 41.

Gestión de Eventos Adversos Relacionados con la Infusión: las infusiones de proteínas se pueden asociar con reacciones a la infusión. Un evento adverso relacionado con la infusión se define como un evento adverso que 1) comienza durante o en las 12 horas posteriores al inicio de la infusión, y 2) se considera posible o probablemente relacionado con medicaciones del estudio ciego.

MRI del hígado y el bazo: los pacientes se sometieron a MRI del hígado y el bazo en el punto de referencia y en las semanas 25 y 41/EOS. Se midió el tamaño del hígado y del bazo usando MRI abdominal cuantitativa.

Niveles de Quitotriosidasa en plasma: Se recogieron muestras de sangre para la evaluación de los niveles de quitotriosidasa en plasma en el punto de referencia y en las semanas 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37 y la semana 41. Se analizó la quitotriosidasa usando un ensayo de actividad de enzimas.

Niveles de CCL18 en Plasma: se recogieron muestras de sangre para la evaluación de los niveles de

CCL18 en plasma en el punto de referencia y en las semanas 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37 y la semana 41. Los niveles de CCL18 se midieron con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) en un kit comercialmente disponible.

Pruebas de Calidad de Vida: en el punto de referencia y en la semana 41, se evaluó la calidad de vida de los pacientes usando cuestionarios validados, incluyendo el Formulario Abreviado 36 (SF-36), versión 2, para pacientes de ≥ 18 años y el Cuestionario de salud infantil (CHQ), PF50 para pacientes de 5 a 17 años (W son Arch Phys Med Rehabil Vol 84, Suppl 2, abril de 2003:43-51 ; SF-36v2™ Health Survey© 1996, 2000 por QualityMetric Incorporated y Medical Outcomes Trust. Derechos reservados: Landgraf et al. Child Health Questionnaire: A User's Manual, 2ª impresión, Health Act, Inc., Boston MA, 1999 ; Landgraf et al., Quality of Life Research, 1998; 7(5):433-445).

Velocidad de Crecimiento y Estadificación de Tanner: para pacientes de 2 a 17 años, el crecimiento se evaluó en el punto de referencia y en las semanas 13, 25 y 41. La velocidad de crecimiento se calculó usando mediciones de altura y peso que se registraron en puntos temporales regulares durante este estudio, y se correlacionaron con la estadificación de Tanner. El estadio de Tanner se registró en el punto de referencia y en las semanas 13, 25 y 41. El cambio desde el punto de referencia para cada paciente entre 2 y 17 años de edad en cada grupo de tratamiento se evaluó como un parámetro de eficacia terciaria.

Crecimiento Esquelético: a los pacientes entre 2 y 17 años se les realizó una radiografía de la mano y la muñeca izquierdas en el punto de referencia y la semana 41 para la evaluación de la edad esquelética.

Biomarcadores Óseos: en el punto de referencia y en la semana 41, los pacientes que tenían ≥ 18 años se sometieron a DXA de la columna lumbar y el cuello femoral, incluyendo formación de imágenes coronales, para determinar la enfermedad ósea local y sistémica relacionada con Gaucher. La pérdida ósea y la desmineralización se evaluaron para estos pacientes midiendo la fosfatasa alcalina sérica, NTx y CTx en el punto de referencia y en la semana 41.

Para pacientes de 2 a 17 años, la MRI del cuello femoral y la columna lumbar se obtuvo en el Punto de referencia y en la Semana 41, al mismo tiempo que estos pacientes se sometían a MRI del hígado y el bazo.

No se esperaba que ningún efecto del tratamiento fuera aparente para estos parámetros durante este estudio, sin embargo, las mediciones recogidas en el Punto de referencia y en la Semana 41 se utilizarían para establecer un punto de referencia desde el que monitorizar estos biomarcadores durante el posterior estudio clínico a largo plazo abierto.

Enfermedades previas y concomitantes: las enfermedades adicionales presentes en el Punto de referencia se consideraron como enfermedades concomitantes y se documentaron en las páginas apropiadas del CRF del historial médico. Las enfermedades que se presentaron o detectaron por primera vez durante el estudio, o el empeoramiento de una enfermedad concomitante durante el estudio, se consideraron como AEs y se documentaron como tales en el CRF.

Los pacientes no recibieron tratamiento con factor de crecimiento de glóbulos rojos o fármaco(s) o dispositivo(s) en investigación en ningún momento durante este estudio o en los 30 días posteriores a la última infusión.

Durante la fase de tratamiento de este estudio, los pacientes podrían recibir corticosteroides como premedicación para mitigar los posibles efectos adversos relacionados con la infusión.

Eventos Adversos

Definición de evento adverso: Un evento adverso (AE) es cualquier cambio nocivo, patológico o involuntario en la función anatómica, fisiológica o metabólica como se indica por los signos físicos, los síntomas y/o los cambios de laboratorio que se producen en cualquier fase de una prueba clínica, y si se consideraron o no relacionados con el fármaco del estudio. Esto incluye una exacerbación de una condición preexistente. Los eventos adversos se recogieron desde el momento en que el paciente proporcionó el consentimiento informado firmado hasta 30 días después de la última dosis de la medicación del estudio ciego y/o hasta que el evento se resolvió/estabilizó o se alcanzó un resultado, lo que ocurriese primero. Para los pacientes que interrumpieron o fueron retirados antes de la visita a la Semana 41, los AE fueron seguidos hasta 30 días después de su última infusión. Para los pacientes que completaron este estudio y eligieron inscribirse en el estudio clínico a largo plazo, los efectos adversos se monitorizaron desde el momento que el paciente proporcionó el consentimiento informado hasta la visita de la Semana 41.

Los AEs incluyen: empeoramiento (cambio en la naturaleza, gravedad o frecuencia) de las afecciones presentes al inicio del estudio; enfermedades intercurrentes; interacciones con fármacos; eventos relacionados con o

posiblemente relacionados con medicaciones concomitantes; valores de laboratorio anormales (esto incluye cambios significativos desde el punto de referencia dentro del intervalo de lo normal que el investigador considera como clínicamente importante); anomalías clínicamente significativas en el examen físico, signos vitales, peso y ECG.

5 Adicionalmente, los AEs también podrían incluir valores de laboratorio inesperados que se volvieron significativamente fuera del intervalo y el investigador determinó que eran clínicamente significativos. En el caso de un valor fuera de rango inesperado, la prueba de laboratorio se repitió hasta que volvió a lo normal o pudo explicarse y la seguridad del paciente no estaba en riesgo.

10 **Definición de Eventos Adversos relacionados con la Infusión:** Un evento adverso relacionado con la infusión se definió como un evento adverso que 1) comienza o durante o en las 12 horas siguientes al comienzo de la infusión, y 2) se juzga como posible o probablemente relacionado con la medicación del estudio ciego. Otros AEs que tuvieron lugar antes de la infusión, junto con AEs asociados con pruebas y evaluaciones definidas por el protocolo (por ejemplo, pruebas de laboratorio, ECGs y exámenes físicos) que se realizaron antes de la infusión, no se definieron como eventos adversos relacionados con la infusión.

15 **Definición de Evento Adverso Serio:** Un AE serio (SAE) es cualquier AE que tiene lugar en cualquier dosis que resulta en cualquiera de los siguientes resultados: muerte, peligro para la vida, requiere la hospitalización del paciente, requiere prolongación de la hospitalización existente, una discapacidad/incapacidad persistente o significativa, y una anomalía congénita/defecto de nacimiento.

20 Los eventos médicos importantes que pueden no dar como resultado la muerte, ser peligrosas para la vida, o que requieren hospitalización pueden ser considerados como SAEs cuando, en base a un criterio médico apropiado, pueden poner en peligro al paciente y pueden requerir intervención médica o quirúrgica para evitar que uno de los resultados enumerados anteriormente.

25 Un AE peligroso para la vida se define como un AE que coloca al paciente, a juicio del informador inicial, en riesgo inmediato de muerte del EA tal como tuvo lugar (es decir, no incluye un AE que, si hubiera tenido lugar en un forma más severa, podría haber causado la muerte).

30 **Clasificación de Eventos Adversos y Eventos Adversos Serios:** La escala de calificación del National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI CTC) Versión 3.0 fue referenciada al evaluar la gravedad de un AE. Si un AE no estaba descrito en la NCI CTC, la gravedad se registró en base a la escala siguiente. La gravedad de todos los AEs/SAEs se registró en la página de CRF apropiada como Grado 1, 2, 3 ó 4 correspondientes, respectivamente, a una gravedad de leve, moderada, grave o peligrosa para la vida. Grado 1 (leve) se define como la ausencia de actividades habituales. Grado 2 (moderado) se define como una limitación de las actividades habituales; Grado 3 (grave) se define como la incapacidad para llevar a cabo las actividades habituales; y Grado 4 (peligrosa para la vida) se define como el riesgo inmediato de muerte.

40 La relación de un evento adverso o un evento adverso serio con la medicación del estudio ciego se determinó por el investigador en base a las siguientes definiciones. "No relacionado" se define como no relacionado con el fármaco del estudio. "Posiblemente relacionado" se define como un evento clínico/anormalidad de laboratorio con una secuencia temporal razonable para la administración del fármaco del estudio, pero que también podría explicarse por una enfermedad concurrente u otras drogas/productos químicos. "Probablemente relacionado" se define como un evento clínico/anomalía de laboratorio con una secuencia temporal razonable para la administración del fármaco del estudio, poco probable que sea atribuible a una enfermedad concurrente u otros fármacos y productos químicos y que siga una respuesta clínicamente razonable en el desafío. La asociación del evento clínico/anormalidad de laboratorio también debe tener cierta plausibilidad biológica, por lo menos bases teóricas.

50 **Aclaración entre Serio y Grave:** el término "grave" se usa a menudo para describir la intensidad (gravedad) de un evento específico (como en un infarto de miocardio leve, moderado o grave); el evento en sí, sin embargo, puede tener un significado médico relativamente menor (como un dolor de cabeza grave). Esto no es lo mismo que "serio", que se basa en los criterios de resultado o acción habitualmente asociados con eventos que representan un peligro para la vida o el funcionamiento. La seriedad (no gravedad) y la causalidad sirven como guía para definir las obligaciones de información reglamentarias.

55 **Monitorización de Eventos Adversos y Período de Observación:** para los propósitos de este estudio, el período de observación se extendió desde el momento en que el paciente proporcionó el consentimiento informado hasta la evaluación final del paciente del estudio. Para propósitos de seguridad, la evaluación final se definió como la evaluación de seguridad posterior al estudio realizada aproximadamente 30 días después de la última infusión para los pacientes que completaron el estudio y no eligieron inscribirse en el estudio a largo plazo, o para los pacientes que interrumpieron o se retiraron del estudio antes de la visita de la semana 41. Para los pacientes que completaron este estudio y eligieron inscribirse en el estudio clínico a largo plazo, los eventos adversos se monitorizaron desde el momento en que el paciente proporciona el consentimiento informado a través de la visita de la semana 41. Si el investigador consideró necesario informar de un AE en un paciente del estudio después del final del período de

observación, debió contactar con el Promotor para determinar cómo se debería documentar e informar del AE.

Método estadístico

Metodología estadística general: Se consideraron dos conjuntos de datos para los análisis estadísticos de eficacia: 1) el conjunto de datos de intención de tratar (ITT) y 2) el conjunto de datos por protocolo (PP). El conjunto de datos ITT está compuesto por todos los pacientes aleatorizados que recibieron por lo menos una dosis completa o parcial del fármaco del estudio. El conjunto de datos PP es un subconjunto del conjunto de datos ITT, que incluye a los pacientes que completaron 41 semanas del estudio, habían recogido mediciones de tanto el punto de referencia como de la semana 4 de la variable de eficacia principal y habían recibido por lo menos el 80% de su dosis de infusión programada.

Para las variables que siguen una distribución continua, los resúmenes tabulares consistieron de n, media, desviación estándar, mínimo, máximo y mediana. Los grupos de tratamiento presentaron gráficos de las variables de eficacia clave. Para las variables categóricas, los resúmenes tabulares consistieron en presentar la frecuencia y el porcentaje en cada categoría por grupo de tratamiento. La variable de eficacia principal se presentó por grupo de tratamiento, e incluía: valores brutos; el valor no transformado de la variable en la escala originalmente informada; el cambio absoluto en el valor desde el punto de referencia, es decir, $X - B$ (donde B es el valor del punto de referencia y X es un valor posterior al punto de referencia); y el cambio porcentual en el valor desde el punto de referencia, es decir, $100 * (X - B)/B$ (donde B es el valor del punto de referencia y X es un valor posterior al punto de referencia).

Prueba de Hipótesis : este estudio comparó el efecto de la velaglucerasa alfa con la imiglucerasa. La intención era mostrar que la velaglucerasa alfa era clínicamente por lo menos tan buena como la imiglucerasa en el nivel de significancia de 0,025.

La hipótesis nula para el criterio de valoración de eficacia principal es que el cambio medio en la concentración de hemoglobina desde el punto de referencia hasta la semana 41 para la velaglucerasa alfa es por lo menos 1 g/dl inferior al cambio medio en la concentración de hemoglobina desde el punto de referencia hasta la semana 41 para la imiglucerasa. La hipótesis que se va a probar se puede expresar como:

$$H_0: \mu_{Vela} - \mu_{IMIG} \leq -1 \text{ frente a. } H_A: \mu_{Vela} - \mu_{IMIG} > -1$$

O

H_0 : la velaglucerasa alfa es inferior con respecto a la respuesta de hemoglobina media

H_A : la velaglucerasa alfa no es inferior con respecto a la respuesta de hemoglobina media

Fallos de Selección y Disposición del Paciente: se tabuló la disposición de todos los pacientes seleccionados para ingresar al estudio junto con las razones del fallo de selección. La disposición de todos los pacientes aleatorizados se tabuló mediante el grupo de tratamiento y la visita, y las razones para la interrupción se tabularon por el grupo de tratamiento.

Justificación del Tamaño de la Muestra: cuando el tamaño de muestra en cada grupo de tratamiento es 14, una prueba t de un lado 0,025 de dos grupos tendrá un 80% de potencial para rechazar la hipótesis nula de que la diferencia en las medias para la hemoglobina es ≤ -1 g/dl a favor de la hipótesis alternativa de que la diferencia en las medias es mayor que -1, suponiendo que la diferencia esperada en las medias es 0, y la desviación estándar común es 0,90.

Suponiendo un abandono del 15%, un total de 32 pacientes (16 pacientes por grupo de tratamiento) se inscribieron en el estudio.

Análisis de Eficacia

Poblaciones del Análisis: Se consideraron dos conjuntos de datos para los análisis estadísticos de eficacia (el conjunto de datos de intención de tratar (ITT) y el conjunto de datos por protocolo (PP)).

Análisis de Eficacia Principal: el criterio de valoración primario de eficacia es el cambio medio desde el punto de referencia hasta la semana 41 en la concentración de hemoglobina entre los dos grupos de tratamiento. El análisis principal se llevó a cabo utilizando la población ITT. Esta es una prueba controlada aleatorizada de no inferioridad diseñada para demostrar que la velaglucerasa alfa no es inferior a la imiglucerasa en términos de eficacia en el tratamiento de pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1.

Se usó un intervalo de confianza del 97,5% unilateral. No se demostró inferioridad por ninguno de un intervalo de confianza unilateral o una prueba de hipótesis para probar la hipótesis nula de que la diferencia de tratamiento es menor o igual que el margen de equivalencia inferior en hemoglobina (-1 g/dl) frente a la alternativa de que la diferencia de tratamiento de imiglucerasa es mayor que el margen de equivalencia inferior. En otras

palabras, centrándose en sólo un extremo del intervalo de confianza e ignorar los otros resultados en un intervalo de confianza del 97,5% unilateral $[(a, \infty)]$, donde a es el límite inferior del intervalo de confianza de 1 lado, podría extraerse una conclusión de la eficacia.

Análisis de Eficacia Secundarios: para los parámetros de eficacia secundarios (recuentos de plaquetas, volumen de hígado y bazo, quitotriosidasa y CCL18) que comparan los cambios desde el punto de referencia entre los grupos de tratamiento, las pruebas estadísticas evaluaron si los cambios medios cambia desde el punto de referencia hasta la semana 41 entre los dos grupos de tratamiento era estadísticamente significativo (estadísticamente significativo se definirá como un valor p menor de 0,05). Se presentó un intervalo de confianza del 95% para la diferencia en los cambios medios del punto de referencia entre los dos grupos de tratamiento usando un modelo de análisis de covarianza (ANCOVA), que incluía, por ejemplo, la edad del punto de referencia como covariable.

Para mediciones de resultados de tiempo hasta el evento (es decir, tiempo hasta la primera respuesta de hemoglobina ≥ 1 g/dl desde el punto de referencia), se presentaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (límite de producto) para cada grupo de tratamiento y una prueba de log-rank para comparar curvas entre grupos de tratamiento. Se presentaron el tiempo mediano y el intervalo de confianza del 95% para cada grupo de tratamiento. Los pacientes que no experimentaron el evento al final del estudio (es decir, en la semana 41) fueron censurados en la semana 41. Los pacientes que se retiraron o fueron suspendidos antes de la evaluación de la semana 41 y que no lograron una respuesta en el momento de la retirada o la interrupción se censuraron en el momento de la última evaluación conocida para ese paciente. Además, se presentó la proporción de pacientes que respondieron frente a los que no respondieron y se compararon entre los grupos de tratamiento usando la Prueba Exacta de Fisher.

Análisis de Seguridad: Todos los pacientes que recibieron por lo menos una dosis del fármaco del estudio (o dosis parcial) se evaluaron para seguridad clínica y tolerabilidad. No se realizaron pruebas estadísticas formales sobre los parámetros de seguridad. Se resumieron los signos vitales, ECG de 12 derivaciones, química clínica, hematología y monitorización de seguridad del análisis de orina. Para las variables categóricas, como los AEs, se tabularon el número y el porcentaje de pacientes que experimentaron cada AE. Los AEs se resumieron por la gravedad del evento. También se mostrará el número y el porcentaje de pacientes que experimentaron AEs relacionados con fármacos y AEs relacionados con la infusión, así como AEs que no se consideraron relacionados con el fármaco del estudio. Las evaluaciones de laboratorio clínico (hematología, química sérica, análisis de orina y determinación de anticuerpos anti-velaglucerasa alfa) se usaron para evaluar la seguridad de velaglucerasa alfa.

Ejemplo 4: Estudio TKT034 (estudio multicéntrico abierto en pacientes que se transfirieron del tratamiento con imiglucerasa)

Resumen

Este ejemplo describe un estudio global, abierto, de 12 meses para examinar la seguridad y eficacia de la velaglucerasa alfa en pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1 que anteriormente recibían imiglucerasa. Los pacientes de ≥ 2 años recibieron velaglucerasa alfa en una dosis igual a su dosis anterior de imiglucerasa, con infusiones administradas durante 1 hora cada dos semanas.

Cuarenta pacientes recibieron velaglucerasa alfa (18 hombres, 4 previamente esplenectomizados, intervalo de edad, 9-71 años). El uso de imiglucerasa previo medio era de 67 meses (intervalo 22-192 meses). Las dosis de Velaglucerasa alfa fueron: 15-22,5U/kg ($n=14$) ("el grupo de 15U/kg"), 22,5-37,5U/kg ($n=12$) ("el grupo de 30U/kg"), 37,5-52,5 U/kg ($n=7$) ("el grupo de 45U/kg"), y $>52,5$ U/kg ($n=7$) ("el grupo de 60U/kg"). La velaglucerasa alfa fue generalmente bien tolerada con la mayoría de los eventos adversos (AEs) de gravedad leve o moderada. Once pacientes (28%) experimentaron un AE considerado posible o probablemente relacionado con el fármaco del estudio; la mayoría fueron considerados relacionados con la infusión. Ningún paciente experimentó un AE peligroso para la vida. Un AE grave se consideró probablemente relacionado con el tratamiento: un paciente tuvo una reacción de hipersensibilidad de grado 2 durante la primera infusión, y eligió suspender el estudio. Este paciente dio negativo para IgE, IgM, IgG, IgA y anticuerpos neutralizantes en el momento de la infusión y 2 semanas después. Ningún paciente desarrolló anticuerpos IgG para velaglucerasa alfa. La concentración de hemoglobina, recuento de plaquetas, volumen de hígado y bazo se mantuvieron a niveles terapéuticos durante 1 año.

En conclusión, los pacientes adultos y pediátricos con enfermedad de Gaucher tipo 1, tratados anteriormente con imiglucerasa durante ≥ 22 meses, se transfirieron con éxito a velaglucerasa alfa, con estabilidad en las mediciones de enfermedad clínicas durante 12 meses.

Objetivos del Estudio

El objetivo principal de este estudio era evaluar la seguridad de la dosificación cada dos semanas de velaglucerasa alfa en pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1 que habían sido tratados anteriormente con

imiglucerasa.

Los objetivos secundarios eran: evaluar los cambios desde el punto de referencia en la concentración de hemoglobina después de la dosificación cada dos semanas de velaglucerasa alfa, evaluar los cambios desde el punto de referencia en el recuento de plaquetas después de la dosificación cada dos semanas de velaglucerasa alfa y evaluar los cambios desde el punto de referencia en el volumen del hígado y del bazo por MRI abdominal después de la dosificación cada dos semanas de velaglucerasa alfa.

Los objetivos terciarios/exploratorios eran: evaluar los cambios desde el punto de referencia en los niveles del ligando 18 de quitotriosidasa y quimiocina (motivo CC) (CCL18) en plasma después de la dosificación cada dos semanas de velaglucerasa alfa, evaluar los cambios en la edad esquelética en pacientes entre 2 y 17 años por radiografía de la mano y la muñeca izquierdas después de la dosificación cada dos semanas de velaglucerasa alfa, evaluar los cambios en la velocidad de crecimiento y la estadificación de Tanner en pacientes entre 2 y 17 años después de la dosificación cada dos semanas de velaglucerasa alfa, establecer una punto de referencia desde el que monitorizar el efecto a largo plazo de la terapia de velaglucerasa alfa sobre la enfermedad ósea local y sistémica relacionada con Gaucher en pacientes de ≥ 18 años de edad, medida por la densidad ósea (DXA) de la columna lumbar y el cuello femoral (incluyendo formación de imágenes coronales), fosfatasa alcalina sérica, enlaces cruzados de N-telopéptido (NTx) y enlaces cruzados de C-telopéptido (CTX), y establecer un punto de referencia a partir del que evaluar la enfermedad ósea en pacientes entre 2 y 17 años mediante MRI de la columna lumbar y el cuello femoral.

Diseño del Estudio General

Este es un estudio abierto, de Fase II/III, multicéntrico, diseñado para evaluar la seguridad de la terapia de velaglucerasa alfa para pacientes que actualmente reciben tratamiento con imiglucerasa para la enfermedad de Gaucher tipo I. Se inscribieron 41 pacientes para recibir la misma cantidad de unidades de velaglucerasa alfa como su dosis de imiglucerasa. Las dosis variaron entre 15 U/kg y 60 U/kg. Los pacientes habían recibido la misma dosis de imiglucerasa durante los 6 meses anteriores a la inscripción en el estudio. La duración total del estudio para cada paciente fue de aproximadamente 14 meses (desde la selección hasta el final del estudio y/o el seguimiento, según corresponda).

El estudio constaba de 5 fases de la siguiente manera: Selección (Día -14 a Día -4), Punto de referencia (Día -3 a Día 0 (antes de la primera dosis)), Fase de tratamiento: semana 1 (Día 1, primera dosis) hasta Semana 51 (se administraron un total de 26 infusiones por paciente), Visita al final del estudio: Semana 53, Seguimiento: 30 días después de la infusión final (para pacientes que abandonaron/se retiraron antes de la evaluación de la Semana 53, o para pacientes que completaron este estudio, pero no eligieron inscribirse en el estudio clínico posterior a largo plazo).

Los pacientes (o padres/tutor legal) que proporcionaron el consentimiento informado escrito se sometieron a evaluaciones de selección en las dos semanas anteriores a su primera dosis para determinar la elegibilidad para la inscripción. Para determinar la elegibilidad para el estudio, se recogió una muestra de sangre de cada paciente durante la selección para evaluar la concentración de hemoglobina y el recuento de plaquetas.

Se recogió una muestra de sangre adicional durante la selección para la evaluación de la concentración de hemoglobina y el recuento de plaquetas con fines de análisis estadístico.

La administración de la primera dosis del fármaco del estudio se definió como la Semana 1 (Día 1). Las infusiones de velaglucerasa alfa se administraron cada dos semanas durante 12 meses (51 semanas) para un total de 26 infusiones. Los pacientes recibieron el mismo número de unidades de velaglucerasa alfa como su dosis de imiglucerasa. Las dosis variaron entre 15 U/kg y 60 U/kg. El tiempo de infusión fue de 60 minutos (1 hora). Las duraciones de infusión aumentadas (por ejemplo, 2 horas) se documentaron en la documentación de la fuente y el CRF apropiado. Las infusiones no fueron de menos de 1 hora de duración.

Las primeras 3 infusiones de velaglucerasa alfa para cada paciente se administraron en el sitio clínico. Los pacientes que no experimentaron un evento adverso serio relacionado con el tratamiento o un evento adverso relacionado con la infusión de velaglucerasa alfa podían recibir sus infusiones posteriores en el hogar por personal médico calificado y capacitado, según la discreción y la dirección del Investigador. Los pacientes que experimentaron un evento adverso relacionado con la infusión podían volverse a evaluar en un momento posterior durante el estudio para considerar la transferencia a infusiones domiciliarias. Se requirió que los pacientes que recibían velaglucerasa alfa como terapia domiciliaria regresaran al sitio clínico en las semanas 7, 13, 19, 25, 31, 37, 45, y 51 y 53.

La visita de finalización del estudio se define como Semana 53. Se consideró que los pacientes habían completado este estudio una vez que han 1) completaron el período de tratamiento de 51 semanas y 2) completaron las visitas del estudio en la Semana 51 y la Semana 53.

Los pacientes que completaron este estudio tuvieron la oportunidad de inscribirse en un estudio clínico abierto a largo plazo posterior. Para los pacientes que eligieron inscribirse en el estudio clínico abierto a largo plazo posterior, se utilizaron ciertas evaluaciones de las visitas de la Semana 51 y la Semana 53 para este estudio (TKT034) como las evaluaciones de punto de referencia para ese estudio; los pacientes recibirían su primera infusión para el estudio clínico abierto a largo plazo posterior en la visita de la Semana 53, después de que se completaran todas las evaluaciones para esa visita y se proporcionase un consentimiento informado escrito para participar en el estudio clínico abierto a largo plazo posterior. Por lo tanto, se pretendía que los pacientes recibieran tratamiento de velaglucerasa alfa continuo en los 2 estudios. Los pacientes que completaron este estudio y no eligieron inscribirse en el estudio clínico abierto a largo plazo posterior tendrían una evaluación de seguridad (parea la recogida de eventos adversos y medicaciones concomitantes) por visita en el sitio o por teléfono 30 días después de su última infusión.

Selección de población de estudio

Todos los pacientes inscritos que recibieron por lo menos 1 infusión (o infusión parcial) se incluyeron en la población de pacientes ITT.

Los participantes elegibles eran hombres o mujeres de ≥ 2 años con enfermedad de Gaucher tipo 1 diagnosticada (actividad de glucocerebrosidasa deficiente en leucocitos, o por análisis de genotipo), que habían recibido tratamiento constante con imiglucerasa durante un mínimo de 30 meses consecutivos; a un paciente se le permitió participar con 22 meses consecutivos de tratamiento previo con imiglucerasa.

Los participantes se excluyeron si tenían tanto una concentración de hemoglobina de ≤ 10 g/dl como un recuento de plaquetas de $\leq 80 \times 10^3$ plaquetas/mm³; tenían una concentración de hemoglobina inestable (excedía un intervalo de ± 1 g/dl del valor de selección) o recuento de plaquetas (excedía un $\pm 20\%$ del valor de selección) durante los 6 meses antes de la selección; tenían (o se sospechaba que tenían) enfermedad de Gaucher tipo 2 ó 3; habían experimentado un shock anafiláctico a la imiglucerasa; tenían un tratamiento inconsistente con imiglucerasa o habían recibido miglustat en los 6 meses anteriores al ingreso en el estudio; o tenían un infarto de bazo clínicamente significativo, activo confirmado radiológicamente o un empeoramiento de necrosis ósea en los 12 meses posteriores a la selección.

Otros criterios de exclusión incluían el tratamiento con cualquier fármaco o dispositivo en investigación en los 30 días anteriores al ingreso en el estudio; prueba positiva para VIH, hepatitis B o C; anemia no relacionada con la enfermedad de Gaucher en la selección; o cualquier comorbilidad significativa que pudiese afectar a los datos del estudio. Las mujeres embarazadas o lactantes fueron excluidas y a las mujeres en edad fértil se les requirió usar un método anticonceptivo médicamente aceptable en todo momento.

Tratamientos del Estudio

Asignación del Tratamiento: los pacientes recibieron infusiones de velaglucerasa alfa cada dos semanas en el mismo número de unidades que su dosis de imiglucerasa. La dosis de imiglucerasa actual del paciente se registró en el punto de referencia. Las dosis de velaglucerasa alfa variaron entre 15 U/kg y 60 U/kg.

Programa de tratamiento: los pacientes recibieron su primera infusión en la Semana 1 (Día 1). Todos los pacientes recibieron velaglucerasa alfa una vez cada dos semanas durante 12 meses (51 semanas); por lo tanto, se administrarán un total de 26 infusiones.

Todas las dosis de velaglucerasa alfa se administraron como infusiones IV continuas a una velocidad máxima de 1 U/kg/minuto. El tiempo de infusión fue de 60 minutos (1 hora). Las duraciones de infusión aumentada (por ejemplo, 2 horas) se documentaron en la documentación de la fuente y el CRF apropiado. Las infusiones pueden no tener menos de 1 hora de duración. Los pacientes recibieron su dosis final de imiglucerasa un máximo de 30 días antes del ingreso en el estudio y un mínimo de 14 días antes del ingreso en el estudio.

Cálculo de la Dosis: Un cambio en el peso de $\geq 5\%$ del punto de referencia o el peso previamente registrado usado para calcular la dosis en las semanas 13, 25 o 37 requirió volver a calcular la dosis de la medicación del estudio.

Ajustes de la Dosis: Se monitorizó a los pacientes durante todo el período de tratamiento para cambios en los parámetros clínicos (es decir, concentración de hemoglobina, recuento de plaquetas y volumen de hígado y bazo). Si un paciente demostró un cambio clínicamente significativo en estos parámetros, el investigador evaluó la opción de aumentar la dosis del paciente en 15 U/kg. Se consideró un ajuste de dosis si se cumplieron dos o más de los siguientes cuatro criterios y eran consistentes en dos evaluaciones consecutivas: disminución desde el punto de referencia en la concentración de hemoglobina de >1 g/dl; una disminución desde el punto de referencia en el recuento de plaquetas de $>20\%$; un aumento en el volumen del hígado según lo indicado por la palpación del órgano y se confirmaba que era $>15\%$ con respecto a la del punto de referencia medida por MRI; y un aumento en el

volumen del bazo según lo indicado por la palpación del órgano y se confirmaba que era >15% con respecto a la del punto de referencia medida por MRI.

Si los valores de los parámetros clínicos no volvieron a los niveles del punto de referencia a los tres meses, el investigador tenía la opción de aumentar la dosis por incrementos de 15 U/kg. No se ofreció aumento de dosis a pacientes que recibían una dosis de 60 U/kg, y no se permitió ninguna dosis superior a 60 U/kg. Si el paciente no respondía a la dosis máxima de 60 U/kg, el paciente podía ser retirado si se consideraba apropiado en base al juicio clínico del Investigador.

Administración de Velaglucerasa alfa

Instrucciones generales para la administración de velaglucerasa alfa: la velaglucerasa alfa se administró por vía intravenosa. Las infusiones de fármacos del estudio tuvieron lugar aproximadamente el mismo día de la semana, pero podían tener lugar cada 14 días (± 3 días) del día objetivo para facilitar la programación del paciente. Si era posible, debían evitarse las infusiones perdidas. Si un paciente no recibió la dosis en los 17 días posteriores a la dosis programada, el paciente recibiría la siguiente infusión lo antes posible después de la aprobación para que el paciente continuase en el estudio. Podría ser aceptable administrar la siguiente infusión tan pronto como 7 días después de la infusión anterior. Las infusiones posteriores regresarían al programa original.

Instrucciones de infusión domiciliaria para la administración de velaglucerasa alfa: Las primeras tres infusiones de velaglucerasa alfa se administraron en el sitio clínico. Después de las tres primeras dosis, los pacientes que no habían experimentado un evento adverso serio relacionado con el tratamiento o un evento adverso relacionado con la infusión podían recibir sus infusiones posteriores en el domicilio. Los pacientes que habían experimentado un evento adverso relacionado con la infusión podrían ser evaluados de nuevo en un momento posterior durante el estudio para considerar la transición a infusiones en el domicilio. Se requirió que los pacientes que recibían velaglucerasa alfa como terapia domiciliaria regresaran al sitio clínico en las Semanas 7, 13, 19, 25, 31, 37, 45, 51 y 53.

En el entorno domiciliario, los signos vitales y la documentación de los eventos adversos se recopilaron en cada visita

Gestión de los Eventos Adversos Relacionados con la infusión: Un evento adverso relacionado con la infusión se definió como un evento adverso que 1) comienza durante o en las 12 horas posteriores al inicio de la infusión, y 2) se juzga como posible o probablemente relacionado con el fármaco del estudio.

Descripción del fármaco del estudio: la velaglucerasa alfa es un producto liofilizado que fue suministrado y enviado por un distribuidor calificado al sitio del estudio clínico para ser almacenado a una temperatura de 2 a 8° C.

Historial de tratamiento específico de la enfermedad de Gaucher: en la selección, se registraron todos los tratamientos específicos de la enfermedad de Gaucher, incluyendo la dosis de imiglucerasa actual del paciente. La dosis de velaglucerasa alfa inicial del paciente se basó en la dosis actual de imiglucerasa registrada.

Valores de hemoglobina y plaquetas históricos: se recopilaron y revisaron todas las evaluaciones de la concentración de hemoglobina y el recuento de plaquetas en los 30 meses anteriores al ingreso en el estudio para determinar la elegibilidad del paciente.

Genotipado de la enfermedad de Gaucher y quitotriosidasa: en la selección solamente, se recogió a todos los pacientes una muestra de sangre para detectar la enfermedad de Gaucher y el genotipado de quitotriosidasa en plasma.

Signos vitales: los parámetros de los signos vitales registrados incluyen pulso, presión arterial, frecuencia respiratoria y temperatura.

Se siguió el siguiente programa para registrar los signos vitales en todas las visitas de infusión: comienzo de la infusión (durante 10 minutos antes de comenzar la infusión, durante la infusión (30 minutos (± 5 minutos)), después de la infusión (en los 5 minutos posteriores a completar la infusión), 30 minutos (± 5 minutos) después de completar la infusión y 60 minutos (± 5 minutos) después de completar la infusión)

Exámenes físicos: se realizaron exámenes físicos en las visitas del punto de referencia, y en las semanas 13, 25, 37, 51 y 53. Los exámenes físicos incluyeron los siguientes: apariencia general, endocrino, cabeza y cuello, cardiovascular, ojos, abdomen, orejas, genitourinario, nariz, piel, garganta, músculo-esquelético, tórax y pulmones, y neurológicos. Cualquier cambio anormal en los descubrimientos físicos se registró como un evento adverso en la página(s) de CRF apropiadas.

Altura y peso: se registraron la altura y el peso en la visita del punto de referencia, y en las semanas 13, 25, 37 y 51. La velocidad de crecimiento se calculó utilizando mediciones de altura y peso, y se correlacionó con la estadificación de Tanner.

Electrocardiogramas de 12 derivaciones: se realizó un ECG de 12 derivaciones en la visita del punto de referencia y en las semanas 13, 25, 37 y 51. Cada ECG de 12 derivaciones incluyó la evaluación de los intervalos PR, QRS, QT y QTc y la frecuencia cardíaca.

Pruebas de laboratorio clínico: se tomaron muestras de sangre y orina como se describe a continuación para las siguientes evaluaciones.

Hematología: se tomaron muestras de sangre para las pruebas de hematología en las visitas de Selección y Punto de referencia, y en las Semanas 7, 13, 19, 25, 31, 37, 45, 51 y 53. Se evaluaron los siguientes parámetros hematológicos: hemograma completo (CBC) con diferencial, tiempo de tromboplastina parcial activada (aPPT), recuento de reticulocitos (realizado por el laboratorio local del sitio), recuento de plaquetas y tiempo de protrombina (PT). En la selección, el punto de referencia y en cada visita al estudio (excepto en la visita de la semana 1), se recogieron muestras de sangre para medir la concentración de hemoglobina y el recuento de plaquetas.

Se recogió una muestra de sangre adicional durante la selección para medir la hemoglobina y el recuento de plaquetas con propósitos de análisis estadístico.

Química sérica: se tomaron muestras de sangre para la prueba de química sérica en la visita de punto de referencia, y en las semanas 13, 25, 37, 51 y 53.

Se evaluaron los siguientes parámetros de la química sérica: sodio, bilirrubina total, potasio, fosfatasa alcalina*, glucosa, alanina aminotransferasa, calcio total, aspartato aminotransferasa, proteínas totales, lactato deshidrogenasa, albúmina, Gamma-glutamyl transferasa, creatinina, creatinina fosfoquinasa, nitrógeno en urea, CTx, NTx* (* los resultados se usaron para evaluaciones de biomarcadores óseos). Los pacientes que en la Selección tenían anemia relacionada con deficiencia de ácido fólico y/o vitamina B₁₂, y por lo tanto no cumplieron los criterios de ingreso en el estudio, se consideraron un fallo de selección. Estos pacientes podrían ser tratados para su anemia relacionada con deficiencia de ácido fólico y/o vitamina B₁₂ durante un máximo de 12 semanas a la discreción del investigador, de acuerdo con la práctica estándar del sitio clínico. Dichos pacientes podían ser re-seleccionados para este estudio después de haber completado el régimen de tratamiento de ácido fólico y/o vitamina B₁₂.

Análisis de orina: se recogieron muestras de orina para análisis de orina en la visita del punto de referencia, y en las semanas 13, 25, 37, 51 y 53. Se evaluaron los siguientes parámetros de análisis de orina: pH, evaluación microscópica y evaluación macroscópica.

Determinación de anticuerpos anti-imiglucerasa en suero: Todos los pacientes tenían una muestra de sangre en el punto de referencia solamente para la determinación de anticuerpos anti-imiglucerasa en suero. Los pacientes fueron elegibles para la inscripción en este estudio independientemente de su estado de anticuerpos anti-imiglucerasa. Los pacientes que eran positivos para anticuerpos anti-imiglucerasa podían ingresar en este estudio. Estas muestras de sangre se evaluaron para determinar la presencia de anticuerpos anti-imiglucerasa.

Determinación de anticuerpos anti-velaglucerasa alfa en suero: se recogieron muestras de sangre para la determinación de anticuerpos anti-velaglucerasa alfa en la visita de punto de referencia, y en las semanas 7, 13, 19, 25, 31, 37, 45 y 51. Se evaluaron las muestras de sangre recogidas para la determinación de anticuerpos para velaglucerasa alfa. Estas muestras se seleccionaron usando un ensayo de inmunosorbencia ligado a enzimas (ELISA).

Eventos adversos: los eventos adversos se monitorizaron a lo largo de todo el estudio desde el momento en que el paciente proporciona el consentimiento informado firmado hasta 30 días después de su última infusión para los pacientes que completaron el estudio y no eligieron inscribirse en el estudio clínico abierto a largo plazo posterior, o para pacientes que interrumpieron o se retiraron del estudio antes de la visita de la Semana 53. Para los pacientes que completaron este estudio y eligieron inscribirse en el estudio clínico abierto a largo plazo posterior, los eventos adversos se monitorizaron desde el consentimiento informado hasta la visita de la semana 53 de este estudio (TKT034).

Enfermedades previas y concomitantes: las enfermedades adicionales presentes en el punto de referencia se consideraron como enfermedades concomitantes y se documentaron en las páginas del historial médico apropiadas del CRF. Las enfermedades que tuvieron lugar o se detectaron por primera vez durante el estudio, o el empeoramiento de una enfermedad concomitante durante el estudio, se consideraron como AEs y se documentaron como tales en el CRF.

Procedimientos del Estudio para Evaluaciones de Eficacia

Concentración de hemoglobina: la concentración de hemoglobina se midió en los momentos descritos en la presente. El cambio desde el punto de referencia hasta 12 meses en la concentración de hemoglobina fue un criterio de valoración secundario de este estudio.

5 **Recuento de plaquetas:** el recuento de plaquetas se midió en los momentos descritos en la presente. El cambio desde el punto de referencia hasta 12 meses en el recuento de plaquetas fue un criterio de valoración secundario de este estudio.

10 **Volúmenes de hígado y bazo medidos por MRI abdominal:** los pacientes se sometieron a MRI abdominal cuantitativa del hígado y el bazo en el punto de referencia, la semana 25 y la semana 51. El cambio desde el punto de referencia hasta 12 meses en el volumen de hígado y bazo fue un criterio de valoración secundario de este estudio.

15 **Niveles de quitotriosidasa y CCL19 en plasma:** se recogieron muestras de sangre para la evaluación de los niveles de quitotriosidasa y CCL18 en plasma en la visita del punto de referencia, y en las semanas 13, 25, 37, 51 y 53. El cambio desde el punto de referencia hasta 12 meses en los niveles de quitotriosidasa y CCL18 fue un criterio de valoración terciario de este estudio.

20 **Velocidad de crecimiento y estadificación de Tanner:** para pacientes de 2 a 17 años, el crecimiento se evaluó en los puntos temporales definidos en la presente. La velocidad de crecimiento se calculó usando mediciones de altura y peso registradas en puntos temporales regulares durante este estudio, y se correlacionó con la estadificación de Tanner. El cambio desde el punto de referencia hasta 12 meses en la velocidad de crecimiento y la estadificación de Tanner fue un criterio de valoración terciario de este estudio.

25 **Crecimiento esquelético:** los pacientes entre 2 y 17 años se sometieron a radiografía de la mano y la muñeca izquierdas en el punto de referencia y la semana 51 para la evaluación de la edad esquelética. El cambio desde el punto de referencia hasta 12 meses en el crecimiento esquelético en pacientes de 2 a 17 años fue un criterio de valoración terciario de este estudio.

30 **Procedimientos de Estudio Adicionales**

Biomarcadores óseos: solo en el punto de referencia, los pacientes de ≥ 18 años se sometieron a DXA de la columna lumbar y el cuello femoral, incluyendo formación de imágenes coronales, para determinar la enfermedad ósea local y sistémica relacionada con Gaucher. La pérdida ósea y la desmineralización también se evaluaron midiendo la fosfatasa alcalina sérica, NTx y CTx. Los resultados para estos parámetros se obtuvieron a partir de las muestras de sangre recogidas para pruebas de laboratorio clínico solo en el punto de referencia.

40 Para los pacientes de 2 a 17 años, la MRI del cuello femoral y la columna lumbar se obtuvieron en el punto de referencia (al mismo tiempo, los pacientes se sometieron a una MRI del hígado y el bazo).

No se esperaba que ningún efecto del tratamiento fuera aparente para estos parámetros durante este estudio, por lo tanto, las mediciones se recogieron en el punto de referencia solo para establecer un punto de referencia a partir del cual monitorizar estos biomarcadores durante el posterior estudio clínico abierto a largo plazo.

45 **Eventos adversos**

Definición de evento adverso: un evento adverso (AE) es cualquier cambio nocivo, patológico o involuntario en la función anatómica, fisiológica o metabólica como se indica por los signos físicos, los síntomas y/o los cambios de laboratorio que se producen en cualquier fase de un estudio clínico, y si es considerado o no relacionado con el fármaco del estudio. Esto incluye una exacerbación de una condición preexistente. Los eventos adversos se recogieron desde el consentimiento informado hasta 30 días después de la última dosis de fármaco del estudio y/o hasta que el evento se resolvió/estabilizó o se llegó a un resultado, lo que ocurriera primero. Para los pacientes que interrumpieron o fueron retirados antes de la visita de la Semana 53, los AEs fueron seguidos hasta 30 días después de su última infusión de velaglucerasa alfa.

55 Los AEs incluyen: empeoramiento (cambio en la naturaleza, gravedad o frecuencia) de las afecciones presentes al comienzo del estudio; enfermedades intercurrentes; interacciones con fármacos; eventos relacionados o posiblemente relacionados con medicaciones; valores de laboratorio anormales (esto incluye cambios significativos desde el punto de referencia dentro del intervalo de los normal que el investigador considere clínicamente importante); anomalías clínicamente significativas en el examen físico, los signos vitales, el peso y el ECG.

65 Adicionalmente, los AEs también podrían incluir valores de laboratorio inesperados que se vuelvan significativamente fuera de rango y que el Investigador determine que son clínicamente significativos. En el caso de un valor fuera de rango inesperado, la prueba de laboratorio se repetiría hasta que vuelva a lo normal o se pueda explicar y la seguridad del paciente no esté en riesgo.

Definición de Eventos Adversos Relacionados con la Infusión: Un evento adverso relacionado con la infusión se definió como un evento adverso que 1) comienza durante o en las 12 horas posteriores al inicio de la infusión, y 2) se juzga como posible o probablemente relacionado con el fármaco del estudio. Otros AEs que tuvieron lugar antes de la infusión, junto con AEs asociados con pruebas y evaluaciones definidas por el protocolo (por ejemplo, pruebas de laboratorio, ECG y exámenes físicos) que se realizaron antes de la infusión, no se definieron como eventos adversos relacionados con la infusión. Los eventos adversos relacionados con la infusión se gestionaron como se ha definido con anterioridad.

Definición de Eventos Adversos Serios: Un AE serio (SAE) es cualquier AE que tiene lugar a cualquier dosis que da como resultado cualquiera de los siguientes resultados: muerte, peligro para la vida, requiere la hospitalización del paciente, requiere prolongación de hospitalización existente, una discapacidad/incapacidad persistente o significativa, y una anomalía congénita/defecto de nacimiento.

Eventos médicos importantes que pueden no dar como resultado la muerte, ser peligrosas para la vida, o que requieren hospitalización pueden considerarse como SAEs cuando, en base a un juicio médico apropiado, pueden poner en peligro al paciente y pueden requerir intervención médica o quirúrgica para evitar uno de los resultados enumerados con anterioridad.

Un AE peligroso para la vida se define como un AE que coloca al paciente, a juicio del informador inicial, en riesgo inmediato de muerte por el AE que ha tenido lugar (es decir, no incluye un AE que, si hubiera tenido lugar en un forma más severa, podría haber causado la muerte).

Clasificación de Eventos Adversos y Eventos Adversos Serios: La escala de calificación de la National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI CTC) Versión 3.0 fue referenciada al evaluar la gravedad de un AE. Si un AE no se describía en el NCI CTC, la gravedad se registró en base a la escala siguiente. La gravedad de todos los AEs/SAEs se registró en la página del CRF apropiada como Grado 1, 2, 3 ó 4 correspondiente, respectivamente, a una gravedad de leve, moderada, grave o peligrosa para la vida. Grado 1 (leve) se define como sin limitación de las actividades habituales. Grado 2 (moderado) se define como alguna limitación de las actividades habituales; Grado 3 (grave) se define como la incapacidad para llevar a cabo las actividades habituales; y Grado 4 (peligroso para la vida) se define como riesgo inmediato de muerte.

La relación de un evento adverso o un evento adverso serio con la medicación del estudio ciego se determinó por el investigador en base a las siguientes definiciones. "No relacionado" se define como no relacionado con el fármaco del estudio. "Posiblemente relacionado" se define como un evento clínico/anormalidad de laboratorio con una secuencia temporal razonable para la administración del fármaco del estudio, pero que también podría explicarse por enfermedad concurrente u otros fármacos/productos químicos. "Probablemente relacionado" se define como un evento clínico/anomalía de laboratorio con una secuencia de tiempo razonable para la administración del fármaco del estudio, poco probable que sea atribuible a enfermedad concurrente u otros fármacos y productos químicos y que sigue una respuesta clínicamente razonable en el abandono. La asociación del evento clínico/anormalidad de laboratorio también debe tener cierta plausibilidad biológica, por lo menos bases teóricas

Aclaración entre Serio y Grave: el término "grave" se usa a menudo para describir la intensidad (gravedad) de un evento específico (como en un infarto de miocardio leve, moderado o grave); el evento en sí, sin embargo, puede tener un significado médico relativamente menor (como un fuerte dolor de cabeza). Esto no es lo mismo que "serio", que se basa en los criterios de resultado o acción generalmente asociados con eventos que representan un peligro para la vida o el funcionamiento. La seriedad (no la gravedad) y la causalidad sirven como una guía para definir las obligaciones de información reglamentarias.

Monitorización de Eventos Adversos y Período de Observación: Para los propósitos de este estudio, el período de observación se extiende desde el momento en que el paciente proporciona el consentimiento informado firmado hasta la evaluación final del estudio del paciente. Por motivos de seguridad, la evaluación final se definió como la evaluación de seguridad posterior al estudio realizada aproximadamente 30 días después de la última infusión para los pacientes que completaron el estudio y no eligieron inscribirse en el estudio clínico abierto a largo plazo posterior, o para pacientes que interrumpieron o se retiraron del estudio antes de la Semana 53. Para los pacientes que eligieron inscribirse en el estudio clínico abierto a largo plazo posterior, los eventos adversos se monitorizaron hasta la Semana 53; los eventos adversos que no se habían resuelto a partir de la visita de la Semana 53 para este estudio se registraron en el historial médico del paciente para el estudio clínico abierto a largo plazo posterior.

Métodos Estadísticos

Metodología Estadística General: La población de pacientes con intención de tratar (ITT) se definió como todos los pacientes inscritos que recibieron por lo menos una infusión (infusión total o parcial). Los análisis de datos estadísticos se realizaron en la población ITT. Los datos continuos recopilados en el punto de referencia y en las visitas del estudio posteriores se resumieron usando estadísticas descriptivas (n, media, mediana, mínimo, máximo y

desviación estándar). Los datos categóricos se resumieron como frecuencias y porcentajes. Se presentaron estadísticas descriptivas para todos los pacientes en la población ITT de acuerdo con las características demográficas y del punto de referencia.

- 5 El análisis de los criterios de valoración secundarios (es decir, parámetros clínicos) se basó en una hipótesis de no inferioridad como se describe a continuación.

10 **Justificación del Tamaño de la Muestra:** Este era una prueba de seguridad, y fue difícil identificar una única variable de resultado de seguridad principal para el estudio. Sin embargo, el tamaño de muestra seleccionado que se basó en los parámetros de eficacia era adecuado para la evaluación de efectos adversos menos comunes.

15 La inclusión de por lo menos 26 pacientes proporcionó información básica sobre la seguridad y la tolerabilidad. Del estudio TKT025, el cambio medio a los 6 meses entre los pacientes no indica un empeoramiento de los eventos adversos (AEs) desde el punto de referencia. Algunos pacientes tendrán sus AEs resueltos, algunos pacientes un empeoramiento de sus AEs. Suponiendo la variabilidad natural de los pacientes, la posibilidad de observar un empeoramiento para un solo paciente es del 11%. Esta tasa de fallo del 11% es para un paciente. La probabilidad de que los 26 pacientes en el ensayo no tengan un SAE es igual a la probabilidad de que el paciente 1 no tenga un SAE multiplicado por la probabilidad de que el paciente 2 no tenga un SAE multiplicado por (...etc...) la probabilidad de que el paciente 26 no tenga un SAE. Es decir un 95% de probabilidad de que por lo menos un paciente de los 26 muestre un empeoramiento de un AE desde el punto de referencia [$1 - (.89)^{26} = 0,95$]. En otras palabras, para un tamaño de muestra de 26, la probabilidad de observar por lo menos un evento será de 0,95 cuando la probabilidad del evento sea de 0,11. O, cuando no se observen eventos, para obtener un límite superior de 0,11 en el intervalo de confianza del 95% para la probabilidad de un evento raro, se requeriría un tamaño de muestra de 26.

25 La hipótesis nula es que los cambios medios desde el punto de referencia (es decir, el final del tratamiento con imiglucerasa) hasta el mes 12 para cada uno de los parámetros clínicos seleccionados (concentración de hemoglobina, recuento de plaquetas, volúmenes de hígado y bazo) estén en los valores clínicamente significativos pre-especificados. Los cambios clínicamente significativos desde el punto de referencia hasta la semana 53 para la hemoglobina se definieron como un cambio de no menos de 1 gm/dl y un cambio del 20% en el recuento de plaquetas. Para el volumen de hígado y bazo normalizado, los cambios desde el punto de referencia hasta la semana 53 se definieron como un aumento de no más del 15%. La estimación del tamaño de muestra de 26 pacientes se basó en una prueba t emparejada de medias, con una desviación estándar de 0,671 con un nivel alfa de dos lados de 0,05 y 80% de potencia.

35 **Análisis Principal:** a todos los pacientes que recibieron por lo menos una dosis completa o parcial del fármaco del estudio se les evaluó para seguridad clínica y tolerabilidad. Los signos vitales, la química clínica y la hematología que se habían recogido para la monitorización de seguridad se enumeraron para cada paciente y se marcaron los valores anormales. Para las variables categóricas, como AEs, se tabularon el número y el porcentaje de pacientes que experimentaron cada AE. Los AEs se resumieron por la gravedad del evento. También se mostró el número y el porcentaje de pacientes que experimentaron AEs relacionados con el fármaco y AEs que no se consideraron relacionados con el fármaco del estudio. También se resumieron las reacciones a eventos adversos relacionados con la infusión y las tasas de formación de anticuerpos anti-velaglucerasa alfa.

45 La principal variable clínica fue evaluar la seguridad de la velaglucerasa alfa administrada cada dos semanas a pacientes con enfermedad de Gaucher tipo I que eran clínicamente estables con imiglucerasa. La seguridad se evaluó mediante la evaluación de los signos vitales y la documentación de los eventos adversos (por tipo, frecuencia y gravedad) en cada visita del estudio, así como mediante la realización de exámenes físicos y cambios en las evaluaciones de laboratorio en las visitas requeridas.

50 Todos los EA se codificaron usando el Diccionario de Codificación MedDRA. Los resúmenes de AEs en general se basaron en todos los AEs que tienen lugar después de la primera infusión al paciente del fármaco del estudio (emergente del tratamiento).

55 **Análisis Secundarios:** los criterios de valoración secundarios de este estudio son: cambio desde el punto de referencia hasta 12 meses en la concentración de hemoglobina; cambio desde el punto de referencia hasta 12 meses en el recuento de plaquetas; cambio desde el punto de referencia hasta 12 meses en volumen de bazo por MRI abdominal (evaluado como % de cambio) (los volúmenes de bazo se normalizaron por el peso corporal); y cambio desde el punto de referencia hasta 12 meses en el volumen del hígado por MRI abdominal (evaluado como % de cambio) (los volúmenes de hígado se normalizaron por el peso corporal).

65 Para cada parámetro de actividad clínica, la hipótesis alternativa es que el cambio medio desde el punto de referencia (es decir, el final del tratamiento con imiglucerasa) hasta el mes 12 estaba dentro de los niveles clínicamente significativos para los parámetros que se iban a evaluar (donde el cambio medio de la población desde el punto de referencia para la hemoglobina está dentro de 1 g/dl, el recuento de plaquetas está dentro del 20% y los

volúmenes de hígado y bazo están dentro del 15%. Esto se evaluó usando un intervalo de confianza del 90% de 2 lados para la diferencia real desde el punto de referencia para estos parámetros clínicos. Por ejemplo, la eficacia de velaglucerasa alfa se concluyó si el intervalo de confianza para el cambio desde el punto de referencia de la hemoglobina estaba dentro del intervalo de -1 a 1 g/dl.

La expectativa del promotor es que la concentración de hemoglobina media era esencialmente constante durante el período de 12 meses. Por ejemplo, en lugar de utilizar un intervalo de confianza del 90% para el análisis de eficacia secundario para la hemoglobina, se podría usar el siguiente par de pruebas de hipótesis estadísticas, cada una a un nivel alfa de 0,05.

$$H_{01}: \mu_d \geq 1 \text{ frente a } H_{11}: \mu_d < 1$$

$$H_{02}: \mu_d \leq -1 \text{ frente a } H_{21}: \mu_d > -1$$

Rechazando la primera hipótesis nula (H_{01}) en favor de la primera hipótesis alternativa (H_{11}), se concluye en el nivel de significancia de 0,05 que el cambio medio del tratamiento desde el punto de referencia para la hemoglobina es menor que 1 g/dl mayor que el valor del punto de referencia. Rechazando la segunda hipótesis nula (H_{02}) en favor de la segunda hipótesis alternativa (H_{21}), se concluye en el nivel de significancia de 0,05 que el cambio medio del tratamiento desde el punto de referencia para la hemoglobina es mayor que 1 g/dl menor que el valor del punto de referencia. Como H_{01} y H_{02} no pueden ser verdad simultáneamente, la tasa de error de Tipo I general es 0,05 para el par de pruebas de hipótesis anteriores. Por lo tanto, rechazando ambas hipótesis nulas en favor de las hipótesis alternativas, se concluye en el nivel de significancia de 0,05 que la concentración de hemoglobina del tratamiento (velaglucerasa alfa) se encuentra dentro del intervalo de -1 a 1 g/dl.

El promotor considera que el método del intervalo de confianza es más fácil de interpretar que el método correspondiente usando pruebas de hipótesis. Por lo tanto, el método del intervalo de confianza se usará para la inferencia secundaria.

Análisis terciarios: los criterios de valoración terciarios para este estudio son: cambio desde el punto de referencia hasta 12 meses en los niveles de quitotriosidasa y CCL18 en plasma; cambio desde el punto de referencia hasta 12 meses en la edad esquelética en pacientes de 2 a 17 años; y cambio desde el punto de referencia hasta 12 meses en la velocidad de crecimiento y estadificación de Tanner.

Los criterios de valoración terciarios se resumieron utilizando estadísticas descriptivas (media, mediana, desviación estándar, mínimo y máximo) en cada punto temporal. Para los criterios de valoración donde se recopilaban los datos en el punto de referencia y en otros puntos temporales durante el estudio, se examinaron los cambios dentro del grupo.

Análisis de subgrupos: se realizaron análisis adicionales específicamente para pacientes entre 2 y 17 años. También, en el análisis se consideró la gravedad de la enfermedad respecto a los valores del punto de referencia de la hemoglobina.

Resultados

Se incluyeron 40 pacientes en el análisis de intención de tratar (ITT) (**Tabla 19**), y 38 pacientes (93%) completaron el estudio. Un paciente lo interrumpió antes de recibir el fármaco del estudio; y dos pacientes en el grupo de 15 U/kg lo interrumpieron, uno debido a una reacción anafilactoide durante su primera infusión con velaglucerasa alfa, y uno en la semana 31 debido a una aparente falta de mejora en los síntomas relacionados con Gaucher.

Los pacientes recibieron velaglucerasa alfa en el mismo número de unidades que su régimen previo de imiglucerasa. El uso de imiglucerasa anterior mediano fue de 67 meses (intervalo 22-192 meses). Las dosis de Velaglucerasa alfa se agruparon en cuatro intervalos: $\leq 22,5$ U/kg ($n=14$), 22,5-37,5 U/kg ($n=12$), 37,5-52,5 U/kg ($n=7$) y $> 52,5$ U/kg ($n=7$). Los investigadores tenían la opción de aumentar la dosis de velaglucerasa alfa (hasta un máximo de 60 U/kg cada dos semanas) si un paciente demostraba un cambio clínicamente significativo en los recuentos de hemoglobina o plaquetas. No se realizaron ajustes de dosis durante el estudio.

Tabla 19 TKT034 Características del paciente al inicio del estudio

		Población ITT (n=40)
5	Edad, media (intervalo)	36 años (9-71 años); 25% <18 años
	Género, n (%)	18 (45%) hombres/22 (55%) mujeres
10	Parámetros clínicos, mediana (intervalo)	
	Hemoglobina	13.8 g/dl (10.4-16.5 g/dl)
	Recuento de plaquetas	162 x 10 ⁹ /l (29-399 x 10 ⁹ /l)
15	Volumen del hígado*	0.8 MN (0.6-1.6 MN)
	Volumen del bazo**	2.5 MN (1.0-16.0 MN)
20	Biomarcadores, mediana	
	Quitotriosidasa	3071,3 nmol/ml/h
	quimioquina de ligando 18 motivo C-C (CCL18)	325.0 ng/ml
25	Uso anterior de imiglucerasa, mediana (intervalo)	67 meses (22-192 meses)
30	Anticuerpo anti-imiglucerasa positivo antes de recibir velaglucerasa alfa, n (%)	3 (8%)
* Un volumen del hígado normal es el 2,5% del peso corporal. ** En 36 pacientes con bazo intacto; cuatro pacientes se habían sometido a una esplenectomía antes de la inscripción. Un volumen normal del bazo es del 0,2% del peso corporal. MN=múltiplos del normal.		

Los parámetros clínicos se mantuvieron a niveles terapéuticos durante 1 año (**Tabla 20**) .

Tabla 20

	n	Mediana del punto de referencia	Cambio medio o % de cambio desde el inicio hasta el mes 12	IC 90%	Puntos de corte clínicamente significativos
40	40	10.8	-0.1	-0.3,0.1	-1, 1
45	40	162	7.0%	0.5%, 13.5%	-20%, 20%
50	40	1.9	0.0%	-2.6%, 2.6%	-15%, 15%
55	36	0.5	-5.6%	-10.8%, -0.4%	-15%, 15%

La Velaglucerasa alfa fue generalmente bien tolerada, con la mayoría de los eventos adversos (AEs) de gravedad leve o moderada (**Tabla 21**.) Los AEs más frecuentemente informados fueron nasofaringitis (8/40 pacientes), artralgia (9/40 pacientes) y cefalea (12/40 pacientes). En general, 11 de los 40 pacientes (28%) experimentaron un AE considerado como posible o probablemente relacionado con el fármaco del estudio; la mayoría de estos eventos se consideraron relacionados con la infusión. Ningún paciente experimentó un AE peligroso para la vida. Se consideró que un evento adverso grave se relacionó con el tratamiento y tuvo lugar en un paciente que tuvo una reacción de hipersensibilidad grave. Este paciente dio negativo para los 4 isotipos (IgE, IgM, IgG, IgA), incluyendo anticuerpos neutralizantes, tanto en el momento de la infusión como 2 semanas después. Un paciente (en el grupo de 15 U/kg) experimentó una reacción anafilactoide que llevó a la interrupción; ningún otro paciente la interrumpió debido a AEs. Ningún paciente desarrolló anticuerpos IgG para velaglucerasa alfa, incluyendo tres pacientes que dieron positivo para anticuerpos anti-imiglucerasa alfa en la selección.

Tabla 21 Resumen de seguridad de TKT034

	Pacientes, n (%)				
	Total (n-40)	15 U/kg (n=15)	30 U/kg (n=12)	45 U/kg (n=6)	60 U/kg (n=7)
Experimentado ≥1 AE emergente del tratamiento *	34 (85)	12 (80)	11 (92)	5 (83)	6 (86)
Experimentado ≥1 AE relacionado con el fármaco	11 (28)	6 (40)	3 (25)	1 (17)	1 (14)
Experimentado ≥1 AE relacionado con la infusión †	9 (23)	6 (40)	2 (17)	0	1 (14)
Experimentado ≥1 AE grave	5 (13)	0	2 (17)	1 (17)	2 (29)
Experimentado ≥1 AE peligroso para la vida	0	0	0	0	0
Experimentado ≥1 AE serio	4 (10)	1 (7)	1 (8)	2 (33)	0
Interrumpido debido a un AE	1 (3)	1 (7)	0	0	0
Muertes	0	0	0	0	0
Desarrollados anticuerpos anti-velaglucerasa alfa	0	0	0	0	0
* Un AE emergente del tratamiento se definió como AEs que tenían lugar en o después del día de la primera infusión hasta 30 días después de la última infusión del paciente.					
† Un AE relacionado con la infusión se definió como un AE que 1) comenzó durante o en las 12 horas posteriores al comienzo de la infusión, y 2) se consideró como posible o probablemente relacionado con el fármaco del estudio.					

Las tres primeras infusiones para cada paciente se administraron en el sitio clínico, después de lo cual los pacientes que no habían experimentado un AE serio relacionado con el fármaco o un AE relacionado con la infusión fueron elegibles para recibir infusiones posteriores domiciliarias. Durante el estudio, 25 (63%) de los 40 pacientes elegibles recibieron terapia domiciliar por lo menos una vez, diez pacientes (67%) en el grupo de 15 U/kg, seis (50%) en el grupo de 30 U/kg, cinco (83 %) en el grupo de 45 U/kg y cuatro (57%) en el grupo de 60 U/kg.

Para la concentración de hemoglobina, el cambio medio desde el punto de referencia fue de -0.1 g/dl, con un intervalo de confianza del 90% de -0,3 para 0,1 g/dl, dentro del criterio de eficacia predefinido de ± 1 g/dl. Para los recuentos de plaquetas, el porcentaje de cambio desde el punto de referencia fue + 7,0%, con un intervalo de confianza del 90% de 0,5 para 13,5%, dentro del criterio de eficacia predefinido de $\pm 20\%$. Para el volumen del hígado, el cambio porcentual desde el punto de referencia fue de -0,0%, con un intervalo de confianza del 90% de -2,6 para 2,6% dentro del criterio de eficacia predefinido de $\pm 15\%$. Para el volumen del bazo, el porcentaje de cambio desde el punto de referencia fue -5,6%, con un intervalo de confianza del 90% de -10,8 para -0,4% dentro del criterio de eficacia predefinido de $\pm 15\%$. La concentración de hemoglobina, los recuentos de plaquetas y el volumen de hígado y bazo se mantuvieron a niveles terapéuticos durante 1 año de tratamiento con velaglucerasa alfa, como lo demuestran los criterios de eficacia pre-especificados para un cambio clínicamente significativo. El cambio medio en la hemoglobina y el cambio porcentual medio en el recuento de plaquetas y los volúmenes de órganos se muestran en las **FIGS. 15-18**. Para cada parámetro, se observaron resultados similares en los cuatro grupos de dosis.

El porcentaje de cambio en quitotriosidasa en plasma y CCL18 en plasma se muestran en las **FIGS. 19 y 20**. Los niveles de ambos biomarcadores se mantuvieron y posiblemente se redujeron durante el período de tratamiento de 12 meses.

Ejemplo 5: Estudio HGT-GCB-058

Resumen

El HGT-GCB-058 es un estudio de tratamiento multicéntrico, abierto, para observar la seguridad de velaglucerasa alfa en pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1 que habían sido recientemente diagnosticados (tratamiento sin tratamiento previo) o que se transfirieron de imiglucerasa a velaglucerasa alfa. El diseño del estudio fue para pacientes masculinos o femeninos de dos años o más. La velaglucerasa se administró a una dosis de 15-60 U/kg cada dos semanas (EOW) por infusión intravenosa (IV) de 1 hora. Los pacientes recibieron el mismo número de unidades de velaglucerasa alfa que su dosis anterior de imiglucerasa (pacientes que recibieron <15 U/kg imiglucerasa EOW recibieron 15 U/kg de velaglucerasa alfa). La velocidad de infusión fue de un máximo de 1 U/kg/minuto.

Pacientes y Métodos

El HGT-GCB-058 se inició para proporcionar una opción de tratamiento alternativo para pacientes que de otro modo tendrían acceso limitado o ninguno a imiglucerasa debido a limitaciones de suministro. El criterio de valoración principal fue observar la seguridad de la velaglucerasa alfa.

Para el HGT-GCB-058, en los 3 meses desde el primer sitio iniciado, 20 sitios clínicos en todo US estaban inscribiendo pacientes. Entre el 1 de septiembre de 2009 y el 31 de enero de 2010, más de 150 pacientes se inscribieron en el HGT-GCB-058 y recibieron por lo menos una infusión de velaglucerasa alfa. Solo 3 pacientes fueron sin tratamiento previo; todos los demás habían sido tratados anteriormente con imiglucerasa.

Resultados preliminares de seguridad

Interrumpido: <10%; Retirada del consentimiento y otros (<10%); Experiencia de AE que incluye SAE (<2%).

Eventos adversos emergentes del tratamiento (TE-AE):

Pacientes sin tratamiento previo (n=3): sin AEs graves; sin AEs severos; dos pacientes experimentaron AEs moderados: dolor de cabeza (moderado) y dolor de espalda (moderado) (relacionado - posiblemente relacionado con la infusión)

Tratados previamente con imiglucerasa (n> 50): 35,8% por lo menos un TE-AE; 18,2% por lo menos un TE-AE posible/probablemente relacionado; 13,8% por lo menos una reacción relacionada con la infusión; <1% - AE serio (una mujer de 69 años de edad que sufrió un accidente cerebrovascular grave que requirió hospitalización) no relacionado; 3,1% - por lo menos un EA grave: artralgia (no relacionada), fatiga (probablemente relacionada), dolor óseo (no relacionado), dolor en extremidad (no relacionado), leucopenia (posiblemente relacionada), accidente cerebrovascular (no relacionado).

Ejemplo 6: Estudio Comparativo

El objetivo de este ejemplo es comparar la eficacia de Ceredase®, Cerezyme®, velaglucerasa alfa, Genz-112638 y Zavesca® en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher tipo 1. La concentración de hemoglobina, el recuento de plaquetas, el volumen del hígado y los volúmenes del bazo se midieron después de 6, 9 o 12 meses de tratamiento.

Dosis: terapia de reemplazo de enzimas (ERT): 60 U/kg EOW; Genz112638: 50 y 100 mg BID; Zavesca: 100 mg TID

Proporción de Hombres a Mujeres: Cerezyme (8 a 7); Ceredase (3 a 2); estudio de Velaglucerasa PhI/II TKT025 (5 a 7); estudio de velaglucerasa-TKT032 dosis de 45U/kg (8 a 5); estudio de velaglucerasa-TKT032 dosis de 60U/kg (7 a 5); Zavesca (1 a 1); Genz-112638 (3 a 4)

Criterios de inclusión:

Cerezyme y Ceredase: anemia y esplenomegalia
Velaglucerasa TKT025: anemia y trombocitopenia
Genz-112638: anemia, trombo y esplenomegalia
Dosis de Zavesca: organomegalia y <100/nl PI o <11,5 Hb

Velaglucerasa HGT-GCB-039 y TKT032: anemia y 1 otra manifestación de parámetros

La comparación del punto de referencia en pacientes sin tratamiento previo se muestra en la **Tabla 22**.

Tabla 22

	Hemoglobina (g/dl)	Plaquetas (células/nl)	Volumen del Hígado MN (l)	Volumen del Bazo MN (l)
Ceredase®	10.8	71	1.83	24
Cerezyme®	10.7	72	1.65	19
Velaglucerasa (Ph I/II TKT025)	11.6	57	1.95 (2.4l)	19 (2.1L)
Velaglucerasa (TKT032-dosis de 45U/kg)	10.9	58	3.50 (% del peso corporal)	2.90 (% de peso corporal)
Velaglucerasa (TKT032) dosis de 60 U/kg	10.83	66	3.60 (% de peso corporal)	2.90 (% de peso corporal)
Genz-112638	11	70	1.7	19
Zavesca®	11.9	77	(2,4 litros)	(1.6l)
MN=Múltiplo del Normal				

Los resultados comparativos de los pacientes tratados con Ceredase®, Cerezyme®, velaglucerasa alfa o Genz-112638 durante seis meses se muestran en la **Tabla 23**.

Tabla 23

	Reducción del volumen del bazo media (%)	Reducción del volumen del hígado media (%)	Aumento de plaquetas medio (%) [real]	Aumento de hemoglobina medio (g/dl)
Ceredase®¹ 6mo	32.1 ± 8.8	11.4 ± 9.4	34 [16/nl]	1.60
Cerezyme®¹ 6mo	37.3 ± 13.6	13.4 ± 13.1	22 [23/nl]	1.82
velaglucerasa² 6mo (n=11)	41.3 ± 9.8	14.7 ± 12.0	38 [23.4 ± 24.6/nl]	1.92 ± 0.82
Genz-112638³ 6mo (n=17-21)	27	7	18 [12.5/nl ⁴]	0.9
¹ Datos de Cerezyme y Ceredase según lo informado por Grabowski et al. (1995) Ann. Intern. Med.122, 33-39 . -El aumento medio en el recuento de plaquetas en células/nl para Cerezyme y Ceredase son de Cerezyme SBA. ² Resultados de la Fase I/II de velaglucerasa alfa ³ Oppenheimer Analyst Report: 8 de mayo de 2008 de Genzyme Analyst Day 2008 ⁴ Calculado multiplicando el punto de referencia por el cambio porcentual ERT administrado a 60 U/kg EOW, Genz11263 administrado a 50 y 100 mg BID				

Los resultados comparativos de los pacientes tratados con Ceredase®, Cerezyme®, velaglucerasa alfa o Genz-112638 durante nueve y doce meses se muestran en la **Tabla 24**.

Tabla 24

	Reducción del volumen del bazo media (%)	Reducción del volumen del hígado media (%)	Aumento de plaquetas medio (%) [real]	Aumento de hemoglobina medio (g/dl)
Ceredase¹ 9mo (n=15)	42.2 ± 6.9	16.4 ± 8.4	53.2	2.28
			[25.1/nl]	
Cerezyme¹ 9mo (n=15)	47.1 ± 13.7	21.4 ± 10.8	43.5 [30.9/nl]	2.54
velaglucerasa² 9mo (n=11)	49.5 ± 12.6	18.2 ± 8.2	67.6 [40.6 ± 30.7/nl]	2.24 ± 0.89
Velaglucerasa³ 1 año (n=10)	no disponible	no disponible	95.3 ± 21.2 [54.9 ± 11.1]	2.35 ± 0.3
Velaglucerasa⁴ 1 año (n=12)	50.4 ± 5.3	17.0 ± 4.5	65.9 ± 16.9 [50.88 ± 12.2]	2.43 ± 0.3
Velaglucerasa⁵ 1 año (n=10)			40.92	2.44
Genz-1126383⁵ 1 año (n=11-13)	40	17	40 [26/nl4]	1.6
1 Datos de Cerezyme y Ceredase 9-Mo según lo informado por Grabowski et al. (1995) Ann. Intern. Med.122, 33-39 . La dosis era de 60 U/kg cada dos semanas (EOW). -Aumento medio en el recuento de plaquetas en células/nl calculado a partir de datos brutos 2 velaglucerasa alfa 9-Mo datos de TKT025 (Ph I/II) - dosis de 60U/kg EOW 3 velaglucerasa alfa 12-Mo datos de Extensión de TKT025 - dosis de 60U/kg EOW 4 velaglucerasa alfa 12 Mo datos de TKT032 - dosis de 60U/kg EOW 5 velaglucerasa afa 12 Mos datos de TKT032 - dosis de 45U/kgs EOW 3 presentación de encuentro WORLD, 20 de febrero de 2009 - administrados a 50 y 100 mg BID				

Conclusiones: este estudio muestra que la velaglucerasa alfa fue por lo menos tan efectiva como Ceredase®, Cerezyme®, Genz-112638 y Zavesca® en el tratamiento de la enfermedad de Gaucher tipo 1 en base a la medición de la concentración de hemoglobina, recuento de plaquetas, volumen del hígado y volumen del bazo , 6, 9 o 12 meses después de iniciado el tratamiento.

Ejemplo 7: Ensayos de Anticuerpo Anti-Fármaco (ADA)

Resumen

El desarrollo de anticuerpos para proteínas terapéuticas puede afectar la seguridad del paciente, la eficacia y las farmacocinéticas del fármaco. Se desarrolló y validó un panel de anticuerpos anti-fármaco (ADA) y anticuerpos neutralizantes (NAb) para evaluar y comparar la respuesta de anticuerpos en pacientes que recibían velaglucerasa alfa o imiglucerasa en uno de los tres estudios de Fase III de velaglucerasa alfa.

La evaluación de la inmunogenicidad potencial de una terapia biológica como la terapia de reemplazo de enzimas (ERT) se realizó mediante los siguientes pasos:

1. Selección de anticuerpos para la ERT

- Permitir falsos positivos
- Amplia especificidad para todos los isotipos
- Tolerante a la presencia de fármacos

2. Paso confirmatorio

- Descartar falsos positivos
- Isotipo específico

3. Paso de titulación

- Concentración relativa

4. Prueba para neutralizar anticuerpos

- i. Actividad in vitro
- ii. Captación celular in vitro

Esta evaluación se puede realizar para cualquier ERT.

Un ejemplo de dicha evaluación se muestra en la **FIG. 21**.

Métodos de Inmunoensayo

Los anticuerpos anti-velaglucerasa alfa y anti-imiglucerasa se evaluaron de forma idéntica usando inmunoensayos puente e inmunoensayos indirectos específicos de subclase de inmunoglobulina (Ig), todos basados en una plataforma electroquimioluminiscente, así como en ensayos RIP. El inmunoensayo electroquimioluminiscente puente detectó todas las subclases de inmunoglobulinas y se consideró el ensayo de selección de anticuerpos. Los inmunoensayos electroquimioluminiscentes de subclase Ig eran ensayos confirmatorios para la presencia de anticuerpos IgA, IgM e IgE, mientras que el ensayo RIP confirmó la presencia de anticuerpos IgG. Los ensayos de selección de anticuerpos y los ensayos de IgG eran calibrados, cuantitativos y utilizaban controles positivos de anticuerpos humanos. Los ensayos de IgA, IgM e IgE eran semicuantitativos y utilizaban controles positivos híbridos (humano-oveja).

Todos los inmunoensayos anti-velaglucerasa alfa y anti-imiglucerasa fueron idénticos, incluyendo los criterios de corte positivo, excepto que se usaron o velaglucerasa alfa o imiglucerasa para interrogar a la muestra. Estos ensayos tienen un alto rendimiento, proporcionan un área de superficie aumentada para la detección, permiten el uso de una alta concentración de muestra de suero con una unión no específica mínima y detectan todas las subclases de anticuerpos.

Ensayos de selección de anticuerpos

Como se muestra en la **FIG. 22**, la selección de anticuerpos anti-fármacos puede realizarse usando un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECL).

Los anticuerpos anti-velaglucerasa alfa (anti-imiglucerasa) se detectaron usando velaglucerasa alfa (o imiglucerasa) conjugada con biotina inmovilizada en placas de micropocillos recubiertas con estreptavidina. Los anticuerpos anti-velaglucerasa alfa (anti-imiglucerasa) capturados de velaglucerasa alfa (o imiglucerasa) biotinilada inmovilizada presentes en los sueros de los pacientes y las proteínas no unidas se eliminaron mediante lavado. Se añadió velaglucerasa alfa (o imiglucerasa) marcada con complejo de rutenio a cada micropocillo lo que dio como resultado la formación de un complejo con los anticuerpos anti-velaglucerasa alfa (anti-imiglucerasa) unidos. Esto fue seguido por un segundo paso de lavado, en el que se eliminaron las proteínas marcadas no unidas.

Las moléculas marcadas que se unen cerca de la superficie del micropocillo emiten luz en un proceso activado por la reacción electroquimioluminiscente, medida por un instrumento MSD SECTOR Imager 2400 (http://www.mesoscale.com/CatalogSystemWeb/WebRoot/products/imager_2400.aspx). Se usó un anticuerpo monoclonal de ratón con reactividad cruzada para velaglucerasa alfa e imiglucerasa como un calibrador dentro de cada placa de ensayo y se usó un anticuerpo anti-imiglucerasa humano con reactividad cruzada con velaglucerasa alfa como control de ensayo positivo. La concentración de anticuerpos anti-velaglucerasa alfa (anti-imiglucerasa) en las muestras de prueba se estimó mediante interpolación de la señal electroquimioluminiscente medida desconocida en la curva de calibración.

Se analizaron un mínimo de 67 puntos de referencia de pacientes con Gaucher para establecer los puntos de corte positivos de anticuerpos para estos ensayos. El diseño de la prueba incluyó por lo menos tres analistas que probaron muestras replicadas usando diferentes números de lote de placas durante un período de por lo menos 14 días. Se usaron por lo menos tres lotes diferentes de placas de micropocillos. Se usaron dos instrumentos MSD disponibles aleatoriamente para un total de 1269 determinaciones para cada ensayo. El punto de corte del ensayo para anticuerpos anti-velaglucerasa alfa (anti-imiglucerasa) se estableció como la media más 1,645 de desviación estándar de los valores electroquimioluminiscentes obtenidos como se recomienda en Mire-Sluis, AR et al. Journal of Immunological Methods 289 (2004), pp 1-16. La sensibilidad del ensayo se estimó en 33,4 y 65,6 ng/ml para los anticuerpos anti-velaglucerasa alfa y anti-imiglucerasa, respectivamente.

Las características de selección para este ensayo (usando velaglucerasa como fármaco) se muestran en la **Tabla 25**.

La especificación para cada parámetro muestra ensayos de selección de ADA altamente sensibles y reproducibles que se validaron para evaluar la respuesta de anticuerpos en pacientes que reciben velaglucerasa alfa o imiglucerasa.

Tabla 25

Parámetro	Especificación
Imprecisión, % RSD	
Intra ensayo	<6.2
Inter ensayo	≤8.5
Precisión, %	93.5 -107.7
Sensibilidad, 1 ng/ml	100
LOD, 2 ng/ml	5
LOQ, ng/ml	15
Controles positivos	ADA humano y de oveja
Calibrador	ADA monoclonal de ratón
ADA=anticuerpo antifármaco; LOD=límites de detección; LOQ=límite de cuantificación; RSD=desviación estándar relativa	

La curva de respuesta a la dosis del ensayo de selección para velaglucerasa se muestra en la **FIG. 23**.

Un ejemplo de las cinéticas de afinidad y unión de una ADA monoclonal en la plataforma BIAcore® se muestra en la **Tabla 26**. Se observaron cinéticas afinidad de ligando y de unión similares para el calibrador de ensayo de ADA.

Tabla 26

Ligando	ka (1/ms)	kd (1/s)	KD (M)
velaglucerasa alfa	9.2E + 05	2.7E-04	3.0E-10
imiglucerasa	2.8E + 06	1.0E-04	3.7E-10
Velaglucerasa alfa biotinilada	4.0E + 05	2.2E-04	5.4E-10
Imiglucerasa biotinilada	2.0E + 06	9.5E-04	4.8E-10

Ensayo de radioinmunoprecipitación

Si se detecta anticuerpo anti-fármaco en una muestra, pueden realizarse ensayos confirmatorios para determinar el isotipo Ig del anticuerpo. Los anticuerpos de inmunoglobulina G (IgG) se detectaron usando radioinmunoprecipitación. Un ensayo de radioinmunoprecipitación (RIP) se muestra en la **FIG. 24**.

En el ensayo de radioinmunoprecipitación, los anticuerpos IgG anti-velaglucerasa alfa (anti-imiglucerasa) presentes en el suero del paciente se unieron a ¹²⁵I-velaglucerasa alfa (o imiglucerasa) en fase de solución y formaron complejos antígeno/anticuerpo que se capturaron usando mini-columnas de Proteína G. Las mini-columnas se lavaron para eliminar el marcador libre y se cuantificaron directamente en un contador gamma. Los recuentos radiactivos retenidos en la mini-columna fueron proporcionales a la concentración de anticuerpos IgG anti-velaglucerasa alfa (anti-imiglucerasa) en la muestra de prueba. La concentración de anticuerpos IgG anti-velaglucerasa alfa (anti-imiglucerasa) en las muestras de prueba se estimó a partir de una curva de calibración usando el mismo calibrador de anticuerpo monoclonal tratado con anterioridad. El mismo control positivo de anticuerpos humanos descrito anteriormente se usó en este ensayo.

La línea de mínimos cuadrados ajustada a la curva de calibración basada en anticuerpos monoclonales de alta pureza, usando concentraciones conocidas bien caracterizadas de anticuerpos, proporcionó un método fiable y consistente para calcular la incertidumbre en las determinaciones del ensayo. Esta herramienta permite la normalización del punto de corte para cambios entre ensayos en recuentos que pueden producirse por decaimiento de radiomarcado de reactivos, radioautólisis y/o variabilidad de manejo del ensayo además de permitir cambios en la unión no específica y cambios en las lecturas del ensayo que pueden tener lugar durante el tiempo.

Se analizaron un total de 59 puntos de referencia de pacientes con Gaucher para establecer el punto de corte positivo de anticuerpos para este ensayo. Los puntos de corte del ensayo para IgG de anti-velaglucerasa alfa (imiglucerasa) se establecieron como se ha descrito anteriormente y se recomendaron en Mire-Sluis et al². La sensibilidad del ensayo se estimó en 28,3 y 64,5 ng/ml para los ensayos de IgG de anti-velaglucerasa alfa e IgG de anti-imiglucerasa, respectivamente.

Un ejemplo de los resultados obtenidos con dicho ensayo usando velaglucerasa como el fármaco se muestra en la **Tabla 27**.

Se validaron ensayos confirmatorios de ADA IgG altamente sensibles y reproducibles para evaluar la respuesta de anticuerpos en pacientes que recibían velaglucerasa alfa o imiglucerasa.

Tabla 27

Parámetro	Especificación
Imprecisión, % RSD	
Intra ensayo	≤8.7
Inter ensayo	≤12.0
Exactitud, %	90.5 -132.8
Sensibilidad, 1 ng/ml	80
LOD, 2 ng/ml	4
LOQ, ng/ml	13
Controles positivos	ADA humano y de oveja
Calibrador	ADA monoclonal de ratón
ADA=anticuerpo anti-fármacos; LOD=límite de detección; LOQ=límite de cuantificación; RSD=desviación estándar relativa	

Un ejemplo de una curva de respuesta a la dosis obtenida para un ensayo de RIP usando velaglucerasa se muestra en la **FIG. 25**.

Inmunoensayos electroquimioluminiscentes indirectos

En paralelo a la selección de anticuerpos IgG, se realizan ensayos para detectar la presencia de anticuerpos IgE. Los ensayos también pueden realizarse para detectar la presencia de anticuerpos IgA e IgM.

Los ADA IgA, IgM e IgE se detectaron usando ensayos ECL. Un ejemplo de dicho ensayo se muestra en la **FIG. 26**.

Los anticuerpos anti-velaglucerasa alfa (imiglucerasa) se analizaron para su subclase Ig usando inmunoensayos electroquimioluminiscentes indirectos. Los anticuerpos se detectaron en suero inmovilizando velaglucerasa (imiglucerasa) alfa biotinilada en placas de micropocillos recubiertas con estreptavidina. Se añadieron muestras de suero diluidas a la velaglucerasa alfa (imiglucerasa) inmovilizada, que capturaron cualquier anticuerpo anti-velaglucerasa alfa (anti-imiglucerasa) presente en la muestra. Después de la incubación de la muestra, los micropocillos se lavaron para eliminar las proteínas no unidas. Luego, se añadieron los anticuerpos secundarios antihumanos marcados con complejo de rutenio contra IgA, IgM o IgE por separado y se incubaron adicionalmente dando como resultado la formación de un complejo específico de clase Ig con cualquier anticuerpo anti-velaglucerasa alfa o imiglucerasa unido. Esto fue seguido por otro paso de lavado, en el que se eliminó el anticuerpo secundario marcado no unido. Las moléculas marcadas unidas cerca de la superficie del micropocillo luego emiten luz como se ha descrito anteriormente.

Se prepararon controles positivos de anticuerpos artificiales para estos ensayos ya que los anticuerpos IgA, IgM, o IgE de anti-velaglucerasa alfa (anti-imiglucerasa) no estaban disponibles. Se sintetizaron híbridos de anticuerpos IgA, IgM e IgE humanos mediante reticulación química de fragmentos de IgA, IgM o IgE humanos, no específicos, purificados para un anticuerpo producido en ovejas hiperinmunizadas con velaglucerasa alfa y reactividad cruzada con imiglucerasa. Los híbridos de anticuerpos IgA, IgM e IgE se unieron por lo tanto a la velaglucerasa alfa (o imiglucerasa) a través del dominio de anticuerpos de oveja, y se detectaron usando anticuerpos secundarios antihumanos marcados con complejo de rutenio contra los dominios IgA, IgM o IgE humanos, respectivamente.

Los puntos de corte del ensayo para IgA, IgM e IgE de anti-velaglucerasa alfa (imiglucerasa) se establecieron como se ha descrito con anterioridad y se recomendaban en Mire-Sluis et al². La sensibilidad del ensayo se estimó en 10,6 y 11,0 ng/ml para los ensayos de IgE de anti-velaglucerasa alfa e IgE de anti-imiglucerasa, respectivamente. Para los anticuerpos IgA e IgM de anti-velaglucerasa alfa (imiglucerasa), se tuvieron que cumplir los puntos de corte positivos del ensayo además de una relación mayor o igual a 2,0 de la señal del punto temporal con respecto a la señal del punto de referencia pre-infusión³.

Para estos ensayos, se pueden usar controles positivos híbridos. Por ejemplo:

- se tratan IgG ADA de oveja, e IgA, IgM e IgE humanas para producir proteínas activadas por piridiltiol (ver Gu M. L., Feng S. L., and Glenn J. K. Development of an animal-human antibody complex for use as a control in ELISA. J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 32 (2003), 523-529)
- Las IgA, IgM e IgE activadas se reducen y desalan
- La IgG activada se mezcla con IgA, IgM o IgE reducidas
- Los anticuerpos híbridos formados se caracterizaron por cromatografía de exclusión por tamaño y ECL ELISA
- Se obtuvieron proporciones molares humano/oveja de 5 para IgA e IgM, y 2 para IgE

Un ejemplo de las características del ensayo confirmatorias de IgA, IgM e IgE (cuando se usó velaglucerasa como fármaco) se muestran en la **Tabla 28**.

Los ensayos de isotipado de ADA IgA, IgM e IgE altamente sensibles y reproducibles se validaron para evaluar la respuesta de anticuerpos en pacientes que recibían velaglucerasa alfa o imiglucerasa.

Tabla 28

Parámetro ⁴	Especificación del ensayo de IgA	Especificación de ensayo de IgM	Especificación de ensayo de IgE
Imprecisión, % RSD			
Intra ensayo	≤3.1	≤6.2	≤6.6
Inter ensayo	≤4.8	≤3.7	≤13.3
Especificidad	Fc de cadena α	Fc de cadena μ	Fc de cadena ε
Linealidad, ¹ ng/ml	156 - 2000	156 - 2500	156 - 10000
LOD, ² recuentos de ECL	260	460	240
Controles positivos ³	ADA híbrido	ADA híbrido	ADA híbrido

¹basado en la respuesta de control híbrido; ²punto de corte positivo; la proporción entre el punto temporal y el punto de referencia debe ser ≥2.0; ³ controles híbridos ADA humano/de oveja; ⁴los ensayos de isotipado de ADA IgA, IgM e IgE altamente sensibles y reproducibles se validaron para evaluar la respuesta de anticuerpos en pacientes que recibían velaglucerasa alfa o imiglucerasa
ADA=anticuerpo anti-fármacos; LOD=límite de detección; LOQ=límite de cuantificación; RSD=desviación estándar relativa

Inhibición de anticuerpos de la actividad enzimática *in vitro*

La inhibición de la actividad enzimática *in vitro* por anticuerpos anti-velaglucerasa alfa (imiglucerasa) se probó usando un ensayo que detecta y cuantifica los anticuerpos que inhiben la actividad de velaglucerasa alfa (imiglucerasa). El método se basa en un ensayo de actividad colorimétrica que mide la capacidad de la velaglucerasa alfa (imiglucerasa) para hidrolizar el sustrato sintético 4-nitrofenil-β-D-glucopiranosido a p-nitrofenol y D-glucopiranosido.

Las muestras de suero positivas de anticuerpos anti-velaglucerasa alfa (imiglucerasa) se pre-incubaron con una cantidad fija de velaglucerasa alfa o imiglucerasa, respectivamente, durante 30 minutos a 37° C. Los anticuerpos policlonales de oveja que se sabe inhiben la velaglucerasa alfa y la imiglucerasa en la actividad *in vitro* se utilizaron como controles positivos. Luego se añadió la solución de sustrato de 4-nitrofenil-β-D-glucopiranosido y se incubó con la muestra de suero/mezcla de enzimas durante una hora a 37° C. La reacción enzimática se detuvo mediante la adición de tampón de glicina/carbonato sódico (pH 10,7) y el producto (p-nitrofenol) se midió a la longitud de onda de absorbancia de 405 nm. Una unidad de actividad de velaglucerasa alfa (imiglucerasa) se definió como la cantidad de enzima requerida para hidrolizar un μmol del sustrato 4-nitrofenil-β-D-glucopiranosido en un minuto a 37° C. La actividad enzimática se cuantificó mediante la comparación del p-nitrofenol liberado en las muestras de prueba y los controles del ensayo con una curva de calibración de p-nitrofenol medida en la misma placa de ensayo. Los resultados de las muestras de prueba se expresaron en relación a la actividad de velaglucerasa alfa (imiglucerasa) medida en ausencia de la muestra de suero y se informaron como % de inhibición.

El punto de corte del ensayo se determinó a partir de sueros de donantes humanos sanos individuales (N=52) y pacientes con Gaucher sin tratamiento de terapia de reemplazo enzimática (N=35). El punto de corte para los ensayos de anticuerpos neutralizantes de velaglucerasa alfa e imiglucerasa se definió como la inhibición >20,0% en base a estas 87 muestras. Por lo tanto, se consideró que una muestra de paciente era negativa para anticuerpos

inhibidores si el nivel de inhibición observado era $\leq 20,0\%$ y para ser positivo si la inhibición era $> 20,0\%$.

Ensayo celular in vitro

Se usó un ensayo basado en células in vitro para evaluar los anticuerpos anti-fármacos para determinar si los anticuerpos eran neutralizantes.

La **Tabla 29** muestra la especificación de las características del ensayo para niveles neutralizantes del anticuerpo anti-fármaco (se usó velaglucerasa como el fármaco).

Tabla 29

Parámetro	Especificación
Imprecisión, % RSD	
Intra ensayo	≤ 12.9
Inter ensayo	≤ 6.1
Exactitud, %	86.7 - 92.7
Linealidad, mU/ml	0.3 - 33.3
Punto de corte positivo, ¹ % de inhibición	> 20
LOD, mU/ml	0.3
LOQ, mU/ml	1.0
Controles positivos	ADA humano y de oveja
¹ n= sueros Gaucher no tratados previamente con ERT 104 NHS y 70 LOD=límites de detección; LOQ=límite de cuantificación; RSD=desviación estándar relativa	

Con respecto a anticuerpos neutralizantes en ERT, como ERT para la enfermedad de Gaucher, los puntos a considerar incluyen:

- La captación de células mediada por receptores es crítica para la función in vivo del agente terapéutico
- La interferencia de unión del receptor por ADA puede obstaculizar el tráfico de enzimas
- La inhibición de la captación de células es una herramienta importante para evaluar el ERT exitoso ya que
 - Se asemeja mucho al mecanismo por el cual NAb puede ejercer un efecto in vivo, y
 - NAb podría reducir o eliminar la actividad biológica del agente terapéutico
- Los ensayos basados en células proporcionan el modelo biológico más apropiado para la evaluación de NAb

Las muestras de pacientes sometidos a ERT en pruebas clínicas para la enfermedad de Gaucher se evaluaron para anticuerpos neutralizantes para velaglucerasa o imiglucerasa. Los resultados se muestran en la **Tabla 30**.

Tabla 30

ID del paciente	Tratamiento	Inhibición de la captación de imiglucerasa,% medio				Inhibición de la captación de velaglucerasa alfa,% medio			
		Semana de Visita				Semana de Visita			
		0	13	19	41	0	13	19	41
032-191-0002	velaglucerasa	NS ²				NS			
039-009-0001	imiglucerasa								
039-194-0001	imiglucerasa								
039-194-0002	imiglucerasa								
039-167-0001	imiglucerasa	NT3	38	38	33	NT	4	5	5
034-027-0002	imiglucerasa ¹	NS	NT ³			NS	NT		
034-154-0001	imiglucerasa ¹	5				10			
034-164-0001	imiglucerasa ¹	38				10			
Se observó una marcada inhibición basada en células de la captación de imiglucerasa en dos pacientes positivos para ADA									
La inhibición basada en células de la captación de velaglucerasa alfa fue o insignificante o no se observó en ningún paciente positivo para ADA probado									
¹ previamente recibió tratamiento con imiglucerasa y cambió a velaglucerasa alfa al inicio del ensayo; ² no significativo (menor que el límite de cuantificación); ³ no probado todavía; punto temporal negativo para anticuerpos anti-velaglucerasa alfa									

Ensayo basado en células in vitro I

Objetivos principales: Se llevaron a cabo experimentos para determinar la capacidad de los anticuerpos humanos reactivos con velaglucerasa alfa y/o imiglucerasa para inhibir (bloquear o neutralizar) la captación mediada por CD206 de las enzimas recombinantes por una línea celular humana (HT1080) diseñada para expresar CD206, y comparar a este respecto los anticuerpos anti-fármacos (ADA) producidos en respuesta a la imiglucerasa con los producidos en respuesta a la velaglucerasa alfa. La hipótesis es que hay diferencias antigénicas entre la velaglucerasa alfa y la imiglucerasa; estos epítomos diferenciarán la velaglucerasa alfa de la imiglucerasa con respecto al efecto funcional del ADA sobre la unión celular, la internalización celular y/o el tráfico intracelular del agente terapéutico.

Materiales y equipamiento:

Materiales críticos

1. La línea celular MRC1-18 se deriva de la línea HT1080 y está transfectada de manera estable con CD206 humano (el receptor de manosa de macrófagos; MMR, también denominado MRC1, receptor C de manosa tipo 1). Las células HT1080 (saf) se transfectaron con un vector de expresión que lleva el gen que codifica el MMR (que se aisló de una biblioteca de ADNc de hígado humano) por electroporación y se colocaron en placas inmediatamente en placas de 96 pocillos. Se seleccionaron los clones estables usando medio que contenía 0,4 mg/ml de G418. La expresión de MRC1 se analizó usando tinción FITC anti-MRC1 y análisis por cambio de fluorescencia. La expresión de MMR en MRC1-18 se confirmó mediante tinción superficial con Ab anti-MMR. Además, se ha verificado que MRC1-18 por inmunotinción y citometría de flujo es negativo para la expresión de los receptores Fc (gamma).
2. Velaglucerasa alfa e imiglucerasa conjugada con Alexa FLUOR® 488: la velaglucerasa alfa o imiglucerasa se conjugaron con Alexa FLUOR® 488 usando el kit de marcado de proteínas Alexa FLUOR® 488 siguiendo el protocolo del fabricante (Molecular Probes, N° de catálogo A 10235).
3. Sueros de pacientes ADA positivos para imiglucerasa o velaglucerasa alfa de los ensayos clínicos TKT-032, TKT-034 y HGT-GCB-039 (ver **Tabla 31** para ID de las muestras)
4. Control positivo del ensayo (PC): 250 µg/ml de anticuerpo anti-velaglucerasa alfa de oveja policlonal purificado (G140) en suero humano normal (NHS; BRH127439)
5. Muestras de control negativo: muestras de suero humano de donantes normales sanos (Bioreclamation, N° de catálogo HMSM, BRH127438, BRH127439), o muestras de suero del punto de referencia de pacientes inscritos en el ensayo clínico TKT-032 (N=25).
6. Manano: Sigma N° de Catálogo M7054
7. D-Manosa-6-fosfato: Sigma N° de Catálogo M3655

8. Medio de crecimiento: 50% de CD-CHO (Invitrogen N° de catálogo 10743) y 50% de CD-293 (Invitrogen N° de catálogo 11913) suplementado con 4 mM de L-glutamina (Invitrogen N° de Catálogo 25230) y 0,4 mg/ml de Geneticina (G418, Invitrogen N° de Catálogo 11811-031).

9. tripsina-EDTA al 0,05%: Invitrogen N° de catálogo 25300

10. Tampón de lavado: PBS/0.5% BSA

11. Perlas de configuración y seguimiento de citómetro BD: BD Bioscience N° de catálogo 641319

Lista parcial de equipos

1. Incubadora a 37° C con 5% de CO₂: Forma Scientific Modelo 3033

2. Centrífuga: Thermo Scientific Modelo Sorvall Legend T +

3. Contador de células: Mexcelom Bioscience LLC, modelo Cellometer Auto T 4

4. Citómetro de flujo: BD Bioscience, FACSCanto II

Métodos: Se examinaron adicionalmente sueros de pacientes que eran positivos para anticuerpos anti-fármaco mediante selección de anticuerpos y ensayo confirmatorio por un ensayo de captación celular *in vitro*, utilizando una línea celular HT1080 diseñada para expresar el receptor de manosa de macrófagos humano (MMR). Brevemente, las células MRC1-18 se mantuvieron en medio CD suplementado con 0,5 mg/ml de G418. Para cada ensayo, se añadieron 1,5x10⁵ células/pocillo en medio CD con G418 en una placa de 96 pocillos de fondo plano, y se pre-incubaron con muestras de suero de ensayo diluidas 1:20, suero humano normal diluido 1:20 (NHS) o controles positivos de ensayo (anticuerpo G140, 5 mg/ml de manano) en NHS diluido a 1:20 a 37° C durante 15 minutos. Luego se añadió velaglucerasa alfa o imiglucerasa marcada con Alexa FLUOR® 488 5 nM, y se incubó a 37° C durante 2 horas adicionales. En cada experimento se incluyó una curva de calibración de velaglucerasa alfa o imiglucerasa marcada con Alexa FLUOR® 488 mediante incubación de células MRC1-18 con velaglucerasa alfa o imiglucerasa marcada con Alexa FLUOR® 488 (0-10 nM) en NHS diluido 1:20 a 37° C durante 2h.

Después de una incubación de 2 horas, los medios se eliminaron por centrifugación, las células se trataron con tripsina-EDTA durante 3 minutos para eliminar la velaglucerasa alfa o imiglucerasa unida a la superficie, luego se neutralizaron mediante la adición de un volumen igual de medio con FBS al 10%. Las células se lavaron con PBS/BSA al 0,5% una vez, se resuspendieron en PBS/BSA al 0,5% y se analizaron mediante BD FACS Canto II con el ajuste de instrumento fijado. El instrumento Canto II se configuró con la configuración de Cytometer BD y las perlas de seguimiento antes de cada análisis. Los resultados se analizaron con el software FlowJo y se registró la intensidad de fluorescencia media (MFI) para cada muestra. La MFI ajustada se calculó restando la MFI de la muestra de fondo (células con fármaco 0 nM) de la MFI de cada muestra. La inhibición de la captación de velaglucerasa alfa e imiglucerasa por muestras de pacientes se determinó en relación con una muestra de suero humano normal (NHS) o la muestra del punto de referencia sin tratar del paciente, cuando está disponible. La inhibición porcentual puede calcularse usando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = 1 - (\text{MFI ajustado de la muestra de prueba} / \text{MFI ajustado del punto de referencia del paciente o NHS}) \times 100$$

Resultados:

Desarrollo del ensayo:

Se obtuvieron los siguientes resultados iniciales tras el desarrollo de este ensayo (datos no mostrados):

- La internalización de velaglucerasa alfa e imiglucerasa por la línea celular MRC1-18 es dependiente de la dosis.
- La internalización de velaglucerasa alfa e imiglucerasa por la línea celular MRC1-18 está mediada por el receptor de manosa, ya que la internalización fue inhibida por el manano (5 mg/ml, > 89%), pero no por M6P (5 mM).
- El anticuerpo G140 adicionado en NHS diluido 1:20 (suero humano normal) inhibe la captación de velaglucerasa alfa e imiglucerasa por la línea celular MRC1-18. La inhibición es dependiente de la dosis.
- Doce lotes de NHS analizados a una dilución 1:20 no inhibieron la captación de velaglucerasa alfa por la línea celular MRC1-18.

Variabilidad del ensayo:

Veinticinco muestras de suero de Gaucher no tratadas individuales de un estudio clínico se probaron durante tres días (N=75) para establecer el efecto del punto de referencia sobre la captación de velaglucerasa alfa o imiglucerasa en la línea celular MRC1-18.

El efecto en suero del punto de referencia medio sobre la captación de velaglucerasa alfa es similar al efecto en suero del punto de referencia sobre la captación de imiglucerasa. Sin embargo, la variabilidad, calculada

como CV%, es mucho mayor para la imiglucerasa que para la velaglucerasa alfa (28% frente a 15%) (datos no mostrados).

Resultados de muestras de suero de pacientes positivos para ADA y reproducibilidad del ensayo:

Se probó la inhibición de la captación de velaglucerasa alfa e imiglucerasa por muestras de suero de pacientes que se había determinado anteriormente que tenían anticuerpos contra imiglucerasa o velaglucerasa alfa. Cada muestra de suero se analizó en paralelo por su capacidad para bloquear la captación de imiglucerasa así como la captación de velaglucerasa alfa, independientemente de qué preparación de enzima provocara inicialmente la producción de los anticuerpos. La **Tabla 31** enumera las muestras de suero de pacientes y el tratamiento de proteínas recibido (solo un paciente positivo para anticuerpos, ENU, recibió tratamiento con velaglucerasa alfa).

Tabla 31: muestras de suero de pacientes positivos para ADA

Paciente	Iniciales del paciente	Tratamiento recibido
032-191-0002	ENU	Velaglucerasa alfa
039-009-0001	RW	imiglucerasa
039-194-0001	GAJ	imiglucerasa
039-194-0002	AVL	imiglucerasa
039-167-0001	KM	imiglucerasa
034-027-0002	SB	imiglucerasa
034-154-0001	JMS	imiglucerasa
034-164-0001	MPQ	imiglucerasa

Las muestras de los pacientes ENU, RW, GAJ, AVL y SB no mostraron inhibición de la absorción de o imiglucerasa o velaglucerasa alfa (datos no mostrados). La reproducibilidad de la inhibición de la captación de velaglucerasa alfa e imiglucerasa por muestras de los pacientes JMS, KM, MPQ y SB (como control negativo) se determinó durante tres días en relación con una muestra de suero humano normal o la muestra del punto de referencia sin tratar propia del paciente, cuando estaba disponible (**Tabla 32**).

El paciente KM (039-167-0001) no estaba tratado en el punto de referencia y se trató luego con imiglucerasa en un estudio posterior. Las muestras de las tres visitas mostraron una inhibición significativa de la captación de imiglucerasa (24-52% de inhibición con respecto a su punto de referencia), en relación con la inhibición equivalente de la captación de velaglucerasa alfa (0-15%, que se encuentra dentro del intervalo de variabilidad del ensayo).

Los pacientes SB (034-027-0002), JMS (034-154-0001) y MPQ (034-164-0001) se habían tratado anteriormente con imiglucerasa. El suero del paciente SB no mostró inhibición ni de la captación de imiglucerasa (0%) ni de la captación de velaglucerasa alfa (0%) en relación con una muestra de suero humano normal. La inhibición de captación de imiglucerasa (0 - 14%) por el suero del paciente JMS fue consistente con la inhibición observada de la captación de velaglucerasa alfa (0 - 20%). La inhibición de la captación de imiglucerasa (32 - 45%) por el suero del paciente MPQ fue significativamente mayor que la inhibición equivalente de la captación de velaglucerasa alfa (0 - 15%, que está dentro del intervalo de variabilidad del ensayo).

Estos resultados preliminares sugieren que los anticuerpos neutralizantes presentes en el suero de los pacientes KM y MPQ inhiben la captación de imiglucerasa pero no la captación de velaglucerasa alfa en las células.

Tabla 32: Inhibición de la captación de Imiglucerasa o Velaglucerasa alfa por muestras de pacientes positivas para ADA

Nº de Paciente	Iniciales	Visita	Tratamiento	Inhibición de la captación de imiglucerasa				Inhibición de la captación de Velaglucerasa alfa
				Día 1	Día 2	Día 3	Media	
039-167-0001	KM	Semana 13	sin tratar al inicio del estudio, luego tratado con imiglucerasa	38%	24%	52%	38%	0-8%
		Semana 19		29%	45%	40%	38%	
		Finalización anticipada		28%	38%	33%	33%	
034-027-0002	SB	Visita de punto de referencia	Previamente tratado con imiglucerasa	0%	0%	0%	0%	0-14%
034-154-0001	JMS	Visita de punto de referencia	Previamente tratado con imiglucerasa	14%	0%	2%	5%	0-20%
034-164-0001	MPQ	Visita de punto de referencia	Previamente tratado con imiglucerasa	45%	32%	40%	38%	0-15%

La inhibición de la captación de imiglucerasa o velaglucerasa alfa por el manano inhibidor de manosa y por el anticuerpo anti-velaglucerasa alfa de oveja policlonal G140 (control positivo) también se determinó durante tres días (**Tabla 33**). El manano inhibe la captación tanto de imiglucerasa como de velaglucerasa alfa en células MRC1-18 a través del receptor de manosa. El anticuerpo G140 inhibe la captación tanto de imiglucerasa como de velaglucerasa alfa en células MRC1-18 en una cantidad equivalente.

Tabla 33: Inhibición de la absorción de Imiglucerasa o Velaglucerasa alfa mediante controles positivos

		Inhibición de la captación de imiglucerasa		Inhibición de la captación de Velaglucerasa alfa	
		Media	CV%	Media	CV%
G140	5 µg/ml	52%	37%	42%	14%
G140	10 µg/ml	78%	11%	71%	7%
Manano	5 mg/ml	92%	3%	91%	3%

Conclusiones: la velaglucerasa alfa y la imiglucerasa difieren estructuralmente, con respecto a la secuencia de proteínas (por ejemplo, la mutación R495H en la imiglucerasa) y la estructura de los carbohidratos. Se realizaron experimentos para abordar la hipótesis de que hay diferencias antigénicas entre la velaglucerasa alfa y la imiglucerasa, y que estos epítomos diferencian velaglucerasa alfa de imiglucerasa con respecto a la capacidad de los anticuerpos anti-fármacos (ADA) para bloquear la unión celular y/o la internalización celular de cada agente terapéutico. Los experimentos se realizaron usando la línea celular HT1080 recientemente desarrollada en la que la captación de agentes terapéuticos se facilita principalmente por la MMR, y se confunde mínimamente con otros mecanismos conocidos de captación celular. La inhibición de la captación de imiglucerasa o velaglucerasa alfa por las muestras de suero de pacientes se midió en relación una de la otra. Los datos muestran que de un total de 7 muestras de suero tomadas de pacientes que produjeron ADA en respuesta al tratamiento con imiglucerasa, y 1 muestra de suero tomada de un paciente que produjo ADA en respuesta al tratamiento de velaglucerasa alfa, 2 sueros (2/7=29 %) de pacientes que produjeron ADA en respuesta a imiglucerasa provocaron del 24% al 52% de inhibición de la captación celular de imiglucerasa, pero solo del 0-15% de inhibición de la captación celular de velaglucerasa alfa que se encuentra dentro de la variabilidad del ensayo. En comparación, solo se ha identificado hasta la fecha un paciente que produjo anticuerpos en respuesta al tratamiento con velaglucerasa alfa; este suero no inhibió la captación.

Cada muestra de suero se analizó en paralelo por su capacidad para bloquear la captación de imiglucerasa y/o la captación de velaglucerasa alfa, independientemente de qué preparación de enzima provocara inicialmente la producción de los anticuerpos. Tales comparaciones de la inhibición de captación de velaglucerasa alfa, frente a la inhibición de captación de imiglucerasa, permiten un "mapeo" bruto de epítomos a porciones biológicamente relevantes de cada agente terapéutico (con la salvedad de que los antisueros probados en la presente son policlonales, y por tanto cada antisuero puede contener una mezcla de especificidades de antígeno, tal vez reconociendo múltiples epítomos). Con estas precauciones en mente, la inhibición de la captación observada con antisueros anti-imiglucerasa parece estar restringida a la imiglucerasa ya que los mismos antisueros no inhiben la internalización de la velaglucerasa alfa probada en paralelo. Estos datos sugieren que algunos ADA producidos en

respuesta a la imiglucerasa inhiben la internalización celular a través de epítomos que están excepcionalmente expuestos en imiglucerasa. Además, la diferencia en la variabilidad observada del efecto del suero sobre la captación de imiglucerasa frente a velaglucerasa alfa puede quizás deberse a una mayor homogeneidad en la preparación de velaglucerasa alfa que en la preparación de la imiglucerasa en términos de modificaciones postraduccionales.

La inhibición de la captación enzimática por anticuerpos anti-velaglucerasa alfa (imiglucerasa) se probó usando un ensayo basado en células que detecta y cuantifica los anticuerpos que interfieren con la captación de velaglucerasa alfa (imiglucerasa) mediada por el receptor de manosa de macrófagos (MMR). El método se basa en la cuantificación de velaglucerasa alfa (imiglucerasa marcada fluorescentemente) que se internaliza por células MRC1-18 bajo condiciones definidas. La MRC1-18 es una línea celular diseñada en Shire HGT a partir de células HT1080 que se transfectaron de forma estable con el receptor C de manosa de macrófagos humano, tipo 1.

Brevemente, las muestras de suero positivas para anticuerpos anti-velaglucerasa alfa (imiglucerasa) se preincubaron con células MRC1-18 en medio de cultivo en placas de 96 pocillos de fondo plano a 37° C durante 15 minutos. Se usó suero humano normal (NHS) agrupado como control negativo. Se usaron anticuerpos policlonales de oveja que se sabe inhiben la captación de velaglucerasa alfa e imiglucerasa, así como manano, el ligando específico de MMR (Sung SJ et al., J. Cell Biol. 1983; 96:160-166) como controles positivos para bloquear la captación de enzimas.

Después de la preincubación, se añadió velaglucerasa alfa o imiglucerasa marcada con Alexa Fluor-488, y se incubó a 37°C durante 2 horas adicionales. En cada experimento se incluyó una curva de calibración que consistía en la incubación de enzima marcada con Alexa Fluor-488 con células MRC1-18. Después de la incubación, se eliminó el medio por centrifugación, las células se trataron con tripsina-EDTA durante 3 minutos para eliminar la enzima unida a la superficie, y finalmente el pH de la reacción se devolvió a neutral mediante la adición de un volumen igual de medio de cultivo. Las células se lavaron una vez y se resuspendieron usando solución salina tamponada con fosfato que contenía BSA al 0,5%. Las células se analizaron usando un instrumento Becton Dickinson FACS Canto II calibrado antes de cada análisis utilizando la configuración del citómetro del instrumento y perlas de seguimiento.

Los resultados se analizaron con el software FlowJo del instrumento y se registró la intensidad de fluorescencia media (MFI) para cada muestra. La MFI ajustada se calculó restando la MFI de fondo de los pocillos de muestra que no contenían enzima de cada MFI de muestra desconocida y de control. La inhibición de la captación de enzimas por las muestras de suero del paciente se estimó en relación con el control de NHS de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Inhibición} = [1 - [\text{MFI ajustada de la muestra de prueba} / \text{MFI ajustada de NHS}]] \times 100$$

El punto de corte del ensayo se determinó por análisis de 25 sueros individuales recogidos de pacientes con Gaucher que no habían recibido tratamiento previo. Cada suero se probó en cuatro días separados para un total de 100 valores y el punto de corte positivo se definió como la inhibición mayor que la media de estos valores más 1,645 desviaciones estándar.

Ensayo basado en células in vitro II

Este ensayo se desarrolló para comparar la captación de la velaglucerasa alfa con la de imiglucerasa.

Métodos: para los ensayos de diseño de experimentos (DOE), el diseño factorial general fue asistido por el software Statease DESIGN EXPERT™. EL DOE utilizó macrófagos derivados de células U937 inducidas por acetato de miristato de forbol (PMA), y se llevaron a cabo en presencia de manosa-6-fosfato 5 mM (M6P). Para las comparaciones de internalización, los macrófagos derivados de U937 se incubaron durante 3 horas con GCB a pH 7.5 con calcio 10 mM. El fármaco internalizado se midió mediante un ensayo de actividad con un sustrato sintético (4-MU-glc) que fluoresce tras la escisión.

Resultados: la comparación en células U937 de las velocidades de internalización de velaglucerasa alfa e imiglucerasa mostró que la velaglucerasa alfa se internaliza hasta 2,5 veces más eficazmente que la imiglucerasa. Esta diferenciación en la internalización celular también se observó usando la línea celular murina J774 que expresa MMR. Bajo condiciones de ensayo específicas, la adición de calcio inhibió levemente la captación celular de imiglucerasa, mientras que mejoró la captación de velaglucerasa alfa. La internalización de ambas enzimas podría inhibirse mediante la adición de manano al medio de cultivo, aunque la inhibición de la captación de velaglucerasa alfa por las células J774 fue más completa que la de la imiglucerasa. Los ensayos DOE revelaron que: i) la interacción del calcio con el pH tiene un gran impacto en la captación; y ii) las comparaciones de muestras de bioensayos requirieron la presencia de calcio, consistente con la dependencia de calcio conocida de las MMR. La presencia de manosa-6-fosfato (M6P) en los experimentos DOE aseguró que el receptor de M6P en células U937 no contribuyó a la internalización medida.

Estos datos sugieren que la velaglucerasa alfa se internaliza más eficientemente que la imiglucerasa. Si bien ambas enzimas se internalizan principalmente a través de las MMR, una porción pequeña, mayor para la imiglucerasa que para la velaglucerasa alfa, se internaliza mediante un mecanismo alternativo. Estos datos pueden ser valiosos para diferenciar la velaglucerasa alfa, la imiglucerasa y otras terapias futuras.

Resumen

A partir de estos estudios, un resumen de los métodos de detección de anticuerpos es como sigue:

- Ensayos equivalentes validados para ADA de velaglucerasa alfa e imiglucerasa según las pautas de la ICH y la FDA. Ver, por ejemplo, <http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/UCM128049.pdf> y <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf>

- Selección
- Confirmatorio
- Título
- Isotipo
- Neutralizante
- Especímenes de pacientes enmascarados evaluados para ADA de velaglucerasa alfa e imiglucerasa en paralelo
- Controles y calibradores cubrieron un amplio intervalo de afinidades de anticuerpos
- Se desarrollaron controles híbridos específicos del isotipo cuando no se encontraron sueros positivos humanos

Estado de inmunogenicidad de los pacientes en estudios de fase III:

- TKT032: pacientes aleatorizados a velaglucerasa alfa 60 U/kg o 45 U/kg EOW
 - Un paciente con ADA negativo al inicio del estudio desarrolló NAb en respuesta a velaglucerasa alfa
- TKT034: pacientes anteriormente estables con imiglucerasa cambiados a velaglucerasa alfa 15-60 U/kg
 - Tres pacientes positivos anti-imiglucerasa en el punto de referencia, fueron anti-velaglucerasas negativos durante el tratamiento de 12 meses.
- HGT-GCB-039: pacientes aleatorizados a velaglucerasa alfa 60 U/kg o imiglucerasa 60 U/kg EOW
 - Cuatro pacientes con ADA negativo en el punto de referencia seroconvertidos en respuesta a imiglucerasa
 - De estos, uno desarrolló reactivo NAb contra imiglucerasa y velaglucerasa alfa, mientras que tres desarrollaron reactivo ADA IgG no inhibidor solo frente a imiglucerasa.

El resumen de seroconversión de pacientes se muestra en la **Tabla 34**. De los 99 pacientes que fueron tratados, 82 recibieron velaglucerasa alfa y 17 recibieron imiglucerasa. Uno de los 82 pacientes que recibieron velaglucerasa alfa y cuatro de 17 pacientes que recibieron imiglucerasa desarrollaron anticuerpos durante los ensayos.

Tabla 34

Estudio	Meses	Tratamientos	U/kg EOW	n	Seroconversion
TKT032					
	12 meses	velaglucerasa alfa	60	12	0/12 pacientes
		velaglucerasa alfa	45	13	1/13 pacientes
TKT034					
	12 meses	velaglucerasa alfa	15-60	40	Hasta la fecha: 0 pacientes (3 pacientes positivos para anticuerpos de imiglucerasa en el punto de referencia)
HGT-GCB-039					
	9 meses	velaglucerasa alfa	60	17	0/17 pacientes
		imiglucerasa	60	17	4/17 pacientes

Las implicaciones clínicas de los estudios tratados en este ejemplo son las siguientes:

- Se desarrollaron métodos altamente sensibles y equivalentes, optimizados y validados para evaluar directamente y comparar la respuesta de anticuerpos de pacientes a los tratamientos de velaglucerasa alfa e imiglucerasa
- Los resultados muestran seroconversión en el 1% de los pacientes tratados con velaglucerasa alfa y en el 23% de los pacientes tratados con imiglucerasa, sugiriendo diferencias antigénicas significativas entre la velaglucerasa alfa y la imiglucerasa
- Adicionalmente, hubo una inhibición marcada de la captación celular por ADA de imiglucerasa pero no de velaglucerasa alfa

Ejemplo 8: Efecto del Contenido de Humedad sobre la Estabilidad de un Producto de Velaglucerasa Liofilizado

Propósito: Evaluar el efecto del contenido de humedad en la estabilidad de un producto de velaglucerasa liofilizado.

Métodos: La proteína se formuló en una solución que contenía sacarosa y se liofilizó usando un liofilizador de escala de laboratorio FTS (Lyostar II). Los viales liofilizados se eliminaron a intervalos después del secado primario con un ladrón de muestras para producir muestras con contenido de humedad variable. La estructura secundaria de la proteína liofilizada se examinó mediante FT-IR. La estabilidad térmica de estas muestras se caracterizó por su apariencia física, contenido de humedad, exclusión por tamaño y HPLC de fase inversa, y oxidación por métodos de mapeo de péptidos.

Tras la reconstitución con agua estéril para inyección, el producto de velaglucerasa contiene aproximadamente 2,5 mg/ml (40 U/ml) de velaglucerasa alfa, 50 mg/ml de sacarosa, 12,9 mg/ml de citrato de sodio dihidrato, 1,3 mg/ml de ácido cítrico monohidrato y 0,11 mg/ml de polisorbato 20.

Resultados: se alcanzó un intervalo de contenido de humedad del 1,3% al 6,2% en el producto liofilizado. El colapso de la torta se observó a una temperatura acelerada (40° C) en un producto farmacéutico con un alto contenido de humedad (≥5%). Sin embargo, los resultados de las pruebas de estabilidad química para la solución reconstituida demuestran que las muestras con mayor contenido de humedad (≥3%) mostraron una degradación significativamente menor que las muestras más secas por los métodos SE-HPLC y RP-HPLC, y también mostraron cantidades menores de oxidación. Esta tendencia de estabilidad se correlaciona con los cambios observados en la estructura secundaria por FT-IR del producto seco.

Conclusión: un mayor contenido de humedad dio como resultado una mejor estabilidad química de una proteína liofilizada. Esta tendencia de estabilidad se explica por menos cambios a la estructura secundaria en la fase sólida con mayor contenido de humedad. Una elección del contenido de humedad adecuado en el producto liofilizado necesita equilibrar tanto la estabilidad estructural de la torta como la estabilidad química de la proteína.

Ejemplo 9: Análisis de objetivos terapéuticos para Velaglucerasa alfa

Se han descrito objetivos terapéuticos para monitorizar el logro, el mantenimiento y la continuidad de la

respuesta terapéutica en pacientes con enfermedad de Gaucher tipo 1 que reciben ERT (Pastores Get al., (2004) Seminars in Hematology, 41 (suppl 5): 4-14)

Para evaluar el impacto del tratamiento de velaglucerasa alfa frente a los objetivos terapéuticos para los parámetros clínicos de la enfermedad de Gaucher tipo 1 (anemia, trombocitopenia, hepatomegalia y esplenomegalia), se comparó la proporción de pacientes con objetivo para anemia, trombocitopenia, hepatomegalia y esplenomegalia en el punto de referencia con la proporción que alcanzaba cada uno de estos objetivos a los 9 meses o 1 año.

No se usó imputación de datos. Solo se incluyen los pacientes que tienen datos para cada objetivo en ambos puntos temporales. Para los parámetros hematológicos, el punto de referencia fue la media de los valores de la selección y el punto de referencia; los valores objetivo terapéuticos de 1 año fueron la media de los valores de Semana 51 y Semana 53 para TKT032 y TKT034, y el promedio de los valores de Semana 39 y Semana 41 para HGT-GCB-039. Para los volúmenes de órganos, se aplicó el valor de la Semana 41 a los criterios de objetivos terapéuticos de 1 año en HGT-GCB-039.

Los objetivos terapéuticos para pacientes TKT032, HGT-GCB-039, HGT-GCB-039 con bazo intacto, pacientes esplenectomizados con HGT-GCB-039, TKT034 y TKT025 se describen en las **Tablas 35-40**.

Tabla 35

Objetivos terapéuticos	velaglucerasa alfa 60 U/kg N=12		velaglucerasa alfa 45 U/kg N=13		velaglucerasa alfa en general N=25	
	Punto de referencia	1 Año	Punto de referencia	1 Año	Punto de referencia	1 Año
Concentración de hemoglobina	2/12 (17%)	11/12 (92%)	3/13 (23%)	12/13 (92%)	5/25 (20%)	23/25 (92%)
Recuento de plaquetas	2/11 (18%)	6/11 (55%)	4/13 (31%)	9/13 (69%)	6/24 (25%)	15/24 (63%)
Hígado	5/11 (45%)	11/11 (100%)	7/12 (58%)	8/12 (67%)	12/23 (52%)	19/23 (83%)
Bazo	3/11 (27%)	11/11 (100%)	4/12 (33%)	11/12 (92%)	7/23 (30%)	22/23 (96%)
≥3 objetivos	1/11 (9%)	10/11 (91%)	5/12 (42%)	9/12 (75%)	6/23 (26%)	19/23 (83%)
Los 4 objetivos	1/10 (10%)	6/10 (60%)	0/12 (0%)	7/12 (58%)	1/22 (5%)	13/22 (59%)

Tabla 36

Objetivos terapéuticos	velaglucerasa alfa 60 U/kg N=17		imiglucerasa 60 U/kg N=17	
	Punto de referencia	9 meses	Punto de referencia	9 meses
Concentración de hemoglobina	10/16 (63%)	15/16 (94%)	4/15 (27%)	12/15 (80%)
Recuento de plaquetas	8/16 (50%)	16/16 (100%)	9/15 (60%)	15/15 (100%)
Hígado	8/16 (50%)	15/16 (94%)	4/16 (25%)	16/16 (100%)
Bazo	1/6 (17%)	6/6 (100%)	3/6 (50%)	6/6 (100%)
≥3 objetivos	1/16 (6%)	14/16 (88%)	1/15 (7%)	12/15 (80%)
Los 4 objetivos	0/6 (0%)	6/6 (100%)	0/6 (0%)	6/6 (100%)

Tabla 37

Objetivos terapéuticos	velaglucerasa alfa 60 U/kg N=7		imiglucerasa 60 U/kg N=7	
	Punto de referencia	9 meses	Punto de referencia	9 meses
Concentración de hemoglobina	5/7 (71%)	7/7 (100%)	2/6 (33%)	6/6 (100%)
Recuento de plaquetas	0/7 (0%)	7/7 (100%)	0/6 (0%)	6/6 (100%)
Hígado	6/7 (86%)	7/7 (100%)	1/6 (17%)	6/6 (100%)
Bazo	1/6 (17%)	6/6 (100%)	3/6 (50%)	6/6 (100%)
≥3 objetivos	1/7 (14%)	7/7 (100%)	1/6 (17%)	6/6 (100%)
Los 4 objetivos	0/6 (0%)	6/6 (100%)	0/6 (0%)	6/6 (100%)

Tabla 38

Objetivos terapéuticos	velaglucerasa alfa 60 U/kg N=10		imiglucerasa 60 U/kg N=10	
	Punto de referencia	9 meses	Punto de referencia	9 meses
Concentración de hemoglobina	5/9 (56%)	8/9 (89%)	2/9 (22%)	6/9 (67%)
Recuento de plaquetas	8/9 (89%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)
Hígado	2/9 (22%)	8/9 (89%)	3/10 (30%)	10/10 (100%)
≥2 objetivos	6/9 (67%)	9/9 (100%)	5/9 (56%)	9/9 (100%)
Los 3 objetivos	0/9 (0%)	7/9 (78%)	0/9 (0%)	6/9 (67%)

Tabla 39

Objetivos terapéuticos	velaglucerasa alfa en general N=40	
	Punto de referencia	1 año
Concentración de hemoglobina	37/38 (97%)	37/38 (97%)
Recuento de plaquetas	29/36 (81%)	29/36 (81%)
Hígado	37/37 (100%)	37/37 (100%)
Bazo	30/34 (88%)	31/34 (91%)
≥3 objetivos	32/37 (86%)	33/37 (89%)
Los 4 objetivos	26/32 (81%)	26/32 (81%)

Tabla 40

Objetivos terapéuticos	TKT025 velaglucerasa alfa 60 U/kg N=12		TKT032 velaglucerasa alfa 60 U/kg N=12	
	Punto de referencia	Mes 9	Punto de referencia	Año 1
Concentración de hemoglobina	5/10 (50%)	10/10 (100%)	2/12 (17%)	11/12 (92%)
Recuento de plaquetas	0/10 (0%)	7/10 (70%)	2/11 (18%)	6/11 (55%)
Hígado	5/10 (50%)	7/10 (70%)	5/11 (45%)	11/11 (100%)
Bazo	0/10 (0%)	9/10 (90%)	3/11 (27%)	11/11 (100%)
≥3 objetivos	0/10 (10%)	8/10 (80%)	1/11 (9%)	10/11 (91%)
Los 4 objetivos	0/10 (10%)	5/10 (50%)	1/10 (10%)	6/10 (60%)

Reivindicaciones

1. Un método para identificar un sujeto como adecuado para el tratamiento con una enzima glucocerebrosidasa alternativa, el método comprendiendo:

determinar si un anticuerpo neutralizante para una enzima glucocerebrosidasa está presente en una muestra de un sujeto que está tomando actualmente o ha recibido anteriormente la enzima glucocerebrosidasa para obtener un valor medido del anticuerpo;
comparar el valor medido con un estándar, en donde si el valor medido es mayor que el estándar, se identifica que el sujeto ha dado positivo para la producción de los anticuerpos; y
seleccionar un sujeto para la enzima glucocerebrosidasa alternativa sobre la base de que el sujeto ha dado positivo para la producción de los anticuerpos.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el sujeto ha dado positivo para la producción de anticuerpos IgE, anticuerpos IgM, anticuerpos IgG o anticuerpos IgA para la enzima glucocerebrosidasa que el sujeto está tomando actualmente o ha tomado anteriormente para la enfermedad de Gaucher.

3. El método de la reivindicación 1, que comprende además

a) seleccionar al sujeto sobre la base de que se ha detectado una reacción en el sitio de infusión, opcionalmente en donde la reacción en el sitio de infusión se detecta durante o en las 12 horas de la administración de la enzima glucocerebrosidasa que el sujeto está tomando o ha tomado anteriormente para la enfermedad de Gaucher; o
b) seleccionar el sujeto sobre la base de que el valor medio de uno o más de los parámetros seleccionados del grupo que consiste de concentración de hemoglobina, recuento de plaquetas, volumen del hígado, volumen del bazo y un parámetro esquelético en el sujeto que está tomando actualmente o ha recibido anteriormente la enzima glucocerebrosidasa es menor a la obtenida para una cohorte de sujetos con enfermedad de Gaucher tratados con la enzima glucocerebrosidasa alternativa; opcionalmente, en donde el parámetro esquelético se selecciona de: densidad mineral ósea (BMD), puntuación Z, puntuación T, crecimiento del sujeto, edad esquelética del sujeto, carga de médula ósea (BMB), dolor óseo o necrosis ósea.

4. El método de la reivindicación 1, en el que la enzima glucocerebrosidasa alternativa es velaglucerasa.

5. El método de la reivindicación 1 ó 4, en el que el paso de determinación comprende:

proporcionar glucocerebrosidasa inmovilizada en una superficie;
poner en contacto la muestra con la glucocerebrosidasa inmovilizada bajo condiciones que permitan que el anticuerpo neutralizante en la muestra, si lo hay, se una a la glucocerebrosidasa inmovilizada, formando de este modo una mezcla;
añadir glucocerebrosidasa marcada a la mezcla bajo condiciones que permitan que la glucocerebrosidasa marcada se una al anticuerpo, si lo hay; y detectar el marcador en la mezcla.

6. El método de la reivindicación 1 ó 4, en el que el paso de determinación comprende:

poner en contacto la muestra con la glucocerebrosidasa marcada bajo condiciones que permitan que el anticuerpo neutralizante en la muestra, si lo hay, se una a la glucocerebrosidasa marcada, formando de este modo una mezcla;
aplicar la mezcla a una resina bajo condiciones que permitan que el anticuerpo, si lo hay, se una a la resina; y detectar el marcador en la mezcla.

7. El método de la reivindicación 1 ó 4, en el que el paso de determinación comprende:

proporcionar glucocerebrosidasa inmovilizada en una superficie;
poner en contacto la muestra con la glucocerebrosidasa inmovilizada bajo condiciones que permitan que el anticuerpo neutralizante en la muestra, si lo hay, se una a la glucocerebrosidasa inmovilizada, formando de este modo una mezcla;
añadir un anticuerpo marcado que se une al anticuerpo neutralizante a la mezcla bajo condiciones que permitan que el anticuerpo marcado se una al anticuerpo neutralizante, si lo hay; y
detectar el marcador en la mezcla; o en el que el paso de determinación comprende:

proporcionar una célula que expresa el receptor de manosa de macrófagos humano (MMR);
poner en contacto la muestra con la célula, formando de este modo una mezcla;
poner en contacto la glucocerebrosidasa marcada con la mezcla bajo condiciones que permitan que la glucocerebrosidasa marcada se una al MMR en ausencia del anticuerpo neutralizante;
eliminar la glucocerebrosidasa marcada no unida y la glucocerebrosidasa marcada unida a la superficie

celular; y
medir la cantidad de glucocerebrosidasa marcada en la célula.

8. El método de la reivindicación 1 ó 4, en el que la terapia de reemplazo de la enzima glucocerebrosidasa que el sujeto está tomando o ha tomado anteriormente para la enfermedad de Gaucher es velaglucerasa o en donde la enzima glucocerebrosidasa alternativa es imiglucerasa o uplyso.

9. El método de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo no neutraliza la actividad enzimática de una enzima glucocerebrosidasa alternativa.

10. Una enzima glucocerebrosidasa para su uso en un método de tratamiento de la enfermedad de Gaucher, en donde el método comprende:

identificar un sujeto como adecuado para el tratamiento con una enzima glucocerebrosidasa alternativa de acuerdo con el método de la reivindicación 1; y administrar la enzima glucocerebrosidasa alternativa al sujeto.

11. La enzima glucocerebrosidasa para el uso de la reivindicación 10, en donde la enzima glucocerebrosidasa alternativa se administra a una dosis de 15 a 60 U/kg.

12. La enzima glucocerebrosidasa para el uso de la reivindicación 10, en donde la enzima glucocerebrosidasa alternativa se administra al sujeto mediante infusión intravenosa durante un período de 90 minutos o menos, o en donde la enzima glucocerebrosidasa alternativa se administra al sujeto mediante infusión intravenosa durante un período de tiempo de 60 minutos o menos, y opcionalmente en donde el paso de administración comprende terapia domiciliaria.

13. La enzima glucocerebrosidasa para el uso de la reivindicación 10, en donde la enzima glucocerebrosidasa alternativa se administra en combinación con tartrato de isofagomina, miglustat, Genz112638 o una o más chaperonas farmacológicas, en donde la enzima glucocerebrosidasa alternativa es velaglucerasa.

14. La enzima glucocerebrosidasa para el uso de la reivindicación 10, en donde la enzima glucocerebrosidasa alternativa se administra a una velocidad de 1U/Kg/minuto o 0,5U/Kg/minuto, o en donde la enzima glucocerebrosidasa alternativa se administra cada dos semanas mediante infusión intravenosa, en donde la enzima glucocerebrosidasa alternativa es velaglucerasa.

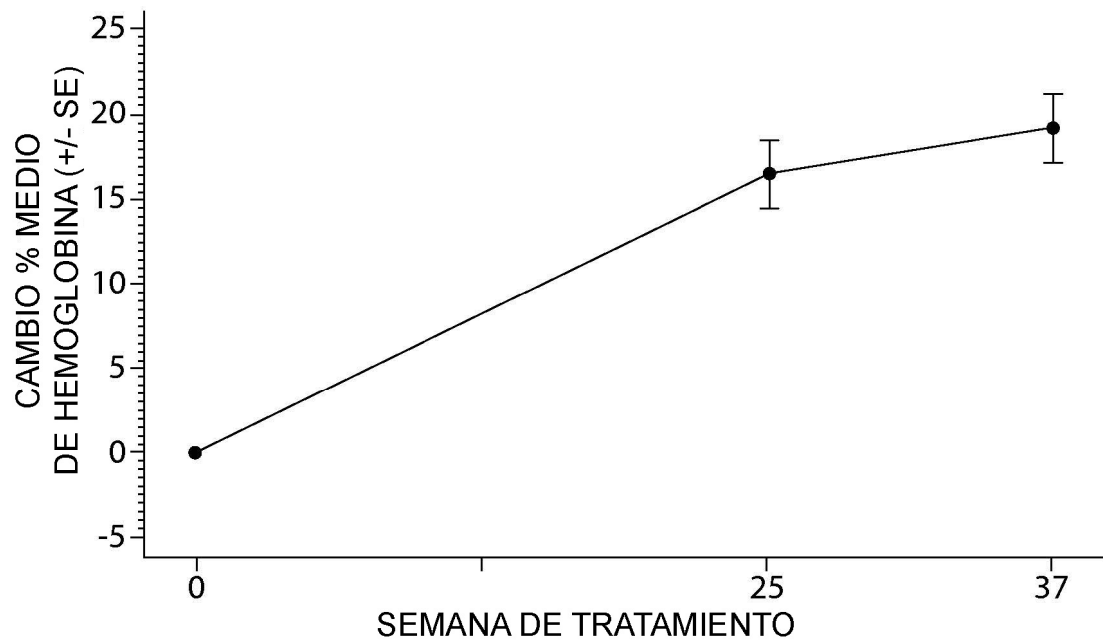


Fig. 1A

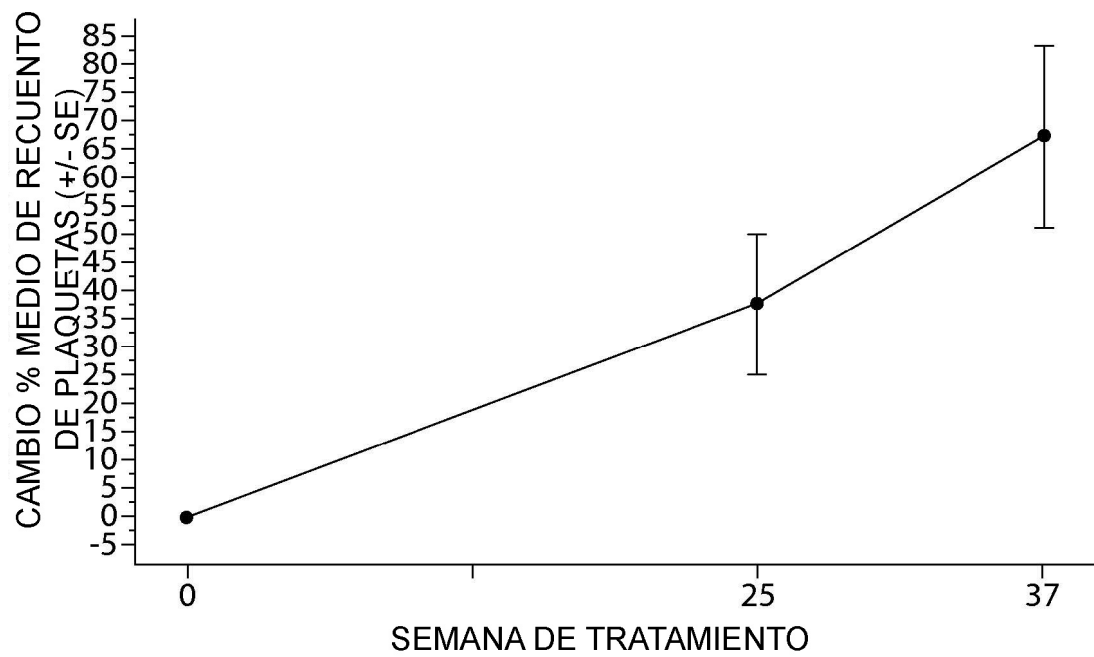


Fig. 1B

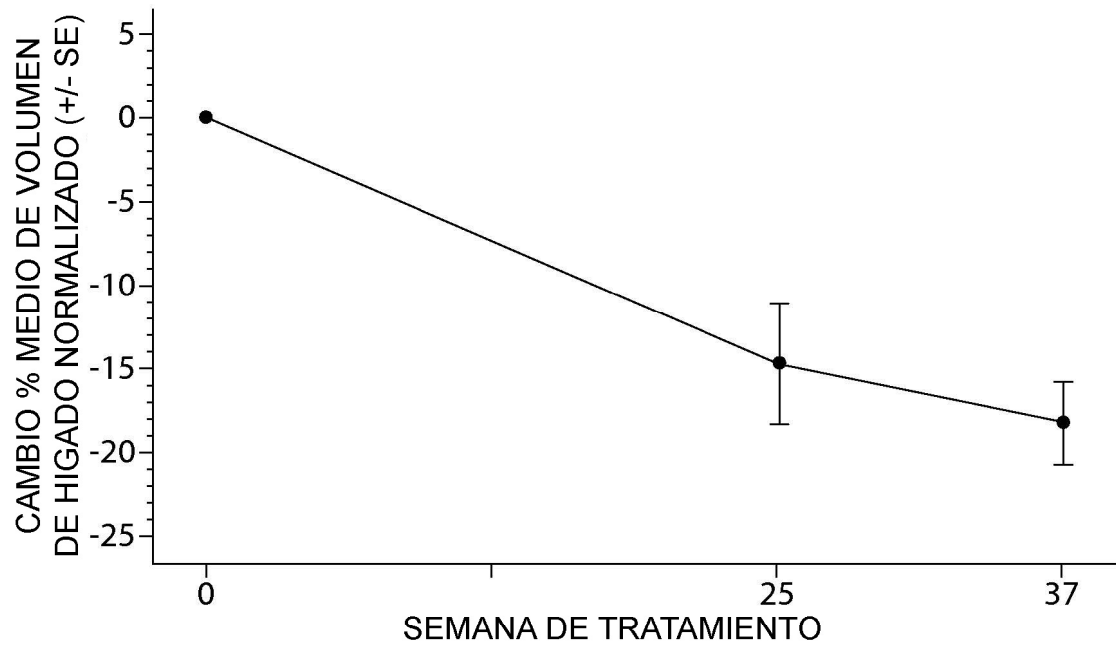


Fig. 1C

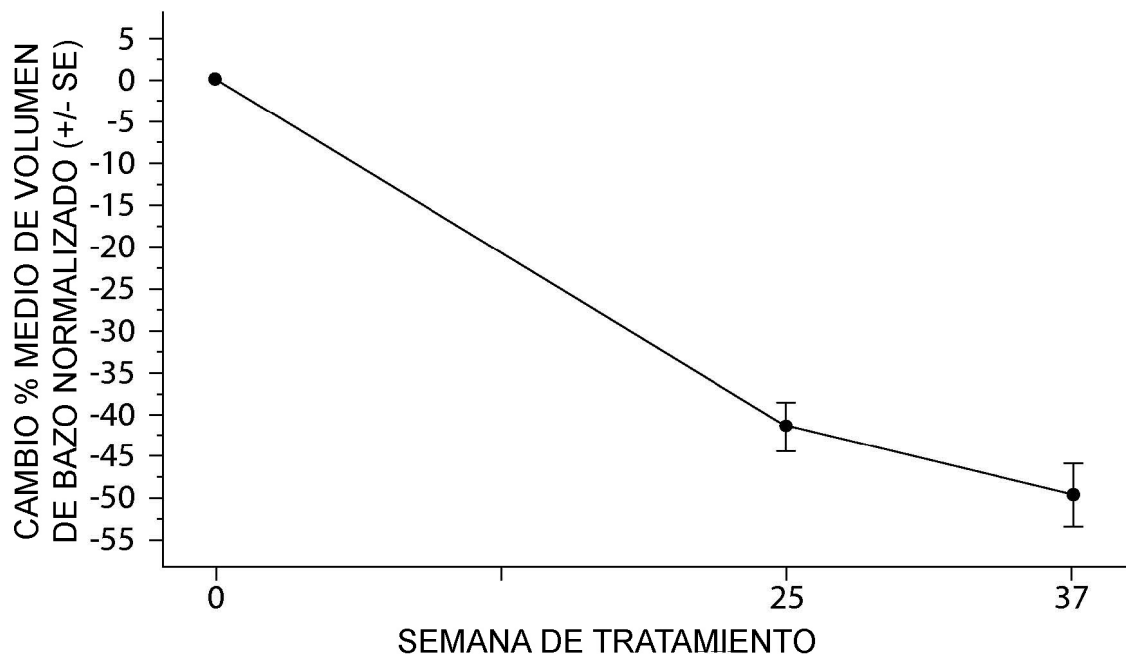


Fig. 1D

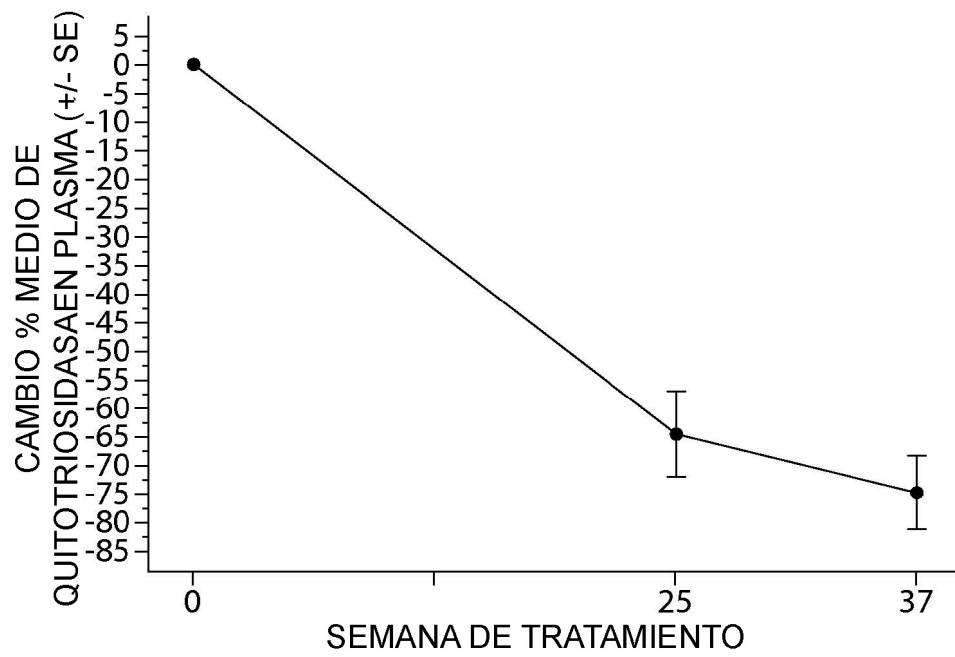


Fig. 1E

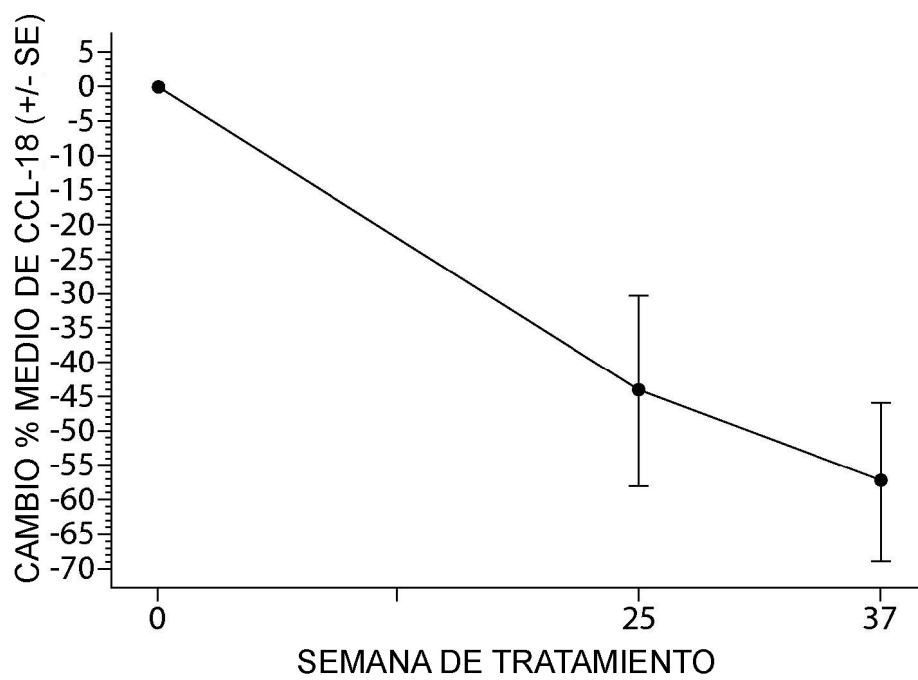


Fig. 1F

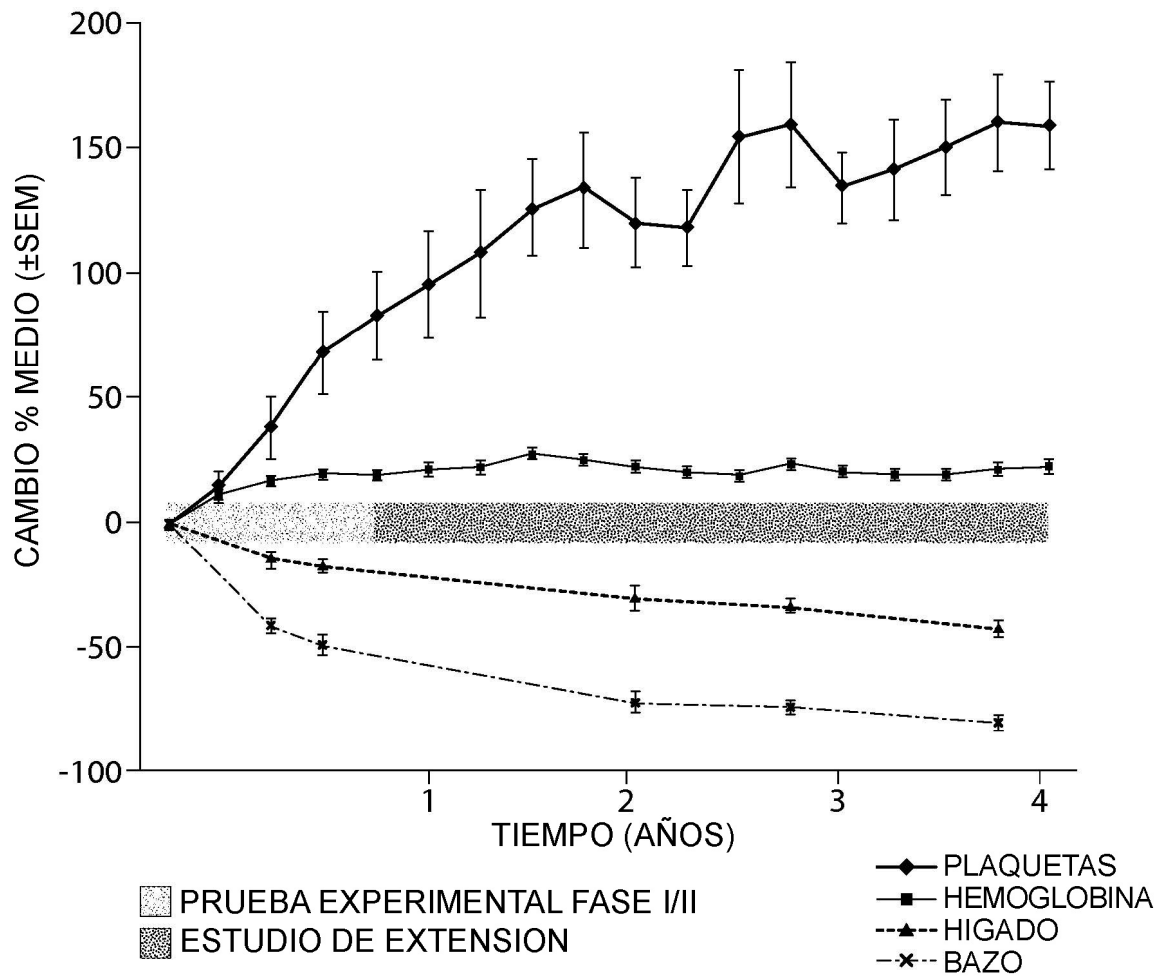


Fig. 2

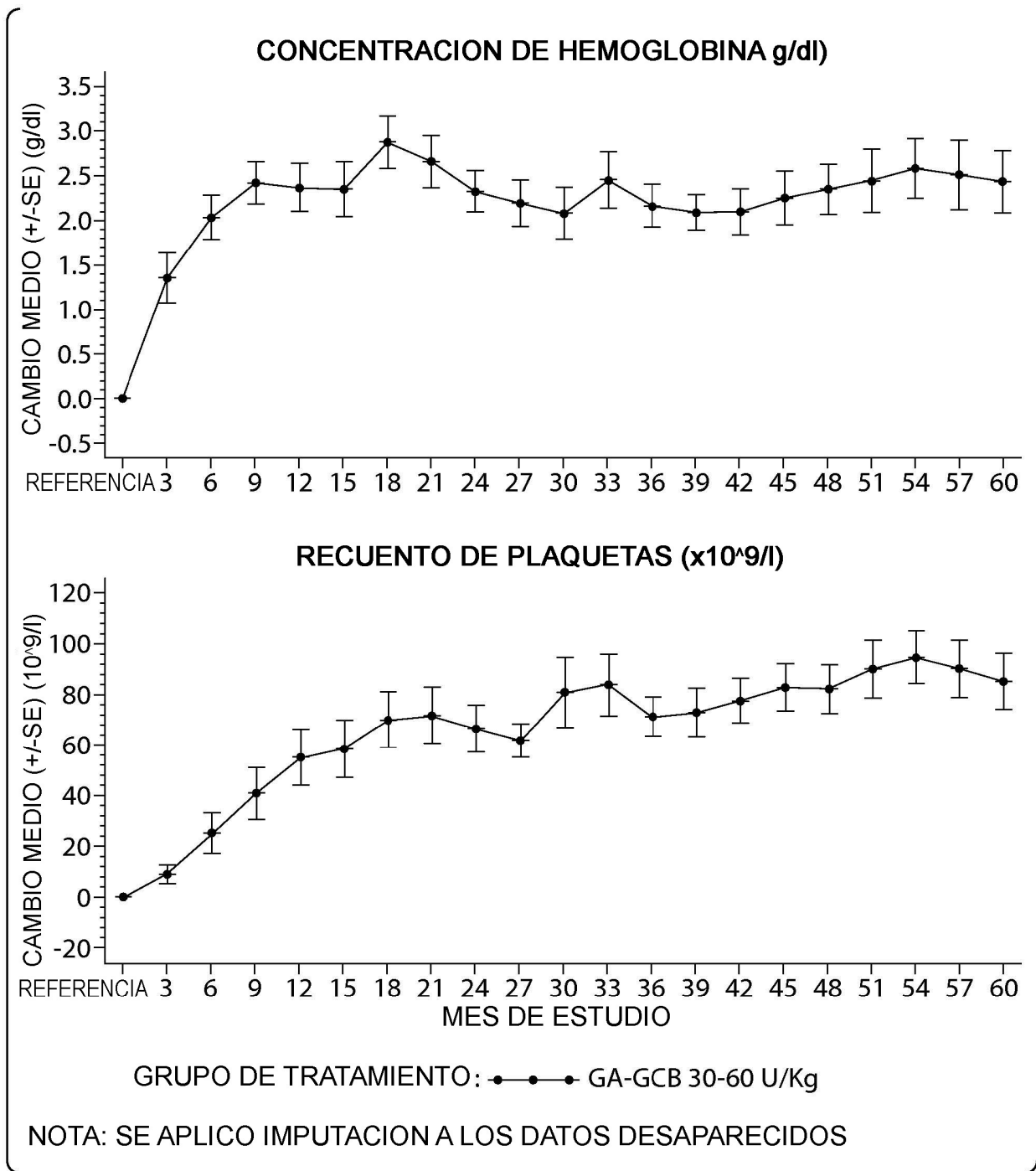


Fig. 3

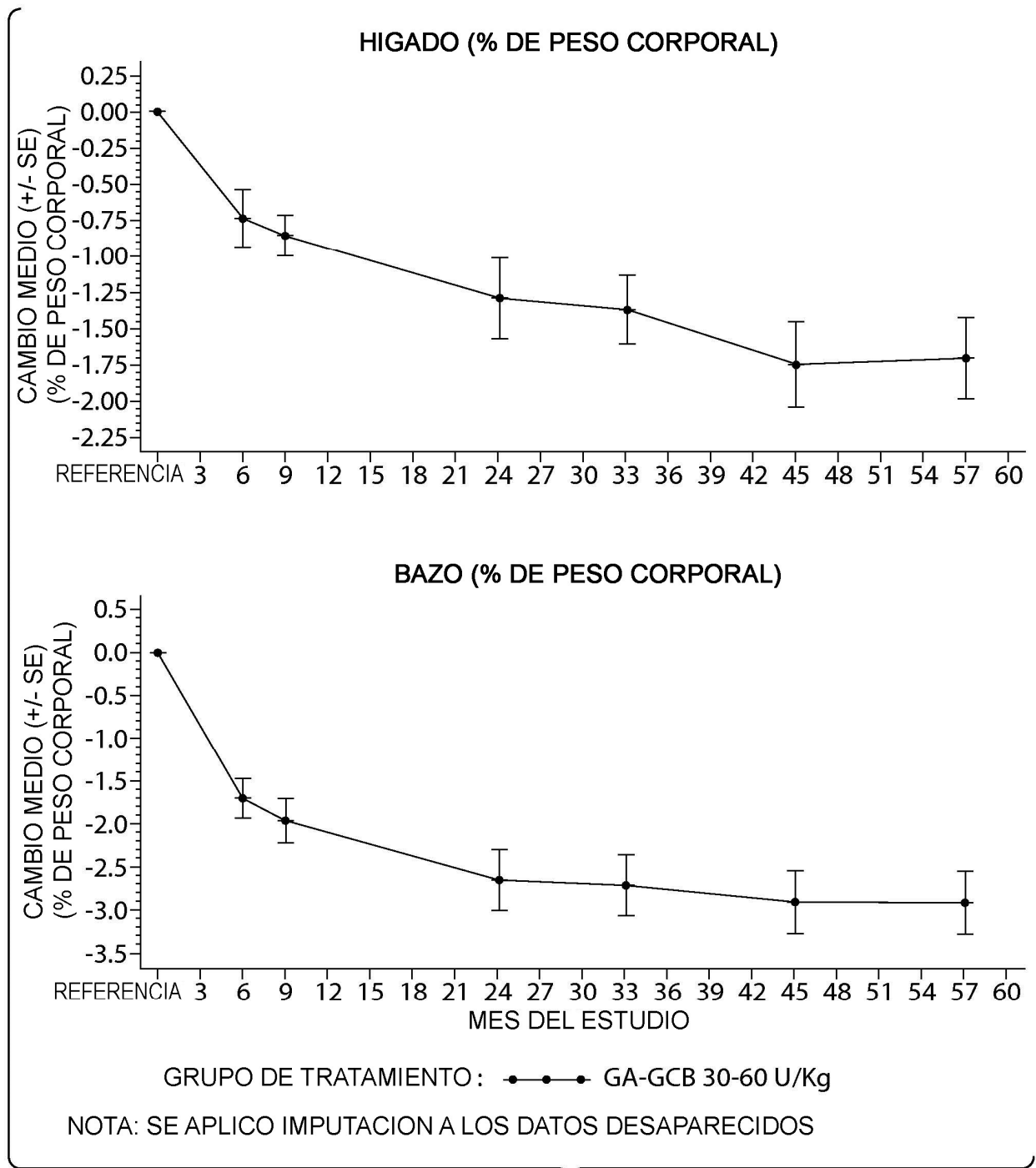


Fig. 4

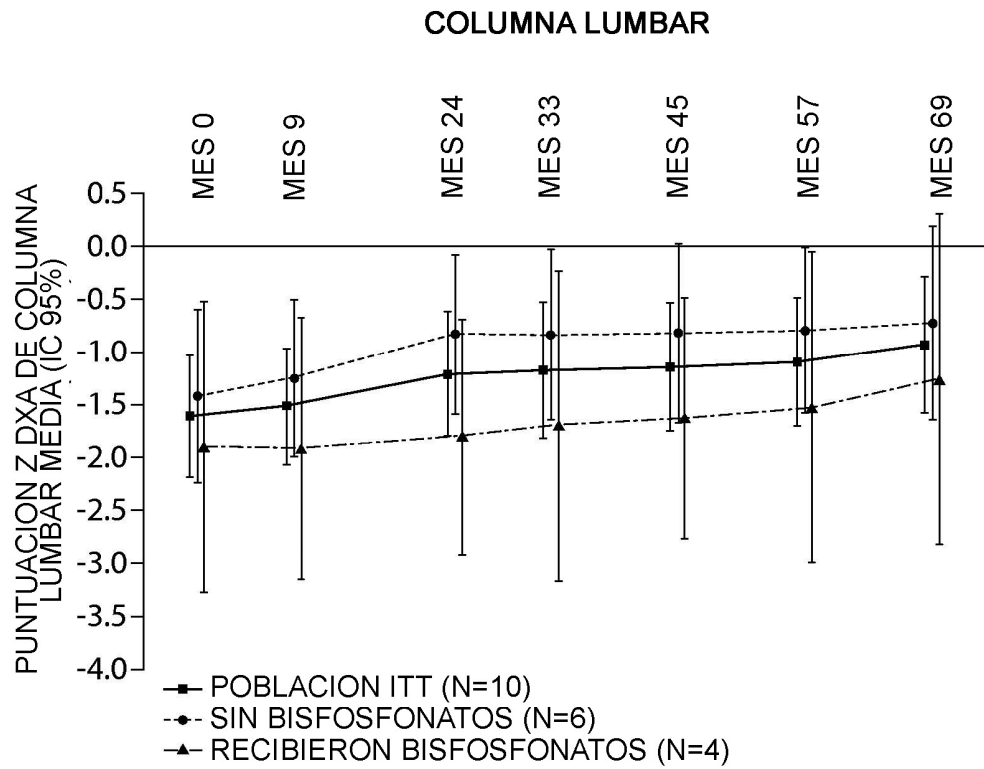


Fig. 5

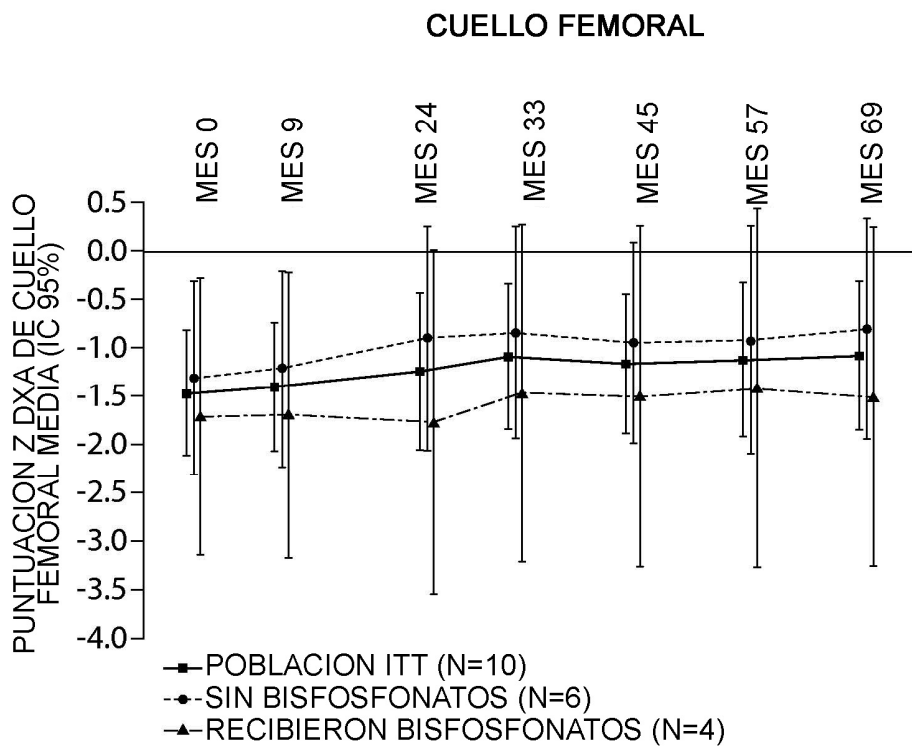


Fig. 6

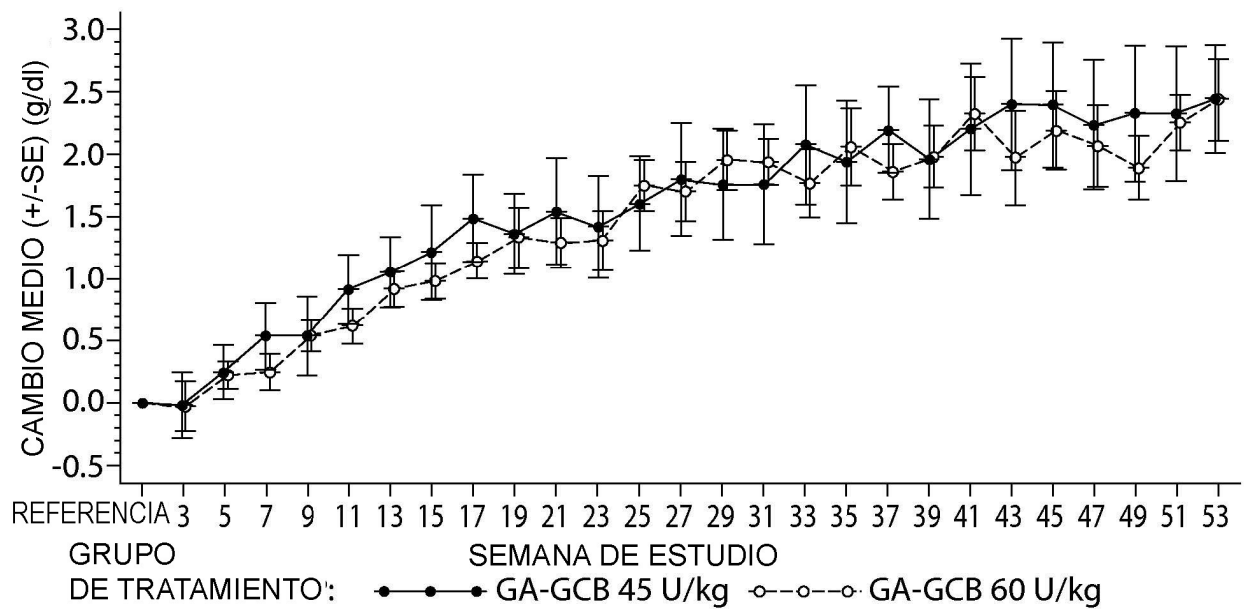


Fig. 7

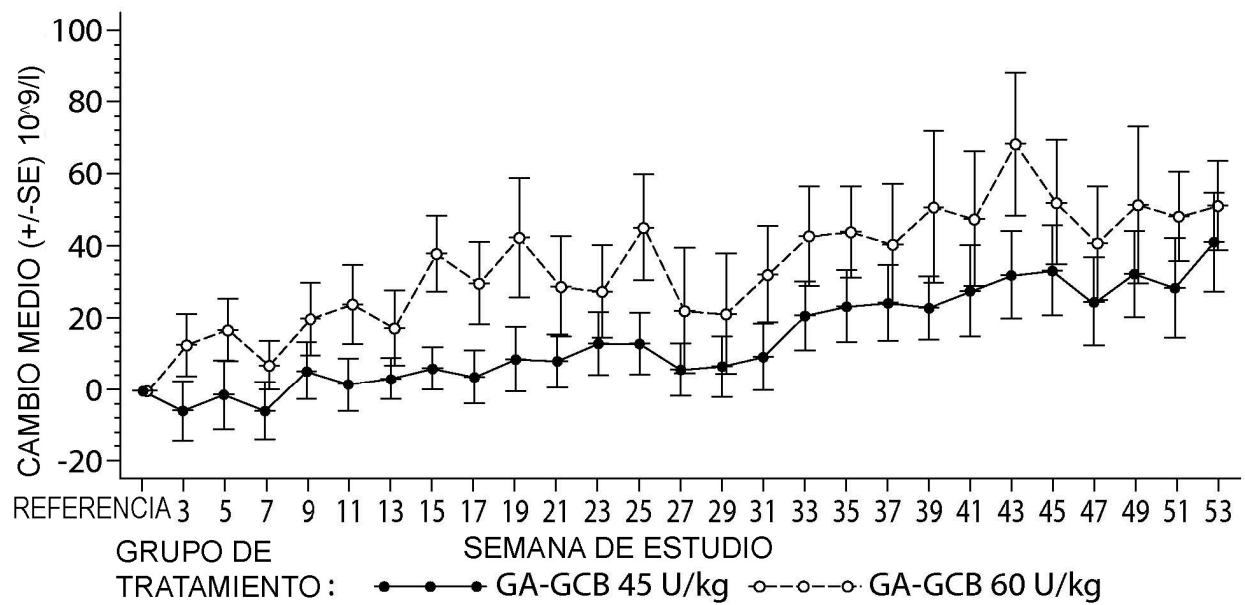


Fig. 8

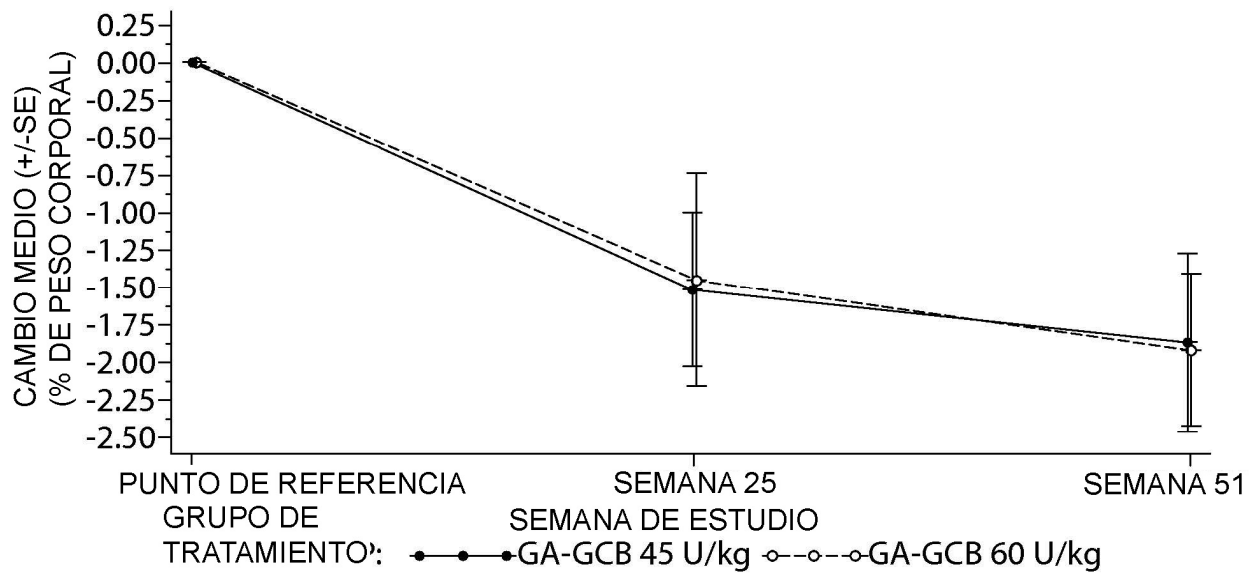


Fig. 9

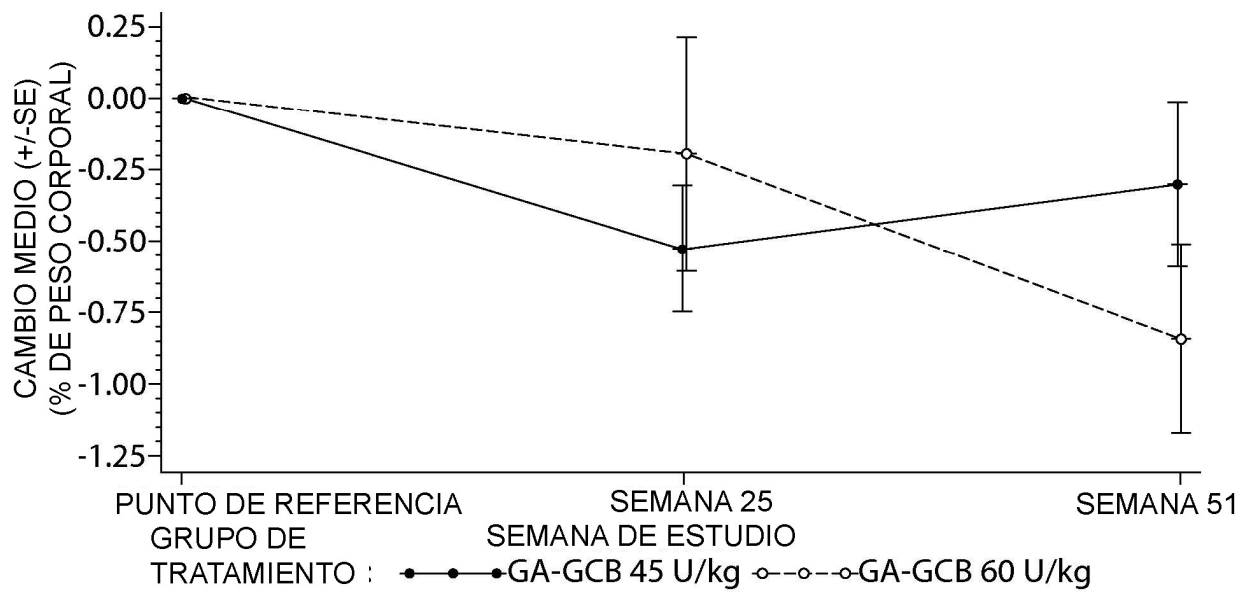


Fig. 10

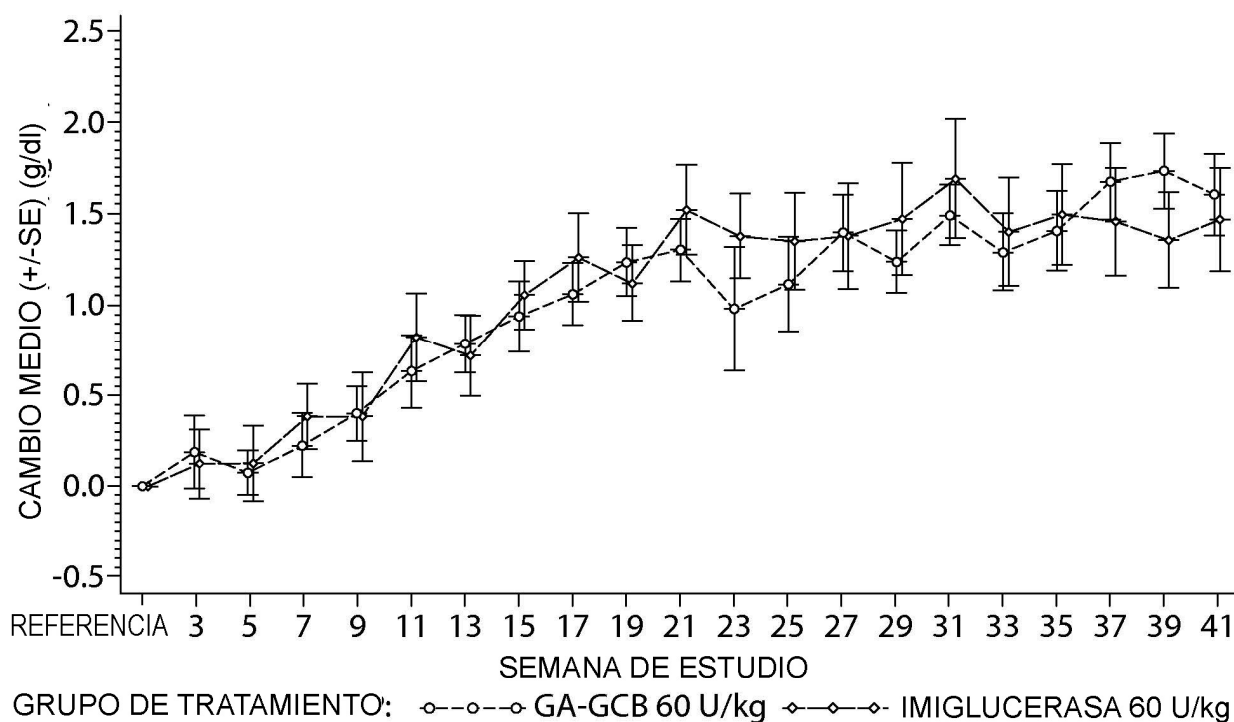


Fig. 11

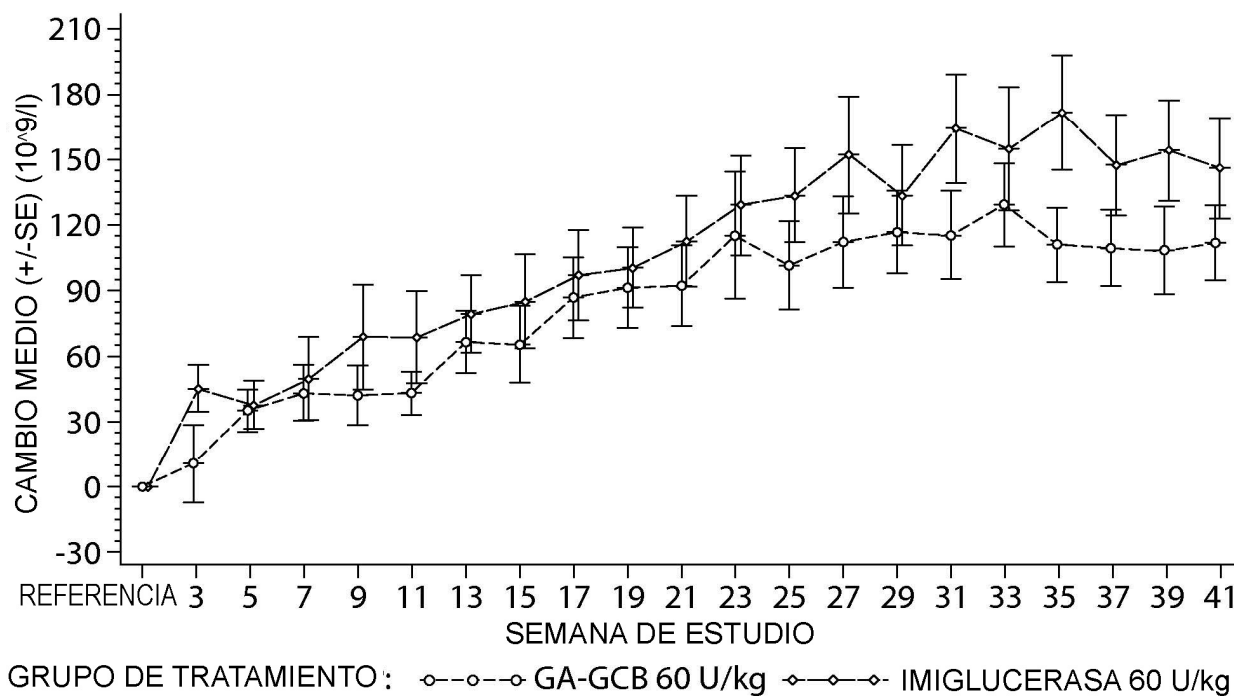


Fig. 12

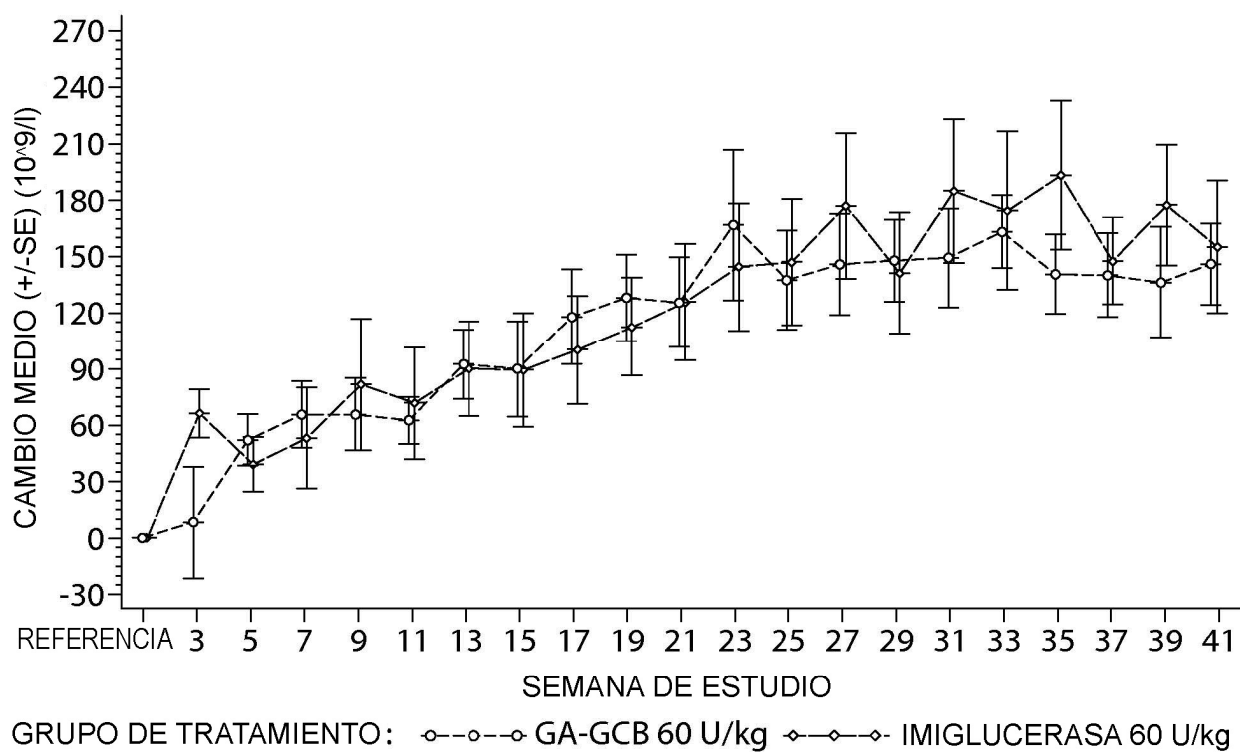


Fig. 13

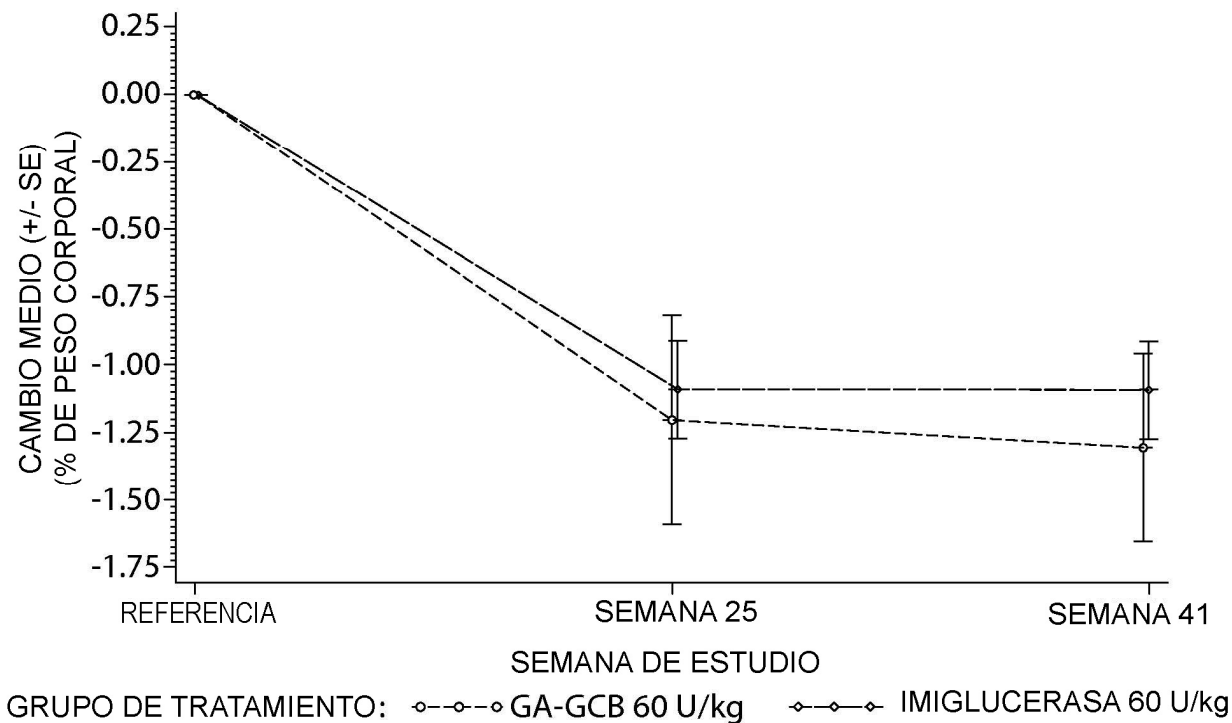


Fig. 14

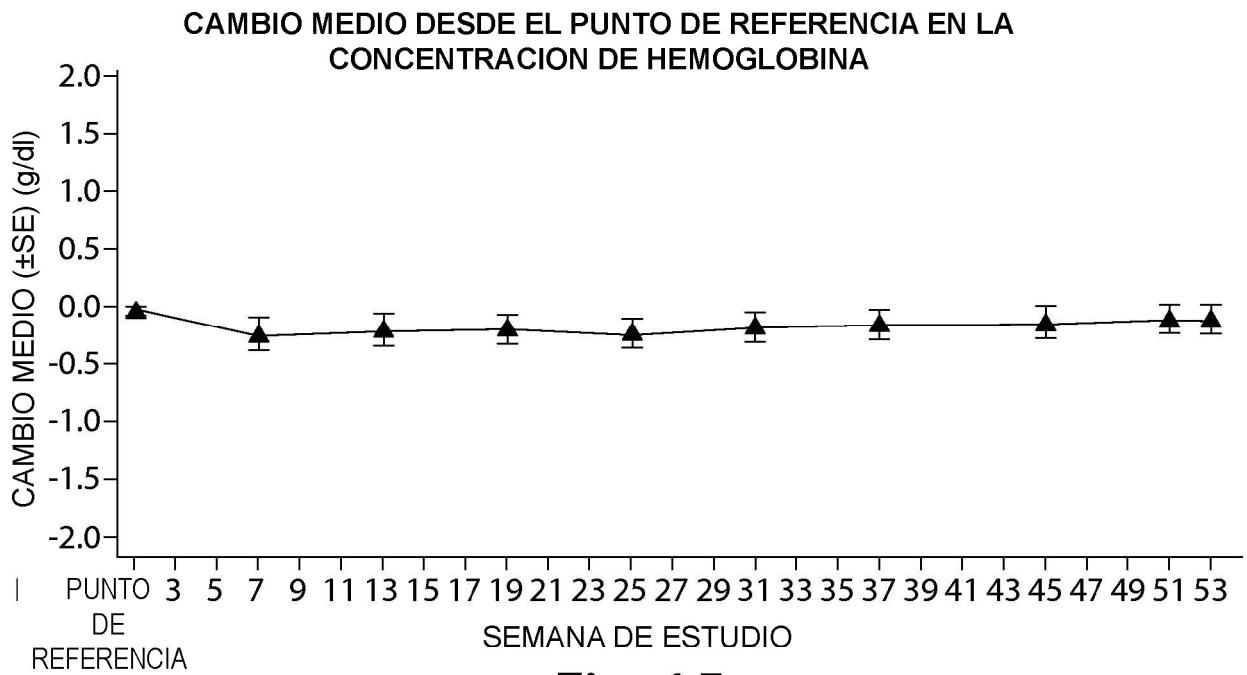


Fig. 15

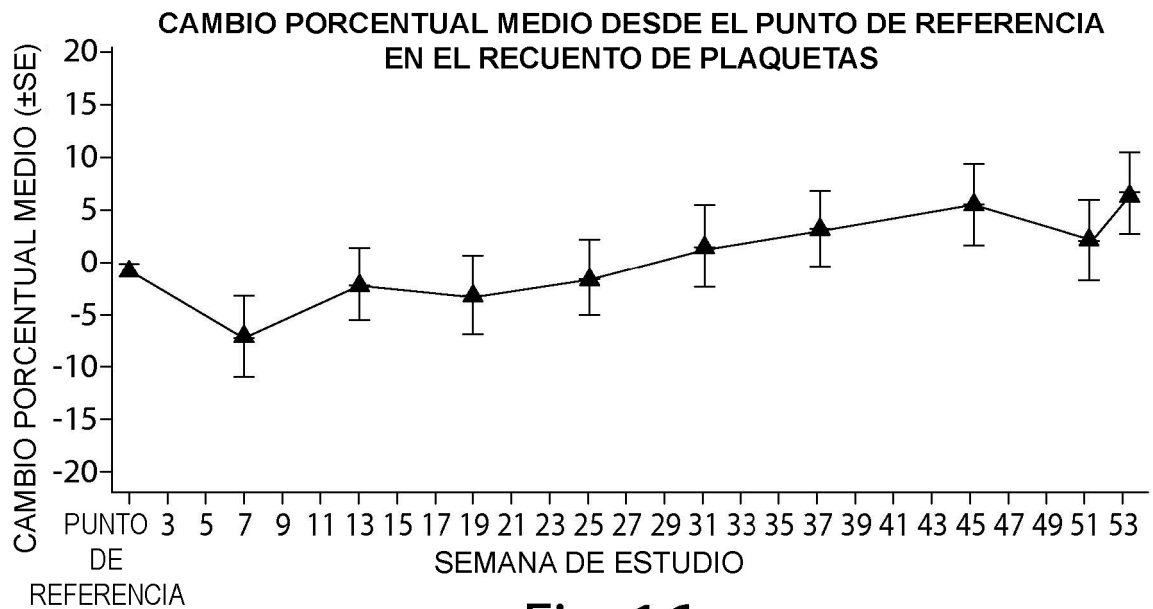


Fig. 16

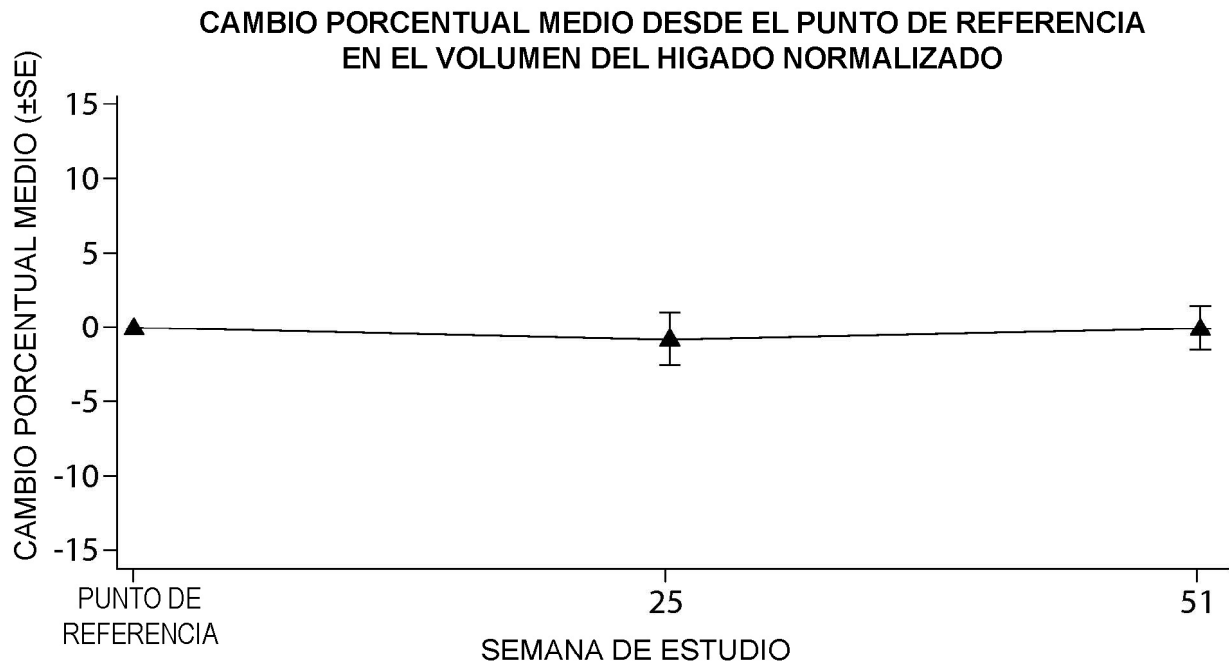


Fig. 17

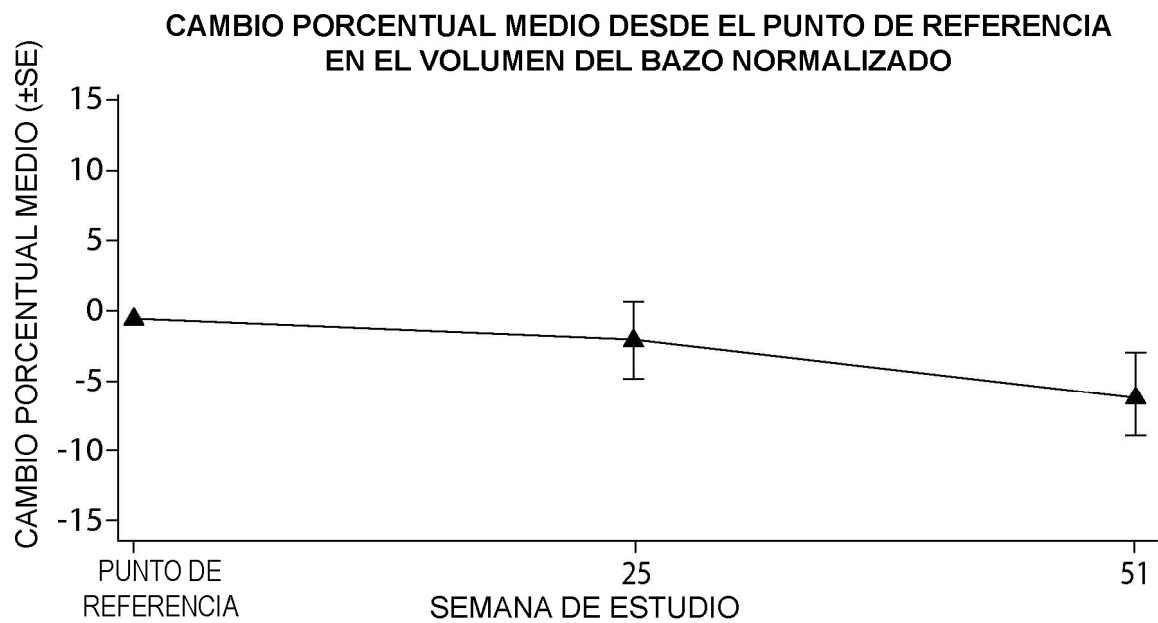


Fig. 18

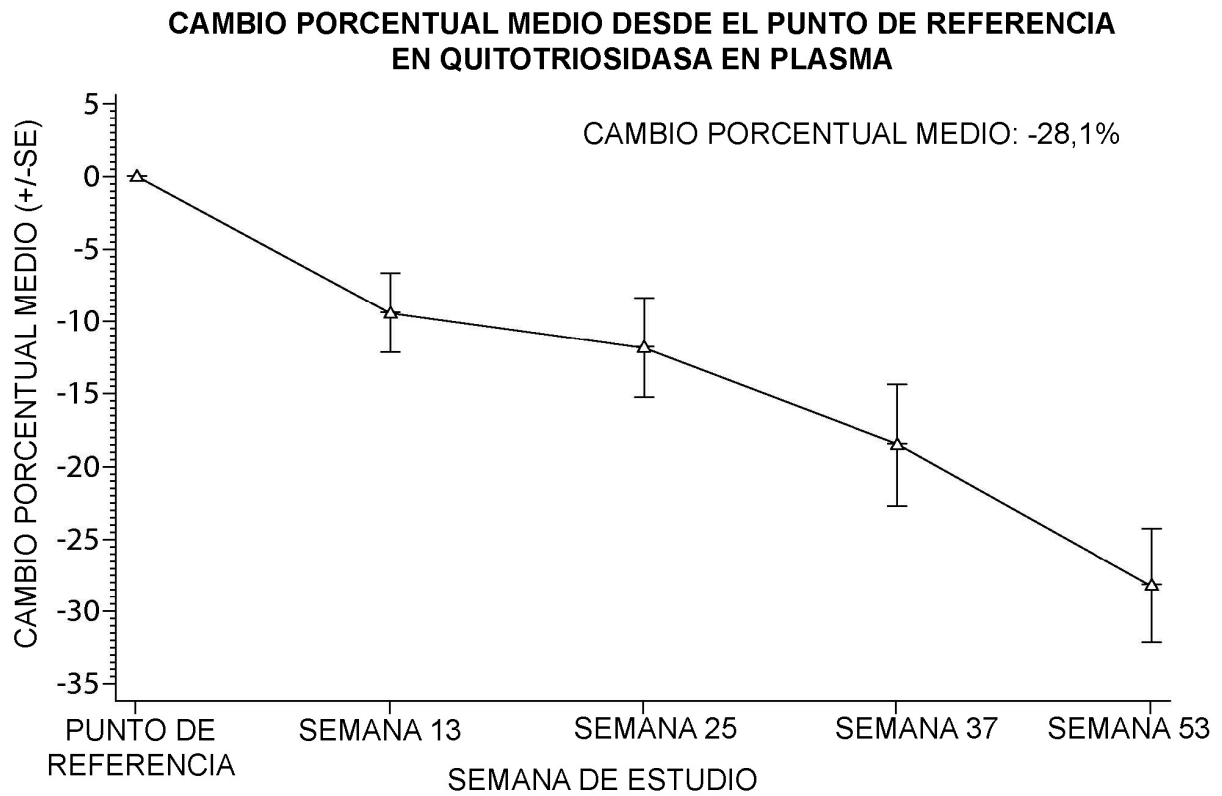


Fig. 19

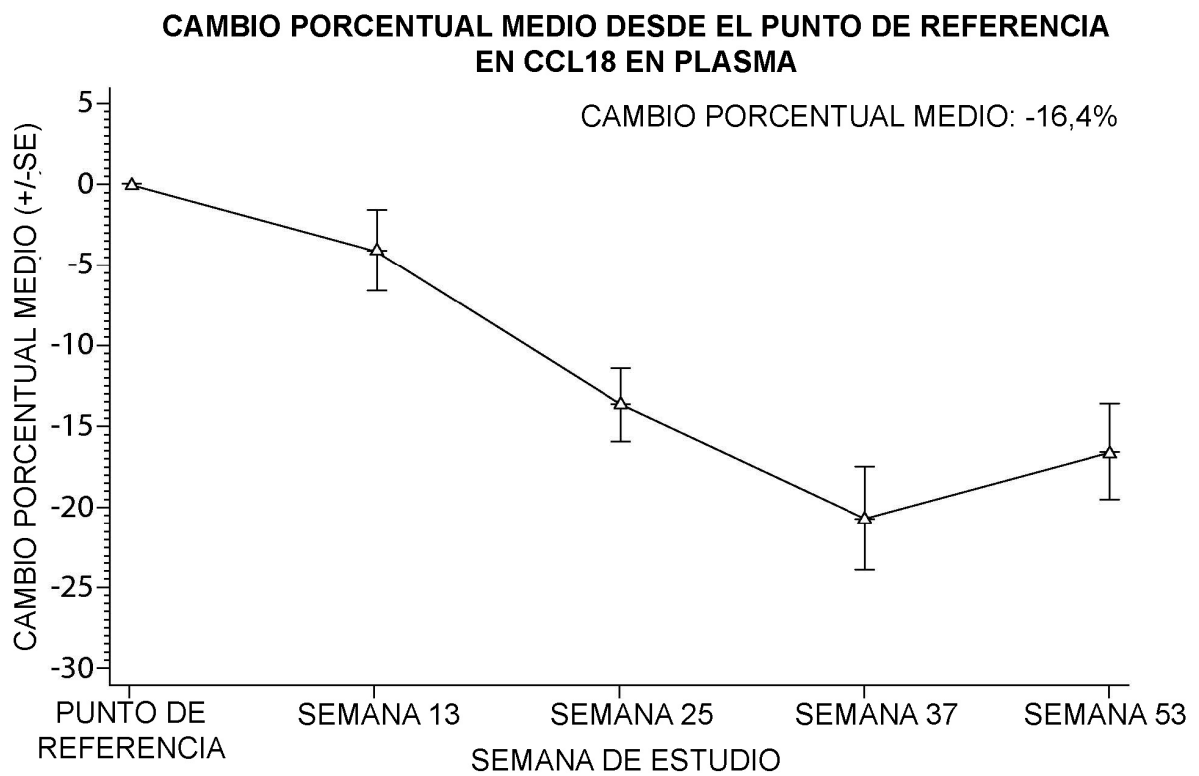


Fig. 20



Fig. 21

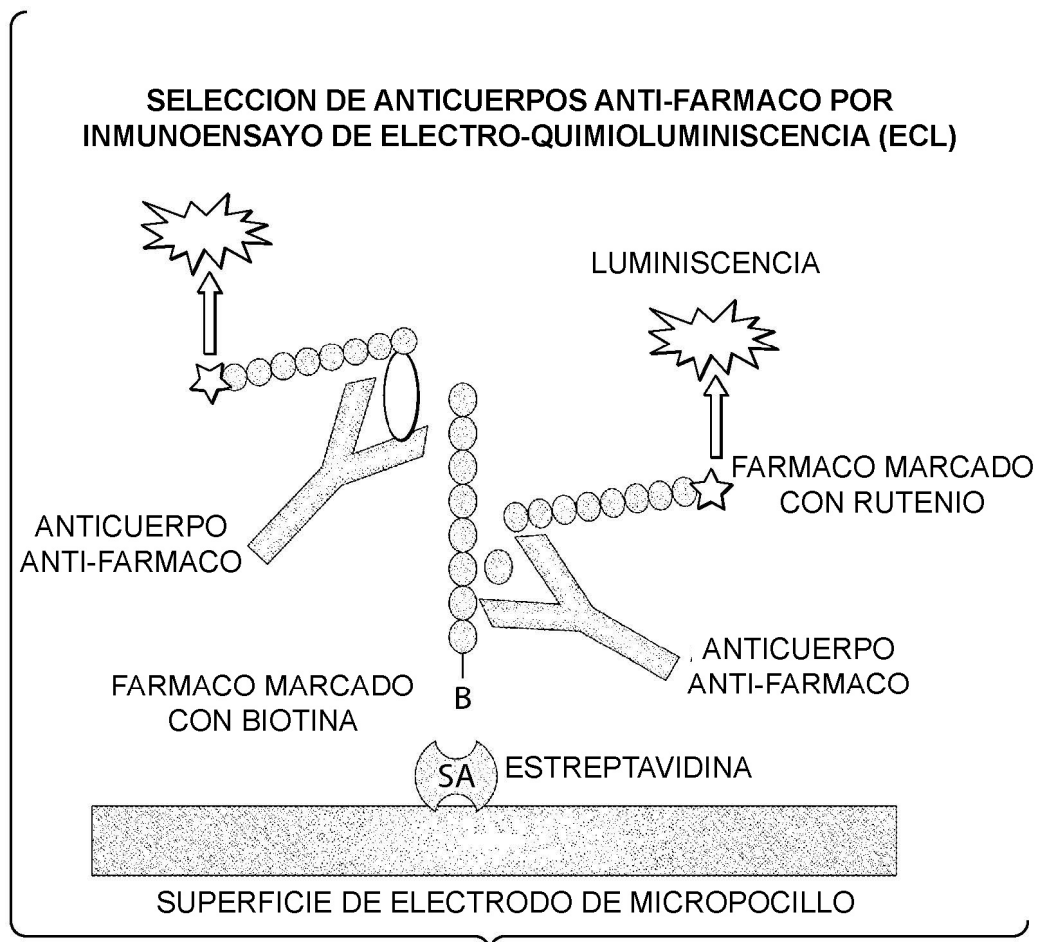


Fig. 22

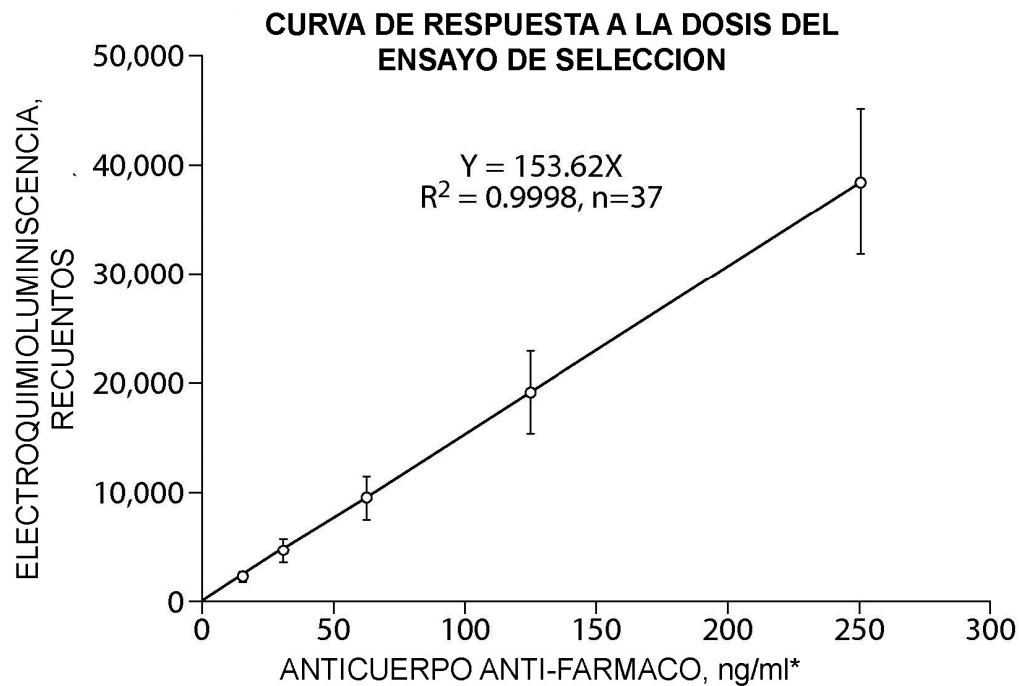


Fig. 23

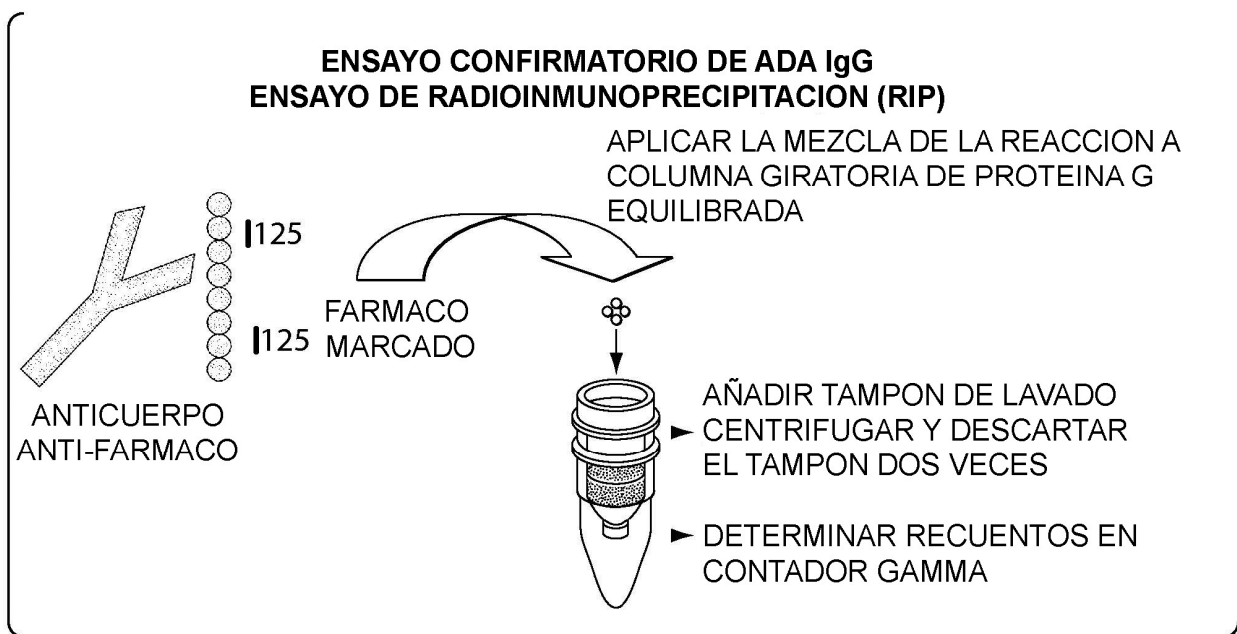


Fig. 24

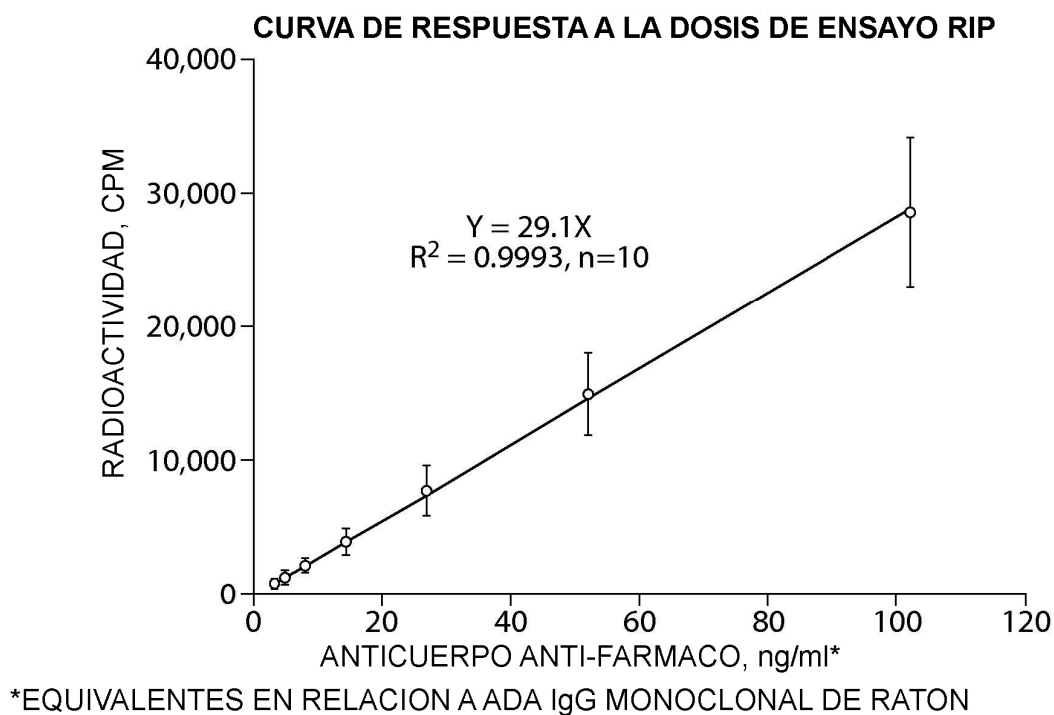


Fig. 25

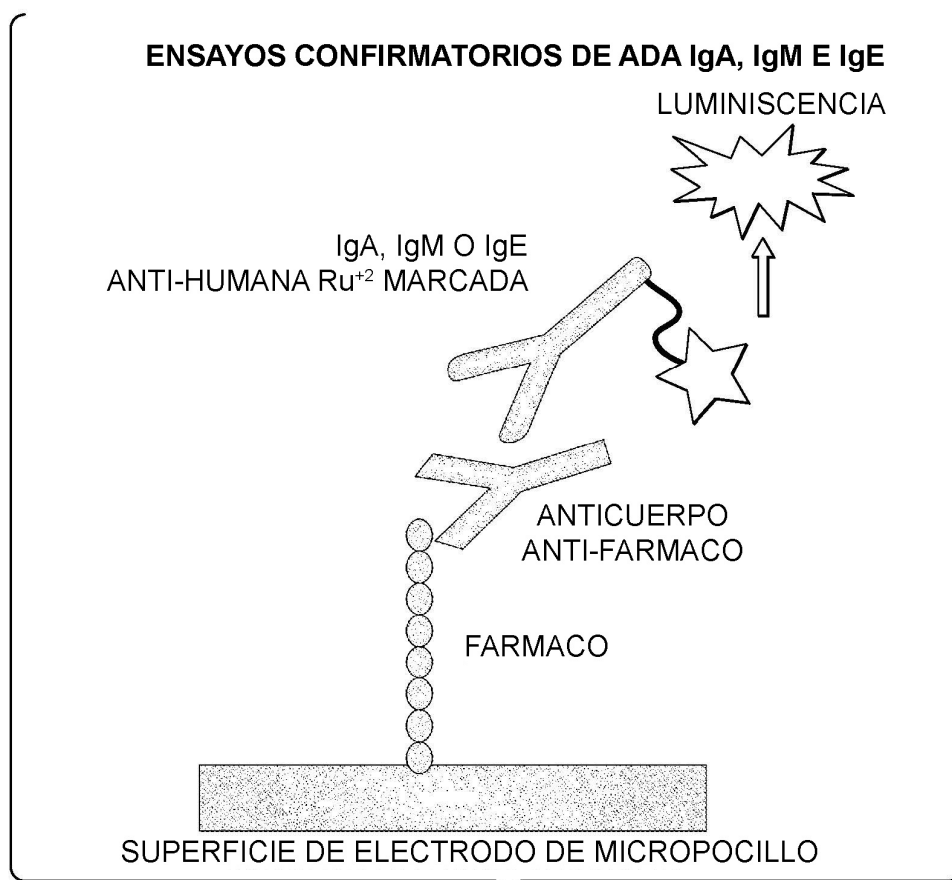


Fig. 26