

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMACIA
DEPARTAMENT DE FARMACIA I TECNOLOGIA FARMACEUTICA
UNITAT DE BIOFARMACIA I FARMACOCINETICA

**ESTUDIO FARMACOCINETICO DE
ANALOGOS DE LA
SOMATOSTATINA**

Josep Maria Cendrós Carreras, 2006

2. MATERIAL Y MÉTODOS

INDICE

2.1	MÉTODO ANALÍTICO	91
2.1.1	TERMINOLOGÍA	91
2.1.2	FUNDAMENTO DEL RADIOINMUNOENSAYO (RIA)	93
2.1.3	PROCEDIMIENTO ANALÍTICO GENERAL	95
2.1.3.1	REACTIVOS	96
2.1.3.2	EQUIPOS	96
2.1.3.3	PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	96
2.1.3.3.1	Tampón A	97
2.1.3.3.2	Solución estándar de lanreótida de 1 mg/ml	97
2.1.3.4	MATRIZ BIOLÓGICA	97
2.1.3.4.1	Obtención de suero	97
2.1.3.4.2	Obtención de plasma	97
2.1.3.4.3	Curva estándar	98
2.1.3.4.4	Controles de calidad	98
2.1.3.4.5	Solución de trazador de lanreótida	99
2.1.3.4.6	Solución de antisuero anti-lanreótida	100
2.1.3.4.6.1	<i>Inmunoreactividad</i>	100
2.1.3.4.6.2	<i>Especificidad</i>	101
2.1.3.5	PROTOCOLO ANALÍTICO DE VALIDACIÓN	102
2.1.3.6	CÁLCULOS	103
2.1.4	VALIDACIONES ANALÍTICAS	104
2.1.4.1	PERFIL DE PRECISIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR	105
2.1.4.2	DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)	105
2.1.4.3	DETERMINACIÓN DEL PARALELISMO	105
2.1.4.4	DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD	106
2.1.4.5	DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN	106
2.1.4.6	EFECTO MATRIZ	106
2.1.4.7	ESTABILIDAD	107
2.1.5	BASES DEL ANÁLISIS EN RUTINA	109
2.1.5.1	PROCESO DE ANÁLISIS EN RUTINA	109
2.1.5.2	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE RESULTADOS	110
2.2	ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS	110
2.2.1	TERMINOLOGÍA	111
2.2.2	ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN LA RATA	111
2.2.2.1	ANIMALES	111
2.2.2.2	SOLUCIÓN DE ADMINISTRACIÓN	111
2.2.2.3	OBTENCION SUERO DE RATA	112
2.2.2.4	ESTUDIOS POR VÍA INTRAVENOSA	112
2.2.2.4.1	Dosis única bolus intravenoso	112
2.2.2.5	ESTUDIOS POR VÍA SUBCUTÁNEA	112
2.2.2.5.1	Dosis única por vía subcutánea	112
2.2.2.5.2	Dosis múltiple por vía subcutánea	113
2.2.3	ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN EL PERRO	113
2.2.3.1	ANIMALES	113
2.2.3.2	SOLUCIÓN DE ADMINISTRACIÓN	114
2.2.3.3	OBTENCION SUERO DE PERRO	114

2.2.3.4	ESTUDIOS POR VÍA INTRAVENOSA.....	114
2.2.3.4.1	Dosis única bolus intravenoso.....	114
2.2.3.4.2	Infusión intravenosa durante 24 h.....	115
2.2.3.5	ESTUDIOS POR VÍA SUBCUTÁNEA.....	115
2.2.3.5.1	Dosis única por vía subcutánea.....	116
2.2.3.5.2	Dosis múltiple por vía subcutánea.....	116
2.2.4	ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN EL CERDO	117
2.2.4.1	ANIMALES.....	117
2.2.4.2	SOLUCIÓN DE ADMINISTRACIÓN.....	117
2.2.4.3	OBTENCION PLASMA DE CERDO.....	117
2.2.4.4	ESTUDIOS POR VÍA INTRAVENOSA.....	117
2.2.4.4.1	Dosis única bolus intravenoso.....	117
2.2.4.5	ESTUDIOS POR VÍA INTRAMUSCULAR.....	118
2.2.4.5.1	Dosis única por vía intramuscular.....	118
2.2.5	ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN VOLUNTARIOS SANOS	118
2.2.5.1	VOLUNTARIOS SANOS.....	118
2.2.5.2	SOLUCIÓN DE ADMINISTRACIÓN.....	118
2.2.5.3	OBTENCION SUERO HUMANO.....	118
2.2.5.4	ESTUDIOS POR VÍA INTRAVENOSA.....	118
2.2.5.4.1	Dosis única bolus intravenoso.....	119
2.2.5.4.2	Infusión intravenosa durante 20 minutos.....	119
2.2.5.5	ESTUDIOS POR VÍA SUBCUTÁNEA.....	119
2.2.5.5.1	Dosis única por vía subcutánea.....	119
2.2.6	RESUMEN DE ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS.....	120
2.3	ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL'.....	121
2.3.1	CONCEPTOS.....	125
2.3.2	TERMINOLOGÍA	127
2.3.3	INTRODUCCIÓN A MODELOS DE EFECTOS MIXTOS.....	129
2.3.4	ANÁLISIS POBLACIONAL.....	131
2.3.4.1	PROGRAMAS UTILIZADOS.....	131
2.3.4.1.1	NONMEM.....	131
2.3.4.1.2	XPOSE.....	132
2.3.4.2	DESARROLLO DEL MODELO.....	133
2.3.4.2.1	Exploración de datos.....	133
2.3.4.2.2	Modelo Estructural Básico.....	133
2.3.4.2.3	Modelo de Covariables.....	141
2.3.4.2.4	Modelo Final.....	143
2.3.4.3	CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	143
2.3.4.3.1	Criterios de Selección para el Modelo Estructural Básico.....	144
2.3.4.3.2	Criterios de Selección para la Inclusión de Covariables.....	148
2.3.4.4	VALIDACIÓN DEL MODELO.....	148
2.3.4.4.1	Determinación del error de predicción.....	148
2.3.4.4.2	Validación cruzada.....	149
2.3.4.4.3	Mínimo Local.....	149
2.3.4.5	EXPLORACIÓN DEL MODELO FINAL.....	149
2.3.5	ANÁLISIS POBLACIONAL PARA CADA ESPECIE.....	150
2.3.6	ESCALADO ENTRE ESPECIES.....	150
2.3.6.1	ALOMETRIA.....	151
2.3.6.2	TIEMPOS FARMACOCINÉTICOS.....	152

2.3.6.2.1 Cálculo tiempos farmacocinéticos: 152

2.4 REFERENCIAS.....153

TABLAS

Tabla 1. Resumen del proceso de análisis por radioinmunoanálisis..... **102**

Tabla 2. Resumen los estudios farmacocinéticos realizados tras la administración intravenosa de la lanreótida en las diferentes especies ensayadas junto con el número de individuos utilizados en cada estudio. **120**

Tabla 3. Resumen los estudios farmacocinéticos realizados tras la administración extravasal de la lanreótida en las diferentes especies ensayadas junto con el número de individuos utilizados en cada estudio.... **120**

Tabla 4. Ventajas e inconvenientes de los distintos métodos de estimación de los parámetros poblacionales.. **124**

FIGURAS

Figura 1. Inmunoreactividad del antisuero anti-lanreótida **100**

Figura 2. Representación gráfica de los principales parámetros de la función 4PL. **104**

Figura 3. Ejemplo esquemático de un compartimento..... **125**

Figura 4. Modelo farmacocinético bicompartimental **134**

Figura 5. Modelo farmacocinético tricompartmental **136**

Figura 6. Modelos básicos de la variabilidad interindividual. **138**

Figura 7. Ejemplo de interacción de la variabilidad interindividual en el CL. **138**

Figura 8. Modelos básicos de la variabilidad residual **140**

Figura 9. Ejemplo de la interacción de la variabilidad residual con la concentración individual predicha. **140**

Figura 10. Ejemplo de los gráficos de bondad de ajustado PRED y IPRED frente a DV. **145**

Figura 11. Ejemplo del gráfico de bondad de ajustado IIWRESI frente a IPRED. **146**

Figura 12. Ejemplo del gráfico de bondad de ajustado WRES frente a la variable independiente (TIME). **146**

Figura 13. Ejemplo de la distribución de los estimados Bayesianos individuales que conforman la variabilidad interindividual en un parámetro. **147**

Figura 14. Ejemplo de representación gráfica de DV, IPRED y PRED frente a la variable independiente (tiempo). **147**

Figura 15. Ejemplo de representación gráfica de los valores observados (DV) y los valores predichos mediante el proceso de simulación frente a la variable independiente (tiempo). **150**

2.1 MÉTODO ANALÍTICO

El método analítico utilizado para la determinación de las concentraciones de lanreótida en las distintas matrices biológicas ensayadas es el radioinmunoanálisis (RIA).

En esta Memoria se ha realizado la validación para la determinación de la lanreótida en las siguientes matrices biológicas:

- Suero de rata
- Suero de perro
- Suero humano¹
- Plasma humano
- Plasma de cerdo

Para cada una de las matrices biológicas utilizadas, se ha realizado una validación completa (determinación del perfil de precisión, límite de cuantificación, paralelismo, exactitud, precisión, efecto matriz y estabilidad a distintas temperaturas), con la excepción del plasma de cerdo, donde solo se ha realizado una validación parcial (determinación del perfil de precisión, límite de cuantificación, paralelismo, exactitud, precisión y estabilidad a -20°C). En el caso del plasma de cerdo, se optó por realizar una validación parcial ya que se disponía de muy poca matriz biológica, y sólo se preveía realizar un único estudio con la lanreótida en esta especie animal.

En el presente trabajo, se da la peculiaridad que las cinco técnicas analíticas validadas para la determinación de lanreótida en cada una de las matrices biológicas ensayadas, la casi totalidad del proceso es análogo, solo diferenciándose de un método analítico a otro en el tipo de matriz biológica utilizada y en la preparación de algunos controles de calidad. Por este motivo, se ha decidido por describir un método general de radioinmunoensayo, que es común a todos los métodos analíticos, y describir cada una de las peculiaridades del método analítico atribuibles a cada una de las matrices biológicas ensayadas.

2.1.1 TERMINOLOGÍA

Se describe a continuación el significado de los diferentes términos implicados durante la validación de los distintos métodos analíticos por radioinmunoanálisis:

- **Radioinmunoanálisis (RIA):** Proceso analítico en el que un anticuerpo y un analito marcado radioactivamente son utilizados para medir la concentración de un analito problema en una muestra biológica.
- **Anticuerpo (Ac):** es el componente funcional del antisuero que es capaz de reaccionar (unirse) con un antígeno determinado. Un anticuerpo es una inmunoglobulina que se forma en el cuerpo en respuesta a una sustancia (antígeno) y que interacciona uniéndose únicamente a lugares específicos de dicha sustancia.

- **Antígeno (Ag):** sustancia que se une específicamente a un anticuerpo. Esta sustancia provoca una respuesta inmune y la producción de anticuerpos en un sistema biológico.
- **Antígeno marcado (Ag*, trazador):** antígeno marcado radioactivamente que se une específicamente a un anticuerpo.
- **Total:** es el valor de la radioactividad total (correspondiente al antígeno marcado) dispensada a cada tubo de una secuencia analítica, expresado en CPM (cuentas por minuto).
- **Blanco:** es la cantidad aparente de analito medida por un método analítico cuando la muestra no contiene dicho analito problema. En el presente trabajo, corresponde al valor de la radioactividad residual en la matriz biológica utilizada para cada secuencia analítica, expresada en CPM.
- **NSB%:** es el valor de la unión no específica expresado en porcentaje. La unión no específica corresponde a todo el material marcado radioactivamente presente en la fracción unida no atribuible a la unión específica al anticuerpo. Para su cálculo se aplica la siguiente ecuación:

$$NSB\% = \frac{Blanco}{Total} \cdot 100 \quad (Ec. 1)$$

- **Referencia (0):** es el valor de la unión máxima del anticuerpo al antígeno marcado (trazador) en la matriz biológica utilizada, expresado en CPM.
- **Binding % (B₀):** es el valor expresado en porcentaje de la unión máxima del anticuerpo al trazador en la matriz biológica utilizada. Para el cálculo se aplica la siguiente ecuación:

$$Binding = \frac{Referencia - Blanco}{Total} \cdot 100 \quad (Ec. 2)$$

- **Curva Estándar:** es la relación entre el valor de la respuesta experimental y la concentración analítica. La curva estándar está compuesta por varios estándares (STD) con diferentes valores de concentración teórica.
- **Control de Calidad (QC):** representa cada uno de los controles de calidad distribuidos a lo largo de la secuencia analítica.
- **Margen de Trabajo (MT):** es el margen de concentraciones de un analito, comprendido entre un límite inferior y superior, donde el analito puede ser cuantificado con precisión y exactitud aceptables. Para cada método analítico, existe un margen de trabajo distinto, que se determina durante la validación.
- **CV%:** Es el coeficiente de variación expresado en porcentaje de los diferentes replicados, se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$CV\% = \frac{DS}{VP} \cdot 100 \quad (Ec. 3)$$

donde: DS: desviación estándar entre los distintos replicados.
VP: valor promedio entre los distintos replicados.

- **ED₂₀**: Concentración de analito necesaria para producir un 20% de desplazamiento del trazador.
- **ED₅₀**: Concentración de analito necesaria para producir un 50% de desplazamiento del trazador.
- **ED₈₀**: Concentración de analito necesaria para producir un 80% de desplazamiento del trazador.

2.1.2 FUNDAMENTO DEL RADIOINMUNOENSAYO (RIA)

Existen diversas técnicas para la determinación de concentraciones muy bajas de péptidos pequeños en fluidos biológicos. Una de las técnicas más utilizadas es el radioinmunoensayo (RIA). Los principales motivos para seleccionar esta metódica analítica son:

- Permite determinar niveles de concentración muy bajos (del orden de los pg/ml), que es difícil obtener con otras técnicas analíticas como la cromatografía.
- El RIA permite trabajar con volúmenes de muestra muy pequeños (aproximadamente 100 µl), que no es fácil de obtener mediante otras técnicas analíticas. El volumen de muestra puede ser un factor limitante en la elección de la técnica analítica, ya que en especies pequeñas como la rata, el suero que se puede obtener de una muestra no suele superar los 200 µl.
- Una vez se dispone del anticuerpo y trazador, el proceso de validación es relativamente rápido.

El RIA comprende la combinación de tres componentes fundamentales:

- Antígeno no marcado (Ag): en este trabajo el antígeno es la lanreótida.
- Antígeno marcado radioactivamente (Ag*): corresponde a la lanreótida marcada con I¹²⁵.
- Anticuerpo específico (Ac): corresponde al anticuerpo policlonal de conejo anti-lanreótida (código 582).

El principio del radioinmunoanálisis se basa en la reacción competitiva entre el péptido o antígeno marcado (Ag*) y el péptido o antígeno no marcado (Ag) por la unión a un anticuerpo específico (Ac). Esta reacción competitiva entre antígeno y anticuerpo, se considera reversible para la formación del complejo Ag-Ac, expresándose de acuerdo con el siguiente esquema:



donde, k_1 : es la constante de velocidad de la reacción directa

k_2 : es la constante de velocidad de la reacción inversa

La velocidad de formación del complejo Ag-Ac depende de la concentración de Ag y de Ac libres presentes en el medio. Por tanto, al iniciarse la reacción con la adición de Ag y Ac, la velocidad de reacción directa (k_1) es más grande que la inversa (k_2). Transcurrido algún tiempo, la velocidad de reacción directa va disminuyendo, debido a la disminución de las cantidades de Ag y Ac libres y al aumento de concentración del complejo Ag-Ac, y por tanto la velocidad de reacción inversa aumenta.

Se alcanza la situación de equilibrio cuando el número de moléculas libres reaccionantes de Ag y Ac para formar el complejo Ag-Ac por unidad de tiempo, es igual al número de moléculas del complejo Ag-Ac que se disocian en este mismo tiempo. Esta situación de equilibrio se puede describir por la Ley de Acción de Masas:

$$K = \frac{[Ag] \cdot [Ac]}{[Ag \cdot Ac]} \quad (\text{Ec. 5})$$

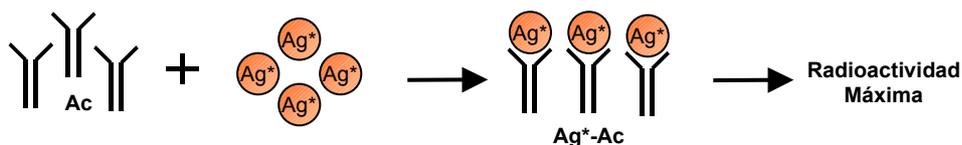
donde K es la constante de afinidad: $K=k_1/k_2$

Para realizar estos análisis específicos por RIA, se han de cumplir una serie de condiciones mínimas:

- La concentración del Ag* y Ac se han de mantener constantes, mientras que la concentración del Ag es variable. Manteniendo la concentración de Ac constante se obtiene un número limitado de puntos de unión. La concentración del Ag* se mantiene constante pero en exceso respecto a la concentración del Ac.
- Similar afinidad del Ag como del Ag* por el Ac, y por tanto tienen la misma probabilidad de unirse al Ac. De esta manera formarán con la misma probabilidad complejos no marcados (Ag-Ac) y complejos marcados radioactivamente (Ag*-Ac), respectivamente.
- Al final de la reacción, la fracción libre (Ag, Ag* y Ac) se debe poder separar de la fracción unida (Ag-Ac y Ag*-Ac). Esta separación se consigue mediante la adición de un agente precipitante (propanol), que permite separar la fracción libre, que se quedará en el sobrenadante, de la fracción unida que formará un precipitado ("pellet"). Una vez eliminado el sobrenadante (fracción libre), se puede cuantificar sólo la radioactividad correspondiente a la fracción unida (Ag*-Ac).

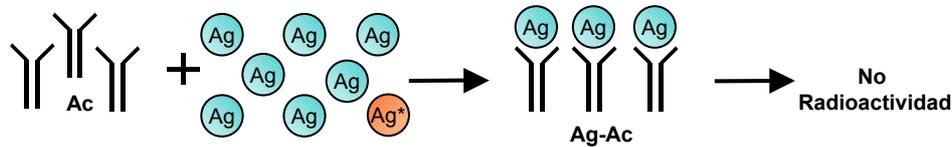
Todos los métodos RIA desarrollados en el presente trabajo, corresponden a ensayos heterogéneos (requieren de la separación de la fracción libre y la fracción unida) y competitivos (la concentración del antígeno se encuentra en exceso respecto a la concentración del anticuerpo). En estas condiciones de análisis, se pueden presentar tres situaciones distintas:

- Muestra que no dispone de antígeno no marcado (Ag): solo se dispone de antígeno marcado (Ag*) y por tanto, todo el Ac se uniría al antígeno marcado (Ag*) formando el máximo de complejos marcados radioactivamente (Ag*-Ac). En esta situación se detectará la radioactividad máxima. Esta respuesta se conoce como referencia o unión máxima.



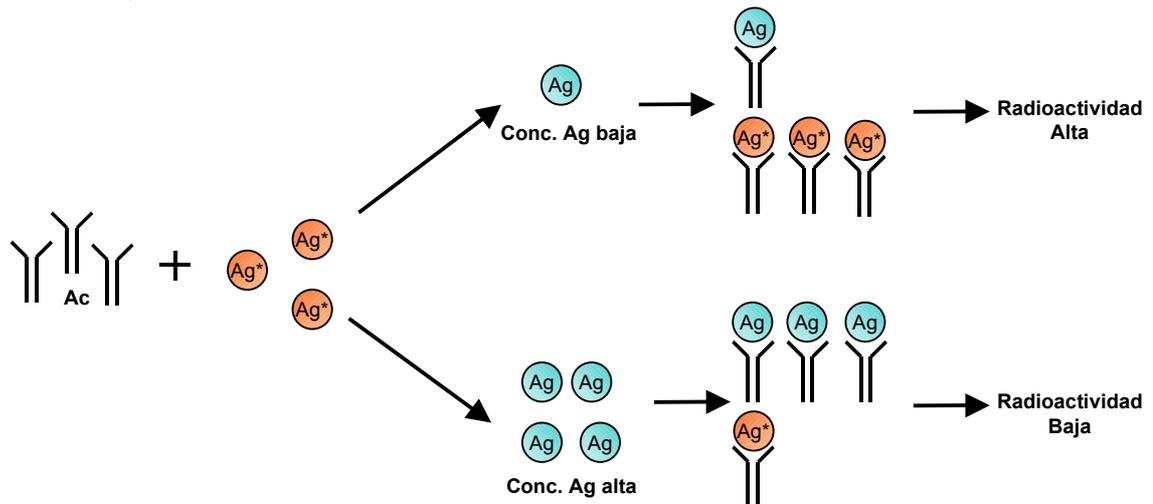
- Muestra con exceso infinito de antígeno no marcado (Ag): el Ag satura todos los puntos de unión disponibles formando máximo número de complejos no marcados (Ag-Ac). En esta situación no se detectará radioactividad. En la

práctica se detecta una pequeña cantidad de radioactividad residual, que se conoce como NSB ("non-specific binding", unión no específica).



Normalmente, el NSB se determina adicionando Ag^* a muestras sin Ac y sin Ag, midiendo la radioactividad remanente después de la separación.

- Muestra con Ag y Ag^* : la concentración de Ag^* es constante, mientras que la concentración del Ag depende de la muestra, pero con la característica que ambos antígenos (Ag y Ag^*) compiten con igual afinidad por la unión al Ac. Al existir Ag se forman complejos Ag-Ac (no marcados), provocando una disminución en la formación de complejos Ag^* -Ac (marcados radioactivamente). De esta manera se establece la relación de: a más cantidad de antígeno no marcado (Ag) en la muestra (concentración elevada de analito en la muestra), se forman más complejos no marcados (Ag-Ac) y menos complejos marcados (Ag^* -Ac), y por lo tanto en estas muestras se detecta menos radioactividad.



Por este motivo, es posible establecer una curva de referencia (curva estándar) con concentraciones conocidas de antígeno no marcado y estimar por interpolación el contenido de lanreótida en las muestras con concentración desconocida.

2.1.3 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO GENERAL

Los diferentes procedimientos analíticos desarrollados para la determinación de lanreótida (uno para cada matriz biológica ensayada) son a grandes rasgos muy similares entre ellos. Por este motivo, se ha optado por describir un método general, común a todos los procedimientos analíticos realizados, indicando las diferencias específicas para cada método.

2.1.3.1 REACTIVOS

Los reactivos utilizados para el análisis son los siguientes:

- Trazador: I¹²⁵-Lanreótida
- Antisuero: Antisuero de conejo anti-lanreótida 582 (Beaufour-Ipsen Industrie²)
- Analito: lanreótida (Beaufour-Ipsen Industrie³)
- Ácido acético 100%, Merck
- Tampón A, compuesto por:
 - Albúmina bovina, ICN (160069.) o Sigma (A-9647)
 - Agua bidestilada, Braun 250 ml (648592) y 1 l (648618)
 - K₂HPO₄, Merck (1.05104.)
 - KH₂PO₄, Merck (1.04873.)
 - NaCl, Merck (6404.)
 - Azida sódica, Merck (S-2002)
 - Tritón X-100, Merck (1.12298.)
- Agente precipitante: 1-Propanol [análisis, SDS (940521) o Fisher (P/7486/17)].
- Matriz biológica: dependiendo del método se utilizará suero de rata, suero de perro, suero humano, plasma humano o plasma de cerdo.

2.1.3.2 EQUIPOS

A continuación se detallan todos los equipos utilizados para realizar el análisis:

- Contadores gamma: COBRA II (Packard) y WIZARD 1470 (Wallac)
- Kemble Dilutor (Guardian Spi)
- 6950005 System Washer (Nichols Institute Diagnostic)
- Centrífuga (+4 °C, 2500 g durante 30 minutos, Beckman)
- Frigorífico + 4 °C (Liebherr)
- Congelador -20 °C (Liebherr)
- Congelador -80 °C (Revco)
- Tubos de poliestireno (PS, Nirco)
- Tubos de polipropileno (PP, Nirco)
- Pipetas automáticas (1µl-5ml, Biohit)
- Multipipeta (Eppendorff)
- Dispensette® (1ml, Brand)

2.1.3.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

A continuación se describen todas las soluciones requeridas para realizar el análisis por RIA.

2.1.3.3.1 Tampón A

El tapón A se obtuvo al mezclar los siguientes productos:

Tampón fosfato 1M pH=7.4	100 ml
Cloruro sódico	9 g
Albúmina bovina (BSA)	2 g
Azida sódica 1%	10 ml
Triton X-100	1 ml
Agua bidestilada <i>q.s.p.</i>	1000 ml

2.1.3.3.2 Solución estándar de lanreótida de 1 mg/ml

La solución estándar se preparó disolviendo lanreótida en una solución de ácido acético 0.1 M hasta una concentración final de 1 mg/ml ($\pm 5\%$). Inmediatamente después de su preparación, esta solución se analizó para determinar su concentración mediante UV-Vis empleando como referencia el coeficiente de extinción de la molécula analizada si éste está disponible, o bien empleando una solución patrón preparada a partir de un vial con contenido certificado. Una vez que la concentración fue determinada y ésta cumplía con la especificación establecida ($\pm 5\%$), se procedió a la identificación de principio activo y la determinación de la pureza cromatográfica empleando un método HPLC normalizado. La pureza cromatográfica fue contrastada frente a la especificación establecida de $\geq 99\%$ a 280 nm. Finalmente, dicha solución se distribuyó en alícuotas y se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en tubos de polipropileno por un periodo no superior a 6 meses.

2.1.3.4 MATRIZ BIOLÓGICA

Se han obtenido dos tipos de matrices biológicas (suero y plasma). El método de obtención tanto de suero como de plasma para las distintas especies animales utilizadas es el mismo:

2.1.3.4.1 Obtención de suero

La sangre se obtuvo sin anticoagulantes proveniente de las distintas especies ensayadas (rata, perro, cerdo y hombre).

Después de la formación del coágulo, los tubos fueron centrifugados a 2500 g durante 15 a 20 minutos a $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, y el suero obtenido se separó y se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en tubos de polipropileno hasta el día del análisis.

2.1.3.4.2 Obtención de plasma

La sangre se obtuvo a partir de las distintas especies animales con heparina sódica al 5% (15 μl Heparina / ml sangre) como anticoagulante.

Los tubos fueron centrifugados a 2500 g durante 15 a 20 minutos a $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, y el plasma obtenido se separó y se congeló a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en tubos de polipropileno hasta el día del análisis.

2.1.3.4.3 Curva estándar

La curva estándar se preparó a partir de una alícuota de la solución madre de 1 mg/ml de lanreótida, y para cada validación se utilizó la matriz biológica correspondiente. Los diferentes pasos para la preparación la curva estándar fueron los siguientes:

- **Solución A** (10 µg/ml)
50 µl Solución 1 mg/ml + 4.95 ml tampón A
- **Solución B** (250 ng/ml)
100 µl Solución A + 3.9 ml tampón A
- **Solución C** (10 ng/ml)
100 µl Solución B + 2.4 ml matriz biológica
- **Estándar S7** (1.25 ng/ml)
125 µl Solución C + 875 µl matriz biológica
- **Estándar S6** (0.625 ng/ml)
500 µl S7 + 500 µl matriz biológica
- **Estándar S5** (0.3125 ng/ml)
500 µl S6 + 500 µl matriz biológica
- **Estándar S4** (0.1563 ng/ml)
500 µl S5 + 500 µl matriz biológica
- **Estándar S3** (0.0781 ng/ml)
500 µl S4 + 500 µl matriz biológica
- **Estándar S2** (0.0391 ng/ml)
500 µl S3 + 500 µl matriz biológica
- **Estándar S1** (0.0195 ng/ml)
500 µl S2 + 500 µl matriz biológica

Las soluciones así obtenidas constituyeron los distintos estándares utilizados durante la validación. Estas soluciones se prepararon diariamente y todas las operaciones de preparación y almacenamiento se realizaron en frío, ya sea situando las gradillas sobre hielo picado o trabajando a +4°C.

En el caso de la validación del plasma de cerdo, la curva estándar sólo estuvo compuesta por 6 estándares (se ha eliminado el estándar de 0.0195 ng/ml). Se optó por eliminar este estándar, ya que al ser la última validación realizada, se comprobó que 6 estándares eran suficientes para obtener adecuado un perfil de la curva estándar.

2.1.3.4.4 Controles de calidad

Los controles de calidad se prepararon con la misma matriz biológica utilizada para preparar la curva estándar. Se prepararon controles de calidad de 10, 1, 0.8, 0.4, 0.25, 0.2 y 0.1 ng/ml para todas las matrices ensayadas con la excepción del plasma de cerdo, donde solo se prepararon los controles de calidad de 1, 0.4 y 0.1 ng/ml. Al igual que la curva estándar, los controles de calidad se prepararon a

partir de la solución estándar de lanreótida de 1 mg/ml, utilizando la matriz biológica correspondiente, siguiendo los siguientes pasos:

- **Solución A** (10 µg/ml)
50 µl Solución 1 mg/ml + 4.95 ml tampón A
- **Solución B** (250 ng/ml)
100 µl Solución A + 3.9 ml tampón A
- **Solución C** (10 ng/ml)
200 µl Solución B + 4.8 ml matriz biológica
- **QC1** (10 ng/ml)
100 µl Solución B + 2.4 ml matriz biológica
- **QC2** (1 ng/ml)
200 µl QC1 + 1.8 ml matriz biológica
- **QC3** (0.8 ng/ml)
800 µl QC1 + 9.2 ml matriz biológica
- **QC4** (0.4 ng/ml)
5 ml QC3 + 5 ml matriz biológica
- **QC5** (0.25 ng/ml)
125 µl QC1 + 4.875 ml matriz biológica
- **QC6** (0.2 ng/ml)
5 ml QC4 + 5 ml matriz biológica
- **QC7** (0.1 ng/ml)
2.5 ml QC6 + 2.5 ml matriz biológica

Una vez preparados los controles de calidad, se distribuyeron en alícuotas en tubos de polipropileno, y fueron almacenados a -20°C por un periodo no superior a 6 meses. Todas las operaciones se realizaron en frío, trabajando sobre hielo picado o a +4°C.

Para determinar el valor del QC1 y QC2 en una secuencia analítica, fue necesario diluir con matriz biológica 40 y 5 veces, respectivamente, ya que sus concentraciones se encuentran fuera del margen de la curva estándar.

2.1.3.4.5 Solución de trazador de lanreótida

El trazador corresponde a la misma molécula en estudio, la lanreótida, pero marcada radioactivamente con I¹²⁵ en la tirosina.

El marcaje con ¹²⁵I se realizó por el servicio de inmunología de Ipsen Pharma, S.A., mediante el método de yodógeno⁴.

La calidad del trazador se comprobó midiendo su inmunoreactividad con el antisuero 582 anti-lanreótida. Las fracciones con la misma inmunoreactividad se mezclaron y se distribuyeron en alícuotas que fueron almacenadas a -80°C.

Antes de cada ensayo, se descongeló la cantidad necesaria de trazador y se diluyó con tampón A, hasta alcanzar una concentración de aproximadamente 10000 cpm/100µl. El volumen de trazador y tampón A necesarios para obtener

los 10000 cpm/100µl, dependió de la actividad del lote del trazador y del decaimiento característico del I^{125} .

Una vez se preparada la dilución del trazador, se recogieron 100 µl en un tubo de poliestireno y se analizaron en el contador gamma para confirmar la concentración deseada (10000 cpm/100µl), aceptando una variación de hasta un $\pm 20\%$ sobre el valor teórico (8000-12000 cpm/100µl).

2.1.3.4.6 Solución de antisuero anti-lanreótida

El antisuero policlonal de conejo utilizado para el ensayo (ref.: 582), se ha obtenido de Beaufour-Ipsen Industrie². El antisuero se encuentra diluido al 50% con glicerol, almacenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se utiliza a una dilución final de 1:80000 en tampón A. La obtención del antisuero se realizó por inmunización de conejos. Para la caracterización del antisuero se desarrollaron las siguientes pruebas: inmunoreactividad y especificidad.

2.1.3.4.6.1 Inmunoreactividad

La inmunoreactividad permite determinar la dilución de Ac óptima para realizar el análisis por RIA. Esta prueba, comprende la incubación de una cantidad fija de Ag^* con diferentes diluciones seriadas de Ac. Se determina el porcentaje de unión ($\%B_0$), que es el porcentaje de Ag^* unido al Ac respecto a la radioactividad total (T) a cada dilución de Ac. Finalmente, se representan gráficamente en escala semi-logarítmica los valores de $\%B_0$ frente a las diluciones seriadas del antisuero.

La dilución de Ac óptima para realizar el análisis por RIA es la que permite unir aproximadamente un 50% del Ag^* . En el antisuero anti-lanreótida 582 se determinó una dilución 1:80000, como la dilución óptima para realizar el análisis (ver Figura 1).

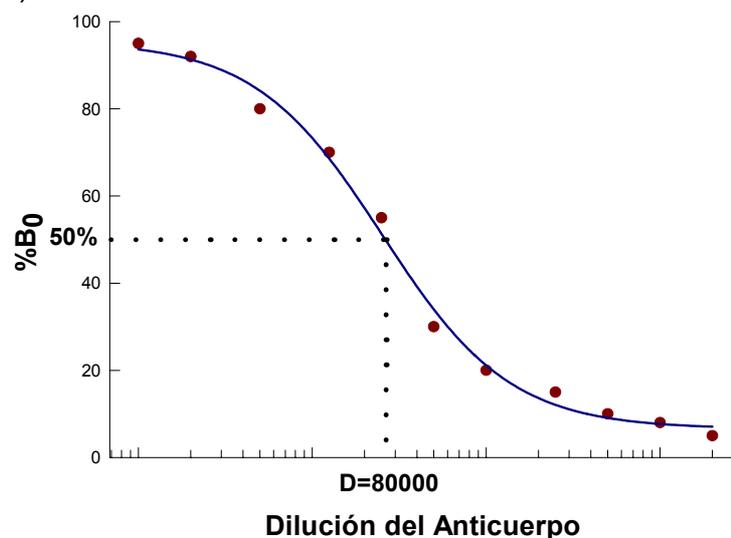


Figura 1. Inmunoreactividad del antisuero anti-lanreótida

2.1.3.4.6.2 Especificidad

La especificidad es la capacidad para medir el analito unívocamente en presencia de otros componentes, tanto endógenos como exógenos. La determinación de la especificidad de un anticuerpo se realiza mediante reacciones cruzadas ("Cross-Reactivity"). La "Cross-Reactivity" es la reacción de un anticuerpo con un antígeno diferente al que ha provocado la formación del anticuerpo, debido a la presencia de determinantes antigénicos similares pero no idénticos al inmunógeno.

La especificidad de la interacción Antígeno-Anticuerpo está limitada por la heterogeneidad del anticuerpo policlonal y por las concentraciones relativas de compuestos estructuralmente similares en la muestra a analizar. La poca selectividad del anticuerpo policlonal es debida a la presencia de anticuerpos específicos a diferentes epitopos del antígeno.

La importancia en la determinación de la "Cross-Reactivity" radica principalmente en poder determinar el grado de interferencia que uno o más "crossreactantes" pueden causar en el ensayo, entendiendo como "crossreactante" como cualquier sustancia endógena o exógena susceptible de unirse al Ac.

La "Cross-Reactivity" se puede calcular mediante diferentes métodos, pero el método más utilizado es el método del 50% de desplazamiento. En este método son comparadas las concentraciones de analito primario (estándar, S) y "crossreactante (CR)" necesarias para desplazar el 50% del antígeno marcado. Estas curvas de desplazamiento se preparan por incubación de diferentes concentraciones de estándar o "crossreactante" con una cantidad constante de antígeno marcado y anticuerpo. Después de cuantificar la fracción unida a cada concentración, se ajustan las curvas mediante el modelo 4PL (ver apartado 2.1.3.6) y se determina el EC_{50} del estándar y del "crossreactante". La relación entre los EC_{50} , expresado en tanto por ciento, representa la "Cross-Reactivity":

$$CR_{50\%} = \left(\frac{EC_{50}S}{EC_{50}CR} \right) \cdot 100 \quad (\text{Ec. 6})$$

- $CR_{50\%}$: es la "Cross-Reactivity"
- $EC_{50}S$: valor que corresponde al porcentaje del EC_{50} de la lanreótida
- $EC_{50}CR$: valor que corresponde al porcentaje del EC_{50} de la sustancia, posible "crossreactante".

Sobre el anticuerpo anti-lanreótida utilizado, se realizaron diversas reacciones cruzadas principalmente con dos grupos de sustancias: con los fragmentos del péptido y con sustancias endógenas donde la somatostatina se encuentra implicada directa o indirectamente. Las sustancias ensayadas fueron las siguientes:

- Todos los fragmentos del péptido.

- Sustancia endógenas:
 - Somatostatina (14 y 28 aminoácidos)
 - Sustancia P
 - hInsulina
 - Glucagon
 - hGH (Hormona del crecimiento)
 - Péptido intestinal vasoactivo (VIP)
 - Factor de liberación de corticotropina
 - Vasopresina
 - Oxitocina
 - β - endorfina
 - Hormona liberadora de gonadotropinas

En cada una de las sustancias ensayadas, se concluyó que no existe reacción cruzada significativa con el anticuerpo anti-lanreótida, al haber obtenido en todos los casos un valor de $CR_{50\%}$ inferior al 0.1%.

2.1.3.5 PROTOCOLO ANALÍTICO DE VALIDACIÓN

En este epígrafe, se describe el procedimiento seguido para realizar el análisis por RIA para todas las matrices biológicas ensayadas. Primero, se realiza la curva estándar y las diluciones de las muestras correspondientes a la secuencia analítica, y seguidamente se prepara la solución de anticuerpo y trazador. Todas las operaciones de preparación se han realizado en frío (sobre hielo picado o a +4°C). Una vez se dispone de todos los reactivos, se procede mediante pipetas automáticas o con el dispensador automático (Kemble) a efectuar propiamente el análisis por RIA siguiendo los pasos descritos en la Tabla 1. En esta tabla se detallan los diferentes reactivos que se han de adicionar a cada uno de los tubos (total, blanco, referencia, estándar, controles y muestras) en los que se realiza el análisis por RIA.

REACTIVOS (μ l)	T (Total)	B (Blanco)	O (Referencia)	QC y STD (Controles y estándar)	MUESTRAS
Matriz	--	50	50	--	--
STD y QC	--	--	--	50	--
Muestras	--	--	--	--	50
Tampón A	--	200	100	100	100
Anticuerpo	--	--	100	100	100
Trazador	100	100	100	100	100
Agitar e incubar 48 horas a 4 °C					
1- Propanol	--	1000	1000	1000	1000
Centrifugar 30 minutos a 2500g a 4 °C					
Aspirar sobrenadante					
Contaje					

Tabla 1. Resumen del proceso de análisis por radioinmunoanálisis.

Una vez dispensados todos los productos se procede a:

- Incubar durante 48 horas a 4°C (incubación mínima de 40 h y máxima de 56 h)
- Añadir, con un Dispensette® o pipeta automática, el agente precipitante (1 ml de 1-propanol) atemperado a 4°C a todos los tubos menos al total. Agitar y centrifugar a 2500 g durante 30 minutos a 4°C.
- Aspirar el sobrenadante con el aspirador automático o mediante una pipeta Pasteur acoplada a una bomba de vacío y contar la radioactividad del “pellet” (fracción ligada) en el contador gamma (determinación de la radioactividad durante 3 minutos y ajustando la curva estándar a la función 4PL, ver siguiente epígrafe).

2.1.3.6 CÁLCULOS

Cada secuencia analítica disponía de una curva estándar y el contador realizaba automáticamente una serie de cálculos:

- Determinación de la unión no específica (NSB%): ver apartado 2.1.1.
- Determinación de la unión máxima (B_0): ver apartado 2.1.1.
- Determinación de los porcentajes de unión para cada punto de la curva estándar, controles y para cada muestra, aplicando la siguiente ecuación:

$$\frac{B}{B_0} = \frac{S_n - \text{Blanco}}{\text{Referencia} - \text{Blanco}} \quad (\text{Ec. 7})$$

- B/B_0 : el porcentaje de unión respecto de la unión máxima para cada punto de la curva estándar, controles y muestras.
- S_n : media de las cpm de los replicados de cada punto de la curva estándar, controles y muestras.
- Blanco: media de las cpm de los blancos (“B”).
- Referencia: media de las cpm de los tubos "Referencia".

Los porcentajes de unión (B/B_0) de los distintos puntos de la curva fueron estimados automáticamente (ecuación 7) y fueron representados en función del logaritmo de la concentración (Figura 2). Automáticamente se ajustó la función 4PL (four-parameter logistic model) a los datos de la curva obtenidos. La función 4PL proporciona una precisa representación de la relación sigmoideal entre la respuesta medida y el logaritmo de la concentración. La expresión matemática de dicha función es la siguiente:

$$Y = \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b} + d \quad (\text{Ec. 8})$$

Y: variable dependiente, cpm

x: variable independiente, las concentraciones de los estándares.

a, b, c y d son los parámetros de la ecuación correspondientes a:

- a: respuesta a dosis cero (Referencia).
- b: la pendiente de la curva cuando $y=(B_0+NSB)/2$.
- c: el ED₅₀ (valor de x resultante de la respuesta "y" cuando toma el valor medio entre "a" y "d").
- d: la respuesta a dosis infinita (NSB).

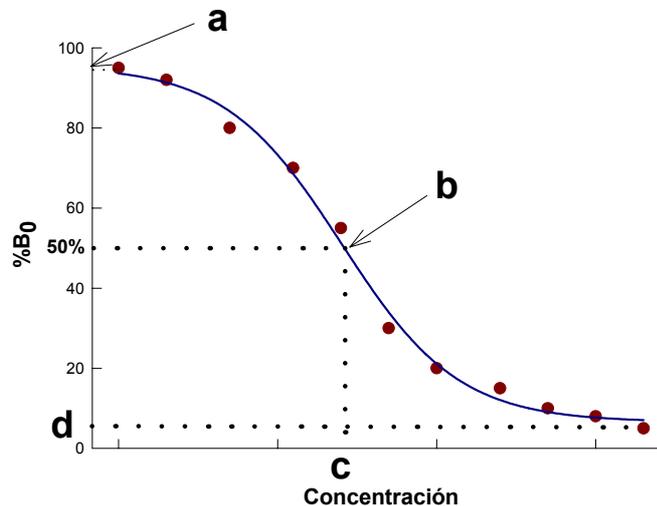


Figura 2. Representación gráfica de los principales parámetros de la función 4PL.

Para obtener el resultado de la concentración de lanreótida de cualquier muestra de la secuencia analítica, el contador realizó los siguientes pasos:

- Cálculo el B/B₀ de la muestra (ecuación 7).
- Interpolación de este valor en la curva de calibrado.
- Obtención a través de la función ajustada del valor de la concentración de lanreótida en la muestra.

La concentración que se obtuvo se encontraba expresada en pg/50µl (al encontrarse los estándares de la curva expresados en pg/50µl), por este motivo para expresar la concentración en ng/ml, se aplicó la ecuación 9 a cada muestra:

$$C \text{ (ng/ml)} = C_p \cdot 0.02 \cdot D \quad (\text{Ec. 9})$$

- C (ng/ml): es la concentración final de la muestra expresada en ng/ml.
- C_p: es la concentración obtenida por interpolación en la curva estándar, expresada en pg/50µl.
- 0.02: factor de conversión de pg/50µl a ng/ml.
- D: factor de dilución a la que se ha sometido la muestra.

2.1.4 VALIDACIONES ANALÍTICAS

Para cada una de las matrices biológicas ensayadas, se realizaron las siguientes pruebas, para así poder determinar los parámetros básicos de la validación de cada método analítico.

2.1.4.1 PERFIL DE PRECISIÓN DE LA CURVA ESTÁNDAR

El perfil de precisión es la representación gráfica de la relación entre el CV% de las medidas analíticas de cada uno de los estándares de la curva (STD) y el valor teórico de concentración de dichos estándares.

A partir de los recalculados de la curva estándar (cada nivel de concentración se ensayó por triplicado), se calculó el coeficiente de variación para cada estándar expresado en porcentaje (CV%). Este cálculo se realizó en las 6 curvas estándares de validación. La precisión (CV%) del valor medio de las 6 curvas estándar para cada estándar no debía exceder el 15%, excepto para el límite de cuantificación (LOQ) que no debía exceder el 20%.

La gráfica del perfil de precisión, se obtuvo al representar en escala semilogarítmica, los valores de concentración de cada estándar de la curva frente al coeficiente de variación medio para cada estándar de las 6 curvas ensayadas (log concentración vs CV%).

2.1.4.2 DETERMINACIÓN DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)

El límite de cuantificación (LOQ) es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser medida con niveles aceptables de exactitud (<20%) y precisión (<20%).

El límite de cuantificación se determinó como la concentración más baja de la curva estándar que pudo ser medida con aceptable exactitud y precisión mediante el perfil de precisión de la curva estándar⁵.

2.1.4.3 DETERMINACIÓN DEL PARALELISMO

El paralelismo permite comprobar que no existen sustancias interferentes en la matriz biológica que puedan invalidar el ensayo, verificando que existe simetría entre la pendiente de la curva estándar y la pendiente obtenida al realizar varias diluciones de una misma muestra.

Para la determinación del paralelismo, se prepararon diluciones consecutivas de controles de lanreótida (se añade una cantidad de estándar de lanreótida a la matriz biológica) hasta obtener controles con las siguientes concentraciones: 0.8, 0.4, 0.2 y 0.1 ng/ml. La pendiente de la curva resultante (curva de controles) se comparó con la pendiente obtenida de la curva estándar.

Para poder comparar las pendientes, los datos fueron transformados mediante la función logit-log, y el paralelismo de las pendientes de las dos regresiones lineales fueron comprobados mediante el test de la "t de Student" para datos no apareados. Ambas curvas fueron consideradas paralelas, cuando sus pendientes no mostraron diferencias estadísticamente significativas a un nivel de probabilidad del 95%.

En el caso del plasma de cerdo, solo se utilizaron los controles de 0.4 y 0.1 ng/ml, por este motivo, al no disponer de suficientes grados de libertad, solo se realizó la comprobación del paralelismo gráficamente.

2.1.4.4 DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD

La exactitud de un método analítico describe el grado de proximidad entre el valor determinado por un método analítico con el valor real conocido bajo unas condiciones preestablecidas.

Para la determinación de la exactitud, se utilizaron los mismos controles de calidad preparados para la determinación del paralelismo. La exactitud representa una medida cuantitativa de la proximidad de un resultado observado respecto su valor teórico real, expresado como tanto por ciento de la concentración nominal (teórica). Se calculó mediante el cociente entre la concentración de la lanreótida determinada por RIA y la concentración de lanreótida teórica, utilizando la siguiente expresión:

$$\text{Exactitud}(\%) = \frac{\text{Lanreotida(RIA)}}{\text{Lanreotida(Teorica)}} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 10})$$

El valor medio estimado debía de estar comprendido entre el $\pm 15\%$ del valor teórico, con la excepción del LOQ que no debía desviarse más de un $\pm 20\%$.

2.1.4.5 DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN

La precisión de un método analítico describe el grado de proximidad entre una serie de medidas obtenidas por un muestreo múltiple de la misma muestra homogénea bajo unas condiciones preestablecidas.

Para la determinación de la precisión, se prepararon controles de calidad a cinco niveles distintos de concentración: 10, 1, 0.8, 0.25 y 0.1 ng/ml. Seis duplicados de cada control de calidad fueron preparados y analizados para cada secuencia analítica, realizándose un total de seis secuencias analíticas. Los resultados fueron analizados por un análisis de varianza de un factor⁶, calculándose los siguientes parámetros:

- Repetibilidad (intra-ensayo): expresa la precisión encontrada dentro de una misma secuencia analítica.
- Reproducibilidad (inter-ensayo): mide la precisión con el tiempo. Por ejemplo el análisis de las mismas muestras en diferentes días (diferentes secuencias analíticas) con diferentes reactivos, diferentes analistas, etc.

El valor medio de precisión no debía exceder el $\pm 15\%$ (CV%), a excepción de las muestras cercanas al LOQ que no debían exceder el $\pm 20\%$ de CV%.

2.1.4.6 EFECTO MATRIZ

El efecto matriz se define como la interferencia directa o indirecta en la respuesta analítica, causada por la presencia de otros analitos que no son determinados por el método analítico o por la presencia de factores no específicos en la muestra. Estos factores son principalmente el pH, cationes, viscosidad de la muestra, proteínas séricas, anticoagulantes, proteínas de unión, etc. Los inmunoensayos son más propensos a las interferencias analíticas con la matriz que los ensayos cromatográficos, ya que se suelen realizar sin un proceso de extracción previo. En el efecto matriz, se comprobó que se obtenían resultados similares al analizar

diferentes controles de calidad preparados con matrices biológicas provenientes de diferentes sujetos y los controles de calidad control (preparados con una mezcla de matrices biológicas provenientes de distintos sujetos). De esta manera se pretendió demostrar que no existían factores individuales que podían afectar al ensayo. El efecto matriz se investigó para cada tipo de matriz biológica, con la excepción del plasma de cerdo, ya que no se disponía de matriz biológica de distintos animales. Para evaluar el efecto matriz, se preparan 4 controles de calidad (0.8, 0.4, 0.2 y 0.15 ng/ml) utilizando matriz biológica de cinco sujetos distintos (4 sujetos distintos en el caso del suero de perro). Se preparó también otro grupo de controles de calidad pero utilizando como matriz biológica una mezcla de matrices biológicas provenientes de distintos sujetos, para así obtener un valor de referencia. Los controles se prepararon de la siguiente manera:

- **Solución A** (10 µg/ml)
50 µl Solución 1 mg/ml + 4.95 ml tampón A
- **Solución B** (250 ng/ml)
100 µl Solución A + 3.9 ml tampón A
- **QM1** (0.8 ng/ml)
50 µl Solución B + 1.2 ml matriz biológica (**Solución C**)
100 µl Solución C + 1.15 ml matriz biológica
- **QM2** (0.4 ng/ml)
500 µl QM1 + 500 µl matriz biológica
- **QM3** (0.2 ng/ml)
500 µl QM2 + 500 µl matriz biológica
- **QM4** (0.15 ng/ml)
375 µl QM3 + 125 µl matriz biológica

La concentración de lanreótida para cada uno de los controles se determinó en una curva estándar preparada con la misma matriz de preparación de los controles de referencia. Los resultados de estos controles fueron analizados mediante un análisis de covarianza (utilizando el nivel de concentración como covariable) para poder detectar las posibles diferencias entre la matriz biológica de cada individuo respecto al valor de referencia (control).

2.1.4.7 ESTABILIDAD

La estabilidad de un fármaco en un fluido biológico es función de las condiciones de almacenamiento, las propiedades químicas del principio activo, la matriz, etc. Por este motivo, se comprobó la estabilidad del principio activo después de periodos de almacenamiento cortos y largos, después de varios ciclos de congelación y descongelación y la estabilidad durante todo el proceso analítico. Las condiciones utilizadas para evaluar la estabilidad de la lanreótida debían reflejar situaciones similares a las encontradas durante el análisis de muestras.

Para la determinación de la estabilidad en suero rata se prepararon controles de calidad a tres niveles distintos de concentración: 100, 10 y 0.1 ng/ml:

- **Solución A** (1 µg/100 µl)
50 µl Solución 1 mg/ml + 4.95 ml tampón A
- **QS1** (100 ng/ml)
500 µl Solución A + 500 µl tampón A (**Solución B**)
20 µl Solución B + 980 µl matriz biológica
- **QS2** (10 ng/ml)
200 µl QS1 + 1800 µl matriz biológica
- **QS3** (0.1 ng/ml)
50 µl QS2 + 4950 µl matriz biológica

Para la determinación de la estabilidad en suero de perro, suero humano, plasma humano y plasma de cerdo se prepararon controles de calidad a tres niveles distintos de concentración: 1, 0.4 y 0.1 ng/ml. Se reemplazaron los controles de concentraciones elevadas para evitar el tener que realizar diluciones altas:

- **Solución A** (1 µg/100 µl)
50 µl Solución 1 mg/ml + 4.95 ml tampón A
- **Solución B** (25 ng/100µl)
100 µl Solución A + 3.9 ml tampón A
- **Solución C** (1000 pg/100 µl)
200 µl Solución B + 4.8 ml matriz biológica
- **QS1** (1 ng/ml)
2 ml Solución C + 18 ml matriz biológica
- **QS2** (0.4 ng/ml)
0.8 ml Solución C + 19.2 ml matriz biológica
- **QS3** (0.1 ng/ml)
2 ml Solución QS1 + 18 ml matriz biológica

Las condiciones de los diferentes ensayos de estabilidad fueron los siguientes:

- Tres ciclos congelación/descongelación: se comprobó que la lanreótida era estable tras tres ciclos de congelación/descongelación, ya que normalmente para obtener el resultado final de una muestra no era necesario descongelar una muestra más de tres veces.
- Estabilidad a 4°C y 20°C durante 2, 6 y 24 horas: se comprobó que la lanreótida era estable a la temperatura normal de trabajo (4°C) durante el tiempo habitual para realizar un análisis (aproximadamente unas 4 horas). También se comprobó el efecto de trabajar a temperatura ambiente (20°C).
- Estabilidad a -20°C (desde tiempo cero hasta 1 a 19 meses): se comprobó la estabilidad de la lanreótida a la temperatura de almacenamiento (-20°C) durante periodos de tiempo prolongados, permitiendo asegurar que durante el periodo de almacenamiento previo a realizar la determinación del péptido, la concentración de lanreótida, no se vio alterada.

En el caso de plasma de cerdo sólo se estudió la estabilidad del fármaco a la temperatura de almacenamiento (-20°C).

Las concentraciones de lanreótida obtenidas en los diferentes controles de estabilidad sometidos a las diferentes condiciones de estabilidad, fueron comparadas con las respectivas concentraciones de lanreótida obtenidas a tiempo cero (t=0). La lanreótida fue considerada estable en las condiciones de estabilidad ensayadas, cuando las concentraciones obtenidas en los controles sometidos a dichas condiciones de estabilidad se encontraban entre el $\pm 20\%$ del valor teórico del control de estabilidad.

2.1.5 BASES DEL ANÁLISIS EN RUTINA

Una vez finalizada la validación, donde se ha establecido el límite de cuantificación, el margen de valores validados, etc., se procedió a describir el proceso de análisis que se debía aplicar durante el análisis en rutina de las muestras provenientes de los estudios farmacocinéticos. El análisis en rutina es esencialmente el mismo que el utilizado durante la validación, pero con ciertas modificaciones, que permitieron agilizar el análisis.

2.1.5.1 PROCESO DE ANÁLISIS EN RUTINA

En base a los resultados obtenidos durante la validación, se optó durante el análisis en rutina por modificar algunos aspectos del proceso de análisis. Estas modificaciones afectaron principalmente a la curva estándar y a los controles de calidad:

- **Curva estándar:** en el análisis en rutina, se optó por solo utilizar 6 estándares (se elimina el estándar de 0.0195 ng/ml). Se comprobó que era suficiente con 6 estándares para definir correctamente el perfil de la curva estándar.
- **Controles de Calidad:** la exactitud y precisión durante el análisis en rutina fueron monitorizados en cada secuencia analítica para asegurar que el método continuaba comportándose satisfactoriamente. Para este control, se prepararon controles de calidad a tres niveles de concentración que cubrían todo el margen de trabajo de la curva estándar (Q1=1 ng/ml, Q2=0.4 ng/ml y Q3=0.1 ng/ml). Se disponía de un total de 6 controles de calidad para cada secuencia analítica, 2 controles para cada uno de los 3 niveles de concentración distintos, distribuidos por parejas (Q1-Q2, Q2-Q3 y Q1-Q3) al principio, mitad y al final de la secuencia analítica. Tanto las muestras problema como los controles de calidad fueron analizados por duplicado.

Todos los demás procesos (preparación solución anticuerpo, tampón A, trazador, protocolo analítico, etc.) fueron exactamente iguales a los descritos en la validación.

2.1.5.2 CRITERIOS DE ACEPTACIÓN DE RESULTADOS

La aceptación de los resultados analíticos en rutina fueron monitorizados para cada secuencia analítica. Se establecieron dos tipos de criterios de aceptación de resultados:

- **Los criterios de aceptación de la curva estándar**

Permitían evaluar si la secuencia analítica era válida o debía repetirse. Se establecieron los siguientes criterios de aceptación:

- **B₀**: no debía ser inferior al 25%
- **NSB%**: no debía ser superior al 10%
- **QC**: Se estableció para cada nivel de concentración de control de calidad un margen de $\pm 20\%$ sobre el valor teórico, fijándose los siguientes límites:
 - Q1 (1 ng/ml): 0.8-1.2 ng/ml
 - Q2 (0.4 ng/ml): 0.32-0.48 ng/ml
 - Q3 (0.1 ng/ml): 0.08-0.12 ng/ml

Se estableció como criterio el **4/6/20**, que significa que para aceptar una secuencia analítica como correcta, la concentración de cómo mínimo 4 de los 6 controles de calidad debía de encontrarse dentro del $\pm 20\%$ respecto a su valor teórico, siempre que los 2 controles que no cumplían el criterio no pertenecieran a la misma concentración teórica (mismo control).

En el caso de no cumplirse todos los requisitos, la secuencia analítica era anulada y ningún resultado obtenido era considerado como válido.

- **Criterios de repetición de una muestra:**

Permitían evaluar si el resultado de una muestra era correcto o no. Se establecieron los siguientes criterios:

- El valor de concentración determinado para la muestra se encuentra dentro del margen de trabajo de la curva estándar (0.0781 ng/ml a 0.480 ng/ml).
- El CV% entre los dos replicados de la muestra (cada muestra se analiza por duplicado) era menor del 15%.

En el caso de no cumplirse los dos requisitos, el resultado de la muestra no se consideraba válido y se repetía el análisis de dicha muestra.

2.2 ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS

La presente Memoria incluye varios estudios farmacocinéticos realizados con la lanreótida en cuatro especies animales distintas: rata, perro, cerdo y el hombre. Indicar que los parámetros farmacocinéticos del fármaco en las distintas especies animales fueron estimados utilizando las concentraciones sin la corrección por el valor de la unión a proteínas plasmáticas.

Los distintos estudios farmacocinéticos realizados se detallan a continuación.

2.2.1 TERMINOLOGÍA

Se describe a continuación el significado de los diferentes términos implicados en los estudios farmacocinéticos desarrollados:

- **PK:** farmacocinética.
- **iv:** administración por vía intravenosa.
- **sc:** administración por vía subcutánea.
- **im:** administración por vía intramuscular.

2.2.2 ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN LA RATA

Se han realizado varios estudios farmacocinéticos en la rata, administrando la lanreótida por dos vías distintas (vía intravenosa y vía subcutánea).

2.2.2.1 ANIMALES

Para todos los estudios farmacocinéticos se utilizaron ratas macho albinas "Sprague-Dawley" obtenidas de "Janvier" (Francia) o "CERJ" (Le Genest-Saint Isle, Francia) con un peso comprendido entre 222 a 346 g.

Se utilizaron seis animales por grupo, aunque se incluyeron adicionalmente más animales a cada grupo con la finalidad de poder asegurar de disponer al final del estudio un mínimo de seis animales por grupo. Las ratas incluidas en el estudio estuvieron un mínimo de 5 días de cuarentena antes de ser incluidas en el estudio experimental. La habitación fue mantenida en ciclos de luz - oscuridad de 12 horas, a una temperatura de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de $55\pm 10\%$. Las ratas tenían libre acceso para beber agua y se les suministró una dieta de roedores durante todo el estudio. Se mantuvieron en ayunas durante un periodo de 18 horas antes de la primera administración de lanreótida. Durante todo el estudio, las ratas estaban identificadas mediante un tatuaje de tinta en la cola. Se realizaron dos certificados:

- Certificado veterinario general sobre el estado de salud de los animales.
- Certificado analítico sobre la calidad del agua y comida, y sobre las condiciones ambientales durante el estudio.

2.2.2.2 SOLUCIÓN DE ADMINISTRACIÓN

Se prepararon soluciones de acetato de lanreótida (con un contenido de péptido superior al 75%) a las siguientes concentraciones: 80, 200 y 2000 $\mu\text{g/ml}$. En función del estudio realizado (dosis única o dosis múltiple), se requirió de más o menos volumen de solución de administración, por este motivo se procede a describir las distintas preparaciones realizadas.

Para obtener las soluciones de 80, 200 y 2000 $\mu\text{g/ml}$ se pesaron exactamente 24 o 50 mg de acetato de lanreótida y se disolvieron en 12 o 25 ml de solución fisiológica salina, respectivamente, obteniéndose una solución de 2000 $\mu\text{g/ml}$ (Solución A). Entonces se procedió con uno de los siguientes pasos:

- 10 y 3 ml de la Solución A fueron diluidos en 25 y 30 ml de solución fisiológica salina para alcanzar la concentración de 80 y 200 µg/ml, respectivamente.
- 1 y 0.4 ml de la Solución A fueron diluidos en 10 ml de solución fisiológica salina para alcanzar la concentración de 80 y 200 µg/ml, respectivamente.

2.2.2.3 OBTENCION SUERO DE RATA

A cada tiempo experimental se extrajeron muestras de sangre sin anticoagulante de aproximadamente 0.2 ml a través una de las venas laterales de la cola. En el caso de la administración por vía intravenosa, para extraer las muestras, se utilizó la vena opuesta a la utilizada durante la administración. Después de la formación del coágulo, los tubos fueron centrifugados a 2500 g durante 15 minutos a +4 °C, y el suero obtenido se separó y congeló a -20 °C en tubos de polipropileno hasta el día del análisis. Tres días antes de la primera administración, se extrajo una muestra de unos 0.2 ml de sangre para poder obtener el basal para cada animal.

2.2.2.4 ESTUDIOS POR VÍA INTRAVENOSA

La administración de la solución de acetato de lanreótida por vía intravenosa se realizó en una de las venas caudales.

2.2.2.4.1 Dosis única bolus intravenoso

Se ha realizado un estudio farmacocinético tras la administración de un bolus intravenoso a tres dosis distintas de la solución de lanreótida:

- **80 µg/kg:** 6 ratas
- **200 µg/kg:** 6 ratas
- **2000 µg/kg:** 6 ratas

Cada una de las distintas dosis ensayadas, fueron administradas a seis ratas mediante la inyección de un bolus intravenoso a través de una de las venas caudales, con un volumen inyectado de 1 ml/kg.

Los tiempos teóricos de muestreo para cada dosis fueron los siguientes:

- **80 µg/kg:** 0, 2, 5, 15, 30 minutos y 1, 2, 4, 6 y 8 horas.
- **200 µg/kg:** 0, 2, 5, 15, 30 minutos y 1, 3, 6, 10, 14 y 24 horas.
- **2000 µg/kg:** 0, 2, 5, 15, 30 minutos y 1, 3, 6, 12, 24, 30, 36 y 48 horas.

2.2.2.5 ESTUDIOS POR VÍA SUBCUTÁNEA

La administración de la solución de acetato de lanreótida por vía subcutánea se realizó en la región interescapular (nuca). Se realizaron dos tipos de estudios farmacocinéticos: estudios tras la administración de una dosis única y estudios tras la administración de dosis múltiple de la solución de lanreótida.

2.2.2.5.1 Dosis única por vía subcutánea

Se ha realizado un estudio farmacocinético tras la administración subcutánea de una dosis única a tres niveles distintos de dosis de la solución de lanreótida:

- **80 µg/kg:** 6 ratas
- **200 µg/kg:** 6 ratas
- **2000 µg/kg:** 6 ratas

El acetato de lanreótida disuelto en la solución salina fue administrado por vía subcutánea a cada grupo de seis ratas. El volumen inyectado fue de 1 ml/kg.

Los tiempos teóricos de muestreo para cada dosis fueron los siguientes:

- **80 µg/kg:** 0, 2, 5, 15, 30 minutos y 1, 2, 4, 6 y 8 horas.
- **200 µg/kg:** 0, 2, 5, 15, 30 minutos y 1, 3, 6, 10, 14 y 24 horas.
- **2000 µg/kg:** 0, 2, 5, 15, 30 minutos y 1, 3, 6, 12, 24, 30, 36 y 48 horas.

2.2.2.5.2 Dosis múltiple por vía subcutánea

Se ha realizado un estudio farmacocinético tras la administración subcutánea de la solución de lanreótida en régimen de dosis múltiple durante 6 días a tres niveles de dosis distintas:

- **80 µg/kg/día** (40 µg/kg/12h): 6 ratas
- **200 µg/kg/día** (100 µg/kg/12h): 6 ratas
- **2000 µg/kg/día** (1000 µg/kg/12h): 6 ratas

La solución de lanreótida se administró cada 12 horas durante seis días a las dosis de 80, 200 y 2000 µg/kg/día (40, 100 y 1000 µg/kg/12horas). El volumen inyectado a cada administración fue de 0.5 ml de la correspondiente solución de lanreótida de 80, 200 y 2000 µg/ml. En el último día de estudio, los animales solo recibieron una administración (40, 100 o 1000 µg/kg), por tanto al final del estudio todas las ratas habían recibido un total de once dosis de 40, 100 o 1000 µg/kg.

Los tiempos teóricos de muestreo fueron los siguientes:

0 h, +12 h después de la primera dosis, +12 h después de la novena dosis (108 h), +12 h después de la décima dosis (120 h) y después de la última dosis (onceava dosis) +5 min (120.083 h), +15 min (120.250 h), +30 min (120.500 h), +90 min (121.500 h), +4 h (124.00 h), +8 h (128.00 h), +12 h (132.00 h), +24 h (144.000 h) (solo para las dosis de 200 y 2000 µg/kg/día) y +48 h (168 h) (solo para la dosis de 2000 µg/kg/día).

2.2.3 ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN EL PERRO

Se han realizado varios estudios farmacocinéticos en el perro, administrando la lanreótida por dos vías distintas (intravenosa y subcutánea).

2.2.3.1 ANIMALES

Se utilizaron un total de 18 perros Beagles obtenidos de Isoquimen (Barcelona) y de peso comprendido entre 9.3 a 16.8 kg. Cada perro se encontraba identificado con un tatuaje en la oreja.

La habitación fue mantenida en ciclos de luz - oscuridad de 12 horas, y fueron alojados en celdas individuales con unas condiciones ambientales ajustadas de 21±1°C y una humedad relativa de 65±15%. Los perros tenían libre acceso para

beber agua y eran alimentados una vez al día con una dieta de perro estándar durante todo el estudio, con la excepción de los periodos de ayuno requeridos (18 horas antes de la primera administración).

Se realizaron análisis bioquímico y hematológico a cada animal al empezar y al finalizar cada experimento. También se evaluó el comportamiento de los animales durante todo el estudio, y se observó cualquier signo de reacción al tratamiento.

2.2.3.2 SOLUCIÓN DE ADMINISTRACIÓN

El acetato de lanreótida fue administrado en forma de solución mediante una solución salina estéril. Se prepararon diferentes soluciones según la vía de administración:

- **Administración intravenosa en forma de bolus y por vía subcutánea:**

Se prepararon soluciones de 160 µg/ml, 400 µg/ml y 4000 µg/ml para administrar la dosis correspondiente en un volumen aproximado de 0.5ml/kg por día.

Las soluciones para la administración de dosis múltiples se almacenaron a 4°C y se filtraron a través de un filtro Millipore de 0.2 µm de diámetro diariamente antes de su administración. Se verificó la estabilidad de las soluciones a 4°C y 20°C antes de empezar el estudio.

- **Administración por infusión intravenosa:**

El acetato de lanreótida se disolvió en una solución salina estéril para conseguir soluciones de 25, 50 y 100 µg/ml. Las infusiones intravenosas fueron de 24 horas a una velocidad de infusión constante de 0.2 ml/h.

2.2.3.3 OBTENCION SUERO DE PERRO

A cada tiempo experimental, se extrajeron muestras de sangre sin anticoagulante de aproximadamente 1 ml de la vena cefálica (tras la administración iv se seleccionaba la vena por donde no ha sido administrado el animal). Después de la formación del coágulo, los tubos fueron centrifugados a 2500 g durante 15-20 minutos a +4 °C, y el suero obtenido se separó y congeló a -20 °C en tubos de polipropileno hasta el día del análisis. Antes de la primera administración de lanreótida, se extrajo una muestra de sangre para poder obtener el basal para cada animal.

2.2.3.4 ESTUDIOS POR VÍA INTRAVENOSA

Se han realizado diferentes estudios farmacocinéticos tras la administración de un bolus iv y de una infusión continua de la solución de lanreótida:

2.2.3.4.1 Dosis única bolus intravenoso

Se ha realizado un estudio farmacocinético tras la administración de un bolus intravenoso a tres niveles de dosis distintas de la solución de lanreótida en seis perros (machos):

- **80 µg/kg**
- **200 µg/kg**

- **2000 µg/kg**

La administración intravenosa de la solución de acetato de lanreótida se realizó mediante la inyección de un bolus a través de un catéter insertado en la vena cefálica.

Entre las diferentes administraciones intravenosas a cada perro se dejó pasar un periodo mínimo de blanqueo de 7 días.

Los tiempos teóricos de muestreo fueron los siguientes:

0, 1, 3, 5, 15, 30, 45 y 60 minutos y 2, 4, 6, 9, 12 y 24 horas. Se extrajeron muestras de sangre adicionales a 36 y 48 horas después de la administración de la dosis de 200 µg/kg y a 36, 48, 60 y 72 horas después de la administración de la dosis de 2000 µg/kg.

2.2.3.4.2 Infusión intravenosa durante 24 h.

Se ha realizado un estudio tras la administración de una infusión intravenosa continua durante 24 horas a tres niveles de dosis distintas de la solución de lanreótida en seis perros (machos):

- **100 µg/kg** (velocidad de infusión 50 µg/h)
- **200 µg/kg** (velocidad de infusión 100 µg/h)
- **400 µg/kg** (velocidad de infusión 200 µg/h)

Los seis perros fueron canulados en la vena yugular izquierda. Después de la cirugía, fueron tratados con antibiótico (Amoxcel®) para evitar las infecciones. Pasados siete días después de la cirugía se les extrajo una muestra de sangre para determinar el basal.

Los seis animales fueron administrados por vía iv en la vena yugular mediante el uso de bombas de infusión, siguiendo el esquema de un diseño cruzado.

Entre las diferentes administraciones a cada perro se dejó pasar un periodo mínimo de blanqueo de 7 días.

Los tiempos teóricos de muestreo fueron los siguientes:

- Durante la infusión: 0, 1, 5, 15 y 30 minutos y 1, 6, 12 y 24 horas.
- Después de la infusión: 24h 2 min, 24h 5 min, 24h 15 min, 24h 30 min, 24h 45 min, 25h, 25h 30 min, 26h, 27h, 28h y 29 horas. Se extrajeron muestras de sangre adicionales a 30 y 32 horas para la dosis de 200 µg/kg y a 30, 32 y 34 horas para la dosis de 400 µg/kg.

2.2.3.5 ESTUDIOS POR VÍA SUBCUTÁNEA

Se han realizado dos tipos de estudios farmacocinéticos: estudios tras la administración de una dosis única y estudios tras la administración de dosis múltiple de la solución de lanreótida.

Cada una de las soluciones de acetato de lanreótida fue administrada por vía subcutánea a los perros a través de la piel dorsal utilizando una aguja de 0.8 mm de diámetro.

2.2.3.5.1 Dosis única por vía subcutánea

Se ha realizado un estudio farmacocinético tras la administración subcutánea de tres dosis distintas de la solución de lanreótida a seis perros macho (los mismos utilizados para la administración de las tres dosis mediante bolus intravenoso):

- **80 µg/kg**
- **200 µg/kg**
- **2000 µg/kg**

Entre las diferentes administraciones a cada perro se dejó pasar un periodo mínimo de blanqueo de 7 días.

Los tiempos teóricos de muestreo fueron los siguientes:

0, 2, 5, 10, 20, 40 y 60 minutos y 1.5, 2, 3, 4, 6, 9, 12 y 24 horas. Se extrajeron muestras de sangre adicionales a 36 y 48 horas después de la administración de la dosis de 200 µg/kg y a 36, 48, 60 y 72 horas después de la administración de la dosis de 2000 µg/kg.

2.2.3.5.2 Dosis múltiple por vía subcutánea

Se ha realizado un estudio tras la administración subcutánea siguiendo un régimen de dosis múltiple durante 6 días a tres dosis distintas de la solución de lanreótida en seis perros (tres machos y tres hembras):

- **80 µg/kg/día** (40 µg/kg/12h)
- **200 µg/kg/día** (100 µg/kg/12h)
- **2000 µg/kg/día** (1000 µg/kg/12h)

Las tres soluciones de lanreótida fueron administradas mediante un diseño cruzado. Cada perro recibió las dosis de 40, 100 y 1000 µg/kg cada 12 horas. El estudio fue llevado a cabo en tres periodos experimentales con un periodo de blanqueo de 1 semana entre administraciones.

Cada perro fue administrado con 11 dosis (2 por día y solo una dosis el último día) para cada nivel de dosis ensayado. El volumen inyectado a cada administración fue de 0.25 ml/kg cada 12 horas, dependiendo del resultado analítico de la solución a administrar.

Los tiempos teóricos de muestreo fueron los siguientes:

0, 1, 12, 24, 25, 48, 49, 72, 73, 96, 108, 120 horas y después de la última dosis (administrada a 120 h) se siguió un perfil farmacocinético completo tomando muestra a 120.08, 120.25, 120.50, 121, 122, 124, 126, 129, 132 y 144 h para la dosis de 80 µg/kg/día.

Se extrajeron muestras adicionales a 156 y 168 horas después de la dosis de 200 µg/kg/día y 156, 168, 180 y 192 horas después de la dosis de 2000 µg/kg/día.

2.2.4 ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN EL CERDO

Se han realizado dos estudios farmacocinéticos en el cerdo, administrando por dos vías distintas (vía intravenosa y vía intramuscular).

2.2.4.1 ANIMALES

Se utilizaron un total de 11 cerdos (Yucatan micro-pigs) de CRIFFA (Barcelona) de peso comprendido entre 35.8 a 107.2 kg. Cada animal estaba identificado por un disco fijado en la oreja izquierda. Los animales fueron estabulados en grupos de 3 a 6 individuos del mismo sexo con unas condiciones ambientales ajustadas de temperatura comprendida entre 9-24°C y una humedad relativa entre 50-85%.

Los animales tenían libre acceso para beber agua y eran alimentados una vez al día con una dieta de "mini-pig" estándar durante todo el estudio, con la excepción de los periodos de ayuno requeridos (16 horas antes de la primera administración).

Se realizaron análisis bioquímico y hematológico a cada animal al empezar y al finalizar cada experimento. También se evaluó el comportamiento de los animales durante todo el estudio, y se observó cualquier signo de reacción al tratamiento.

2.2.4.2 SOLUCIÓN DE ADMINISTRACIÓN

Se prepararon soluciones de acetato de lanreótida a la concentración de 1 mg/ml, disolviendo un vial que contiene 1 mg de lanreótida y 10 mg de manitol, en 1 ml de agua destilada para inyección. Las soluciones fueron almacenadas a 4°C.

2.2.4.3 OBTENCION PLASMA DE CERDO

Se extrajeron muestras de sangre con heparina como anticoagulante de aproximadamente 1 ml por la oreja a cada tiempo experimental.

Los tubos fueron centrifugados a 2500 g durante 10 minutos a +4 °C, y el plasma obtenido se separó y congeló a -20 °C en tubos de polipropileno hasta el día del análisis. Antes de la primera administración de lanreótida, se extrajo una muestra de sangre para poder obtener el basal para cada animal.

2.2.4.4 ESTUDIOS POR VÍA INTRAVENOSA

Se ha realizado un estudio farmacocinético administrando un bolus intravenoso de la solución de lanreótida.

2.2.4.4.1 Dosis única bolus intravenoso

Se ha realizado un estudio tras la administración de un bolus intravenoso a una sola dosis (7µg/kg) de la solución de lanreótida en diez de los once cerdos (4 machos y 6 hembras), ya que el cerdo identificado como 110.2, falleció antes de poder ser administrado por esta vía. La administración de la solución de acetato de lanreótida se realizó mediante la inyección intravenosa de un bolus en una de las venas de la oreja.

Los tiempos teóricos de muestreo fueron los siguientes:

0, 1, 3, 5, 15, 30 y 45 minutos y 1, 2, 4, 6 y 8 horas.

2.2.4.5 ESTUDIOS POR VÍA INTRAMUSCULAR

Se ha realizado un estudio farmacocinético de la lanreótida administrando por vía intramuscular una dosis única.

2.2.4.5.1 Dosis única por vía intramuscular

Se ha realizado un estudio tras la administración intramuscular de una dosis única de 7µg/kg de la solución de lanreótida en cinco de los once cerdos (3 machos y 2 hembras). El resto de animales (6) fueron administrados por vía subcutánea, pero se descartó la inclusión de estos resultados en esta Memoria, debido a diversos problemas registrados durante la administración.

Los tiempos teóricos de muestreo de la vía im fueron los siguientes: 0, 2, 5, 15 y 30 minutos y 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas.

2.2.5 ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN VOLUNTARIOS SANOS

Se han realizado varios estudios farmacocinéticos de la lanreótida en voluntarios sanos, administrando por dos vías distintas (vía intravenosa y vía subcutánea).

2.2.5.1 VOLUNTARIOS SANOS

Se han utilizado un total de 61 voluntarios sanos de ambos sexos de peso comprendido entre 51 a 80 kg.

2.2.5.2 SOLUCIÓN DE ADMINISTRACIÓN

Se prepararon soluciones de acetato de lanreótida a la concentración de 1 mg/ml, disolviendo un vial que contiene 1 mg de lanreótida y 10 mg de manitol, en 1 ml de agua destilada para inyección.

El volumen de la solución de lanreótida a administrar fue calculado considerando el peso de cada individuo y la dosis teórica de 7 µg/kg.

2.2.5.3 OBTENCION SUERO HUMANO

Se extrajeron muestras de sangre sin anticoagulante de aproximadamente 6 ml a través del catéter insertado en la vena del antebrazo (seleccionando el brazo por donde no ha sido administrado) a cada tiempo experimental. Después de la formación del coágulo, los tubos fueron centrifugados a 2500 g durante 15-20 minutos a +4 °C, y el suero obtenido se separó y congeló a -20 °C en tubos de polipropileno hasta el día del análisis. Antes de la administración de lanreótida, se extrajo una muestra de sangre para poder obtener el basal para cada voluntario.

2.2.5.4 ESTUDIOS POR VÍA INTRAVENOSA

Se han realizado estudios farmacocinéticos en voluntarios sanos tras la administración de un bolus intravenoso y tras una infusión continua de la solución de lanreótida.

2.2.5.4.1 Dosis única bolus intravenoso

Se ha realizado un estudio tras la administración de un bolus intravenoso a una sola dosis ($7\mu\text{g}/\text{kg}$) de la solución de lanreótida en 12 voluntarios sanos (8 hombres y 4 mujeres).

La administración intravenosa de la solución de acetato de lanreótida se realizó a los doce voluntarios mediante la inyección de un bolus a través de un catéter insertado en el antebrazo.

Los tiempos teóricos de muestreo fueron los siguientes:
0, 2, 15, 30 y 60 minutos y 3, 5, 7, 9, 11, 18 y 24 horas.

2.2.5.4.2 Infusión intravenosa durante 20 minutos

Se ha realizado un estudio tras la administración de una infusión intravenosa continua durante 20 minutos a una sola dosis ($7\mu\text{g}/\text{kg}$) de la solución de lanreótida en 25 voluntarios sanos (22 hombres y 3 mujeres).

Con la finalidad de administrar la dosis correcta ($7\mu\text{g}/\text{kg}$) a cada sujeto durante 20 minutos, se utilizó una solución de $17.7\mu\text{g}/\text{ml}$. Esta solución se obtuvo añadiendo 0.9 ml de la solución reconstituida de lanreótida en 50 ml de solución salina ($900\mu\text{g}/50.9\text{ ml}=17.7\mu\text{g}/\text{ml}$). El flujo de la bomba de infusión se ajustó basándose en el peso del individuo para poder administrar toda la dosis en 20 minutos.

La administración intravenosa de la solución de acetato de lanreótida se realizó a los 25 voluntarios mediante una bomba de infusión a través de un catéter insertado en el antebrazo.

Los datos utilizados provienen de dos estudios clínicos distintos, por este motivo existen unas pequeñas variaciones en los tiempos de muestreo. Los tiempos teóricos de muestreo fueron los siguientes:

- Durante la infusión: 0, 5, 10, 15 y 20 minutos.
- Después de la infusión se extrajeron muestras siguiendo dos pautas:
2, 15, 30 y 60 minutos y 2, 3, 5, 7, 9, 11, 18 y 24 horas.
2, 15, 30 y 60 minutos y 2, 4, 6, 8, 9, 12, 16 y 24 horas.

2.2.5.5 ESTUDIOS POR VÍA SUBCUTÁNEA

Se ha realizado un estudio farmacocinético de la lanreótida administrada por vía subcutánea a una dosis única:

2.2.5.5.1 Dosis única por vía subcutánea

Se ha realizado un estudio tras la administración subcutánea a una sola dosis ($7\mu\text{g}/\text{kg}$) de la solución de lanreótida en 24 voluntarios sanos (12 hombres y 12 mujeres).

Los tiempos teóricos de muestreo fueron los siguientes:
0, 2, 5, 15, 30, 60 y 90 minutos y 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas.

2.2.6 RESUMEN DE ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS

En la Tabla 2 y Tabla 3 se recopila en forma de resumen los diferentes estudios farmacocinéticos desarrollados en las distintas especies analizadas tras la administración de la lanreótida por vía intravenosa y extravasal, respectivamente. También se indica el número de individuos incluidos en cada estudio.

VIA INTRAVENOSA								
Especie	Bolus				Infusión			
	7 <i>µg/kg</i>	80 <i>µg/kg</i>	200 <i>µg/kg</i>	2000 <i>µg/kg</i>	7 <i>µg/kg</i>	50 <i>µg/h</i>	100 <i>µg/h</i>	200 <i>µg/h</i>
Rata	-	6	6	6	-	-	-	-
Perro	-	6	6	6	-	6	6	6
Cerdo	10	-	-	-	-	-	-	-
Humano	12	-	-	-	25	-	-	-

Tabla 2. Resumen los estudios farmacocinéticos realizados tras la administración intravenosa de la lanreótida en las diferentes especies ensayadas junto con el número de individuos utilizados en cada estudio.

VIA EXTRAVASAL								
Especie	SC D. U.				SC D. M.			IM D. U.
	7 <i>µg/kg</i>	80 <i>µg/kg</i>	200 <i>µg/kg</i>	2000 <i>µg/kg</i>	80 <i>µg/kg/d</i>	200 <i>µg/kg/d</i>	2000 <i>µg/kg/d</i>	7 <i>µg/kg</i>
Rata	-	6	6	6	6	6	6	-
Perro	-	6	6	6	6	6	6	-
Cerdo	-	-	-	-	-	-	-	5
Humano	24	-	-	-	-	-	-	-

SC D.U.: administración subcutánea en régimen de dosis única
 SC D.M.: administración subcutánea en régimen de dosis múltiple
 IM D.U.: administración intramuscular en régimen de dosis única

Tabla 3. Resumen los estudios farmacocinéticos realizados tras la administración extravasal de la lanreótida en las diferentes especies ensayadas junto con el número de individuos utilizados en cada estudio.

2.3 ANALISIS FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL^{7,8}

La farmacocinética poblacional, al igual que la farmacocinética clásica, pretende describir el comportamiento farmacocinético de un fármaco a partir de un grupo de sujetos que representan una población a los que se les administra una dosis de principio activo y, a diferentes intervalos de tiempo, se extraen muestras sanguíneas para poder determinar la concentración de dicho principio activo. Cuando se realiza un análisis poblacional, los modelos estructurales farmacocinéticos utilizados no son distintos a los utilizados en el análisis de datos a partir de un solo individuo; por tanto, el análisis poblacional requiere de un modelo para la relación entre la concentración, la dosis y el tiempo. En el ámbito terapéutico, si todos los pacientes fueran idénticos, se requeriría para el tratamiento de una determinada patología, la misma dosis de fármaco en todos los casos. Sin embargo, debido a la variabilidad interindividual entre los pacientes, en general, se precisa individualizar las dosis para obtener la respuesta terapéutica óptima para cada paciente. Para un determinado fármaco, los estudios de farmacocinética poblacional pretenden obtener información acerca de la farmacocinética media del fármaco en una determinada población así como, la variabilidad interindividual de los parámetros PK del fármaco sometido a estudio y la variabilidad residual. En farmacocinética poblacional la variabilidad residual incluye, la variabilidad intraindividual del modelo y la medida del error.

Existen distintos métodos para la estimación de los parámetros farmacocinéticos poblacionales, pero los métodos más ampliamente utilizados son tres:

- Método "Naive Pooled Data":
Se trata de la aproximación más simple y consiste en combinar los datos de todos los individuos disponibles de una población como si provinieran de un solo individuo. Para que los datos sean comparables se han de normalizar las dosis. Este método muestra la tendencia general de la media de los parámetros farmacocinéticos. Si se utiliza este método, se recomienda representar gráficamente los datos para poder visualizar si algún individuo o grupo de individuos se desvían de la tendencia central con respecto a la absorción, distribución y/o eliminación.
- Método en dos etapas "Two-stage Method":
Se denomina así por que la obtención de los parámetros medios poblacionales se realiza en dos etapas:
 - 1ª etapa: se estiman los parámetros farmacocinéticos para cada individuo por separado.
 - 2ª etapa: se estiman los parámetros poblacionales a través de los distintos individuos de la población calculando la media de cada parámetro, la varianza y la covarianza.Este método permite relacionar mediante técnicas de regresión los parámetros farmacocinéticos y las covariables de interés.

- Modelos no lineales de efectos mixtos "Nonlinear Mixed Effects Models":
Estos modelos se denominan de efectos mixtos ya que en su estructura se incluyen dos tipos de efectos:
 - Efectos fijos: que corresponden a los parámetros farmacocinéticos y los parámetros de regresión.
 - Efectos aleatorios: que corresponden a la variabilidad interindividual y la variabilidad residual.

Los modelos de efectos mixtos se basan en el principio de que los parámetros farmacocinéticos individuales de una población se obtienen a partir de la distribución de dicho parámetro. Esta distribución puede ser descrita por la media poblacional del parámetro y por la varianza interindividual. De esta manera, cada parámetro farmacocinético individual se puede expresar como la media poblacional más una desviación típica para este individuo. Esta desviación es la diferencia entre la media poblacional del parámetro y el parámetro individual.

Otra característica de los métodos de efectos mixtos es que permite agrupar los datos de todos los individuos de la población en estudio y realizar el análisis de forma simultánea con todos los datos (análisis en una sola etapa) pero preservando su individualidad, permitiendo la estimación de parámetros poblacionales.

Estos métodos permiten la monitorización de fármacos mediante la estimación Bayesiana, cuya particularidad es la utilización en el ajuste de los datos al modelo propuesto, no sólo de la información experimental (concentración-tiempo) obtenida en el individuo, sino también de la información conocida *a priori* sobre el comportamiento cinético del fármaco en una población con características fisiopatológicas similares a las del individuo tratado.

Algunos programas (como NONMEM) permiten obtener los parámetros individuales a partir de las concentraciones observadas de cada individuo (información individual), los valores medios de los parámetros farmacocinéticos poblacionales estimados y su variabilidad (información poblacional). Esta aproximación utiliza la teoría estadística de Bayes para predecir los parámetros farmacocinéticos individuales (a estos parámetros individuales estimados se denominan parámetros individuales Bayesianos). La minimización de la función objetiva Bayesiana (OBJ_{Bayes}) presentada a continuación da por resultado la estimación de los parámetros farmacocinéticos teniendo en cuenta la concentración medida y la concentración predicha de fármaco junto con la información del error de medida y los valores típicos para la variabilidad de los parámetros farmacocinéticos en la población⁹:

$$OBJ_{Bayes} = \sum \frac{(P_{pop} - P_{ind})^2}{\text{var}(P_{ind})} + \sum \frac{(C_{obs} - C_{pred})^2}{\text{var}(C_{pred})} \quad (\text{Ec. 11})$$

Donde: P_{pop} : valor medio del parámetro poblacional P
 P_{ind} : el valor individual medio esperado para el parámetro P
 $var(P_{ind})$: la varianza interindividual del parámetro estimado P
 C_{obs} : valor de la concentración observada
 C_{pred} : valor de la concentración predicha de acuerdo con el modelo propuesto.
 $var(C_{pred})$: varianza residual de la concentración predicha

Esta ecuación está compuesta por dos términos:

- Un primer término que minimiza el parámetro poblacional respecto al parámetro individual, es decir, busca que el parámetro individual se asemeje al parámetro poblacional.
- Un segundo término que minimiza las concentraciones observadas respecto a las concentraciones predichas (mínimos cuadrados).

Si se dispone de los parámetros poblacionales medios, estos programas permiten obtener los parámetros individuales Bayesianos aunque solo se disponga de muy pocas observaciones (concentraciones) por individuo ($N \geq 1$). Cuando la información individual de concentraciones es alta, el primer término sumatorio de la ecuación pierde influencia en la estimación de parámetros y el método se asemeja a una regresión no lineal. Sin embargo, cuando se dispone de poca información por individuo, la influencia de los parámetros de población en el ajuste es grande y evita obtener valores de parámetros muy diferentes a los predichos de acuerdo con sus características fisiopatológicas.

El valor de la varianza de los parámetros limita el rango de valores que puede presentar los parámetros estimados, de forma que a menor varianza menor será la amplitud del rango alrededor del valor medio que puedan tomar los parámetros individuales. El valor de la varianza de las concentraciones determina la contribución de las concentraciones en la estimación de los parámetros. Así, cuanto menor sea dicha varianza, mayor será la contribución de las concentraciones en la estimación de los parámetros.

Una importante limitación de esta metodología es la disponibilidad previa de información poblacional, ya que una inadecuada selección de la misma, o bien una correcta caracterización de los valores medios y varianzas de los parámetros poblacionales, influyen notablemente en la fiabilidad y capacidad predictiva de los métodos Bayesianos, especialmente si la información individual es limitada. Idealmente, el paciente debe ser representativo del grupo de población en la que fueron caracterizados los parámetros poblacionales que se utilicen en la estimación Bayesiana. En muchas ocasiones, sin embargo, se utilizan parámetros poblacionales obtenidos de fuentes bibliográficas.

En los estudios estrictamente farmacocinéticos, el análisis con efectos mixtos, permite realizar un análisis compartimental simultáneo, obteniendo además de las estimas de los parámetros farmacocinéticos medios de la población en estudio, las estimas de la variabilidad interindividual sobre estos parámetros y la

variabilidad residual. La variabilidad residual incluye la variabilidad intraindividual, la mala especificación del modelo y una medida del error. Toda esta información es necesaria para poder diseñar correctamente el régimen posológico de un principio activo.

En la Tabla 4 se resumen las principales ventajas y desventajas de los tres métodos de estimación de los parámetros poblacionales.

Método de Estimación	Ventajas	Inconvenientes
Naive	<ol style="list-style-type: none"> 1 Simplicidad 2 Puede utilizar datos dispersos y con un número diferente de muestras por individuo 	<ol style="list-style-type: none"> 1 No es posible incluir covariables 2 No distingue entre variabilidad inter e intraindividual 3 Error en la estima de parámetros con datos no balanceados 4 Riesgo de enmascarar comportamientos individuales
Two-Stage	<ol style="list-style-type: none"> 1 Sencillo y método habitual 2 Parámetros estimados para cada individuo (estimas con poco error) 3 Se pueden incluir covariables en el modelo 	<ol style="list-style-type: none"> 1 Se precisa del mismo modelo estructural para todos los sujetos 2 Se precisa de un número elevado de muestras a tiempos apropiados para obtener estimas precisas 3 Varianza y covarianza están sesgadas y contiene elementos de variabilidad interindividual, variabilidad intraindividual, mala especificación del modelo, etc.
Nonlinear Mixed Effects	<ol style="list-style-type: none"> 1 Estima variabilidad interindividual y residual 2 Se pueden incluir covariables en el modelo 3 Permite estimar parámetros poblacionales y parámetros individuales 4 Puede analizar datos rutinarios, datos dispersos y datos con un número distinto de muestras por individuo 	<ol style="list-style-type: none"> 1 Complejidad de los algoritmos de cálculo 2 Se requiere de bastante tiempo durante el proceso de modelización

Tabla 4. Ventajas e inconvenientes de los distintos métodos de estimación de los parámetros poblacionales.

En esta Memoria, se ha realizado el análisis farmacocinético poblacional mediante el uso de modelos no lineales de efectos mixtos por varios motivos:

- Permite el análisis simultáneo de todos los datos. Al disponer de un número elevado de individuos y de muestras para cada individuo, el análisis farmacocinético se simplifica si se realiza de forma simultánea con todos los datos en una sola etapa.
- Permite estimar la variabilidad interindividual y residual. Permite así realizar simulaciones a nuevas dosis y regímenes posológicos.
- Existe poca bibliografía en la que se ha realizado un estudio alométrico utilizando modelos de efectos mixtos.
- Actualmente la modelización con efectos mixtos es una metodología en auge, que en próximo futuro se confirmará como el análisis farmacocinético de elección.

Existen varios programas que permiten el ajuste poblacional utilizando modelos de efectos mixtos, pero el programa más ampliamente utilizado es el NONMEM. Por este motivo se ha optado por estimar los parámetros farmacocinéticos poblacionales utilizando el programa NONMEM.

El análisis farmacocinético poblacional de los datos obtenidos en todos los estudios farmacocinéticos incluidos en esta Memoria se han realizado en dos etapas¹⁰:

- Análisis poblacional para cada especie: se ha realizado la determinación de los parámetros poblacionales para cada una de las especies ensayadas (rata, perro, cerdo y hombre).
- Escalado entre especies: se ha realizado dos aproximaciones: la alometría y los tiempos farmacocinéticos.

Para estos dos grupos de análisis poblacional se ha seguido la misma estructura de desarrollo del modelo poblacional.

2.3.1 CONCEPTOS

Se describe a continuación una serie de conceptos básicos implicados en el análisis farmacocinético poblacional:

- **Análisis Compartimental¹¹**: Los seres vivos constituyen sistemas complejos en los que resulta difícil establecer relaciones cuantitativas entre la dosis de fármaco, la vía de administración y la concentración de fármaco en distintas zonas anatómicas y el tiempo transcurrido. Con el fin de lograr una adecuada descripción de la evolución temporal de los niveles de fármaco, se recurre a modelos en los que se expresan matemáticamente las velocidades de los procesos de absorción, distribución y eliminación, que finalmente, a través de los resultados experimentales, se obtienen ecuaciones que permiten describir y predecir las concentraciones de fármaco en el organismo en función del tiempo. Los modelos compartimentales son los modelos más utilizados en farmacocinética. Un compartimento representa una fracción de material biológico en el que el fármaco se supone uniformemente distribuido y en el que presenta las mismas propiedades cinéticas. Un compartimento se trata de un concepto meramente cinético, cuya entidad no es necesariamente fisiológica en sentido estricto, aunque si abarca zonas con constantes cinéticas semejantes.

Un compartimento viene definido por sectores acuosos que ocupan un volumen determinado (V) y que contienen una determinada cantidad de fármaco (Q). La concentración de fármaco en el compartimento (C) vendrá dada por el cociente entre Q y V ($C=Q/V$). Las cinéticas de entrada y salida del compartimento pueden ser de orden uno, orden cero y de Michaelis-Menten. Desde un punto de vista matemático, un compartimento puede definirse como: el empleo de una función exponencial para el tratamiento de los datos experimentales. En la siguiente figura se representa un esquema de un compartimento, donde las flechas indican la entrada y salida del fármaco:

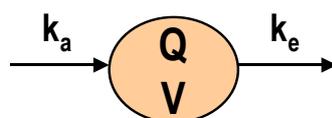


Figura 3. Ejemplo esquemático de un compartimento.

El organismo es un sistema muy complejo y teóricamente podría dividirse en un gran número de compartimentos. Sin embargo, ello llevaría a un tratamiento matemático muy complejo (una exponencial por compartimento) de los procesos cinéticos a los que se hallaría sometido el fármaco en cada uno de dichos compartimentos y se requeriría de muchas observaciones. Por este motivo, en la práctica se recurre a una simplificación drástica, y se considera el organismo constituido por el mínimo número posible de compartimentos que permiten describir la cinética del fármaco. Otro aspecto importante en la elaboración de un modelo farmacocinético es si se trata de un modelo cinético lineal o no lineal. Puede definirse la linealidad cinética como una proporcionalidad directa entre velocidades de transferencia y concentraciones. Por tanto, un modelo farmacocinético lineal es aquel en el que los procesos cinéticos responden a una cinética de primer orden (proporcionalidad directa entre velocidad y concentración). Como consecuencia de ello, los valores de los parámetros farmacocinéticos no cambian al variar la dosis, la concentración de fármaco a un tiempo dado es directamente proporcional a la dosis y el área bajo la curva de la concentración frente al tiempo (AUC) es función lineal de la dosis administrada por vía intravenosa. Sin embargo, en ocasiones se observa que, al variar la dosis de fármaco, el valor de uno o más parámetros farmacocinéticos cambia y la concentración a un tiempo dado no es directamente proporcional a la variación de dosis. En estos casos, se trata de un fármaco con farmacocinética no lineal o farmacocinética dependiente de la dosis.

- **Modelo Farmacoestadístico:** Para el análisis poblacional con NONMEM, se requiere el uso de modelos farmacoestadísticos, con la finalidad de poder cuantificar tanto los parámetros farmacocinéticos como los términos de error (variabilidad interindividual y residual).

El modelo farmacoestadístico incluye un modelo farmacocinético para generar las predicciones de concentraciones del principio activo en función de los parámetros farmacocinéticos individuales (modelo estructural), y modelos adicionales (modelo estadístico) para determinar la magnitud de la variabilidad de los parámetros farmacocinéticos (variabilidad interindividual) y la magnitud de la variabilidad residual.

- **Modelo estructural:** incluye el modelo farmacocinético y las fórmulas de regresión que evalúan el posible efecto de las covariables sobre los parámetros farmacocinéticos. Este modelo se desglosa en dos partes:
 - Modelo estructural básico: incluye el modelo farmacocinético (por ejemplo un modelo monocompartimental), y relaciona la variable independiente (por ejemplo el tiempo) con las observaciones (por ejemplo la concentración de principio activo en la sangre).
 - Modelo de Covariables: las covariables son incluidas en este modelo, y relacionan la información demográfica (edad, sexo, peso, etc.) y las

mediciones demográficas, bioquímicas o estado del paciente con los parámetros del modelo estructural básico.

- **Modelo estadístico:** Permite la determinación de los términos de error aleatorios: la variabilidad interindividual y residual.
 - Variabilidad Interindividual: permite modelar y describir las diferencias entre los valores típicos de los parámetros en la población bajo estudio con los valores individuales de los parámetros.
 - Variabilidad Residual: permite modelar y describir las diferencias entre las observaciones (ej.: concentraciones de fármaco) y las predicciones del modelo.

Para poder realizar el análisis poblacional utilizando modelos de efectos mixtos, se debe especificar el modelo farmacoestadístico completo.

2.3.2 TERMINOLOGÍA

A continuación se detalla la lista de las principales abreviaturas utilizadas durante el análisis poblacional:

ADDL	Número de dosis adicionales
Adm.	Administración
ALAG1	Periodo de latencia
AMT	Dosis de fármaco administrada expresada en mg
APE	Valor absoluto del error de predicción
CL	Aclaramiento total
CMT	Código para definir el número de compartimento
Conc.	Concentración de lanreótida expresada en ng/ml
CV	Coefficiente de variación expresado en %
D	Dosis
DE	Desviación estándar
DM	Dosis Múltiple
DOS	Código de identificación de las distintas dosis administradas: <ul style="list-style-type: none"> • DOS=1: Bolus iv 80µg/kg • DOS=2: Bolus iv 200µg/kg • DOS=3: Bolus iv 2000µg/kg • DOS=4: Administración sc 80µ/kg/día • DOS=5: Administración sc 200µ/kg/día • DOS=6: Administración sc 2000µ/kg/día • DOS=7: Infusión iv 50µg/h • DOS=8: Infusión iv 100µg/h • DOS=9: Infusión iv 200µg/h • DOS=11: Bolus iv 7µg/kg • DOS=12: Administración sc 7µg/kg • DOS=13: Administración im 7µg/kg • DOS=14: Infusión iv 7µg/kg

DU	Dosis única
DV	Variable Dependiente (concentraciones observadas)
EVID	Código para definir el tipo de evento que sucede a cada muestra (ej.: EVID=1 se administra una dosis)
f	Modelo farmacocinético
F1	Biodisponibilidad del compartimento central
FLAG	Código de identificación de la vía de administración: <ul style="list-style-type: none"> • FLAG=1: Administración extravasal • FLAG=2: Administración intravenosa
FO	Método de estimación de primer orden ("First Order")
FOCE	Método de estimación "First Order Conditional Estimation"
GAM	Siglas correspondientes al término en inglés de modelos aditivos generalizados "Generalized Additive Models"
ID, Ident.	Número de Identificación del individuo
II	Intervalo de dosificación
IPRED	Predicciones Individuales del modelo
IV	Administración intravenosa
IWRE	Residuales ponderados asociados con las predicciones individuales
KA	Constante de absorción
K₀	Velocidad de infusión
MAPE	Mediana del valor absoluto del error de predicción
MPE	Mediana del error de predicción
NONMEM	Siglas correspondientes al término en inglés de modelos no lineales de efectos mixtos "Nonlinear Mixed Effects Modelling"
OBJ	Función objetiva
PD	Farmacodinamia
PE	Error de predicción
PK	Farmacocinética
PRED	Predicciones típicas del modelo
Q3	Aclaramiento intercompartimental entre el compartimento central y el compartimento poco profundo
Q4	Aclaramiento intercompartimental entre el compartimento central y el compartimento profundo
RATE	Velocidad de infusión
SC	Administración por vía subcutánea
SEX	Código de identificación del sexo: <ul style="list-style-type: none"> • SEX=1: Individuo es macho • SEX=2: Individuo es hembra
SS	Código para identificar si la muestra se encuentra en estado estacionario
TIME	Tiempo expresado en horas

$t_{1/2}$	Semivida
V_2	Volumen de distribución aparente del compartimento central
V_3	Volumen de distribución aparente del compartimento poco profundo
V_4	Volumen de distribución aparente del compartimento profundo
V_{ss}	Volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario ($V_{ss}=V_2+V_3+V_4$)
W, WGT	Peso corporal expresado en kg
WRES	Residuales ponderados
Ω	Matriz de varianza-covarianza que incluye las estimas de las ω^2 y sus covarianzas
Σ	Matriz de varianza-covarianza que incluye las estimas de las σ^2 y sus covarianzas
ε	Diferencia entre las concentraciones observadas y predichas
η (ETA)	Diferencia entre θ_i y θ_{pop}
θ_i	Parámetro farmacocinético individual
θ_{pop}	Valor típico de un parámetro farmacocinético
θ_{sim}	Estimado típico de la población para los datos simulados (notación utilizada durante la validación del modelo)
σ^2	Varianza de las ε s
ω^2	Varianza de las η s
χ^2	Distribución Chi-cuadrado

2.3.3 INTRODUCCIÓN A MODELOS DE EFECTOS MIXTOS

La farmacocinética poblacional, con respecto a la farmacocinética tradicional, se encuentra en sus inicios. Su origen se localiza aproximadamente a mediados de los años 70, principalmente por los resultados obtenidos por Sheiner y Beal en la Universidad de California, San Francisco.

El termino "farmacocinética poblacional", no debe ser confinado solo a la respuesta farmacocinética, ya que dependiendo del principio activo de interés, debe abarcar también la farmacodinamia (actualmente es una de las herramientas más importantes en el análisis de datos farmacocinéticos y farmacodinámicos).

La farmacocinética poblacional puede ser definida como el análisis de los datos primarios que correlaciona la variabilidad de las concentraciones plasmáticas del principio activo entre los distintos individuos que representan la población diana que finalmente recibirán dosis relevantes del principio activo de interés¹².

Las principales ventajas del análisis poblacional sobre otros métodos farmacocinéticos más tradicionales son las siguientes:

- Permiten incluir la población de interés, no solo incluyen voluntarios sanos o poblaciones especiales.
- Se obtienen mejores estimaciones de la media poblacional y de la varianza.

- Permite evaluar múltiples factores (demográficos, fisiopatológicos, bioquímicos, etc.) que pueden influenciar la disposición del fármaco. Por este motivo, si alguno de estos factores están asociados con cambios clínicamente significativos, la dosis puede ser modificada apropiadamente.

Los primeros análisis poblacionales mediante modelos no lineales de efectos mixtos se realizaron en estudios con escasos datos ("Sparse data"). Por este motivo, dichos modelos se han identificado como los modelos poblacionales o aproximación poblacional. Sin embargo, los modelos no lineales de efectos mixtos, también pueden ser aplicados a estudios con datos abundantes ("rich data"), por ejemplo desde un grupo de voluntarios sanos (estudio Fase I), y en este caso, el uso del término de modelos poblacionales es cuestionable, ya que el número de individuos puede ser pequeño, pero todavía se utiliza este término por conveniencia¹³.

Los escenarios donde la farmacocinética poblacional puede ser empleada son muy amplios y abarca todas las fases del desarrollo de un fármaco desde el descubrimiento hasta la Fase IV. El uso de la farmacocinética poblacional durante el desarrollo de un producto ofrece la posibilidad de integrar toda la información farmacocinética de dicho fármaco, no solo desde datos relativamente escasos obtenidos desde estudios en sujetos, sino también desde datos abundantes o la combinación de datos escasos y de datos abundantes. Esta aproximación también permite el análisis de datos provenientes desde una gran variedad de diseños no balanceados, así como de estudios que están normalmente excluidos debido a que su diseño no permite el análisis farmacocinético clásico.

Esta técnica de análisis ha sido empleada principalmente en los siguientes campos:

- Cribar compuestos para la selección de candidatos ("screening").
- Analizar datos toxicocinéticos ("sparse data").
- Ayudar en el escalado entre especies.
- Combinar datos preclínicos, datos humanos no clínicos, o ensayos clínicos para realizar un meta-análisis.
- Orientar en ensayos de poblaciones especiales.
- Analizar la bioequivalencia.
- Proporcionar una guía para los regímenes de dosificación para ensayos pilotos.
- Asistir con análisis farmacocinéticos/farmacodinámicos (PK/PD) a ensayos de Fase I, II, III y IV.

El análisis farmacocinético poblacional se realiza en varias etapas, empezando por el modelo más simple, que es ampliado hasta el modelo más complejo que permiten los datos. Durante el proceso de modelización se utiliza el análisis de gráficos y diferentes análisis estadísticos que permiten decidir como modificar el modelo en el siguiente paso. Estas nuevas modificaciones en el modelo, normalmente permiten añadir otro componente, como la relación de una covariable, o evitar el incumplimiento de cualquier premisa realizada durante este tipo de análisis¹⁴. La secuencia típica de desarrollo de un modelo poblacional es la siguiente:

- Exploración de datos: en esta etapa se realiza un análisis gráfico de la variable dependiente vs variable independiente, un análisis de la distribución de las covariables bajo investigación, un análisis de la correlación entre covariables y si es pertinente, se investiga la evolución temporal de la enfermedad.
- Determinación del modelo estructural básico: se selecciona el mejor modelo sin incluir covariables que mejor describe los datos. También se analiza la sensibilidad del análisis para determinar los datos que pueden afectar a la determinación de los parámetros (datos perdidos, errores de recogida de datos, etc.).
- Análisis exploratorio de parámetros: se determinan las estimas de los parámetros individuales Bayesianos a partir del modelo estructural básico para poder examinar la covarianza entre parámetros.
- Selección del modelo de covariables: se examina la adición de las diferentes covariables disponibles en el modelo estructural básico mediante la utilización modelos aditivos ("Generalised Additive Modeling, GAM").
- Refinamiento poblacional: se obtienen las estimas de los parámetros farmacocinéticos poblacionales, se determinan las covariables influyentes y los "outliers", y se obtiene un valor razonable del error residual aleatorio.
- Validación: se evalúa la robustez y la capacidad de predicción del modelo farmacocinético poblacional.
- Proyección y aplicación: se evalúa la utilidad del modelo farmacocinético poblacional: para describir la farmacocinética del principio activo y la relación con las covariables relevantes para la presentación del registro, para poder responder a cuestiones de datos "reales", y para proponer estudios adicionales basados en estos descubrimientos.

2.3.4 ANALISIS POBLACIONAL

En esta Memoria el tratamiento de los datos farmacocinéticos se ha realizado utilizando el análisis farmacocinético poblacional utilizando el programa de efectos mixtos NONMEM.

2.3.4.1 PROGRAMAS UTILIZADOS

Para realizar el análisis farmacocinético poblacional y el análisis exploratorio de los datos se han utilizado principalmente dos programas: NONMEM y Xpose.

2.3.4.1.1 NONMEM

NONMEM Versión V, level 1.0¹⁵

NON linear **Mixed** Effects **Model**.

NONMEM es un programa informático, escrito en FORTRAN 77, diseñado para ajustar modelos estadísticos de regresión (no lineal) a diferentes tipos de datos. En un principio fue desarrollado para analizar datos de farmacocinética clínica (fase II y III).

NONMEM realiza el análisis en una sola etapa, y permite estimar simultáneamente los parámetros de efectos fijos, la variabilidad interindividual y la variabilidad residual.

El valor de la función objetiva (OBJ) proporcionado por NONMEM da una medida global sobre la bondad del ajustado. La OBJ está basada en las estimas finales de los parámetros y es igual a "-2 log likelihood" (función de probabilidad).

La principal característica de modelar los datos con modelos poblacionales es la de proporcionar la estimación de la variabilidad interindividual y de la variabilidad residual (denominados efectos aleatorios), así como de medir los efectos concomitantes (efectos fijos). De esta manera, NONMEM permite modelar estos efectos denominados mixtos (combinación de efectos aleatorios y fijos).

NONMEM es un programa que permite ajustar una amplia variedad de datos (farmacocinéticos, farmacodinámicos, etc.).

Existen dos subrutinas muy importantes denominadas PK y ERROR que es donde se realiza la función básica del modelaje:

- **PK:** subrutina que permite calcular los valores típicos de la población (por ejemplo CL, V, etc.) para un modelo y da respuesta para las "diferencias" entre los valores individuales y los valores típicos poblacionales (variabilidad interindividual).
- **ERROR:** subrutina que da respuesta para las "diferencias" entre los valores predichos por el modelo y los valores observados (variabilidad residual).

2.3.4.1.2 XPOSE

La versión utilizada del Xpose es la 2.0.

Este programa se ejecuta bajo el programa estadístico S-PLUS y permite realizar el análisis exploratorio de los datos en estudio.

El programa Xpose toma los archivos de salida del NONMEM, habitualmente en forma de uno o más archivos de tablas, y visualiza un sistema de menús, desde el cual el analista puede seleccionar la creación de diferentes tipos de gráficas y análisis. Las gráficas incluyen: gráficos básicos de bondad del ajustado, gráficos de bondad de ajustado más especializados diseñados para chequear ciertas suposiciones, gráficos que ayudan en el desarrollo del modelo de covariables, gráficos para la exploración de datos y gráficos para comparar dos modelos. El programa también dispone de varios análisis auxiliares, entre los que hay que destacar el "generalized additive modeling (GAM)"¹⁶, que permite evaluar las covariables relevantes susceptibles de ser incluidas en el modelo poblacional.

2.3.4.2 DESARROLLO DEL MODELO

Para determinar la relación entre la variable independiente (en nuestro caso el tiempo) y la variable dependiente (en nuestro caso la concentración de lanreótida), se realiza a través del desarrollo de modelos poblacionales, en los que se analizan simultáneamente todos los datos provenientes de todos los individuos de la población en estudio. Con la finalidad de obtener el mejor modelo que ajuste los datos, se desarrollan varios modelos, donde se van incluyendo nuevos parámetros en el modelo mediante un proceso iterativo, evaluando la mejora del ajustado del modelo. La discriminación entre modelos se realiza a través de la utilización de una combinación de técnicas estadísticas y gráficas. Este proceso se realiza en varias etapas:

- Exploración de datos
- Determinación del modelo estructural básico
- Análisis exploratorio de parámetros y covariables (criterios de selección de modelos)
- Selección del modelo de covariables
- Selección del modelo poblacional final

2.3.4.2.1 Exploración de datos

En este apartado se ha realizado una exploración gráfica y numérica de los datos disponibles para cada una de las poblaciones estudiadas, con la finalidad de poder estudiar el comportamiento de la lanreótida y de las covariables en cada población. De esta manera se ha realizado una serie de análisis exploratorios para cada población:

- Resumen de los datos disponibles (número de individuos, número de muestras por individuo, distribución de los tiempos de muestreo, etc.).
- Representación gráfica de todas las observaciones normalizadas por la dosis.
- Distribución de las variables demográficas disponibles, etc.

2.3.4.2.2 Modelo Estructural Básico

El modelo estructural básico es aquel modelo que describe satisfactoriamente las observaciones sin incluir en su estructura ninguna covariable. Los objetivos de esta etapa fueron:

- i)* Selección del modelo farmacocinético estructural básico.
- ii)* Determinar sobre qué parámetros debe asociarse variabilidad interindividual.
- iii)* Existencia de covarianza en parte o en la totalidad de los elementos de Ω .
- iv)* Tipo de modelo de error residual más apropiado a los datos.

En este paso se debe seleccionar el modelo farmacocinético, el modelo estadístico y el método de estimación:

- **Modelo Farmacocinético:**

En esta sección se define el modelo farmacocinético, utilizando la subrutina denominada PREDPP (biblioteca proporcionada por NONMEM que suministra el código para implementar los modelos farmacocinéticos más comunes).

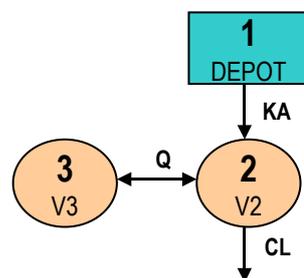
También se puede utilizar \$PRED o subrutina PRED en lugar de PREDPP para suministrar a NONMEM con valores predichos de DV (variable dependiente) de acuerdo con algún otro tipo de modelo (no es imprescindible que sea modelo farmacocinético).

Durante el desarrollo del modelo se han ensayado principalmente dos modelos farmacocinéticos compartimentales (bi- y tri-compartimental), que a continuación se pasan a describir:

- **Modelo Bicompartimental:**

Este modelo refleja el hecho de que la distribución del fármaco en el organismo tras su administración no es un proceso instantáneo. En aquellos tejidos con mayor aporte sanguíneo relativo, el equilibrio en la distribución del fármaco entre dichos tejidos y el plasma se alcanzará rápidamente, al contrario de lo que sucederá con aquellos tejidos con menor aporte sanguíneo relativo. De esta manera, se divide el organismo en dos compartimentos abiertos o internos: uno que corresponde a los tejidos en los que se alcanza el equilibrio de distribución rápidamente (se puede considerar instantáneamente) denominado compartimento central, y otro que corresponde a los tejidos en los que el equilibrio de distribución precisa de un tiempo más o menos dilatado para alcanzarse, denominado compartimento periférico. En este modelo se considera que el fármaco sólo es eliminado del organismo a través del compartimento central.

En la Figura 4 se representa esquemáticamente el modelo farmacocinético bicompartimental ensayado: dos compartimentos internos cuando la administración es por vía intravenosa, y tres compartimentos, uno externo que representa la zona anatómica de absorción (depot), cuando la administración es extravasal.



KA: constante de absorción (h^{-1})

CL y Q: aclaramiento total y aclaramiento intercompartimental (l/h)

V2 y V3: volúmenes de distribución del compartimento central y periférico (l)

Figura 4. Modelo farmacocinético bicompartimental

Este modelo farmacocinético (bicompartimental) consta de tres compartimentos: 1 compartimento externo y 2 compartimentos internos:

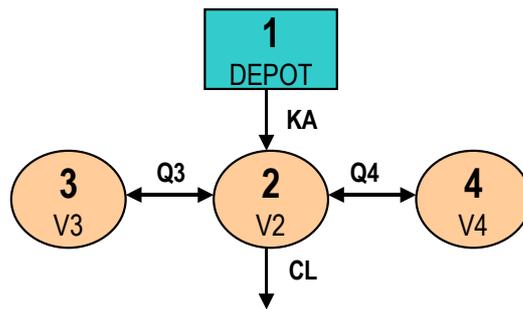
- **Compartimento 1:** Compartimento externo denominado "depot". En este compartimento es donde se sitúa la dosis en caso de administrar el fármaco por vía extravasal. La desaparición del fármaco de este compartimento está controlada por la constante de absorción (KA).
- **Compartimento 2:** Compartimento central. En este compartimento interno es donde se toman las muestras para la determinación de la concentración de fármaco y donde se sitúa la dosis en caso de ser administrada por vía intravenosa. En el caso de una administración extravasal, la entrada del fármaco de este compartimento está controlada por la constante de absorción (KA) y el aclaramiento intercompartimental (Q), mientras que la salida del fármaco de este compartimento en todos los casos está controlada por el aclaramiento total (CL) y el aclaramiento intercompartimental (Q).
- **Compartimento 3:** Compartimento periférico. Es el compartimento interno donde el fármaco se distribuye lentamente. La entrada y salida de fármaco en este compartimento está controlada por el aclaramiento intercompartimental (Q).

➤ Modelo Tricompartimental:

Este modelo refleja, al igual que en modelo bicompartimental, el hecho de que la distribución del fármaco en el organismo no es un proceso instantáneo, pero este modelo divide el organismo en tres compartimentos internos o abiertos: compartimento central (distribución inmediata del fármaco), compartimento periférico poco profundo (distribución del fármaco lenta) y compartimento periférico profundo (distribución del fármaco muy lenta).

En este modelo el fármaco sólo es eliminado del organismo a través del compartimento central.

En la Figura 5 se representa esquemáticamente el modelo farmacocinético tricompartimental ensayado, considerando un compartimento externo (depot) que representa la zona de absorción cuando la administración es extravasal.



KA: constante de absorción (h^{-1})

CL, Q3 y Q4: aclaramiento total y aclaramiento intercompartmental poco profundo y profundo (l/h)

V2, V3 y V4: volúmenes de distribución del compartimento central, compartimento periférico poco profundo y del compartimento periférico profundo (l).

Figura 5. Modelo farmacocinético tricompartmental

Este modelo farmacocinético (tricompartmental) consta de 4 compartimentos: 1 compartimento externo y 3 compartimentos internos:

- **Compartimento 1:** Compartimento externo denominado "depot". En este compartimento es donde se sitúa la dosis en caso de administrar el fármaco por vía extravasal. La desaparición del fármaco de este compartimento está controlada por la constante de absorción (KA).
- **Compartimento 2:** Compartimento central. En este compartimento interno es donde se toman las muestras para la determinación de la concentración de fármaco y donde se sitúa la dosis en caso de ser administrada por vía intravenosa. En el caso de una administración extravasal, la entrada del fármaco de este compartimento está controlada por la constante de absorción (KA) y los aclaramientos intercompartmentales (Q3 y Q4), mientras que la salida del fármaco de este compartimento en todos los casos está controlada por el aclaramiento total (CL) y los aclaramientos intercompartmentales (Q3 y Q4).
- **Compartimento 3:** Compartimento periférico poco profundo. Es el compartimento interno donde se distribuye el fármaco lentamente. La entrada y salida de fármaco está controlada por el aclaramiento intercompartmental Q3.
- **Compartimento 4:** Compartimento periférico profundo. Es el compartimento interno donde se distribuye el fármaco muy lentamente. La entrada y salida de fármaco está controlada por el aclaramiento intercompartmental (Q4).

- **Modelo estadístico:**

En esta sección se define el modelo de la variabilidad interindividual y el modelo de la variabilidad residual:

- **Variabilidad Interindividual:** la variabilidad interindividual representa la diferencia (η) entre el parámetro farmacocinético individual y el parámetro farmacocinético poblacional (valor típico del parámetro en la población).

La interacción entre la diferencia (η) y el valor típico del parámetro puede ser modelada mediante dos modelos:

- **Modelo aditivo:** Es el modelo donde η simplemente se adiciona al valor típico del parámetro. En esta situación, la varianza del parámetro se mantiene constante en todo el margen de la variable independiente.

$$\theta_{1i} = \theta_{1pop} + \eta_{1i} \quad (\text{Ec. 12})$$

Donde θ_{1i} , representa al parámetro farmacocinético θ_1 en el individuo i ; θ_{1pop} , al valor típico poblacional del parámetro θ_1 (el valor de θ_{1pop} es el mismo para todos los individuos de la población); η_{1i} es el efecto aleatorio interindividual que representa a la desviación del valor de θ_{1i} respecto a θ_{pop} .

- **Modelo proporcional:** Es el modelo donde η se multiplica al valor típico del parámetro. En esta situación, la varianza del valor típico del parámetro se incrementa al incrementar el valor del parámetro (la varianza es proporcional al valor del parámetro). Se puede modelar de dos maneras:

$$\theta_{1i} = \theta_{1pop} * (1 + \eta_{1i}) \quad (\text{Ec.13})$$

$$\theta_{1i} = \theta_{1pop} * e^{\eta_{1i}} \quad (\text{Ec. 14})$$

La principal diferencia entre estos dos modelos proporcionales, radica en que en el primer modelo se asume una distribución normal del parámetro, mientras que en el segundo modelo se asume una distribución log-normal del parámetro.

En la Figura 6 se muestra, a modo de ejemplo, la relación entre la varianza del parámetro y el valor típico del parámetro (CL) para los dos modelos de variabilidad interindividual (aditivo y proporcional). En estas gráficas se ha modelado una relación lineal entre el CL y el CrCL (aclaramiento de creatinina). La línea sólida marca la relación lineal entre el CL y el CLCr (media poblacional), y las líneas punteadas marcan el tipo de dispersión del valor del parámetro (parámetro individual) que se obtendrá según el modelo de variabilidad seleccionado.

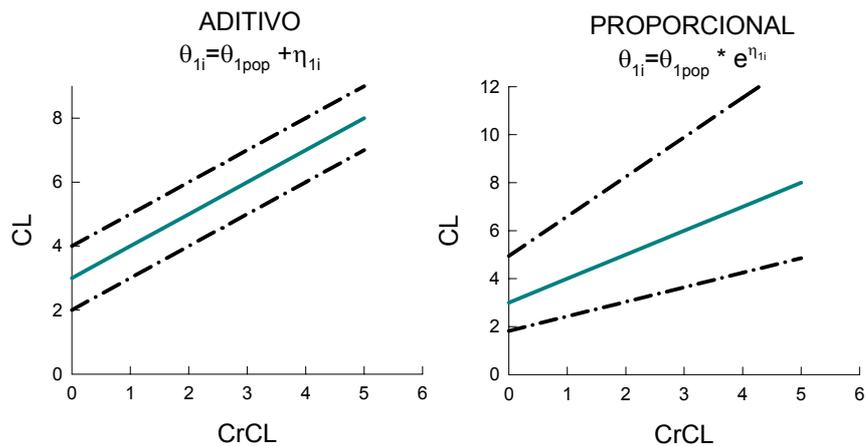


Figura 6. Modelos básicos de la variabilidad interindividual.

La distribución de η_1 en ambos modelos (modelo aditivo y modelo proporcional) se asume simétrica entorno al valor 0 y con varianza ω_1^2 . En la Figura 7 se representa un ejemplo de la interacción de la variabilidad interindividual con el aclaramiento típico poblacional (CL_{pop}). En este esquema se observa que para cada individuo de la población surge una η desde la distribución simétrica con media alrededor de 0 y varianza ω^2 . Esta η interacciona con el típico valor del parámetro (CL_{pop}) para generar el parámetro "verdadero" individual (CL_{ind}). Con este nuevo parámetro (CL_{ind}), que corresponde al parámetro individual, se genera un nuevo perfil farmacocinético ($f_t(ind)$) distinto al perfil medio poblacional ($f_t(pop)$).

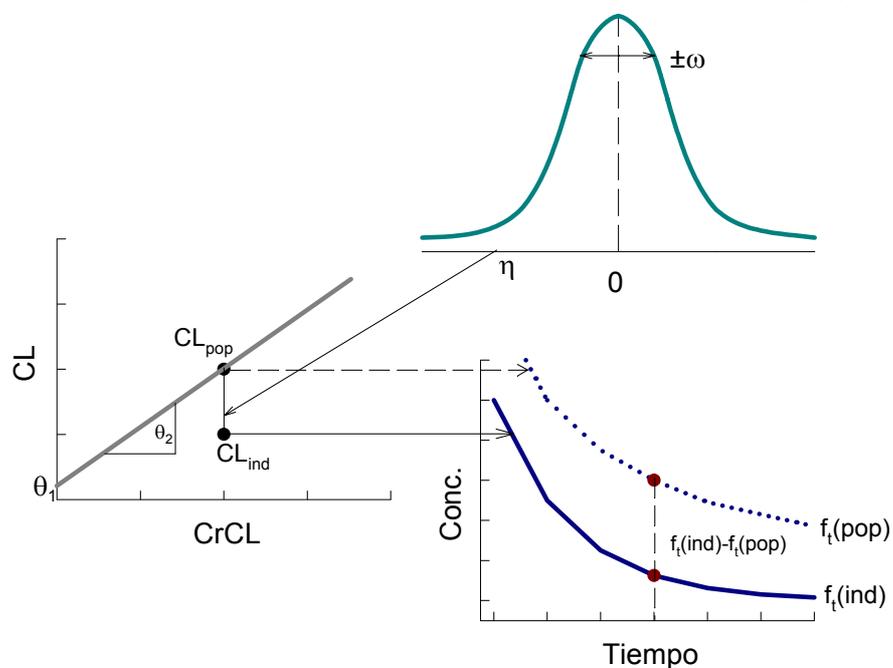


Figura 7. Ejemplo de interacción de la variabilidad interindividual en el CL.

La matriz varianza-covarianza denominada Ω engloba a las varianzas $\omega^2_{1\dots n}$ y posibles covarianzas (relacionadas con la correlación entre los distintos términos de η) que caracterizan la variabilidad interindividual de los parámetros farmacocinéticos.

Normalmente las variabilidades interindividuales en los parámetros farmacocinéticos son modeladas utilizando el modelo proporcional donde la distribución del parámetro θ_1 es log-normal, ya que con este modelo se evita el que un parámetro farmacocinético tenga un valor no-positivo.

- **Variabilidad residual:** la variabilidad residual representa la diferencia (ε) entre los valores de concentración observados y los predichos por el modelo estructural en combinación con el modelo de variabilidad interindividual. La variabilidad residual incluye la mala especificación del modelo farmacocinético, la variabilidad en el método analítico, las desviaciones de muestreo, dosis, etc. y la variabilidad intraindividual. La interacción entre la diferencia (ε) y el valor de concentración predicho puede ser modelada mediante tres modelos:

- **Modelo aditivo:** Es el modelo donde ε simplemente se adiciona a la función que permite describir el perfil individual farmacocinético ($f(pk_i, D_i, t_{ij})$). Esta función permite calcular las concentraciones predichas para cada individuo y tiempo, utilizando los parámetros individuales. En este caso, la varianza se mantiene constante en todo el margen de las concentraciones predichas.

$$C_{ij} = f(pk_i, D_i, t_{ij}) + \varepsilon_{ij} \quad (\text{Ec. 15})$$

Donde C_{ij} , representa la concentración de fármaco (lanreótida) observada en el individuo i a tiempo j ; f , el tipo de modelo farmacocinético seleccionado (por ejemplo monocompartimental); pk_i , el conjunto de parámetros farmacocinéticos estimados en el individuo i ; D_i , la dosis administrada al individuo i ; t_{ij} , la variable independiente tiempo; y por último ε_{ij} hace referencia al error residual, interpretado como la diferencia entre las concentraciones observada y predicha.

- **Modelo proporcional:** Es el modelo donde ε se multiplica a la función que permite describir el perfil individual farmacocinético ($f(pk_i, D_i, t_{ij})$). En este caso, la varianza de la concentración observada se incrementa al incrementar la concentración predicha (la varianza es proporcional a la concentración predicha).

$$C_{ij} = f(pk_i, D_i, t_{ij}) * (1 + \varepsilon_{ij}) \quad (\text{Ec. 16})$$

- **Modelo Mixto:** Es el modelo que combina el modelo aditivo y proporcional a la vez, y por tanto tiene dos componentes de variabilidad residual, uno aditivo y uno proporcional.

$$C_{ij} = f(pk_i, D_i, t_{ij}) * (1 + \varepsilon_{1ij}) + \varepsilon_{2ij} \quad (\text{Ec.17})$$

En general se asume que el conjunto de ε s están simétricamente distribuidas alrededor del valor 0 y tienen varianza σ^2 .

En la Figura 8 se muestra la relación entre la varianza de la concentración observada y la concentración predicha para los dos modelos de variabilidad residual. En estas gráficas la línea sólida marca el perfil farmacocinético predicho por el modelo (media poblacional), y las líneas punteadas marcan el tipo de dispersión del valor de concentraciones observadas que se obtendrá según el modelo de variabilidad residual seleccionado.

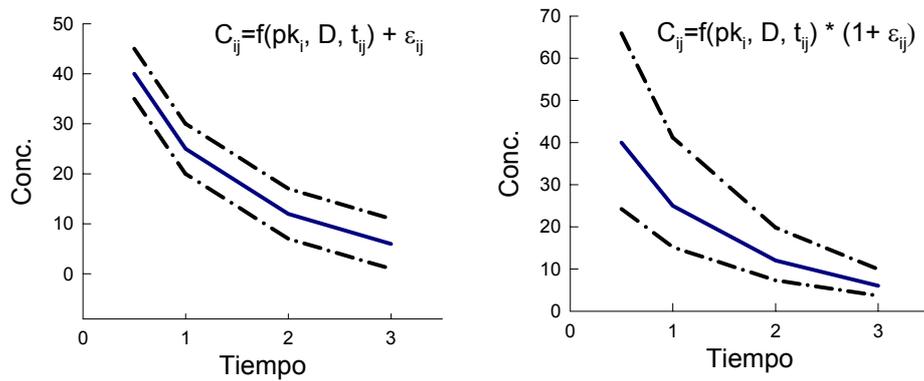


Figura 8. Modelos básicos de la variabilidad residual

En la Figura 9 se representa un ejemplo de la interacción de la variabilidad residual con la concentración predicha.

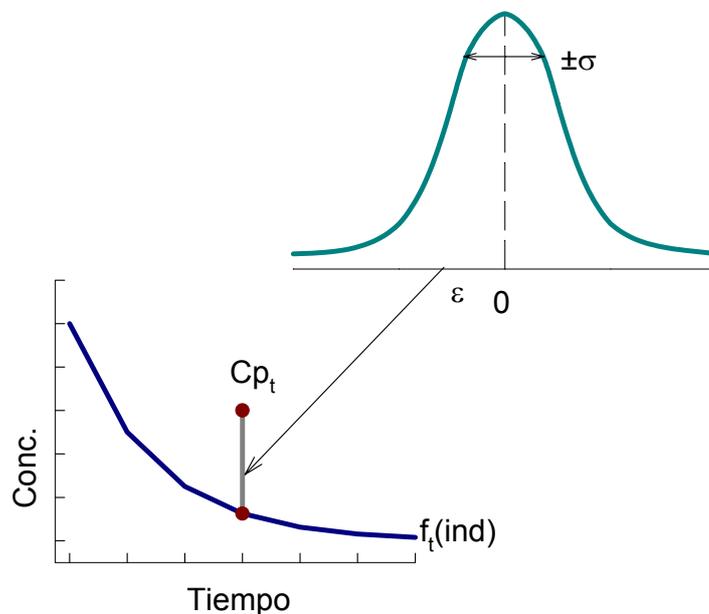


Figura 9. Ejemplo de la interacción de la variabilidad residual con la concentración individual predicha.

En la figura anterior, se observa que para cada concentración observada (C_{p_t}) para cada individuo de la población surge un ε desde la distribución simétrica con media alrededor de 0 y varianza σ^2 . Este valor de ε interacciona con el valor predicho de concentración para generar la concentración observada.

La matriz varianza-covarianza denominada Σ engloba a las varianzas $\sigma^2_{1,\dots,n}$ y posibles covarianzas (relacionadas con la correlación entre los distintos términos de σ) que caracterizan la variabilidad residual.

En análisis poblacionales con un número escaso de observaciones por individuo (desde 1 a 3 o 4 observaciones) se asume además que los diferentes ε son independientes entre sí, es decir no son individuo-específicos.

- **Método de estimación:**

La función objetiva (OBJ) mide la diferencia entre los valores observados y los predichos desde un grupo de parámetros.

La función objetiva puede ser minimizada mediante el programa NONMEM utilizando diversos métodos de estimación. Los métodos de estimación más utilizados en farmacocinética poblacional son los siguientes:

- FO (First-order estimation model): cuando todas las η toman el valor 0 (la media poblacional de η es igual a 0) durante el proceso de estimación.
- FOCE (First-Order Conditional Estimations method): cuando todas las η toman el valor de las estimas condicionales de η , en otras palabras, las η entran dentro del proceso de estimación. La versión más utilizada de este modelo es FOCE INTERACTION, donde se asume que existe interacción entre ε y η .

En el presente análisis se ha intentado utilizar, siempre que ha sido posible, el método FOCE INTERACTION, debido a que el número de observaciones para cada individuo es elevado, y que no puede asumirse que los valores de ε no dependan de cada individuo; la opción INTERACTION hace posible la interacción entre ε y η ; FOCE permite que Ω participe en el proceso de minimización y en general permite una mejor estimación de la variabilidad interindividual.

2.3.4.2.3 Modelo de Covariables

Una de las principales ventajas del análisis farmacocinético poblacional respecto al análisis farmacocinético individual es la posibilidad de la inclusión de las covariables dentro del modelo.

Durante el desarrollo del modelo de covariables, se irán comprobando si las covariables disponibles son capaces de explicar parte de la variabilidad

encontrada y si mejoran significativamente el ajustado con respecto al modelo básico estructural.

Para encontrar que covariables pueden ser susceptibles de ser incluidas en el modelo se dispone principalmente de dos herramientas:

- **Análisis gráfico exploratorio:** se realizará un análisis gráfico exploratorio de las relaciones entre las covariables y los parámetros farmacocinéticos. Este análisis exploratorio se realiza representando gráficamente para cada uno de los individuos incluidos en el estudio, el valor individual de cada covariable frente al valor individual del parámetro farmacocinético estimado (parámetros Bayesianos) y observar la posible correlación.
- **GAM ("stepwise Generalised Additive Modelling"):** identificar una a una las covariables susceptibles de ser incluidas en el modelo, es una tarea que requiere mucho tiempo, por este motivo actualmente se está utilizando una técnica de identificación de covariables denominada GAM (modelos aditivos)¹⁷.

El GAM se ejecuta desde el programa Xpose2 (S-Plus), y es una técnica estadística similar a una regresión lineal múltiple por etapas pero que no se encuentra restringida a modelos lineales.

Los modelos de regresiones lineales múltiples para una variable dependiente "Y" y un grupo de "p" variables predictoras X_1, \dots, X_p se define como:

$$Y = \alpha + \sum_{j=1}^p \beta_j X_j + \varepsilon \quad (\text{Ec. 18})$$

donde β_j es el coeficiente de la regresión lineal, α es una constante (intersección) y ε es el termino de varianza que tiene distribución normal sobre cero con una varianza constante.

El GAM (modelos aditivos) reemplaza la función lineal por una función no lineal. La ecuación utilizada para estos modelos es la siguiente:

$$Y = \alpha + \sum_{j=1}^p f_j X_j + \varepsilon \quad (\text{Ec. 19})$$

donde f puede ser una función lineal o no lineal.

El primer paso para la utilización del GAM es determinar el modelo estructural básico (modelo sin covariables). En esta etapa no se asume covarianza entre las η , y se obtienen las estimas empíricas Bayesianas para cada parámetro del modelo. En estas condiciones se puede utilizar el GAM para identificar las covariables más útiles que permiten explicar la variabilidad en el parámetro de interés, utilizando las estimas Bayesianas de dicho parámetro como variable dependiente ("Y") y las covariables como "X_j" en la ecuación anterior.

El proceso de identificación de covariables significativas mediante el GAM, se realiza mediante un proceso por etapas. En este proceso, se examinan

distintas combinaciones de diferentes modelos con las covariables (X_j). La discriminación entre modelos se lleva a cabo mediante la comparación del criterio de información de Akaike (Akaike information criterion, AIC). La búsqueda por etapas se lleva a cabo de acuerdo con una jerarquía definida de posibles relaciones funcionales (una para cada covariable), las cuales por defecto son: la covariable no es incluida en el modelo, la covariable es incluida de forma lineal en el modelo y la covariable es incluida de forma no lineal. En cada paso y para cada covariable, se aplican los distintos modelos dentro de la jerarquía establecida y el modelo que disminuye más el AIC es retenido en el siguiente paso. La búsqueda termina cuando ningún otro modelo puede disminuir más el valor de AIC.

Mediante este proceso, cada vez que se ejecuta el GAM sobre un parámetro farmacocinético, se analiza el posible efecto de las "p" covariables sobre dicho parámetro.

Antes de utilizar estos modelos es conveniente examinar las correlaciones entre covariables. Si algunas covariables están altamente correlacionadas, como por ejemplo el peso y la altura, se tenderá a utilizar la covariable con mayor significado clínico.

Una vez identificadas las covariables que parecen explicar parte de la variabilidad en alguno de los parámetros farmacocinéticos, se pasa a incluir estas covariables, una a una, en el parámetro farmacocinético del modelo estructural básico. El modelo estructural básico es utilizado como el modelo base y para cada covariable incluida en el modelo se examina si se obtiene una mejora en el ajustado (disminución de la función objetiva, disminución de la variabilidad interindividual en el parámetro donde se ha incluido la covariable, mejora en las predicciones, etc., ver apartado de criterios de selección). Sólo en el caso de encontrar una mejora en el ajustado estará justificada la inclusión de la covariable en el parámetro farmacocinético.

2.3.4.2.4 Modelo Final

El modelo final, es el modelo farmacocinético que una vez incluidas las covariables significativas y se ha finalizado el proceso de validación (ver apartado 2.3.4.4), ajusta mejor los datos observados en la población del estudio.

Este modelo es el que permite obtener los parámetros poblacionales medios, la medida de la variabilidad interindividual y residual, la estimación de los parámetros individuales (estimaciones Bayesianas), y permite realizar predicciones.

2.3.4.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN

Se han utilizado dos tipos de criterios de selección para el refinamiento del modelo que incluyen aproximaciones gráficas y numéricas¹⁸:

- Criterios de selección para el modelo estructural básico
- Criterios de selección para la inclusión de covariables

Finalmente, la aceptación de un modelo como modelo final depende de los resultados obtenidos durante el ejercicio de validación del modelo (ver 2.3.4.4).

2.3.4.3.1 Criterios de Selección para el Modelo Estructural Básico

Para seleccionar el modelo estructural básico optimizado de la población en estudio se han utilizado los siguientes criterios de selección:

- Cualquier modelo ha sido considerado como válido si ha cumplido las siguientes condiciones:
 - Ha finalizado correctamente el ajustado.
 - El número de cifras significativas de todos los parámetros estimados por NONMEM es igual o superior 3.
- Para disponer de un criterio estadístico que nos permita decidir si es necesario o no aceptar un modelo más complejo (con más parámetros) para describir los datos del estudio, se ha utilizado el valor de la función objetiva (OBJ) proporcionado por NONMEM. Se identifican dos tipos de modelos:
 - Modelo Restringido: es el modelo más sencillo con el que se quiere realizar la comparación.
 - Modelo Completo: modelo con uno o varios parámetros de más que el modelo restringido.

Para conocer si un modelo más complejo (modelo completo) explica mejor los datos que un modelo más simple (modelo restringido), se analiza la diferencia entre los valores de la OBJ obtenidos para ambos modelos. Esta diferencia en el valor de la OBJ entre dos modelos anidados se asume que tiene una distribución aproximada χ^2 y con grados de libertad igual a la diferencia en el número de parámetros entre los dos modelos. Por tanto se consideró como significativo a un nivel de significación de $p < 0.005$ un descenso en 7.88 puntos en el valor de OBJ para un grado de libertad (diferencia de un parámetro entre modelos). No obstante, modelos que proporcionaron descensos en de OBJ cercanos a este valor fueron estudiados en detalle.

- Para cada modelo se han valorado las siguientes características:
 - Evaluación del error estándar relativo de los parámetros (RSE%). A menor valor de RSE% mayor precisión en la estima del parámetro. En la siguiente ecuación se muestra el cálculo del RSE%:
$$RSE\% = (\text{Error Estándar} / \text{Parámetro}) * 100 \quad (\text{Ec. 20})$$
 - Constatar que existe una mínima correlación entre los parámetros
 - Disminución en la estimación de la varianza interindividual y residual resultante por la adición o eliminación de algún parámetro.

- Los gráficos básicos para comprobar la bondad del ajustado (obtenidos por el programa Xpose2) que nos han mostrado si el modelo presenta desviaciones o tendencias, son los siguientes:
 - En los dos paneles de la Figura 10, se muestra un ejemplo de las predicciones para el individuo tipo en la población (PRED) y las predicciones para cada individuo (IPRED) frente a la variable dependiente (concentraciones observadas, DV), respectivamente. Los círculos verdes y granates corresponden a los valores predichos PRED y IPRED, respectivamente, mientras que la línea sólida representada corresponde a la línea de identidad. Si el modelo estructural es el apropiado, los datos estarán agrupados uniformemente alrededor de la línea de identidad a lo largo de todo el ámbito de concentraciones y por tanto la línea de identidad pasará aproximadamente por el medio de todos los datos. La gráfica de ajustado IPRED vs DV debe tener un mejor ajustado que la gráfica PRED vs DV, ya que IPRED incorpora los diferentes términos de variabilidad interindividual (η) necesarios para el ajuste individual de los datos. Además esta gráfica (IPRED vs DV) puede ayudar en la identificación de la variabilidad entre ocasiones (IOV) y en decidir sobre la idoneidad del modelo estructural.

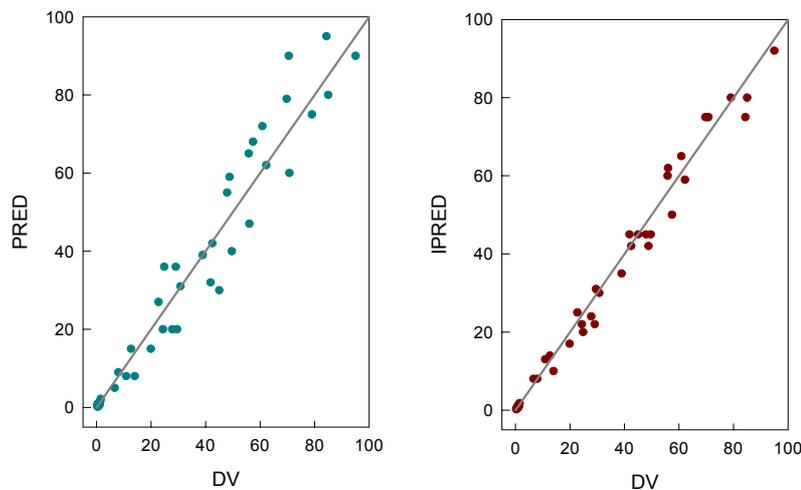


Figura 10. Ejemplo de los gráficos de bondad de ajustado PRED y IPRED frente a DV.

- La Figura 11 representa un ejemplo de los valores absolutos para los residuales individuales ponderados ($|IWRES|$) frente a las predicciones individuales (IPRED). Esta gráfica permite analizar si el modelo de error residual es correcto. La varianza de los residuales individuales ponderados tiene el valor de unidad y no se encuentran correlacionados, por tanto si el modelo es adecuado no se deben observar tendencias marcadas y la línea "smooth" debería ser aproximadamente horizontal.

Los valores de los residuales ponderados individuales deberán ser inferiores a 2. Los valores superiores a 3 pueden ser explorados como posibles "outliers".

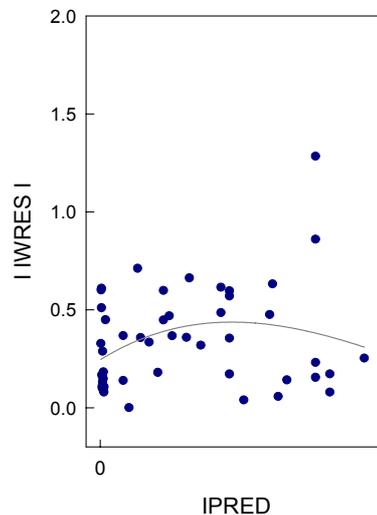


Figura 11. Ejemplo del gráfico de bondad de ajustado I IWRES I frente a IPRED.

- En la Figura 12 se representa un ejemplo de los residuales ponderados (WRES) frente a la variable independiente (TIME). Este gráfico permite evaluar la bondad del ajustado y analiza las dependencias de los valores a lo largo de la variable independiente (tiempo). Los residuales deben estar aleatoriamente dispersos sobre la línea de residual=0. Este gráfico permite un diagnóstico general del ajustado, principalmente del modelo estructural, y no debe mostrar ninguna tendencia marcada. En general, los valores de los residuales deberán estar comprendidos entre ± 2 .

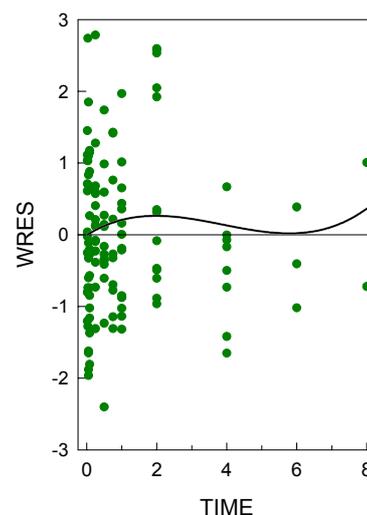


Figura 12. Ejemplo del gráfico de bondad de ajustado WRES frente a la variable independiente (TIME).

- En la Figura 13 se representa un ejemplo de la distribución de un término de variabilidad interindividual (η o ETA). Las distribuciones de los distintos términos de variabilidad interindividual deben estar simétricamente distribuidas sobre 0, ya que es una premisa para el uso del programa NONMEM.

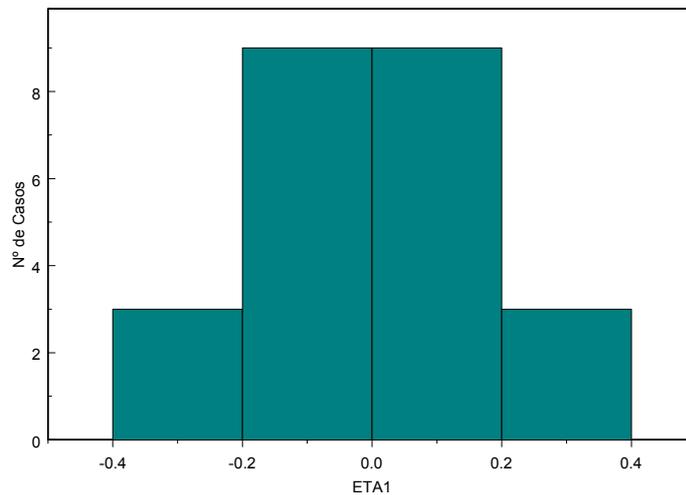


Figura 13. Ejemplo de la distribución de los estimados Bayesianos individuales que conforman la variabilidad interindividual en un parámetro.

- Las gráficas individuales correspondientes a la concentración observada (DV), las predicciones individuales basadas en las estimaciones individuales Bayesianas (IPRED) y las predicciones típicas en la población (PRED) frente la variable independiente (Tiempo en horas) también han sido exploradas (ver ejemplo en la Figura 14). En estas gráficas los valores predichos (PRED y IPRED) deben ser consistentes con los datos observados (DV).

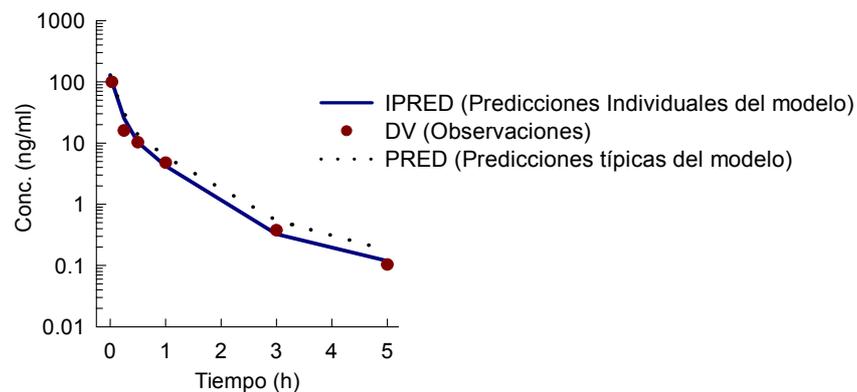


Figura 14. Ejemplo de representación gráfica de DV, IPRED y PRED frente a la variable independiente (tiempo).

2.3.4.3.2 Criterios de Selección para la Inclusión de Covariables

Para evaluar el efecto de incluir una covariable dentro del modelo se han utilizado los siguientes criterios de selección:

- Técnicas gráficas que incluyen las gráficas de las estimas Bayesianas de los parámetros frente a las covariables, para examinar sus posibles relaciones.
- Generalised Additive Modelling (GAM): Un cambio de 7.88 en la OBJ será considerado significativo ($p < 0.005$) para la inclusión de la covariable cuando el modelo restringido tiene un parámetro menos de regresión que el modelo completo.
- Obtener un menor error estándar relativo (RSE%) en las estimas de los parámetros al incluir la covariable en el modelo.
- Constatar que en la gráfica WRES vs PRED, los residuales se encuentran aleatoriamente distribuidos alrededor de cero.
- Valorar la relevancia de la covariable, evaluando por ejemplo la disminución en el grado de variabilidad interindividual al incluir la covariable.
- Comprobar que la inclusión de la covariable tiene sentido desde un punto de vista biológico.

2.3.4.4 VALIDACIÓN DEL MODELO

Una vez seleccionado el modelo final y con la finalidad de comprobar la robustez del modelo, se ha realizado un proceso de validación en tres etapas distintas:

2.3.4.4.1 Determinación del error de predicción.

En todos los parámetros estimados del modelo final, tanto parámetros fijos como aleatorios, se evaluó el sesgo y la precisión calculando los siguientes parámetros:

- MPE: es la mediana del error de predicción (Sesgo).
- MAPE: es la mediana del valor absoluto del error de predicción (Precisión).

Para obtener el error y precisión de cada parámetro se simuló 100 nuevos grupos de datos en base a los estimados poblacionales obtenidos en el modelo final seleccionado. Cada uno de estos grupos de datos consistía del mismo número de individuos, de dosis, de covariables, y tiempos de muestreo que los datos originales. Una vez realizadas las simulaciones se procedió para cada uno de los 100 nuevos grupos de datos a la estimación de los parámetros farmacocinéticos. Posteriormente se determinó el error de predicción (PE) utilizando la siguiente ecuación:

$$PE = ((\theta_{sim} - \theta_{pop}) / \theta_{pop}) * 100 \quad (\text{Ec. 21})$$

donde θ_{sim} y θ_{pop} representan el valor del parámetro obtenido durante el análisis de los datos simulados y el valor del parámetro obtenido en el modelo final seleccionado, respectivamente.

El sesgo y la precisión fueron calculados para cada parámetro a través de la mediana del error de predicción (MPE) y la mediana del valor absoluto del error de predicción (MAPE).

2.3.4.4.2 Validación cruzada.

Para determinar si los parámetros estimados con el modelo final seleccionado dependen en exceso de uno o más individuos, se realizó un análisis de validación cruzada ("cross-validation") con el grupo de individuos más influyente de la población en estudio.

Para realizar este análisis de validación cruzada se crearon nuevos grupos de datos. En cada grupo de datos un individuo (o grupo de individuos) de la población en estudio era excluido. Posteriormente se ajustó cada uno de los grupos de datos con el modelo final seleccionado, estimándose el valor poblacional medio de cada parámetro.

La influencia de cada individuo sobre el ajustado fue explorada comparando los nuevos parámetros poblacionales estimados para cada grupo de datos, con aquellos obtenidos por el modelo final seleccionado (análisis de todos los datos).

2.3.4.4.3 Mínimo Local.

Los parámetros estimados en el modelo final seleccionado son aquellos asociados al modelo con menor valor de función objetiva (OBJ). La violación de esta premisa puede ocurrir si el modelo final representa un mínimo local en lugar del mínimo global del ajustado a los datos.

Para comprobar que realmente el modelo final se encuentra en un mínimo global, se realizó un nuevo análisis del modelo final seleccionado, pero con las estimas iniciales perturbadas aproximadamente un 25% respecto a las estimas iniciales del modelo final; posteriormente se determinó el nuevo valor de los parámetros.

Solo se aceptaron cambios en la tercera cifra significativa cuando se compararon los valores de los nuevos parámetros estimados y los obtenidos por el modelo final¹⁴.

2.3.4.5 EXPLORACIÓN DEL MODELO FINAL

Una vez seleccionado el modelo final, y con la finalidad de explorar las implicaciones de las estimaciones de las variabilidades interindividual y residual en las predicciones farmacocinéticas del modelo, se han simulado 1000 perfiles de concentración de lanreótida frente al tiempo para cada una de las dosis y vías ensayadas.

A partir de estos resultados, se han generado una serie de gráficas donde se representan los valores observados (DV) y los valores predichos mediante el proceso de simulación. Las líneas punteadas inferior y superior que cubren el 90% de las predicciones, han sido construidas calculando para cada tiempo el percentil 5% y 95% de las 1000 simulaciones realizadas. También se representó el percentil 50% (ver ejemplo en la Figura 15).

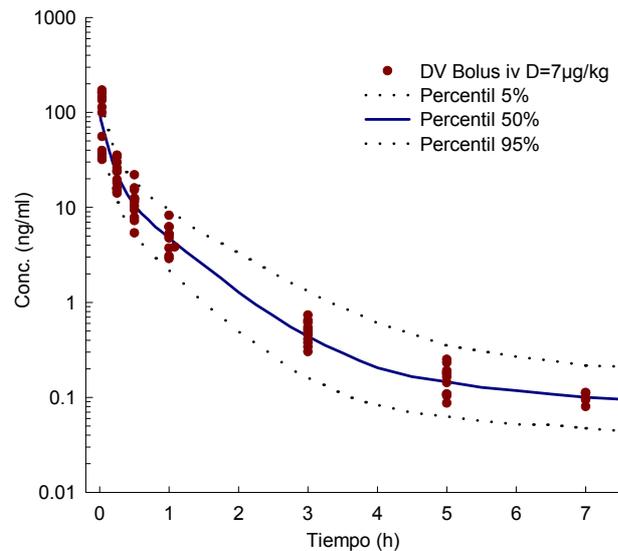


Figura 15. Ejemplo de representación gráfica de los valores observados (DV) y los valores predichos mediante el proceso de simulación frente a la variable independiente (tiempo).

Si los valores observados (DV) se encuentran en general dentro del intervalo del 90% y el percentil 50% pasa por el medio de las observaciones a cada tiempo, esto nos confirma la robustez y la capacidad de predicción del modelo final seleccionado.

2.3.5 ANALISIS POBLACIONAL PARA CADA ESPECIE

En un primer paso, se ha realizado la determinación de los parámetros farmacocinéticos poblacionales para cada una de las especies ensayadas (rata, perro, cerdo y hombre) por separado, mediante el programa de efectos mixtos NONMEM.

Para cada especie ensayada, se agruparon todos los datos disponibles y se realizó el desarrollo del modelo poblacional hasta obtener en una primera etapa los parámetros poblacionales correspondientes al modelo estructural básico (sin covariables) y en una segunda etapa los parámetros poblacionales finales.

Con este análisis se ha conseguido describir la farmacocinética poblacional de la lanreótida en las 4 especies ensayadas.

2.3.6 ESCALADO ENTRE ESPECIES

En un segundo paso, se han ensayado diferentes modelos de escalado entre especies, utilizando los datos provenientes de los estudios realizados en la rata, el perro y el cerdo (no se han incluido en el análisis los datos obtenidos en humanos).

Para desarrollar los diferentes modelos de escalado entre especies, también se ha utilizado el programa de efectos mixtos NONMEM. Una de las principales ventajas de la utilización de técnicas con modelos de efectos mixtos (NONMEM) en el escalado entre especies, es que permiten realizar el ajustado con todos los datos a

la vez desde diferentes individuos y especies (análisis simultáneo), pero preservando la individualidad.

El escalado entre especies se ha realizado mediante dos aproximaciones:

- Alometría
- Tiempos farmacocinéticos

En ambas aproximaciones, se han utilizado como valores referencia los valores obtenidos por el modelo estructural básico (modelo sin covariables) para cada una de las especies ensayadas.

Para seleccionar el mejor modelo de escalado ente especies se han seguido principalmente dos criterios:

- El modelo que es capaz de ajustar correctamente los datos en las tres especies incluidas en el análisis.
- El modelo que predice mejor los parámetros y el perfil farmacocinético en el hombre.

2.3.6.1 ALOMETRIA

La alometría se basa en el concepto de que entre distintas especies puede existir una relación entre los parámetros farmacocinéticos de un principio activo y una característica fisiológica (principalmente el peso corporal).

En esta Memoria se han realizado diferentes aproximaciones^{10,19}:

- Relación entre el parámetro farmacocinético y el peso corporal:

$$Y=aW^b \quad (\text{Ec. 22})$$

- Relación entre el parámetro farmacocinético, el peso corporal y el peso del cerebro:

$$Y=aW^bBW^b \quad (\text{Ec. 23})$$

- Relación entre el parámetro farmacocinético, la esperanza máxima de vida y el peso corporal:

$$MLP \cdot Y=aW^b \quad (\text{Ec. 24})$$

donde Y es cualquier parámetro, a es el coeficiente alométrico, b es el exponente alométrico, W es el peso corporal (kg), BW es el peso del cerebro expresado como porcentaje del peso corporal y MLP es la esperanza máxima de vida.

El análisis alométrico se ha realizado utilizando todos los datos provenientes de las tres especies ensayadas (incluyendo vía intravenosa y vía extravascular).

Al utilizar NONMEM, los coeficientes y exponentes alométricos (a y b) que caracterizan la relación entre los parámetros farmacocinéticos y las características de cada especie (peso corporal, peso del cerebro, esperanza de vida máxima, etc.) son estimados directamente en un solo paso desde los datos de tiempo concentración provenientes de todas las especies.

En las primeras fases de investigación de un fármaco, normalmente solo se dispone de información farmacocinética en dos especies animales, normalmente ratón o rata y perro o mono. Por este motivo y con el fin de simular las condiciones

normales de desarrollo de un fármaco, se ha evaluado un modelo alométrico de la lanreótida utilizando sólo dos especies animales (rata y perro), con la finalidad de poder comprobar la capacidad de predicción en el hombre al incluir en el análisis sólo dos especies animales utilizadas habitualmente en los estudios preclínicos. También se ha evaluado las diferencias entre utilizar dos especies (rata y perro) y tres especies (rata, perro y cerdo) al realizar la alometría.

2.3.6.2 TIEMPOS FARMACOCINÉTICOS

Además del tiempo cronológico, común para todos los seres vivos, existe un tiempo farmacocinético (diferente para cada especie) y que mide el intervalo en el que se lleva a cabo cualquier proceso de tipo farmacocinético en dicha especie.

Del mismo modo que se utiliza el peso corporal para correlacionar fenómenos biológicos y farmacocinéticos, se utiliza también como base para el cálculo de diferentes medidas de tiempo (equivalente, kallynochron y apolysichron). Se han calculado diferentes tiempos farmacocinéticos con los datos obtenidos en las tres especies animales tras la administración intravenosa de la lanreótida (no se han utilizado los datos extravasculares), con el objetivo de evaluar cual es la mejor unidad de tiempo que normaliza el perfil farmacocinético en las tres especies y además permite obtener una mejor predicción del perfil cinético en el hombre.

2.3.6.2.1 Cálculo tiempos farmacocinéticos^{20,21}:

Los tiempos farmacocinéticos han sido calculados a partir del tiempo cronológico de acuerdo con los métodos descritos por Dedrick²² y Boxenbaum²³. De esta manera se han calculado los siguientes tiempos farmacocinéticos:

- Tiempo equivalente: El tiempo cronológico (t) ha sido normalizado a tiempo equivalente, dividiendo el tiempo cronológico por el peso corporal elevado a 0.25 ($t / W^{0.25}$).

El gráfico elemental de Dedrick, donde se representan las concentraciones normalizadas por la dosis y el peso frente al tiempo equivalente, permite evaluar la fiabilidad del método, ya que si los perfiles de tiempo-concentración de diferentes especies se colapsan en una sola curva, indica que la unidad de tiempo equivalente es una buena aproximación.

- Kallynochrons: el tiempo cronológico ha sido convertido a Kallynochrons dividiendo el tiempo cronológico por el peso elevado a 1-x ($t / W^{(1-x)}$) donde x es el exponente alométrico del aclaramiento (CL). En el cálculo de los Kallynochrons se asume que el volumen de distribución (V_d) es directamente proporcional al peso corporal (W).
- Apolysichrons: los Apolysichrons están definidos como el tiempo cronológico dividido por el peso corporal elevado a y-x (t / W^{y-x}), donde "x" e "y" corresponden a los exponentes del CL y V_d , respectivamente.

Durante el ajustado de los diferentes modelos utilizando las distintas unidades de tiempo, se han utilizado:

- Las concentraciones de lanreótida sin transformar
- La dosis real administrada a cada individuo ha sido normalizada por el peso corporal individual (mg/kg). En el caso de los Apolysichrons, se utilizó para la normalización, la dosis real administrada dividida por el peso corporal elevado a "y" (W^y).

Para poder predecir directamente del modelo alométrico los parámetros farmacocinéticos en el hombre, cada unidad de tiempo animal (t_{animal}) ha sido convertida en tiempo humano (t_{humano}) utilizando las siguientes ecuaciones:

- Tiempo equivalente:

$$t_{\text{humano}} = t_{\text{animal}} \cdot (W_{\text{humano}}/W_{\text{animal}})^{0.25} \quad (\text{Ec. 25})$$

- Kallynochrons:

$$t_{\text{humano}} = t_{\text{animal}} \cdot (W_{\text{humano}}/W_{\text{animal}})^{1-x} \quad (\text{Ec. 26})$$

- Apolysichrons:

$$t_{\text{humano}} = t_{\text{animal}} \cdot (W_{\text{humano}}/W_{\text{animal}})^{y-x} \quad (\text{Ec. 27})$$

donde W_{humano} corresponde al peso medio en humanos (67.364 kg) y W_{animal} corresponde al peso individual de cada animal expresado en kg.

Una vez finalizadas las dos aproximaciones de escalado entre especies (alometría y tiempos farmacocinéticos) se ha evaluado cual es la aproximación que permite obtener una mejor predicción de los parámetros en el hombre.

2.4 REFERENCIAS

- 1 Barbanoj M et al. Pharmacokinetics of the somatostatin analog lanreotide in patients with severe chronic renal insufficiency. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 1999, VOL 66 N° 5: 485-491.
- 2 Dray F. Validation du dosage radioimmunologique du lanreotide utilisant l'antiserum 582. Centre d'applications biologiques. Laboratoire de biophysique CHU Cochin Port-Royal. Paris. 1995.
- 3 Beaufour-Ipsen Industrie. Service Galénique Nouvelle. 28100 Dreux. France.
- 4 Fraker P, Speck J. Protein and cell membranes iodination with a sparingly soluble chloroamide 1,3,4,6, tetrachloro 3 α , 6 α diphenyl glycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1978 80, 849
- 5 SHAH, U.P. Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics* 1991 16: 249-255.
- 6 Caporal-Gautier J., Hivet JM. Guide de validation analytique Rapport d'une commission SFSTP.I. *Metodologie STP Pharma Practiques* 1992 2 (4): 205-226.
- 7 R. D. Schoenwald. J.F. Barret. *Pharmacokinetics in drug discovery and development.* CRC Press. 2002
- 8 A.J. Atkinson, C.E. Daniels, R.L. Dedrick, C. V. Grudzinskas, S. P. Markey. *Principles of clinical pharmacology.* Academic Press. 2001

- ⁹ Mahmood I. Comparison of different reduced sampling approaches for the estimation of pharmacokinetic parameters for long half-life drugs in patients with renal or hepatic impairment. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 40 (2): 53-59, 2002.
- ¹⁰ V. F. Cosson, E. Fuseau, C. Efthymiopoulos, and A. Bye. Mixed effect modeling of sumatriptan pharmacokinetics during drug development. I: Interspecies allometric scaling. *J.Pharmacokinet.Biopharm.* 25 (2):149-167, 1997
- ¹¹ J. Doménech Berrozpe, J. Martínez Lanao, JM Plá Delfina. *Biofarmacia y farmacocinética*. Editorial Síntesis. 1997
- ¹² Guidance for Industry Population Pharmacokinetics. FDA. February 1999.
- ¹³ Aarons L, Karlsson MO, Mentré F, Rombout F, Steimer JL, van Peer A. Role of modelling and simulation in Phase I drug development. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13:115-122, 2001.
- ¹⁴ Karlsson MO, Jonsson EN, Wiltse CG, Wade JR. Assumption Testing in Population Pharmacokinetic Models: Illustrated with an Analysis of Moxonidine Data from Congestive Heart Failure Patients. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 26: 207-246, 1998.
- ¹⁵ Beal SL, Sheiner LB. *NONMEM Users Guides*. San Francisco (CA): NONMEM Project Group, University of California at San Francisco, 1992.
- ¹⁶ Jonsson EN, Karlsson MO. Xpose-An S-PLUS Based Population Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Model Building Aid for NONMEM. *Computer Methods and Programs in Program Biomedicine* 58: 51-64, 1999.
- ¹⁷ Mandema J.M., Verotta D., and Sheiner L. B.. Building population pharmacokinetic-pharmacodynamic models. I. Models for covariate effects. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 20 (5): 511-528, 1992.
- ¹⁸ Ette EI, Ludden TM. Population Pharmacokinetic Modeling. The importance of Informative Graphics. *Pharmaceutical Research*, Vol.12 No 12, 1995.
- ¹⁹ Martín-Jiménez T., Riviere J.E. Mixed-Effects modelling of the interspecies pharmacokinetic scaling of oxytetracycline. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 91, No 2: 331-341, 2002.
- ²⁰ T. Lave, Trafit B. Levet, Hoffmann AH Schmitt, B. Morgenroth, W. Richter, and R. C. Chou. Interspecies scaling of interferon disposition and comparison of allometric scaling with concentration-time transformations. *J.Pharm.Sci.* 84 (11):1285-1290, 1995.
- ²¹ A. Puigdemont, J. Ramis, R. Guitart, and M. Arboix. Species scaling of propafenone disposition and concentration--time relationships among eight mammalian species. *J.Pharm.Sci.* 82 (11):1126-1129, 1993.
- ²² R. L. Dedrick. Animal scale-up. *J.Pharmacokinet.Biopharm.* 1 (5):435-461, 1973.
- ²³ H. Boxenbaum. Interspecies scaling, allometry, physiological time, and the ground plan of pharmacokinetics. *J.Pharmacokinet.Biopharm.* 10 (2):201-227, 1982.