



Estudio farmacocinético del elomotecan

Anna B. Pérez Mayoral



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NoDerivatives 3.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA

ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DEL ELOMOTECAN

ANNA B. PÉREZ MAYORAL, 2013

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA

PROGRAMA DE DOCTORAT- RECERCA, DESENVOLUPAMENT I
CONTROL DE MEDICAMENTS

ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DEL ELOMOTECAN

Memoria presentada por Anna B. Pérez Mayoral para optar al título
de doctor por la Universitat de Barcelona

Los directores de tesis:

Dra. H. Colom Codina

Dra. C. Peraire Guitart

Dr. J.M. Cendrós Carreras

El tutor de tesis:

La doctoranda

Dra. C. Peraire Guitart

Anna B. Pérez Mayoral

Anna B. Pérez Mayoral, 2013

AGRAÏMENTS

Vull agrair el talent i la disponibilitat que els meus tres directors de tesis, han posat al meu avast per aconseguir que aquest treball s'hagi convertit en realitat.

A la Doctora Helena Colom, vull agrair els seus encertats consells, el rigor científic i per introduir-me en el món de la farmacocinètica poblacional, un món que era totalment aliè per mi i que ha resultat molt engrescador. Ha estat un privilegi poder aprendre d'una experta en la matèria com ho és l'Helena.

A la Doctora Concepció Peraire vull agrair els seus coneixements farmacocinètics, meticulositat i constant recolzament. Els seus coneixements i experiència en el desenvolupament de nous fàrmacs han estat crucials pel correcte desenvolupament d'aquest projecte.

Al Doctor Josep Maria Cendrós per fer-me partícep dels seus coneixements al·lomètrics poblacionals així com per la seva visió pràctica. Espero que sempre recordis que la meva va ser la primera de les moltes tesis que segur dirigiràs.

A la direcció del grup Ipsen per deixar-me utilitzar les instal·lacions així com les dades obtingudes. Vull agrair a tot el personal que formaven part del departament de farmacocinètica i bioanàlisis del laboratoris Ipsen Pharma els anys compartits. Entre vosaltres vaig créixer com a persona i com a professional. De tots he après alguna cosa i a la motxilla tinc un bon record de tots vosaltres.

Vull agrair al Dr. Rossend Obach el model que ha estat pels que hem tingut el privilegi de treballar amb ell i al Dr. Carles Celma el que m'introduís en el món de l'espectrometria de massa i el bioanàlisis, un camp en el que sense dubte és un gran expert.

Als estabularis d'Ipsen Pharma (Barcelona), Piedmont Research Center (EEUU), MDS Pharma Services (França), Centre Recherches biologiques (França) i Centre International Toxicologie (França) per la seva col·laboració en la fase experimental *in vivo*.

Al Dr. Ignacio Díez pels seus aclariments en qüestions galèniques i pel seu suport en la fase final d'aquest projecte.

A tots els meus amics d'Ipsen Pharma els bons moments compartits, sense vosaltres hagués estat tot plegat més avorrit.

Als meus companys de la secció d'anàlisis dels Laboratoris Lesvi, el seu recolzament i ànims en l'etapa final d'aquest projecte.

Als meus amics, vull agrair tots els cafès que hem fet i sobretot els que hem deixat de fer. Gràcies per escoltar les meves històries i entendre les meves ausències.

Als meus pares, a les meves germanes, a la meva sogra, als meus cunyats i com no, als meus nebodets per donar-me ànims i força per continuar cada dia. Vull aprofitar i dir-li a ma germana Eva que vagi reservant pista de Pàddel i a la meva germana Marta que té una nova companya de scrapbooking.

Tot seguit, vull agrair a la persona que ha fet possible aquest treball, el meu marit, en Ramon. La seva comprensió, ajut i suport en tots els camps durant tots aquests anys han fet que aquestes línies siguin una realitat. Moltes gràcies per entendre'm i fer també teves les meves inquietuts.

He deixat pel final a la persona a qui vull dedicar aquest treball, a la Berta, el meu bitxet preciós. Gràcies per entendre que de vegades no podiem jugar perquè la mama havia de fer feina. M'ha encantat compartir l'estudi amb tu i veure com has passat de només pintar a fer lletra lligada. Espero que aquest treball et serveixi d'inspiració en el futur.

A tots i totes, gràcies i mil gràcies per la vostra col·laboració i suport ja que sense vosaltres de ben segur que aquest vaixell no hagués arribat a port.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
1.1 CÁNCER	9
1.1.1 CLASIFICACIÓN	10
1.1.2 EPIDEMIOLOGÍA	12
1.1.3 TRATAMIENTO	13
1.2 CAMPTOTECINAS	15
1.2.1 ANTECEDENTES	15
1.2.2 TOPOISOMERASAS	16
1.2.3 RELACIÓN ESTRUCTURA - ACTIVIDAD	18
1.2.4 IRINOTECAN	19
1.2.5 TOPOTECAN	21
1.2.6 DIFLOMOTECAN	22
1.2.7 ELOMOTECAN	23
1.3 TÉCNICA BIOANALÍTICA	25
1.4 FARMACOMETRÍA	27
1.4.1 FARMACOCINÉTICA COMPARTIMENTAL	28
1.4.2 FARMACOCINÉTICA NO COMPARTIMENTAL	29
1.4.3 FARMACOCINÉTICA POBLACIONAL	31
1.4.4 ALOMETRIA	42
OBJETIVO	49
PLAN DE TRABAJO	53
MATERIAL Y METODOS	57
4.1 METODOLOGÍA ANALÍTICA	59
4.1.1 ESTÁNDARES	59
4.1.2 REACTIVOS	59
4.1.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	59
4.1.4 PROCESADO DE LAS MUESTRAS DE ELOMOTECAN Y BN80960	61
4.1.5 ANÁLISIS INSTRUMENTAL	62
4.1.6 VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS	64
4.1.7 DETERMINACIÓN DEL ELOMOTECAN EN LAS MUESTRAS DE PLASMA	68
4.2 DISEÑO DE ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS	70
4.2.1 FORMULACIONES	70
4.2.2 ESTUDIO FARMACOCINÉTICO EN EL RATÓN	72
4.2.3 ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN LA RATA	73
4.2.4 ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN EL PERRO	75
4.2.5 ESTUDIO FARMACOCINÉTICO EN EL MONO	79
4.3 TRATAMIENTO FARMACOCINÉTICO DE LOS DATOS	79
4.3.1 ANÁLISIS NO COMPARTIMENTAL	80
4.3.2 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL	81
4.4 PROGRAMAS INFORMÁTICOS	88
RESULTADOS	89
5.1 RESULTADOS ANALÍTICOS	91
5.1.1 VALIDACION DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS	91
5.1.2 RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE LA DETERMINACIÓN DEL ELOMOTECAN EN LAS MUESTRAS DE PLASMA PROCEDENTES DE LOS ESTUDIOS EXPERIMENTALES	99

5.2	ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS Y FARMACOMETRÍA	107
5.2.1	ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN EL RATÓN	107
5.2.2	ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN LA RATA	116
5.2.3	ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN EL PERRO	143
5.2.4	ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN EL MONO	175
5.2.5	MODELO DE ESCALADO ALOMÉTRICO POBLACIONAL	185
DISCUSIÓN		195
CONCLUSIONES		207
REFERENCIAS		211
ANEXO I		219

ABREVIATURAS

AcOH Ácido acético

ADN Ácido desoxirribonucleico

AF Ácido fórmico

AUC Área bajo la curva concentración-tiempo desde tiempo cero hasta el infinito

AUC/D Área bajo la curva concentración-tiempo desde tiempo cero hasta el infinito normalizada por la dosis

AUC_{extrap} Porcentaje de área extrapolada

AUC_t Área bajo la curva concentración-tiempo desde tiempo cero hasta el último tiempo con concentraciones cuantificables

AUC_t/D Área bajo la curva concentración-tiempo desde tiempo cero hasta el último tiempo con concentraciones cuantificables, normalizada por la dosis

AUMC Área bajo la curva desde el primer momento de la curva desde tiempo cero hasta el infinito

BQL Concentración por debajo del límite de cuantificación

BW Peso del cerebro

CH₃CN Acetonitrilo

CH₃OH Metanol

C₀ Concentración estimada a tiempo cero

C₀/D Concentración estimada a tiempo cero normalizada por la dosis

CL Aclaramiento plasmático

C_{max} Concentración máxima

C_{max}/D Concentración máxima normalizada por la dosis

C_{max}/AUC Cociente indicativo de la velocidad de absorción

CV% Coeficiente de variación porcentual

CWRES Residuales ponderados condicionados

D Dosis

DE Desviación estándar

DMA N,N-dimetilacetamida

ABREVIATURAS

DMSO Dimetilsulfóxido

DMF N,N-dimetilformamida

DV Datos observados

F Biodisponibilidad

FDA Food and Drug Administration

FOCE Estimación condicional de primer orden

FOCEI Estimación condicional de primer orden con interacción

GAM Modelo aditivo generalizado (generalized additive model)

H Hembra

HP β CD Hidroxipropil-beta-ciclodextrina

HPLC Cromatografía líquida de alta eficacia

IC₅₀ concentración inhibitoria 50%

IC 95% Intervalo de confianza del 95%

IPRED Predicciones individuales

IRES Residuales individuales

i.v. Intravenosa

IWRES Residuales individuales ponderados

K Constante de velocidad de eliminación del fármaco del organismo

K_a Constante de velocidad de absorción

K₁₂ Constante de velocidad de transferencia del fármaco del compartimento 1 al 2

K₂₁ Constante de velocidad de transferencia del fármaco del compartimento 2 al 1

K₁₃ Constante de velocidad de transferencia del fármaco del compartimento 1 al 3

K₃₁ Constante de velocidad de transferencia del fármaco del compartimento 3 al 1

LOQ Límite de cuantificación

M Macho

MLP Máxima esperanza de vida

MRT Tiempo medio de residencia desde tiempo cero hasta el infinito

n Número de valores

NONMEM Método no lineal de efectos mixtos

On-line SPE-HPLC-MS/MS Extracción en fase sólida on-line acoplada a la cromatografía líquida de alta eficacia y a la espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray

pc-VPC Evaluación predictiva visual normalizada por la predicción (“prediction corrected Visual Predictive Check”)

PEG Polietilenglicol

p.o. Administración oral

PRED Predicciones poblacionales

Q Aclaramiento de distribución

r Coeficiente de correlación

R_{ac(AUC)} Cociente de acumulación

RE Error residual

RES Concentraciones residuales

RSE Coeficiente de variación (Relative standard error)

SPE Extracción en fase sólida

t_{1/2λz} Semivida aparente de eliminación

t_{max} Tiempo en el que se alcanza la concentración máxima

t_R Tiempo de retención

V_c (V1) Volumen de distribución en el compartimento central

VII Variabilidad interindividual

VPC Evaluación predictiva visual (“visual predictive check”)

V_{perif} (V2 y V3) Volumen de distribución en el(los) compartimento(s) periférico(s)

V_{ss} Volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario

V_z Volumen de distribución calculado en la fase terminal

W Peso corporal

WRES Residuales ponderados

ABREVIATURAS

α Constante de velocidad de disposición rápida (modelo tricompartmental)

β Constante de velocidad de disposición intermedia (modelo tricompartmental)

γ Constante de velocidad de disposición lenta (modelo tricompartmental)

ε Variabilidad residual

λ_z Constante de velocidad de eliminación

η Variabilidad interindividual

θ Valor típico del parámetro

σ Desviación estándar de la variabilidad residual

ω Desviación estándar de la variabilidad residual interindividual

1 INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) un tumor es un término utilizado para aquellas enfermedades en las que células anormales se dividen sin control. Mientras que un tumor benigno no se puede diseminar por invasión o por metástasis, y por tanto, sólo crece localmente, un tumor maligno o cáncer, es capaz de diseminarse por invasión de áreas contiguas o por metástasis.

Las principales características de los tumores malignos son:

- **Angiogénesis.** Es la capacidad de formar nuevos vasos sanguíneos por medio de la secreción de ciertas sustancias, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Los nuevos vasos son indispensables para la nutrición de las células tumorales y le permite al parénquima tumoral tener un gran aporte de oxígeno y nutrientes, lo cual favorecerá su crecimiento descontrolado y proliferación a mayor velocidad y distancia.
- **Perdida de la adherencia celular.** Las células tumorales para poder diseminarse deben ser capaces de romper su unión con la estructura del tejido en el que se originan. En el cáncer la adhesión entre células se reduce por la pérdida de las moléculas de adhesión celular (MAC), proteínas localizadas en la superficie de la membrana celular.
- **Proteólisis.** Las células tumorales producen proteasas que degradan la matriz extracelular y favorecen la expansión y diseminación del tumor.
- **Metástasis.** Es la migración de las células malignas. Algunas abandonan el tumor primario y viajan por medio del sistema circulatorio o linfático a un sitio alejado del organismo originando un tumor secundario de las mismas características que el primario.
- Las células tumorales sufren una transformación de manera que pierden los mecanismos normales de control del crecimiento celular.

El ciclo celular consta de varias fases bien diferenciadas ^[1]:

- **Fase G1 (fase del primer hueco):** También se denomina fase post-mitótica o pre-sintética. La célula contiene dos copias de cada cromosoma, el estado diploide normal de una célula eucariota. En un momento tardío de la fase G1, se desencadena el compromiso para la división celular.
- **Fase S (fase de síntesis):** Se produce la replicación del ADN. Necesita cambios en la arquitectura celular, la ruptura de la envoltura nuclear, la condensación de la cromatina y la reorganización general del citoesqueleto. Las histonas y las proteínas no histonas se depositan sobre las moléculas hijas de ADN para reproducir las estructuras de cromatina.
- **Fase G2 (fase del segundo hueco):** También se denomina fase pre-mitótica o post-sintética. La célula tiene un contenido de ADN de cuatro veces la cantidad haploide.

Las fases G₁, S y G₂ se denominan interfase y en ésta, la cromatina está dispersa por el núcleo.

- Fase M (fase de mitosis): La mitosis consta de cuatro subfases: profase, metafase, anafase y telofase y culmina con la división de una célula madre en dos hijas. Durante la profase, los cromosomas replicados se condensan, la membrana nuclear se desintegra y se forma el huso mitótico. En la metafase, cada cromosoma se alinea de manera independiente. Durante la anafase, los microtúbulos contráctiles que forman el huso mitótico arrastran los pares de cromátidas separándolas, de manera que cada una de las células hija reciba un conjunto idéntico de cromosomas y finalmente, en la telofase, la membrana nuclear vuelve a formarse alrededor de cada núcleo hijo y la célula se divide. Esta división celular se denomina citocinesis.

Tras la división, los cromosomas de las células hijas se descondensan y comienza una nueva fase G₁. La Figura 1 representa las distintas fases del ciclo celular.

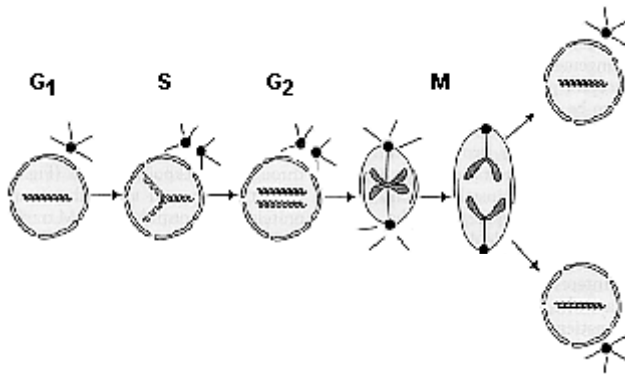


Figura 1. Ciclo celular eucariota. La fase mitótica se alterna con la interfase o período de crecimiento.

1.1.1 CLASIFICACIÓN

Se conocen más de 200 tipos diferentes de cánceres. Algunos tumores malignos se denominan con el nombre del científico que los descubrió, como por ejemplo el linfoma de Hodgkin o el linfoma de Burkitt pero la mayoría están clasificados en función de su origen primario en ^[2]:

- Carcinoma. Cáncer que se desarrolla en el epitelio, en glándulas como la mama o la próstata o en órganos internos como el pulmón, el estómago o el colon. Entre el 80% y el 90% de los cánceres están dentro de esta categoría.
- Sarcoma. Cáncer que se origina en el hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conectivo o de soporte.
- Leucemia. Cáncer que se origina en el sistema hematopoyético; generalmente comienza en la médula ósea y se extiende por la sangre a otras partes del cuerpo, incluyendo los ganglios linfáticos.

- Linfoma. Cáncer que se desarrolla en las células de las glándulas del sistema inmunológico.
- Mieloma. Cáncer que se desarrolla en las células del plasma de la médula ósea.

Para describir la gravedad del cáncer basándose en la extensión del tumor primario y del grado de diseminación se utilizan los estadios. Éstos, sirven para: (a) clasificar y estimar el pronóstico de los pacientes, (b) ayudar al médico a determinar el mejor tratamiento, (c) identificar los estudios clínicos que puedan ser adecuados para la inclusión de los pacientes y (d) hablar un lenguaje común todos los profesionales implicados en el campo de la oncología. La clasificación TNM ^[3], creada en 1950 por Pierre Denoix, es una de las más utilizadas ya que está aceptada por la *International Union Against Cancer* (UICC) y por el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). La clasificación TNM se basa en la valoración de la extensión del tumor (**T**), el grado de diseminación a los ganglios linfáticos (**N**), y la presencia de metástasis (**M**) que junto a subseries numéricas indican la extensión progresiva de la enfermedad. Así:

- T: es la extensión del tumor primario.
 - Tx: el tumor primario no puede ser evaluado.
 - T0: no hay evidencia de tumor primario.
 - Tis: carcinoma in situ. CIS; células anormales están presentes pero no se han diseminado a los tejidos cercanos. Aunque no es cáncer, el CIS puede progresar a cáncer y algunas veces se llama cáncer preinvasivo.
 - T1, T2, T3, T4: tamaño y extensión creciente del tumor primario.
- N: es el grado de diseminación a los ganglios linfáticos.
 - Nx: no es posible evaluar los ganglios linfáticos regionales.
 - N0: no existe complicación de ganglios linfáticos.
 - N1, N2, N3: Complicación de ganglios linfáticos regionales (número creciente de ganglios linfáticos y grado de diseminación).
- M: presencia o ausencia de metástasis.
 - Mx: No es posible evaluar una metástasis distante.
 - M0: No existe metástasis distante.
 - M1: Presencia de metástasis distante. Este estadio puede especificarse con mayor detalle añadiendo la abreviatura de la localización de la metástasis como por ejemplo PUL para metástasis al pulmón.

A modo de ejemplo, un tumor T4N1M0, es un cáncer que ha crecido mucho localmente llegando a invadir algún ganglio linfático pero que no se ha diseminado.

Las pruebas más usadas para determinar el estadio son:

- Exploración física. Puede mostrar la localización y el tamaño de los tumores así como la diseminación del cáncer a los ganglios linfáticos o a otros órganos.
- Pruebas de imagen. Los procedimientos como los rayos X, la tomografía computerizada (TC), la resonancia magnética (RM) y la tomografía por emisión de positrones (TEP) pueden mostrar la localización del cáncer, el tamaño del tumor y si hay diseminación.
- Pruebas de laboratorio. Los análisis de sangre, de orina o de otros fluidos o tejidos del paciente pueden proporcionar información sobre el tipo de cáncer ya que se han identificado varios marcadores tumorales (sustancias que se encuentran alteradas debido a la presencia de un cáncer).
- Informe de patología. Una biopsia proporciona información sobre el tamaño del tumor, el crecimiento del tumor dentro de otros tejidos u órganos, el tipo de células cancerosas y el grado del tumor. Los informes de citología describen los resultados del examen de células en los fluidos del cuerpo.
- Informes de cirugía. Estos informes describen el tamaño y la apariencia del tumor e incluyen con frecuencia observaciones sobre ganglios linfáticos y órganos vecinos.

1.1.2 EPIDEMIOLOGIA

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), agencia dependiente de la Organización Mundial de la Salud (OMS), publica regularmente los datos registrados dentro del proyecto GLOBOCAN ^[4] que tiene por objetivo facilitar datos sobre la incidencia, mortalidad, prevalencia y esperanza de vida de la mayoría de cánceres de 184 países. De acuerdo con estos datos, el cáncer es la principal causa de muerte a escala mundial. Se le atribuyen 7.6 millones de defunciones (aproximadamente el 13% del total) ocurridas en todo el mundo en 2008. Los que causaron más defunciones fueron: el cáncer de pulmón (1.37 millones de defunciones), el gástrico (736000 defunciones), el hepático (695000 defunciones), el colorrectal (608000 defunciones) y el de mama (458000 defunciones). Se prevé que el número de defunciones por cáncer siga aumentando en todo el mundo y supere los 13.1 millones en 2030.

Más del 70% de las defunciones por cáncer se registraron en países con un índice de PIB bajo-medio. En España, como en la mayor parte de los países desarrollados, el cáncer es la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares, si bien, en hombres ocupa el primer lugar desde el año 2005. La Figura 2 muestra los datos de incidencia y mortalidad publicados para la población española en el año 2008. Como puede observarse, el cáncer con mayor incidencia es el de mama seguido del de próstata y del colorrectal. Si nos fijamos en la mortalidad, el cáncer que produjo más muertes en el año 2008 fue el de pulmón.

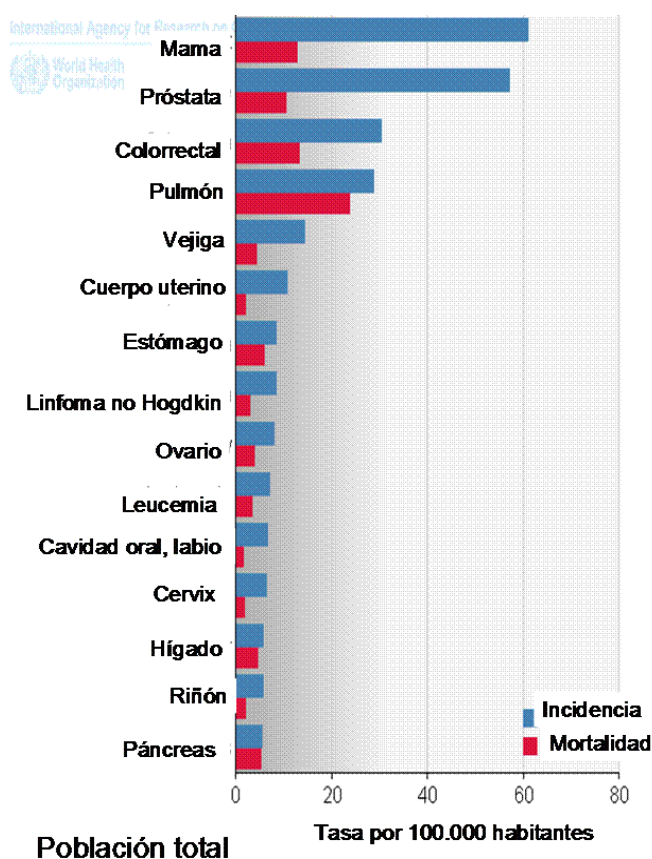


Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer en España en el año 2008 según los datos reportados en el proyecto GLOBOCAN 2008.

1.1.3 TRATAMIENTO

Para el tratamiento del cáncer existen varias opciones. El cáncer puede tratarse con cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal y con terapia biológica. El médico puede usar un método o una combinación de métodos, dependiendo del tipo y ubicación del cáncer, de la existencia o no de metástasis, de la edad y del estado de salud del paciente.

1.1.3.1 CIRUGÍA

La cirugía es un procedimiento que se utiliza para extirpar el tumor. Los efectos secundarios de la cirugía dependen de muchos factores, como por ejemplo el tamaño y la localización del tumor, el tipo de operación realizada y del estado general de salud del paciente. Los pacientes suelen tener dolor y sentirse cansados o débiles después de la cirugía.

1.1.3.2 RADIOTERAPIA

La radioterapia aplica rayos de alta energía para destruir las células cancerosas en una región determinada del cuerpo. La radiación puede administrarse de forma externa por medio de una máquina que dirige la radiación a la zona del tumor, o internamente mediante agujas, semillas, alambres o catéteres que contienen la sustancia radioactiva que se implanta cerca del tumor. La radioterapia por sí misma no causa dolor pero suele causar cansancio y una disminución del

número de glóbulos blancos en la sangre. Con la radiación externa, es común la caída del pelo en la zona tratada y que la piel se ponga roja, reseca, sensible y con prurito.

1.1.3.3 QUIMIOTERAPIA

La quimioterapia consiste en la administración de fármacos para destruir las células cancerosas de todo el organismo. Una de las desventajas de este tipo de tratamiento es que las células sanas también pueden dañarse, especialmente las que se dividen rápidamente. El tratamiento puede consistir en uno o en la combinación de varios fármacos. Los efectos secundarios de la quimioterapia dependen del fármaco y de la dosis administrada. Las células normales generalmente se recuperan una vez ha finalizado la quimioterapia, por lo que la mayoría de los efectos secundarios desaparecen gradualmente al finalizar el tratamiento. Los fármacos antineoplásicos se pueden clasificar según su mecanismo de acción en relación con el ciclo celular ^[5] en:

1.1.3.3.1 AGENTES ESPECIFICOS DEL CICLO CELULAR

- Agentes antimetabolitos. Actúan en la fase S del ciclo celular interfiriendo en el crecimiento del ADN y del ARN al sustituir los elementos fundamentales de estas moléculas. Pueden dividirse en función del metabolito con el que interfiere en:

- Análogos de ácido fólico. Ej. Metotrexato.
- Análogos de pirimidina. Ej. 5-fluorouracilo.
- Análogos de purina. Ej. Mercaptopurina.

- Inhibidores de la topoisomerasa. Actúan en la fase S del ciclo celular estabilizando el complejo ADN- topoisomerasa (*cleavable complex*) que se forma durante la replicación del ADN. Esto provoca que se pare la horquilla de replicación causando la apoptosis celular. Pueden dividirse en:

- Inhibidores de la topoisomerasa I. Ej. Topotecan.
- Inhibidores de la topoisomerasa II. Ej. Etoposido.

- Alcaloides de la Vinca. Actúan durante la fase M del ciclo celular. Se unen a la tubulina, subunidad proteica de los microtúbulos que forman el huso mitótico.

- Taxanos. Actúan durante la fase M del ciclo celular aumentando la polimerización de tubulina de manera que induce la formación de microtúbulos no funcionales.

1.1.3.3.2 AGENTES NO ESPECIFICOS DEL CICLO CELULAR

Estos compuestos ejercen su acción en todas las fases del ciclo celular y se usan ampliamente para tratar varios tipos de cáncer. Pertenece a este grupo:

- Agentes alquilantes. Dañan directamente el ADN evitando la reproducción de las células cancerosas. Existen diferentes tipos de agentes alquilantes:

- Mostazas nitrogenadas. Ej. Ciclofosfamida.
- Etileniminas y metilmelaminas. Ej. Tiotepa.
- Alquil sulfonatos. Ej. Busulfán.
- Nitrosoureas. Ej. Carmustina (BCNU).
- Triazenos. Ej. Dacarbazina (DTIC).

Los medicamentos con platino (Ej. cisplatino) algunas veces se agrupan con los agentes alquilantes porque destruyen las células de manera similar.

- Antraciclinas. Son antibióticos que interfieren con las enzimas involucradas en la replicación de ADN.

1.1.3.3.3 AGENTES NO CLASIFICADOS

Son compuestos que no pueden ser clasificados por su efecto en el ciclo celular porque tienen un mecanismo de acción complejo y/o no ha sido determinado totalmente. Pertenece a este grupo por ejemplo la L-asparaginasa.

1.1.3.4 TERAPIA HORMONAL

La terapia hormonal se utiliza para el tratamiento de ciertos cánceres que dependen de determinadas hormonas para su crecimiento. La cirugía para extirpar los órganos que producen hormonas también se considera terapia hormonal. La terapia hormonal puede causar cansancio, retención de líquidos, aumento de peso, sofocos, náuseas, vómitos, cambios de apetito, coágulos de sangre y osteoporosis. Dependiendo del tipo de terapia hormonal que se emplee, estos efectos secundarios pueden ser temporales o permanentes.

1.1.3.5 TERAPIA BIOLÓGICA

La terapia biológica utiliza directa o indirectamente el sistema inmune del cuerpo para combatir la enfermedad y puede disminuir algunos de los efectos secundarios del tratamiento contra el cáncer. Los anticuerpos monoclonales, el interferón, IL-2 (interleucina 2) y los factores estimulantes de colonias son algunos ejemplos de terapia biológica. Los efectos secundarios causados por la terapia biológica varían con el tratamiento específico.

1.2 CAMPTOTECINAS

1.2.1 ANTECEDENTES

En 1958 el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) esponsorizó un programa para el screening de productos naturales. Se descubrió que un extracto del árbol de *Camptotheca acuminata* mostraba actividad frente a diferentes modelos de tumores sólidos y leucemia.

En 1966 Monroe Wall y colaboradores aislaron el 20(s)-camptotecina^[6] y demostraron que este alcaloide pentacíclico, que se encontró en madera, corteza y fruto, era el responsable de la

actividad antitumoral del extracto del árbol de *Camptotheca acuminata*. Posteriormente, se encontró también este alcaloide en la planta india *Mappia foetida Miers* [7]. Para aumentar su solubilidad, se sintetizó la sal sódica de camptotecina y este compuesto entró en fase clínica en 1970 [8,9].

Susan Horwitz publicó en 1973 los efectos de la camptotecina en la rotura y reparación del ADN durante el ciclo celular [10] pero no fue hasta 1985, que se identificó el enzima Topoisomerasa I como la diana de las camptotecinas [11]. Durante esta misma época, también se desarrollaron derivados semisintéticos como el irinotecan [12,13] y el topotecan [14] con el objetivo de mejorar la baja solubilidad acuosa y minimizar la toxicidad del alcaloide original.

El irinotecan se aprobó en Japón en 1994 (Campto[®], Yakult Honsha) para el tratamiento del cáncer de pulmón, cáncer de cérvix y cáncer de ovario. En 1996 se aprobó su comercialización en Estados Unidos. Ese mismo año, se aprobó también en Estados Unidos y Europa el topotecan, una camptotecina semisintética, para el tratamiento del cáncer de ovario, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de cérvix. El irinotecan se aprobó en el año 2000 en combinación con 5-fluorouracilo y leucovorina en pacientes con carcinoma metastático de colon o recto. En Europa, en el año 2007 se aprobó como fármaco huérfano para el tratamiento del glioma y en el año 2011 para el tratamiento del cáncer de páncreas mediante nanoliposomas.

En el año 1997 se sintetizaron las homocamptotecinas, a partir de una modificación del anillo de lactona por introducción de un metileno entre el alcohol y grupo carboxílico en el anillo E. Se trata de β -hidroxilactonas sin pérdida de la actividad [15,16]. Diferentes estudios mostraron que las homocamptotecinas mejoraban la actividad antitumoral de las camptotecinas [17,18]. Los resultados clínicos obtenidos tras la administración oral del diflomotecan en el estudio de Fase I se presentaron en el año 2003 [19].

En el año 2006 se realizó un estudio de fase III con el exatecan, un derivado sintético soluble en agua, para el tratamiento del cáncer de páncreas avanzado [20].

En el año 2012 se presentaron los resultados de seguridad, farmacocinética y actividad del namitecan, un derivado sintético soluble en agua, frente a modelos de tumores sólidos pediátricos [21].

1.2.2 TOPOISOMERASAS

Las topoisomerasas son enzimas que actúan modificando la topología del ADN ya que alteran el número de enlaces del ADN mediante la escisión de una o ambas hebras de ADN [22,23]. La necesidad de las topoisomerasas radica en la propia estructura de doble hélice de ADN e intervienen durante la replicación, transcripción y reparación del ADN. Durante la replicación, las dos hebras deben separarse completamente y para ello es necesario eliminar las torsiones. Durante la transcripción, el paso de la ARN polimerasa genera una tensión que también debe ser relajada [24]. La asociación del ADN con histonas u otras proteínas produce un superenrollamiento que requiere también la actuación de las topoisomerasas.

Las topoisomerasas presentes en humanos son ^[25,26]:

- Topoisomerasa I (topo I). Monómero de 100kDa codificado por un gen de copia única localizado en el cromosoma 20q11.2-13.1. Se caracteriza por tener un espacio lo suficientemente grande como para acomodar una doble hélice de ADN. Durante la replicación del ADN, tiene la función de relajar las torsiones de la doble hélice de ADN que se producen por el avance de la horquilla de replicación. Esto lo consigue al introducir un corte en una de las cadenas de ADN mediante la formación de un enlace fosfodiéster entre la tirosina 723 de la topo I y el grupo fosfato del extremo 3' del ADN. La apertura transitoria de los enlaces fosfodiéster del ADN se denomina reacción de segmentación y el complejo ADN-topo I se denomina complejo de segmentación. Seguidamente, la cadena intacta del ADN pasa a través de la hendidura produciendo la relajación de la cadena de ADN. Finalmente, se reconstituye la molécula de ADN y la disociación de la topo I de su lugar de unión ^[27]. La Figura 3 muestra el mecanismo de acción de la topoisomerasa I durante la replicación del ADN.

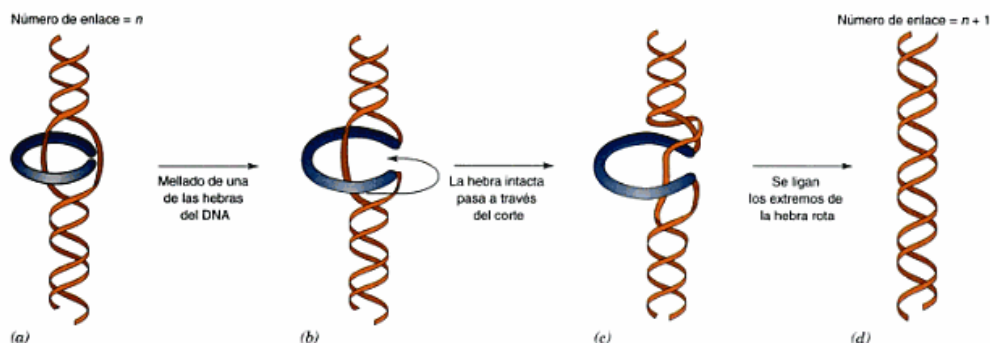


Figura 3. Mecanismo de acción de la topoisomerasa I. (a) se une al ADN y separa localmente las hebras complementarias; (b) corta una de las hebras; (c) la hebra intacta pasa a través del corte; (d) restablece el enlace fosfodiéster obteniéndose una estructura más relajada.

- Topoisomerasa II (topo II). Actúa fijándose al ADN de manera que se generan dos bucles superenrollados. A continuación, el enzima corta ambas hebras y pasa un segmento de ADN a través de la mella antes de restablecer la continuidad de la hebra. Esta manipulación invierte el signo de la vuelta superhelicoidal durante la replicación del ADN y también contribuye a la relajación del ADN durante la transcripción ^[28]. Requiere ATP para su actividad. Se clasifica en:

- Topo II α . Dímero de 174kDa codificado por el gen humano localizado en el cromosoma 17q21-22. Está presente en todas las células eucariotas.
- Topo II β . Dímero de 180kDa codificado por el gen humano localizado en el cromosoma 3p24. Se encuentra presente sólo en vertebrados y parece que está asociada con la diferenciación celular.

1.2.3 RELACIÓN ESTRUCTURA - ACTIVIDAD

Las camptotecinas actúan inhibiendo el enzima nuclear topoisomerasa I (topo I) durante la fase S del ciclo celular [29]. La Figura 4 muestra el mecanismo de acción de las camptotecinas. Las camptotecinas se unen covalentemente a la topo I y estabilizan el complejo de segmentación de manera que la hebra de ADN que se había escindido no se puede volver a unir provocando así la apoptosis celular. Las camptotecinas sólo se unen al complejo formado por la Top I-ADN, no se une ni al enzima solo ni al ADN solo.

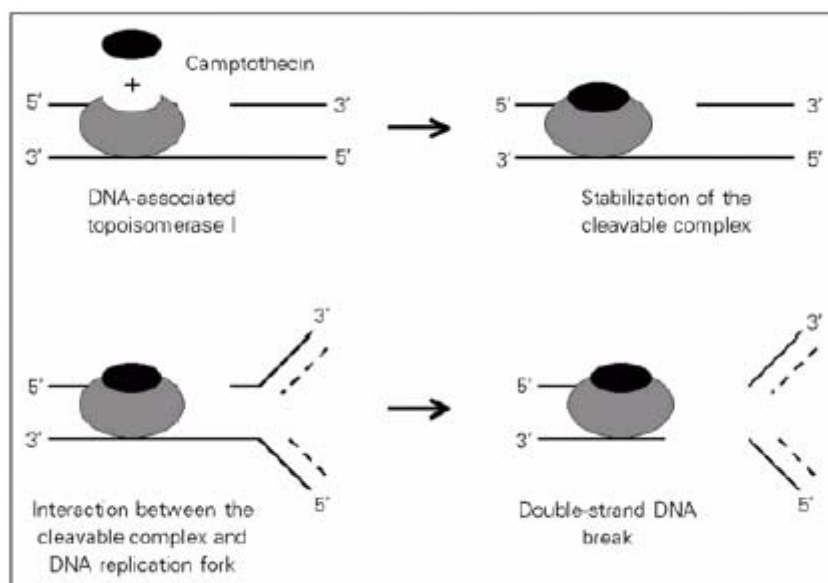


Figura 4. Mecanismo de acción de la camptotecina. Se une covalentemente al complejo de segmentación de manera que lo estabiliza causando que la horquilla de replicación no pueda continuar y se rompe la cadena de ADN causando la muerte celular.

Con el objetivo de mejorar la solubilidad en agua, la estabilidad del anillo de lactona y la actividad, se realizaron estudios de relación estructural a partir del alcaloide original 20(s)-camptotecina, cuya estructura química se muestra en la Figura 5 [6].

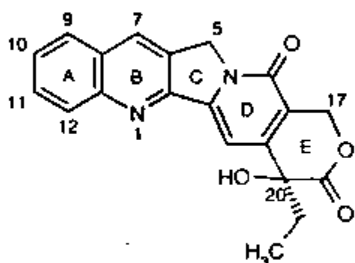


Figura 5. Estructura química de la 20(s)-camptotecina.

Las modificaciones en la estructura se encuentran en el anillo A y B de la Camptotecina. Los sustituyentes en la posición C-11 o C-12 provocan una disminución de la actividad así como la inclusión de grupos voluminosos en la posición C-10. En cambio, sustituyentes en la posición

C-7, C-9 o C-10 generalmente aumentan la actividad del producto. El anillo de lactona (anillo E) y la configuración *s* del C-20 son ambos imprescindibles para la actividad de las camptotecinas ^[30]. Existe un equilibrio entre el anillo de lactona y la forma carboxílica que se forma por la apertura del anillo de lactona provocando la inactividad en la molécula. Predomina una forma u otra dependiendo del pH y de la temperatura. A pH 7 o superior el equilibrio se desplaza hacia la forma carboxílica. La cantidad de albúmina también afecta al equilibrio entre la lactona y la forma carboxílica ya que ésta se une con 200 veces más afinidad a la forma carboxílica que a la lactona ^[31]. Así, en plasma, el equilibrio se desplaza rápidamente hacia la forma carboxílica mientras que en sangre, la estabilidad de la lactona está aumentada por unión con la bicapa lipídica de los hematíes ^[32].

En el caso de las homocamptotecinas, al tratarse de β -hidroxilactonas, no se produce el equilibrio entre la lactona y la forma carboxílica ^[17] ya que presentan menor electrofilia provocando así una mayor estabilidad de la estructura química. Además, cuando se produce la apertura del anillo de lactona, ésta es irreversible.

1.2.4 IRINOTECAN

El irinotecan es un derivado semisintético de la camptotecina que pertenece al grupo de los inhibidores de la topoisomerasa I. El irinotecan se une al complejo topoisomerasa I-ADN y evita que la hebra de ADN que se había escindido se vuelva a unir provocando la apoptosis celular. El irinotecan es soluble en agua y *in vivo* por acción de carboxilesterasas se transforma en el metabolito activo SN-38 que es 1000 veces más activo que el irinotecan. La Figura 6 muestra la estructura química del irinotecan.

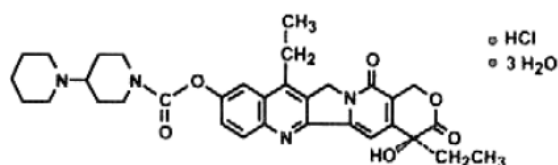


Figura 6. Estructura química del irinotecan.

Actualmente en España se encuentra comercializado como especialidad farmacéutica genérica y está aprobado para las siguientes indicaciones ^[33]:

- Monoterapia. Para pacientes con cáncer colorrectal avanzado en los que ha fracasado un régimen de tratamiento establecido que contiene 5-fluorouracilo. La dosis recomendada es de 350 mg/m² de hidrocloreto de irinotecan trihidrato administrados en perfusión intravenosa, durante un periodo de 30 a 90 minutos cada tres semanas.
- En combinación con 5-fluorouracilo y ácido folínico. Para pacientes sin quimioterapia anterior con cáncer colorrectal avanzado. La dosis recomendada de hidrocloreto

de irinotecan trihidrato es de 180 mg/m², administrada en perfusión intravenosa cada 2 semanas durante un periodo de 30 a 90 minutos, seguido de perfusión con ácido folínico y 5-fluorouracilo.

- En combinación con 5-fluorouracilo, ácido folínico y bevacizumab. Para el tratamiento en primera línea de pacientes con carcinoma metastásico de colon o recto. La dosis recomendada de hidroclicloruro de irinotecan trihidrato es de 180 mg/m², administrada en perfusión intravenosa cada 2 semanas durante un periodo de 30 a 90 minutos, seguido de perfusión con ácido folínico y bevacizumab.

- En combinación con cetuximab. Para el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal metastásico que exprese el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) después del fracaso con un tratamiento citotóxico que haya incluido irinotecan. Normalmente la dosis empleada de irinotecan es la misma que la administrada en ciclos previos. El irinotecan, debe ser administrado, como mínimo, una hora después de la finalización de la perfusión del cetuximab.

Las principales reacciones adversas descritas en monoterapia son:

- Trastornos gastrointestinales. Náuseas, vómitos, diarrea y episodios de deshidratación asociados a diarrea y/o vómitos.

- Trastornos de la sangre y del sistema linfático. Neutropenia febril, neutropenia, trombocitopenia y anemia.

- Trastornos de la piel y del tejido subcutáneo. Alopecia.

- Incrementos transitorios en los niveles séricos de transaminasas, fosfatasa alcalina, bilirrubina y creatinina.

FARMACOCINÉTICA

Tras la administración intravenosa a dosis de 100 a 750 mg/m² cada tres semanas mediante perfusión de 30 minutos en el hombre ^[34], el irinotecan mostró un aclaramiento plasmático medio de 15 L/h/m², un volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario de 157 L/m² y una semivida aparente de eliminación en la fase terminal de 14.2 horas. La distribución plasmática del SN-38 fue descrita mediante un modelo bicompartimental con una semivida de eliminación asociada a la fase terminal de 13.8 horas. La concentración máxima del SN-38 generalmente se alcanzó tras 1 hora la finalización de la infusión intravenosa. En el intervalo de dosis estudiado, el AUC del irinotecan aumentó proporcionalmente con la dosis administrada mientras que el AUC del SN-38 no se incrementó proporcionalmente a la dosis (incremento menor). El irinotecan se unió de manera moderada a las proteínas plasmáticas (30% a 68%) mientras que el SN-38 presentó una alta unión a proteínas plasmáticas (95%). La albúmina fue la proteína con más afinidad para ambos compuestos. Los parámetros

farmacocinéticos observados en ambos productos fueron independientes del número de ciclos previos.

Respecto al metabolismo del irinotecan, se sabe que por acción de las enzimas carboxilesterasas se transforma en el hígado en el metabolito activo SN-38 y éste, por acción del uridina-difosfoglucuronosil transferasa 1A1, se conjuga con glucurónido formando el glucurónido SN-38 inactivo (SN-38G) que es inactivo. La excreción urinaria del irinotecan es de entre 11 y 20% mientras que la del SN-38 es < 1% y la del SN-38G es del 3%

1.2.5 TOPOTECAN

El topotecan es un derivado semisintético de la camptotecina. Es soluble en agua y pertenece al grupo de los inhibidores de la topoisomerasa I. La Figura 7 muestra la estructura química del topotecan.

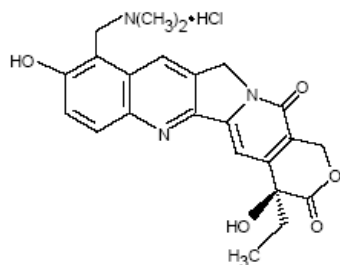


Figura 7. Estructura química del topotecan.

El topotecan (Hycamtin[®], Glaxo SmithKline) ^[35] actualmente en Europa está aprobado para las siguientes indicaciones:

- Monoterapia. Está indicado en pacientes con carcinoma metastásico de ovario después del fracaso de la terapia de primera línea o posteriores y en pacientes con cáncer de pulmón de célula pequeña (CPCP) recidivante para los que no se considera apropiado el re-tratamiento con el esquema de primera línea. La dosis recomendada de topotecan es de 1.5 mg/m² de superficie corporal/día administrados en perfusión intravenosa de 30 minutos, durante cinco días consecutivos, con un intervalo de tres semanas entre el comienzo de cada ciclo. Si se tolera bien, el tratamiento puede continuar hasta la progresión de la enfermedad.

- En combinación con cisplatino. Para pacientes con carcinoma de cérvix que han recaído tras la radioterapia, y en pacientes con la enfermedad en el estadio IVB. En los pacientes tratados previamente con cisplatino, se requiere un intervalo libre de tratamiento prolongado que justifique el tratamiento con la combinación. La dosis recomendada de topotecan es de 0.75 mg/m²/día, administrado en perfusión intravenosa de 30 minutos, en los días 1, 2 y 3. El cisplatino se administra en perfusión intravenosa en el día 1 a una dosis de 50 mg/ m²/día y tras la dosis de topotecan. Este esquema de tratamiento se repite cada 21 días, durante seis ciclos o hasta la progresión de la enfermedad.

Las principales reacciones adversas descritas en monoterapia son:

- Trastornos gastrointestinales. Náuseas, vómitos, diarrea, estreñimiento, dolor abdominal, mucositis y colitis neutropénica.
- Trastornos de la sangre y del sistema linfático. Neutropenia febril, neutropenia, trombocitopenia, anemia y leucopenia.
- Trastornos de la piel y del tejido subcutáneo. Alopecia y reacciones de hipersensibilidad incluyendo erupción cutánea.
- Trastornos generales. Anorexia, fiebre, astenia y fatiga.

FARMACOCINÉTICA

La farmacocinética del topotecan ha sido estudiada tras la administración intravenosa a las dosis de 0.5 a 1.5 mg/m² por infusión diaria de 30 minutos durante cinco días en el hombre [35]. El topotecan presentó un aclaramiento plasmático elevado de 62 L/h. El volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario (Vd_{ss}) fue de 132 L y la semivida de la fase terminal fue de 2-3 horas. La comparación de los parámetros farmacocinéticos no sugirió ningún cambio en la farmacocinética durante los cinco días de tratamiento. El área bajo la curva aumentó aproximadamente en proporción al incremento de la dosis. Tras la administración de dosis diarias repetidas, no se produjo acumulación de topotecan o fue muy baja y no hubo evidencia de que se produjese un cambio en las propiedades farmacocinéticas tras la administración de dosis múltiples.

El topotecan presenta una baja unión a proteínas plasmáticas (35 %). El principal mecanismo de eliminación del topotecan es por la apertura del anillo de lactona. En función del pH, predomina la lactona o la forma carboxílica. Así, a pH ≤ 4 predomina la lactona mientras que a pH fisiológico predomina la forma carboxílica. El aclaramiento renal es otra vía importante de eliminación ya que el 30% de la dosis se excreta de forma inalterada por la orina.

1.2.6 DIFLOMOTECAN

El diflomotecan pertenece al grupo de las homocamptotecinas. La Figura 8 muestra la estructura química del diflomotecan. Actualmente, el diflomotecan, se encuentra en fase II de desarrollo.

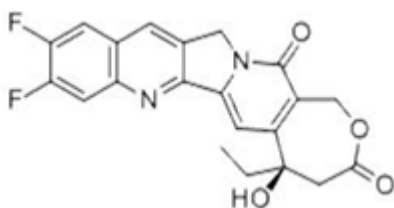


Figura 8. Estructura química del diflomotecan.

FARMACOCINÉTICA

El estudio de fase I en el que se administró diflomotecan mediante infusión intravenosa de 20 minutos durante 5 días cada 3 semanas mostró que la máxima dosis tolerada de diflomotecan era 0.15 mg/m² [36]. En el intervalo de dosis estudiado, el AUC del diflomotecan aumentó proporcionalmente con la dosis. Los parámetros farmacocinéticos mostraron una gran variabilidad interindividual.

1.2.7 ELOMOTECAN

El elomotecan, también conocido como BN80927, pertenece al grupo de las homocamptotecinas. Se trata de un análogo semisintético de las camptotecinas [37] cuyas características son:

CAS N°: 220998-10-7 (base) y 220997-99-9 (clorhidrato).

Nombre químico: 3H,15HOxepino[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-3,15-dione, 9-cloro-5-etil-1,4,5,13-tetrahidro-5-hidroxi-10-metil-12-[(4-metil-1-piperidinil)metil]-,monohidroclorídico, (5R).

Fórmula molecular: C₂₉H₃₂ClN₃O₄ (base) y C₂₉H₃₂ClN₃O₄.HCl (clorhidrato).

Peso molecular: 522.03 (base) y 558.50 (clorhidrato).

Fórmula estructural: La molécula contiene un centro de asimetría. El elomotecan corresponde al isómero (+).

Aspecto: Polvo amarillo o ligeramente amarillo no higroscópico y de estructura no cristalina.

Solubilidad: Es insoluble en agua, etanol, metanol, cloruro de metileno, acetona, aceites vegetales y en medio acuoso básico (<0.01 mg/mL). Tiene baja solubilidad en alcohol bencílico, DMA (0.08 mg/mL), DMSO (0.25 mg/mL) y en medio acuoso ácido (pH < 3.5). La solubilidad no mejora por la adición de tensioactivos.

El elomotecan se degrada fácilmente en medio básico formándose principalmente la forma carboxílica (BN80960) por apertura irreversible del anillo de lactona. La Figura 9 muestra ambas estructuras químicas. El elomotecan es estable en medio ácido pero la temperatura y la luz ultravioleta, aumentan su degradación por lo que debe almacenarse protegido de la luz a 5°C.

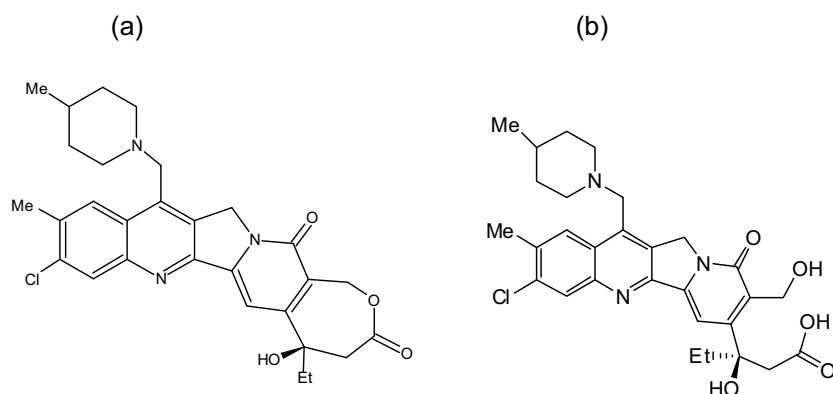


Figura 9. Estructura química del elomotecan (a) y del BN80960 (b) - principal producto de degradación y metabolito del elomotecan.

El Elomotecan, como todas las camptotecinas, tiene actividad inhibitoria sobre la topoisomerasa I (Topo I) y además muestra actividad sobre la topoisomerasa II (Topo II) mediando la relajación del ADN sin estabilizar el complejo unido indicando una inhibición catalítica [38]. Se estudió la actividad *in vitro* del elomotecan en nueve líneas celulares tumorales humanas mostrando mayor actividad que el irinotecan [39, 40] en todas ellas. La Tabla 1 muestra las concentraciones inhibitorias 50% (IC₅₀) de ambos compuestos. Además, el elomotecan presentó actividad frente a líneas celulares resistentes al irinotecan (KBSTP2) lo que refuerza que también presenta actividad sobre la Topo II. La actividad *in vivo* se estudió en modelos de xenotransplantes de tumores humanos en ratones usando las líneas celulares de adenocarcinoma de próstata PC3 y DU145 [40]. El elomotecan se administró en cuatro esquemas de dosificación diferentes obteniéndose el mejor resultado tras su administración dos veces al día durante 14 días a la dosis de 5 mg/kg por vía oral.

Se realizaron otros estudios cuyos datos no han sido publicados. Así, se realizó un estudio de balance de masas en ratas tras la administración única del elomotecan marcado con carbono 14 a la dosis de 3 mg/kg por vía intravenosa y oral. Tras la administración intravenosa, se observó que tras un periodo de recolección de 168 horas, más del 95% del producto se excretaba por las heces y que la excreción urinaria representaba menos del 1%. Tras la administración oral, se observó que sólo se absorbió entre el 12 y 22 % de la dosis administrada. En ratas canuladas, el estudio de la excreción biliar mostró que en 48 horas, el 78% de la dosis se recuperó en la bilis de ratas hembra y el porcentaje aumentó hasta el 92% en ratas macho identificándose 15 metabolitos diferentes. Así mismo, se observó que la concentración de radioactividad en plasma y sangre era similar por lo que la relación de concentración sangre/plasma se estableció en 1. También se estudió la relación de concentración sangre/plasma en el ratón y en el perro y se obtuvo valores de 1 y 0.6, respectivamente. El estudio de unión a proteínas séricas en diferentes especies mostró que el elomotecan se unía en 98.2 ± 0.46 , 98.2 ± 0.48 , 98.7 ± 0.47 , 98.2 ± 0.43 , 98.5 ± 0.38 en ratón, rata, perro, mono y humano, respectivamente en el intervalo de concentración de 20 a 1000 ng/mL.

Tabla 1. Valores de IC₅₀ del elomotecan y del irinotecan frente a 9 líneas celulares tumorales.

Tumor	Línea celular	IC ₅₀ (nM)	
		elomotecan	irinotecan
Mamario	MCF7	48	318
Colon	HT29	21	106
Próstata	DU145	3	18
	PC3	81	126
Ovario	SKOV3	13	39
Vejiga	T24	2.2	4.6
Leucemia	HL60	7.4	8.4
	K562	8.4	9.2
Pulmón	A549	17	61

FARMACOCINÉTICA

El estudio de fase I en el que se administró elomotecan mediante infusión intravenosa de 30 minutos una vez cada 3 semanas a las dosis de 1.5 a 75 mg mostró que la máxima dosis tolerada de elomotecan era 75 mg y la dosis recomendada era 60 mg ^[41]. Tras el análisis poblacional de los datos, el modelo que mejor explicó los datos fue un modelo de tres compartimentos con eliminación de primer orden desde el compartimento central. El aclaramiento del elomotecan disminuía con la edad y el volumen de distribución del compartimento profundo dependía del peso del paciente. En el intervalo de dosis estudiado, el AUC del elomotecan aumentó proporcionalmente con la dosis.

1.3 TÉCNICA BIOANALÍTICA

La técnica analítica más utilizada para el bioanálisis de compuestos es la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) ^[42].

La cromatografía líquida es una técnica que permite separar físicamente los componentes de una mezcla. La muestra es distribuida entre dos fases inmiscibles, una estacionaria (columna cromatográfica) y una fase móvil que fluye a través de la anterior. La separación se basa en la distribución de los componentes de la muestra entre las dos fases. Los componentes de la mezcla invierten un tiempo diferente en recorrer cada una de las fases, así, si un componente está la mayor parte del tiempo en la fase móvil, el producto se mueve rápidamente, mientras que si se encuentra la mayor parte en la fase estacionaria, el producto queda retenido y su salida es mucho más lenta.

La espectrometría de masas es una técnica que permite separar los componentes de una mezcla según la relación masa/carga (m/z) de los iones que se generan en la fuente de ionización. En el "scan" de monitorización de reacciones múltiples o MRM (multiple reaction monitoring), los iones de interés son filtrados en el primer cuadrupolo, fragmentados en la

cámara de colisión y un fragmento es seleccionado en el tercero obteniéndose así la transición a monitorizar.

Disponer de un método bioanalítico de calidad para la determinación de los niveles de fármaco en muestras biológicas es fundamental para la obtención de datos fiables que permitan estimar los parámetros farmacocinéticos. Por ello, la validación del método bioanalítico es fundamental para demostrar la validez de los datos y poder realizar con éxito los estudios de farmacocinética preclínica y clínica. La importancia de los métodos bioanalíticos y su validación fue reconocida por los organismos reguladores a finales de los años 80 pero no fue hasta mayo del 2001 que la Food and Drug Administration (FDA) publicó la guía para la industria sobre validación de métodos bioanalíticos ^[43]. En ésta se recogen los parámetros fundamentales que deben evaluarse durante la validación que son selectividad, exactitud, precisión, recuperación, curvas de calibrado y estabilidad del analito.

La selectividad es la capacidad del método bioanalítico de diferenciar y cuantificar el analito en presencia de otros componentes de la muestra. La selectividad debe asegurarse en el límite inferior de cuantificación.

Se entiende por exactitud la proximidad de un valor hallado respecto al valor real. Se determina mediante el análisis de replicados que contienen cantidades conocidas del analito de interés. La precisión es una medida de la dispersión, e indica la proximidad de diferentes medidas individuales de un analito respecto a su valor medio. Podemos distinguir entre exactitud y precisión intra-ensayo (dentro de una secuencia analítica) e inter-ensayo (obtenida a partir de varias secuencias analíticas).

La recuperación es la eficacia en la extracción del analito de la matriz biológica. En los métodos bioanalíticos, la recuperación no hace falta que sea del 100% pero sí que debe ser constante a lo largo del rango de concentraciones ensayadas.

Las curvas de calibrado muestran la relación entre la respuesta del instrumento y la concentración del analito. Si la respuesta es directamente proporcional a la concentración del analito, se obtiene una recta y se dice que el método es lineal en el intervalo de trabajo estudiado. En la espectrometría de masas, es frecuente el uso de ecuaciones cuadráticas ($y=a \cdot x^2 + b \cdot x + c$) para definir dicha relación.

Los experimentos de estabilidad se deben diseñar para evaluar la manipulación y conservación del analito durante todo el proceso de análisis. Las condiciones usadas deben reflejar las condiciones probables que pueden producirse durante el análisis y el almacenamiento a corto y largo plazo de las muestras de los estudios de farmacocinética preclínica y clínica.

1.4 FARMACOMETRÍA

La farmacometría es la ciencia de desarrollar y aplicar métodos estadísticos y matemáticos para caracterizar, comprender y predecir la farmacocinética, la farmacodinámica y el comportamiento de los biomarcadores de un determinado fármaco ^[44]. Cuando se aplica en el desarrollo de un nuevo fármaco implica el desarrollo o estimación de su farmacocinética, farmacodinámica y el conocimiento del curso de las enfermedades dentro de las poblaciones y su variabilidad.

La farmacocinética puede definirse como el estudio y caracterización de la evolución temporal de los fármacos y de sus metabolitos en el organismo a través del análisis cinético de las curvas concentración/tiempo o cantidad/tiempo obtenidas a partir de muestras de fluidos biológicos ^[45]. La farmacocinética utiliza modelos matemáticos para describir la evolución de las concentraciones del fármaco a lo largo del tiempo y a partir de éstos, es posible la estimar los parámetros farmacocinéticos que permitirán explicar el comportamiento del fármaco en el individuo.

Las aproximaciones más utilizadas en el análisis de datos procedentes de estudios farmacocinéticos son la aproximación no compartimental, la aproximación compartimental clásica y la aproximación poblacional. La diferencia fundamental entre estos métodos radica en la sencillez vs complejidad, consumo de tiempo, formación requerida y capacidad descriptiva y predictiva de la información obtenida, entre otros aspectos tal como se muestra en la figura 10.

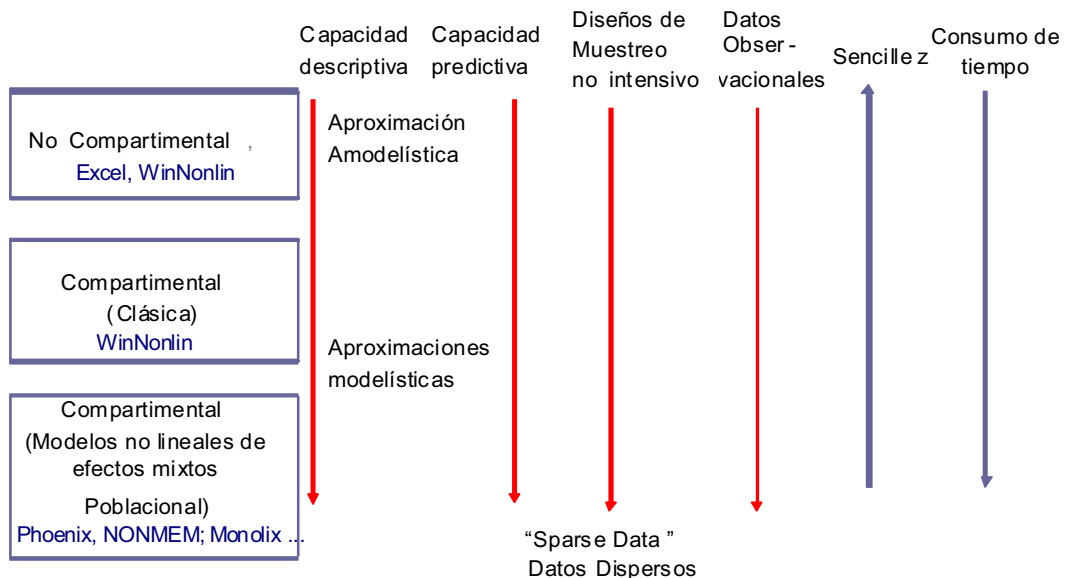


Figura 10. Aproximaciones más utilizadas para el análisis de datos farmacocinéticos.

1.4.1 FARMACOCINÉTICA COMPARTIMENTAL

Los modelos matemáticos basados en compartimentos son los más utilizados ^[46]. Un compartimento representa una fracción de material biológico en la que el fármaco está uniformemente distribuido y tiene las mismas propiedades cinéticas. Un compartimento viene definido por sectores acuosos que ocupan un volumen (V) y que contienen una determinada cantidad de fármaco (Q). La concentración de fármaco en el compartimento viene dado por el cociente entre Q y V . El organismo es un sistema muy complejo y aunque teóricamente puede dividirse en un amplio número de compartimentos, esto requeriría un complejo tratamiento matemático y un elevado número de observaciones. Por esto, en la práctica, se utiliza un máximo de tres compartimentos. Es importante destacar, que un compartimento, no siempre abarca una entidad fisiológica sino que se trata de una unidad conceptual, ya que a veces zonas próximas o relacionadas pueden pertenecer a compartimentos distintos. La Figura 11 muestra la representación esquemática de los modelos de uno (a), dos (b) y tres (c) compartimentos tras la administración intravenosa del fármaco. En el modelo de un compartimento, se considera al organismo como un único compartimento en el que el fármaco se distribuye instantáneamente ocupando un volumen de distribución (V) y se elimina por una constante de eliminación de primer orden (K_{el}). En el modelo de dos compartimentos, el fármaco se distribuye en un compartimento central (C) y un compartimento periférico (P_1). Tras la administración intravenosa, el fármaco se distribuye instantáneamente en el compartimento central y desde éste pasa al compartimento periférico y de éste retorna de nuevo al compartimento central. El aclaramiento intercompartimental (Q) rige la distribución del fármaco entre ambos compartimentos de acuerdo con un proceso cinético de primer orden. V_1 representa el volumen de distribución del compartimento central y V_2 el del compartimento periférico. El proceso de eliminación ocurre únicamente desde el compartimento central (K_{el}). En el modelo de tres compartimentos, el fármaco se distribuye en un compartimento central (C), un compartimento periférico superficial (P_1) y un compartimento periférico profundo (P_2). V_1 , V_2 y V_3 representan los volúmenes de distribución de los compartimentos central, periférico superficial y periférico profundo, respectivamente. Tras la administración intravenosa, el fármaco se distribuye instantáneamente en el compartimento central y desde éste pasa al compartimento periférico superficial y más lentamente al compartimento periférico profundo. Desde los compartimentos periféricos, el fármaco retorna al compartimento central. El aclaramiento intercompartimental rige la distribución del fármaco entre el compartimento central y el compartimento periférico superficial (Q_1) y entre el compartimento central y el compartimento periférico profundo (Q_2) de acuerdo con un proceso cinético de primer orden. Como en los modelos anteriores, el proceso de eliminación ocurre únicamente desde el compartimento central (K_{el}).

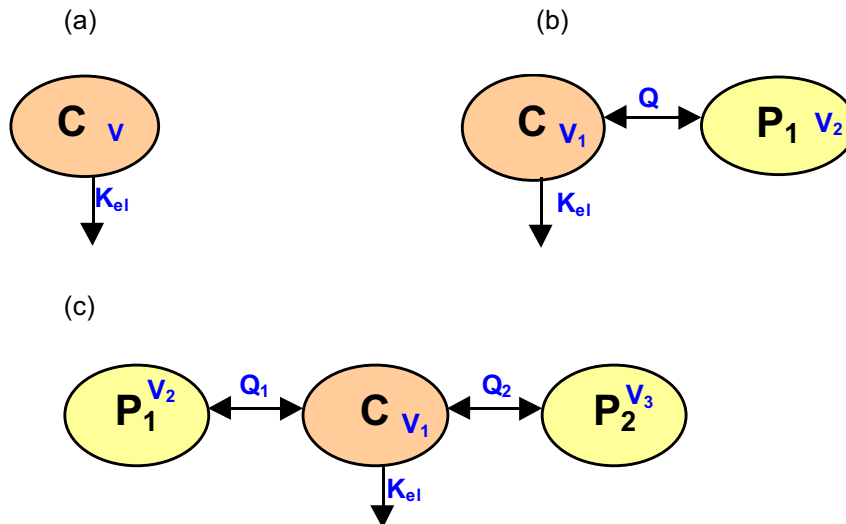


Figura 11. Representación esquemática de los modelos de uno (a), dos (b) y tres (c) compartimentos tras la administración de un fármaco mediante un bolus intravenoso.

1.4.2 FARMACOCINÉTICA NO COMPARTIMENTAL

Las limitaciones de los métodos compartimentales como puede ser la complejidad de los métodos matemáticos o la imposibilidad de identificar adecuadamente un modelo debido al bajo número de observaciones experimentales, han conllevado al uso del análisis farmacocinético no compartimental.

La farmacocinética no compartimental puede definirse como el tratamiento de los datos experimentales que permite estimar los parámetros farmacocinéticos sin necesidad de disponer de un modelo específico. Este tratamiento de datos proporciona medidas puntuales de lo que ocurre con el fármaco en una situación e individuo determinado y en un punto temporal concreto y en consecuencia es difícil predecir lo que ocurrirá en distintos escenarios no ensayados. Por ello, sólo puede utilizarse con fines predictivos si se asume que el aclaramiento plasmático del fármaco permanece constante con respecto al tiempo y que la relación entre la velocidad de entrada del fármaco y la concentración plasmática resultante, tiene las propiedades de superposición e invariabilidad en el tiempo ^[47].

En el análisis farmacocinético no compartimental la única asunción matemática que se hace es considerar que el curso de las concentraciones asociadas a la fase terminal de la curva de concentración plasmática vs tiempo sigue una cinética de orden uno. A partir de esta fase monoexponencial terminal, es posible el cálculo de la pendiente (λ_z) representativa de dicha fase mediante regresión lineal semilogarítmica. Una vez conocida dicha pendiente, es posible determinar la semivida aparente de eliminación mediante la ecuación 1.

$$t_{1/2\lambda_z} = \frac{\ln 2}{\lambda_z} \quad \text{Ecuación 1}$$

El área bajo la curva de niveles plasmáticos (AUC) se puede estimar mediante varios métodos pero los más utilizados son el método trapezoidal y logotrapezoidal ya que son sencillos y no son más inexactos que métodos mucho más complejos como el de Lagrange. El método trapezoidal considera el área entre dos tiempos experimentales como un trapecio que se calcula mediante la expresión:

$$AUC_{t_{i-1}}^{t_i} = [t_i - t_{i-1}] \cdot \left[\frac{C_i + C_{i-1}}{2} \right] \quad \text{Ecuación 2}$$

El área total desde tiempo cero a tiempo t equivale a la suma de las áreas de todos los trapecios considerados en este periodo de tiempo. Mediante este método, el área se subestima durante las fases ascendentes y se sobrestima en las fases descendentes ^[48].

El método logotrapezoidal utiliza una transformación logarítmica de cada par de concentraciones:

$$AUC_{t_{i-1}}^{t_i} = \left[\frac{C_{i-1} + C_i}{\ln C_{i-1} - \ln C_i} \cdot (t_i - t_{i-1}) \right] \quad \text{Ecuación 3}$$

Este método es adecuado cuando los niveles son descendientes pero no puede aplicarse cuando una concentración es igual a cero o dos concentraciones consecutivas son iguales.

La determinación del AUC desde el último punto experimental hasta infinito se realiza para el método trapezoidal y logotrapezoidal mediante la siguiente expresión:

$$AUC_t^\infty = \frac{C_t}{\lambda_z} \quad \text{Ecuación 4}$$

El área extrapolada desde el último punto experimental hasta infinito debe ser lo más pequeña posible pero está ampliamente aceptado que no debe ser superior al 20% del área total a menos que se utilice como estima inicial para un futuro estudio farmacocinético ^[49].

El aclaramiento plasmático mediante un tratamiento no compartimental se calcula según la ecuación:

$$CL = \frac{D}{AUC} \quad \text{Ecuación 5}$$

El aclaramiento de un órgano (CL_o) es función del flujo de sangre del órgano en cuestión (Φ) y de la tasa de extracción (E). El valor de la tasa de extracción puede ser de entre 0 a 1.

$$CL_o = \Phi \cdot E \quad \text{Ecuación 6}$$

Tras la administración del fármaco por vía intravenosa, el volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario puede calcularse mediante la ecuación 7:

$$V_{SS} = MRT \cdot CL \quad \text{Ecuación 7}$$

En el tratamiento farmacocinético no compartimental, los valores de C_{max} y t_{max} se calculan experimentalmente. El valor de t_{max} está relacionado con la velocidad de absorción mientras que C_{max} depende de la velocidad y de la magnitud de la absorción.

1.4.3 FARMACOCINÉTICA POBLACIONAL

La farmacocinética poblacional surgió de la necesidad de estimar los parámetros farmacocinéticos a partir de datos procedentes de la monitorización terapéutica ^[50]. La farmacocinética poblacional ha experimentado una gran evolución desde su origen y en la actualidad, los escenarios que permiten aplicarla son muy amplios y abarcan desde la práctica clínica rutinaria a las distintas etapas de desarrollo de un fármaco, adquiriendo un papel muy importante en el desarrollo eficaz de un nuevo fármaco.

Además, la farmacocinética poblacional ofrece la posibilidad de efectuar análisis simultáneos integrando toda la información farmacocinética de un fármaco, no solo a partir de datos procedentes de diseños de muestreo relativamente dispersos ("sparse data") sino también a partir de datos procedentes de diseños intensivos ("dense data") o a partir de la combinación de ambos, diseños balanceados con el mismo número de muestras por individuo vs diseños no balanceados, así como de estudios que están normalmente excluidos debido a que su diseño no permite el análisis farmacocinético clásico. A modo de ejemplo, en los estudios preclínicos o en los estudios clínicos de fase II y III, se suele disponer de pocos datos por individuo, siendo insuficientes para describir el perfil farmacocinético individual completo. El análisis compartimental clásico así como el análisis no compartimental de estos datos obliga a considerarlos como si provinieran todos de un mismo individuo y no permite discernir entre variabilidad interindividual y residual. Como consecuencia de todo ello, en estos casos, la estimación de los valores de los parámetros farmacocinéticos puede ser inexacta.

La farmacocinética poblacional se define como el estudio de las fuentes de variabilidad en las concentraciones de fármaco entre individuos que reciben un régimen de dosificación estándar. Esta aproximación permite i) analizar simultáneamente la información de todos los sujetos en la población de estudio, ii) estimar el valor medio de los parámetros farmacocinéticos, iii) cuantificar tanto la magnitud de la variabilidad asociada a los parámetros farmacocinéticos dentro de la población de estudio como la contribución de determinadas características individuales (peso corporal, edad, sexo, etc.), fisiopatológicas (parámetros relacionados con la funcionalidad renal o hepática, etc.) o terapéuticas (la presencia de tratamientos concomitantes, etc.) a dicha variabilidad y iv) estimar la variabilidad o error asociado a las concentraciones experimentales ^[51, 52].

Existen diferentes métodos para la estimación de los parámetros farmacocinéticos poblacionales^[53]. Los más utilizados son el método de datos agrupados (naive pooled data), el método en dos etapas y el método de los modelos no lineales de efectos mixtos.

1.4.3.1 MÉTODO DE DATOS AGRUPADOS "NAIVE POOLED DATA"

Este método es útil cuando existe poca variabilidad entre los individuos. Es la aproximación más simple. Es un método que analiza todos los datos provenientes de los diferentes individuos como si provinieran de uno único. Para que los datos sean comparables, deben normalizarse por las dosis. Este método permite conocer la tendencia central de los parámetros farmacocinéticos. Las principales ventajas de este método son la facilidad de su aplicación y que puede usarse con una gran variedad de diseños, como por ejemplo diseños de datos dispersos o bien a partir de diseños con un número distinto de muestras por individuo. Sin embargo este método no permite el cálculo de los parámetros farmacocinéticos individuales, no distingue entre la variabilidad interindividual y la residual y no permite la inclusión de covariables. Todo ello, puede causar que se pueda pasar por alto tendencias en un grupo de individuos con respecto a la absorción, distribución y/o eliminación lo que puede producir error en la estima de los parámetros si los datos no están balanceados.

1.4.3.2 MÉTODO EN DOS ETAPAS "TWO-STAGE METHOD"

La aproximación en dos etapas es el análisis farmacocinético tradicional. En la primera etapa se estiman los parámetros farmacocinéticos de cada individuo por separado mediante métodos de regresión no lineal. En este caso, es posible calcular los valores medios, varianzas y covarianzas de cada parámetro a partir de los valores individuales de los mismos y por tanto conocer la variabilidad interindividual. En una segunda etapa, este método permite de forma sencilla, relacionar mediante técnicas estadísticas multivariantes los valores de los parámetros farmacocinéticos individuales y las covariables de interés. Esta aproximación presenta también algunos inconvenientes como se describe a continuación:

- Requiere un mínimo número de datos de concentración plasmática vs tiempo por individuo así como un diseño adecuado en los tiempos de muestreo para que todos los parámetros puedan ser estimados con precisión^[54].
- Tiende a sobrestimar la variabilidad interindividual asociada a los parámetros farmacocinéticos.
- El comportamiento farmacocinético de todos los individuos debe ser descrito por el mismo modelo estructural, siendo ello una limitación especialmente cuando los datos a modelizar proceden de administraciones por vías extravasales.

1.4.3.3 MODELOS NO LINEALES DE EFECTOS MIXTOS "NONLINEAR MIXED-EFFECTS MODELS"

Los modelos no lineales de efectos mixtos, incluyen los denominados efectos fijos que corresponden a los parámetros farmacocinéticos y coeficientes de regresión de las covariables que describen parte de la variabilidad interindividual debida a características individuales conocidas y los efectos aleatorios que corresponden a la variabilidad interindividual y residual ^[55]. Esta aproximación, permite el análisis simultáneo de todos los datos para estimar los valores de los parámetros farmacocinéticos (efectos fijos) y de la varianza asociada a las distribuciones de los efectos aleatorios interindividuales (η) y residuales (ϵ).

Los modelos de efectos mixtos se basan en la asunción de que los parámetros farmacocinéticos individuales de una población siguen una distribución normal. Esta distribución puede ser descrita por la media poblacional del parámetro y la varianza asociada. De esta manera, cada parámetro farmacocinético individual viene dado por la media poblacional o valor típico del parámetro más una desviación con respecto al valor típico, o dicho de otra forma, esta desviación es la diferencia entre la media poblacional del parámetro y el valor del parámetro individual.

De acuerdo con estos modelos, la concentración plasmática observada en un individuo dado i , a un tiempo dado j , puede describirse mediante la ecuación 8.

$$Y_{ij} = f(D_i, F_{ci}, X_i, t_{ij}) + \epsilon_{ij} \quad \text{Ecuación 8}$$

Siendo, Y_{ij} : Concentración plasmática del fármaco en el individuo i al tiempo j (t_{ij}), f : Modelo farmacocinético que mejor describe las observaciones experimentales (modelo estructural), F_{ci} : Vector de parámetros del modelo estructural, D_i : Dosis de fármaco administrada, X_i : Características demográficas del individuo y ϵ_{ij} : Error residual o diferencia entre el valor de concentración predicho por el modelo y el observado para el individuo i al tiempo j .

Tal como se observa en la Figura 12 los modelos no lineales de efectos mixtos son modelos jerárquicos que presentan dos niveles de variabilidad; los efectos aleatorios interindividuales (η_i) que pertenecen al primer nivel y los efectos aleatorios residuales (ϵ_{ij}) que pertenecen al segundo, estando éstos anidados en los primeros ^[56].

Tal como ya se ha descrito, la principal ventaja de este método es que permite el análisis de datos dispersos y de datos provenientes de individuos con un número distinto de muestras por individuo, diseños no balanceados, etc. de forma simultánea (análisis en una sola etapa) pero preservando su individualidad. Además, permite la estimación de parámetros poblacionales e individuales. Para ello, se requiere de complejos algoritmos de cálculo y puede requerir de bastante tiempo durante el proceso de modelización.

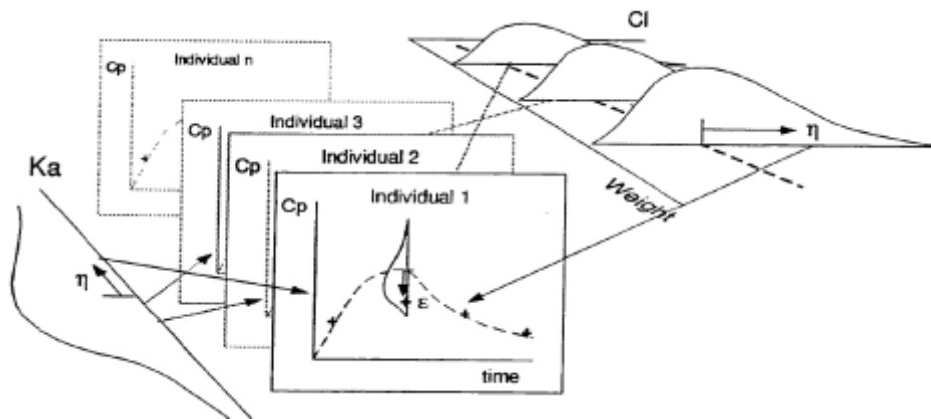


Figura 12. Modelos no lineales de efectos mixtos (modelos jerárquicos): Efectos aleatorios residuales (ϵ) anidados dentro de los efectos aleatorios interindividuales (η).

Los modelos no lineales de efectos mixtos permiten métodos de estimación paramétrica y no paramétrica:

- Aproximación paramétrica. Asume que los parámetros presentan una distribución conocida (normal o log-normal) caracterizada por una media y sus correspondientes medidas de dispersión (varianza). Los métodos de estimación paramétrica más utilizados en farmacocinética poblacional son los siguientes:

- *FO (First-order estimation model)*: Método de estimación de primer orden: Mediante este método, las η no entran dentro del proceso de minimización de la función objetivo y toman el valor 0 (la media poblacional de η es igual a 0) durante el proceso de estimación. Como consecuencia mediante dicho método puede obtenerse estimas sesgadas de los parámetros poblacionales, por lo que no es el más recomendable.

- *FOCE (First-Order Conditional Estimation method)*: Método de estimación condicional de primer orden. Mediante este método, las η intervienen durante el proceso de estimación y toman el valor de las estimas condicionales de η . La opción FOCE INTERACTION tiene en cuenta la posible interacción existente entre ϵ y η . Este método permite obtener estimas no sesgadas de los parámetros poblacionales.

- Aproximación no paramétrica. Esta aproximación surge de la imposibilidad de caracterizar la distribución de los parámetros poblacionales como normales o log-normales. Se basa en maximizar la probabilidad (función de densidad) de que los parámetros estimados describan adecuadamente el proceso que representa ^[55]. Tanto el método no paramétrico de máxima verosimilitud (NPML) ^[57] como el método no paramétrico de máxima expectación (NPEM) ^[58] no permiten cuantificar los intervalos de confianza de las distribuciones obtenidas ni separar las fuentes de variabilidad inter e intraindividual.

En las últimas décadas han surgido varios programas que permiten desarrollar modelos farmacocinéticos poblacionales mediante la aproximación de los modelos no lineales de

efectos mixtos. NONMEM es quizás el programa más ampliamente utilizado. Se trata de un programa escrito en lenguaje FORTRAN 77 inicialmente desarrollado en la Universidad de California, San Francisco, por Beal y Sheiner ^[59] y que actualmente ha evolucionado hasta la versión 7. Es un programa diseñado para ajustar modelos fármaco estadísticos mediante procedimientos de regresión no lineal a los datos experimentales de concentración plasmática frente al tiempo, con el objetivo de estimar el valor típico de los parámetros farmacocinéticos, la incertidumbre asociada a los mismos o variabilidad interindividual y la variabilidad asociada a las concentraciones o error residual, así como identificar aquellos factores o características individuales que pueden explicar parte de la variabilidad asociada a los parámetros farmacocinéticos.

El desarrollo de un modelo farmacocinético poblacional efectuado con NONMEM incluye el modelo estructural y el modelo estadístico. El modelo estructural está compuesto a su vez por un modelo farmacocinético que describe la evolución media de las concentraciones predichas en función de los parámetros cinéticos poblacionales y un modelo de regresión o de covariables que relaciona los parámetros cinéticos con las características de los individuos. El modelo estadístico tiene por objetivo modelizar y evaluar la magnitud de la variabilidad interindividual asociada a los parámetros farmacocinéticos y de la variabilidad residual asociada a las concentraciones.

1.4.3.3.1 MODELO ESTRUCTURAL

El modelo estructural describe el comportamiento farmacocinético medio (también denominado típico) del fármaco en la población de estudio. En una primera etapa se desarrolla el modelo base que es aquel que mejor describe las observaciones en ausencia de covariables. Aunque se disponga de información previa procedente de estudios previos, la estrategia a seguir suele ser ajustar los modelos de uno, dos y tres compartimentos combinando con distintas cinéticas de absorción (en caso de que el fármaco se haya administrado por vía extravasal) seleccionando el modelo más óptimo basándose en criterios estadísticos (test de razón de máxima verosimilitud, LRT; criterio de Akaike, AIC), precisión en los parámetros estimados, y a través de la exploración de gráficos de bondad de ajustado.

Una covariable se define como aquella característica de un individuo que puede afectar al comportamiento del fármaco a través de un cambio en sus parámetros cinéticos. La incorporación de covariables en un modelo poblacional debería disminuir la variabilidad interindividual, identificar subpoblaciones con mayor riesgo de fracaso terapéutico (disminución de la eficacia o aumento de toxicidad al tratamiento), aumentar la capacidad predictiva del modelo, aumentar el carácter mecanicista del modelo y/o permitir explorar el posible impacto de otras covariables en los parámetros del modelo.

La forma en la que el parámetro cambia en función de los valores de las covariables se puede modelar mediante diferentes expresiones matemáticas dependiendo de las características de cada una de las covariables (continua o categórica) y de su influencia en el parámetro ^[60].

1.4.3.3.2 MODELO ESTADÍSTICO

Los efectos aleatorios interindividuales (η) son la diferencia entre el parámetro farmacocinético individual y el parámetro farmacocinético poblacional. La variabilidad interindividual puede ser modelada como:

- Modelo aditivo: η se añade al valor poblacional. La varianza del parámetro es constante a lo largo de todo el intervalo de valores del parámetro.

$$\theta_{1i} = \theta_{1pop} + \eta_{1i} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde: θ_{1i} : Parámetro farmacocinético en el individuo i , θ_{1pop} : Valor típico del parámetro farmacocinético y η_{1i} : Variable aleatoria para el individuo i en el parámetro farmacocinético

- Modelo proporcional: η se multiplica al valor típico del parámetro farmacocinético poblacional. La varianza aumenta a medida que aumenta el valor del parámetro.

$$\theta_{1i} = \theta_{1pop} \cdot (1 + \eta_{1i}) \quad \text{Ecuación 10}$$

- Modelo exponencial: basado en un modelo de error exponencial. Suele ser el modelo de elección para modelar la variabilidad interindividual en los parámetros farmacocinéticos.

$$\theta_{1i} = \theta_{1pop} \cdot \left(e^{\eta_{1i}} \right) \quad \text{Ecuación 11}$$

En la ecuación 10 se asume una distribución normal mientras que en la ecuación 11 se asume una distribución log-normal en la que los parámetros individuales no alcanzarán valores negativos. Esto se ajusta a lo esperado desde un punto de vista fisiológico.

La magnitud de la variabilidad interindividual puede expresarse en términos de coeficiente de variación porcentual (CV%), cuyo cálculo depende del modelo de variabilidad interindividual seleccionado. Así, en el caso del modelo proporcional y del modelo exponencial, el CV% se calcula a partir de la ecuación 12:

$$CV(\%) = \sqrt{\omega^2} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 12}$$

Para una población con un número m de individuos, los valores de η_{1i} representan la desviación de los parámetros de cada individuo respecto al valor medio poblacional. Esta desviación tiene una distribución aleatoria simétricamente distribuida alrededor de 0 y con una varianza igual a ω_p^2 . El valor de ω_p^2 representa la variabilidad interindividual asociada al parámetro.

Los efectos aleatorios residuales (ϵ) cuantifican las desviaciones entre las concentraciones predichas por el modelo y las concentraciones observadas en el individuo que no pueden explicarse mediante el modelo poblacional propuesto. Se asume que los efectos aleatorios

residuales son independientes entre sí y presentan una distribución simétrica alrededor de cero y varianza σ^2 , Los efectos aleatorios residuales pueden modelarse como:

- Modelo aditivo: ε se añade a la función que describe el perfil farmacocinético del individuo. La varianza asociada a las concentraciones es constante e independiente del valor de éstas.

$$C_{ij} = f(D_i, F_{ci}, X_i, t_{ij}) + \varepsilon_{ij} \quad \text{Ecuación 13}$$

- Modelo proporcional: ε se multiplica a la función que describe el perfil farmacocinético del individuo. La varianza asociada a las concentraciones aumenta proporcionalmente con la magnitud de éstas.

$$C_{ij} = f(D_i, F_{ci}, X_i, t_{ij}) \cdot (1 + \varepsilon_{ij}) \quad \text{Ecuación 14}$$

- Modelo combinado (aditivo-proporcional): Es la combinación entre el modelo aditivo y el proporcional. La variabilidad residual tiene dos componentes aditivo y proporcional. Ambos se añaden a la función que describe el perfil farmacocinético del individuo.

$$C_{ij} = f(D_i, F_{ci}, X_i, t_{ij}) \cdot (1 + \varepsilon_{ij1}) + \varepsilon_{ij2} \quad \text{Ecuación 15}$$

Se asume que el conjunto de los efectos aleatorios residuales está simétricamente distribuidos alrededor de 0 y la varianza de dicha distribución es σ^2 . La matriz varianza-covarianza Σ engloba a las varianzas σ^2_1, \dots, n (n es el número errores residuales considerados asociados a distintos tipos de datos concentración frente al tiempo, si procede) y la posible covarianza que caracteriza la variabilidad residual.

En aquellos casos en que se trabaja con datos logotransformados, el modelo de error residual se convierte en el modelo de error aditivo para datos logotransformados dado por la ecuación 16.

$$y_{ij} = \ln \left[f(\theta_i, D_i, x_{ij}) \right] + \varepsilon_j \quad \text{Ecuación 16}$$

Siendo, en este caso y_{ij} , las concentraciones de cada individuo i a un tiempo j , expresadas en logaritmos neperianos.

1.4.3.3.3 MÉTODOS DE DISCRIMINACIÓN DE MODELOS DURANTE EL DESARROLLO

Para la evaluación del modelo poblacional, no existe un único criterio que permita discriminar entre modelos de forma óptima. Los métodos más ampliamente utilizados para la evaluación y discriminación de modelos se basan fundamentalmente en criterios numéricos y gráficos de bondad de ajustado.

CRITERIOS NUMÉRICOS:

- La función objetiva (OBJ) da cuenta de la diferencia entre los valores de concentración observados y predichos para un grupo de individuos. Permite describir la bondad del ajuste de un modelo dado a los datos experimentales y asumiendo que el modelo es correcto, determina la máxima probabilidad de predecir los datos observados (función de máxima verosimilitud). Asimismo, permite discriminar entre los distintos modelos ajustados a los mismos datos para la selección del modelo óptimo. Puesto que de hecho, la función objetiva es igual a -2 veces el valor del logaritmo de la función de máxima verosimilitud (-2·log likelihood, -2LL), cuanto menor sea su valor, mayor probabilidad de que el modelo describa adecuadamente los datos observados.

$$-2\log(L) = n\log(2\pi) + \sum_{i=1}^n \left(\log\sigma_i^2 + \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{\sigma_i^2} \right) \quad \text{Ecuación 17}$$

Para modelos anidados que solo difieran en un parámetro, la diferencia entre los valores de sus respectivas funciones objetivas sigue una distribución de xi-cuadrado con un grado de libertad. Como consecuencia la significancia del parámetro que diferencie a ambos modelos será del 5% ($p < 0.05$) si del modelo reducido al completo existe una disminución de la función objetiva de 3.84 puntos, y del 0.5% ($p < 0.005$) si la reducción es de 7.879 puntos ^[61,62].

- Para modelos no anidados, se utiliza como criterio discriminativo el criterio de información Akaike (Akaike Information Criteria AIC) ^[63]:

$$AIC = MVOF + 2 \cdot P \quad \text{Ecuación 18}$$

Donde MVOF corresponde al valor de la función objetiva y P es el número total de parámetros del modelo. El modelo que proporcione el mínimo valor de AIC será el que mejor describe los datos experimentales.

- Precisión en los valores de los parámetros estimados El coeficiente de variación porcentual de los parámetros estimados (Relative standard error - RSE%) permite conocer el grado de precisión/imprecisión en su estimación. Cuanto menor es el valor de RSE% mayor es la precisión con la que se estima el parámetro. El valor del RSE% viene dado por la ecuación 19.

$$RSE\% = (\text{error estándar} / \text{parámetro}) * 100 \quad \text{Ecuación 19}$$

GRÁFICOS DE BONDAD DE AJUSTE:

Los gráficos de la bondad de ajuste permiten detectar desviaciones o tendencias debidas ya sea al modelo estructural como al estadístico desarrollados. Los datos observados (DV), las predicciones poblacionales (PRED) e individuales (IPRED) frente al tiempo tras la administración (TAD) son los gráficos más utilizados en la literatura ^[64]. Estos gráficos permiten tener una impresión general del ajustado del modelo. En la figura 13 se representan los valores observados frente a los predichos poblacionales así como los valores observados frente a los predichos individuales. La línea sólida representa la línea de identidad y la línea roja representa la línea de tendencia general de los datos. Si el modelo estructural es adecuado, los datos estarán agrupados uniformemente alrededor de la línea de identidad a lo largo de todo el ámbito de concentraciones ^[65]. El gráfico IPRED frente al tiempo tiene un mejor ajustado ya que incorpora la variabilidad interindividual necesaria para el ajuste individual de los datos. Dicha Figura incluye también los gráficos de los residuales ponderados poblacionales condicionales vs tiempo (CWRES=PRED-DV/W) y los residuales individuales ponderados (IWRES=IPRED-DV/W) vs las predicciones individuales. En ambos casos debería existir una distribución homogénea alrededor de cero, sin ninguna tendencia. Asimismo la magnitud de los IWRES debería ser inferior a la magnitud de los WRES.

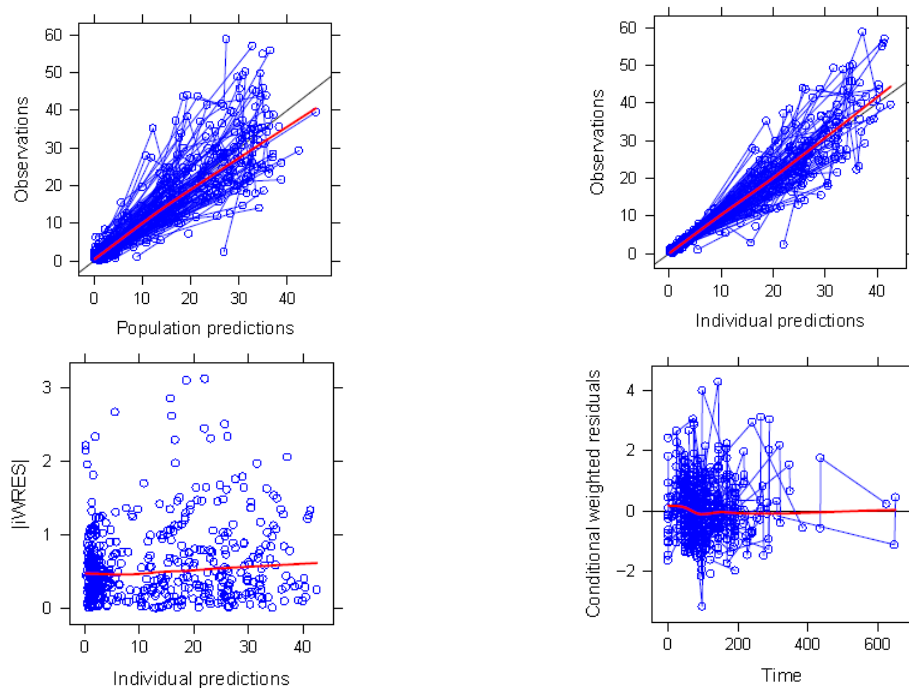


Figura 13. Gráficos de bondad de ajustado PRED frente a DV e IPRED frente a DV

1.4.3.3.4 MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE MODELOS

La evaluación del modelo permite conocer su capacidad predictiva. Para ello existen métodos de evaluación o validación interna y métodos de validación externa. Los métodos de validación interna utilizan fundamentalmente la herramienta de la simulación, mientras que los métodos de validación externa se basan en la predicción bayesiana. Estas técnicas

suelen aplicarse una vez obtenido el modelo final pero pueden ser también muy útiles durante el desarrollo del modelo como herramienta de ayuda en la discriminación de modelos.

Por otra parte es conveniente conocer el valor del shrinkage tanto del modelo base como del modelo final desarrollado.

SHRINKAGE:

El valor de "ε-shrinkage" se utiliza para cuantificar cómo de informativo es el gráfico. Tiene un valor que va de cero a uno. Cuanto más se acerca a uno, menos informativo resulta el gráfico. La ecuación 20 muestra el cálculo de "ε-shrinkage", donde SD (IWRES) es la desviación estándar de los residuales individuales ponderados (IWRES). Un valor de "shrinkage" superior al 20% supone una pérdida de significancia del gráfico IPRED vs DV ^[66].

$$\varepsilon - \text{shrinkage} = 1 - \text{SD}(\text{IWRES}) \quad \text{Ecuación 20}$$

El concepto de "shrinkage" también se aplica a la variabilidad interindividual durante la selección de covariables. Un valor alto de "η-shrinkage" se asocia con una estimación menos fiable de la variabilidad interindividual. La ecuación 21 muestra el cálculo de "η-shrinkage", donde SD (η) es la desviación estándar de las estimas empíricas bayesianas de la variabilidad interindividual (η) y ω es la estima poblacional del parámetro de η ^[66].

$$\eta_x - \text{shrinkage} = 1 - \left(\frac{\text{SD}(\eta_x)}{\omega} \right) \quad \text{Ecuación 21}$$

El gráfico de residuales individuales ponderados (IWRES) frente al tiempo cuando se utiliza el método FO para la estimación de parámetros y el gráfico de los residuales ponderados condicionales (CWRES) frente al tiempo cuando se utiliza el método FOCE, son útiles para observar las diferencias entre las predicciones y las observaciones a lo largo de la variable independiente ^[67]. Los residuales deben estar dispersos aleatoriamente sobre la línea de residual (0). Permiten un diagnóstico del ajustado y no debe mostrar ninguna tendencia. Los valores deben estar comprendidos entre ± 2. Valores ± 3 se pueden considerar como "outliers".

MÉTODOS DE VALIDACIÓN INTERNA:

- Técnica de bootstrap de Bradley Efron

El "bootstrapping" ^[68] es un método de re-muestreo en que se hace un muestreo a la población original N veces. El tamaño de la muestra suele ser igual al de la población original de forma que en cada muestra pueden existir individuos repetidos. El bootstrap puede ser de tipo paramétrico o no paramétrico. En el bootstrap paramétrico se generan

pseudo-muestras distribuidas de acuerdo con la distribución del modelo desarrollado (distribución normal) mientras que en el no paramétrico se realiza a partir del archivo de datos originales. El método se ajusta a los datos de cada pseudo-muestra y se estiman los mismos parámetros que en la población original para cada una de las muestras. A partir de dichos valores se calcula la media de los valores muestrales y los intervalos de confianza asociados a dicha media.

- Evaluación predictiva visual

En la evaluación predictiva visual, se utiliza las características de los datos observados ^[69, 70] para la validación interna del modelo. Consiste en la representación gráfica de las observaciones y de los intervalos de las predicciones a lo largo del tiempo para los valores simulados y permite evaluar tanto los efectos fijos como los efectos aleatorios del modelo. En la predicción corregida de la evaluación predictiva visual (pc-VPC) se normalizan las observaciones y las predicciones del modelo por las predicciones típicas del modelo en cada grupo de variable independiente ^[71].

- Evaluación predictiva cuantitativa (NPC)

La evaluación predictiva cuantitativa (NPC) evalúa la concordancia entre los datos observados y los obtenidos por el modelo mediante la comparación de uno o varios descriptores de interés farmacocinéticos (por ejemplo C_{max} , AUC, etc.) pero que no son empleados para el ajuste del modelo poblacional ^[72].

- Evaluación predictiva posterior (PPC)

Fue sugerida por DB Ruffin en 1984 ^[73] como una herramienta para construir procedimientos deductivos en el análisis estadístico de datos. En esta aproximación, el modelo es estimado directamente a partir de los datos y después, a partir de éste, se simula un nuevo grupo de datos. Los datos simulados se comparan con los datos observados para evaluar la capacidad deductiva del modelo.

- Predicción normalizada de la distribución de los errores (NPDE)

La predicción normalizada de la distribución de los errores es una técnica relativamente nueva ^[74,75]. Las discrepancias en las predicciones se obtienen como los cuantiles de cada observación en la distribución predicha. El modelo describe bien los datos cuando las discrepancias predichas están uniformemente distribuidas.

En la práctica, los métodos de evaluación de modelos sólo pueden llevarse de una manera eficiente mediante el uso de herramientas especialmente diseñadas para ayudar en el desarrollo de modelos poblacionales como por ejemplo PsN (<http://psn.sourceforge.net/>), Xpose (<http://xpose.sourceforge.net/>), Census (<http://census.sourceforge.net/>) y Piraña (<http://pirana.sourceforge.net/>) y de softwares para la manipulación de datos, cálculos estadísticos y de visualización de gráficos. Los softwares R (<http://cran.r-project.org>) y

S-PLUSR (Copyright 1988, 2002 Insightful Corp) son ampliamente utilizados en el campo de la farmacometría.

MÉTODOS DE VALIDACIÓN EXTERNA:

La evaluación externa consiste en aplicar el modelo farmacocinético final seleccionado para predecir los niveles de fármaco de unos datos correspondientes a un estudio distinto al utilizado para construir el modelo (población externa), y comparar el grado de similitud entre los datos predichos por el modelo y los observados en dicha población externa.

Las agencias reguladoras consideran la evaluación externa como el método más riguroso para evaluar un modelo farmacocinético poblacional. Sin embargo, la aplicación de esta aproximación suele presentar dos limitaciones principales; no siempre es viable disponer de datos externos al desarrollo del modelo y si la predicción no es satisfactoria, no se puede establecer si está causada por una selección errónea del modelo, o por diferencias en las poblaciones de estudio.

1.4.4 ALOMETRIA

La información obtenida en los estudios preclínicos durante el desarrollo de un fármaco se utiliza para estimar una dosis inicial segura para administrar a humanos. La predicción de la farmacocinética en humanos, y especialmente del aclaramiento y biodisponibilidad (para la administración oral), resulta de gran importancia para la elección de la dosis a utilizar en los primeros ensayos clínicos. Existen dos métodos fundamentales para abordar la extrapolación de los resultados obtenidos en la experimentación animal: el uso de modelos fisiológicos y la alometría. La aplicación de modelos fisiológicos es más compleja, requiere conocer un número de variables anatómicas y fisiológicas, además de información experimental. La extrapolación alométrica se basa en las similitudes anatómicas, fisiológicas y bioquímicas de las diferentes especies animales que se pueden plasmar en ecuaciones empíricas y matemáticas simples ^[76]. Entre las distintas especies puede existir una relación entre los parámetros farmacocinéticos del principio activo y una característica fisiológica, normalmente el peso corporal. El tamaño corporal es característico de cada especie. Numerosos aspectos de la biología de un animal como su fisiología (velocidad de latido cardíaco, frecuencia respiratoria, capacidad metabólica, etc...), anatomía (masa de los órganos, volumen de sangre, área superficial) y otros, como la esperanza de vida, están influenciados por esta propiedad. La medida más inmediata y sencilla del tamaño corporal es el peso corporal. Por tanto, existen un gran número de variables morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y farmacológicas que pueden relacionarse con el peso corporal.

La ecuación alométrica general, que correlaciona las funciones fisiológicas y anatómicas con el peso corporal de un animal, es una ecuación de potencia:

$$y = a \cdot W^b$$

Ecuación 22

Donde "y" es la variable fisiológica o parámetro farmacocinético, "a" y "b" son el coeficiente y el exponente alométrico respectivamente y "W" es el peso corporal. La transformación logarítmica de la ecuación empírica anterior da lugar a la ecuación de una recta.

A partir de los datos experimentales de la variable o el parámetro en distintas especies animales se obtienen empíricamente los valores de "a" y "b"; conocidos "a" y "b" para un parámetro determinado y un fármaco concreto, se puede calcular el valor de dicho parámetro (y) en la especie deseada, generalmente el hombre, mediante la simple sustitución de W por el peso correspondiente (aprox. 70 kg) en la ecuación alométrica previamente establecida. En esta ecuación, en general, el valor de la constante "a" depende del fármaco, mientras que el valor del exponente "b" está más relacionado con el tipo de parámetro farmacocinético o fisiológico. Se ha observado que para la mayoría de los parámetros anatómicos y fisiológicos el exponente alométrico varía entre 0.67 y 1.0^[77]. La tendencia general de los exponentes alométricos es de 0.75 para el aclaramiento, de 1.0 para los volúmenes de distribución y de 0.25 para las semividas, frecuencias y tiempos biológicos^[78]. En las últimas décadas, se ha encontrado que, en general, las ecuaciones alométricas descritas no son adecuadas para fármacos que presentan un comportamiento complejo como cinética no lineal, secreción tubular o excreción biliar.

El porcentaje de error entre el valor observado y el predicho se utiliza para evaluar la exactitud en la determinación del parámetro evaluado.

$$\text{Error (\%)} = \frac{(\text{valor observado} - \text{valor predicho})}{\text{valor observado}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 23}$$

La mayoría de autores consideran que un % de error de $\pm 30\%$ es indicativo de una predicción alométrica adecuada.

1.4.4.1 PREDICCIÓN DEL ACLARAMIENTO

El aclaramiento es quizás el parámetro farmacocinético más importante para predecir una dosis segura y eficaz para administrar al hombre. Por ello, existen diferentes aproximaciones para predecir el aclaramiento en el hombre.

1.4.4.1.1 ECUACIÓN ALOMÉTRICA SIMPLE

Se basa en relacionar el valor del aclaramiento con el peso de las distintas especies mediante la ecuación 22. Para fármacos que se eliminan principalmente a través del hígado mediante reacciones metabólicas, la ecuación alométrica simple funciona bien en todas las especies excepto para el hombre (con un aclaramiento renal sensiblemente menor al que le correspondería teóricamente), lo que ha sido atribuido a una pérdida en la capacidad del hombre para transformar fármacos y xenobióticos.

1.4.4.1.2 ECUACIÓN ALOMÉTRICA CORREGIDA CON LA MÁXIMA ESPERANZA DE VIDA (MLP)

Cada especie tiene una máxima esperanza de vida característica que está correlacionada con otras funciones temporales específicas como la gestación, la pubertad, la velocidad de latido del corazón y la velocidad metabólica. Por tanto, se establece una máxima esperanza de vida (MLP) para cada especie que puede calcularse a partir de la ecuación 24 ^[79]:

$$MLP = 185.4 \cdot BW^{0.636} W^{-0.225} \quad \text{Ecuación 24}$$

Donde BW es el peso del cerebro y W es el peso corporal, ambos expresados en kilogramos.

En esta aproximación, el aclaramiento observado en las diferentes especies animales se multiplica por su MLP, según se describe en la ecuación 25.

$$CL \cdot MLP = a \cdot W^b \quad \text{Ecuación 25}$$

Esta ecuación se ha utilizado para predecir el aclaramiento intrínseco de fármacos que son eliminados fundamentalmente por metabolismo hepático ^[80].

1.4.4.1.3 ECUACIÓN ALOMÉTRICA CORREGIDA CON LA MASA CEREBRAL (BW)

En esta aproximación se utiliza el peso del cerebro (BW) aplicando la siguiente ecuación ^[81]:

$$CL \cdot BW = a \cdot W^b \quad \text{Ecuación 26}$$

Donde BW es el peso del cerebro y W es el peso corporal, ambos expresados en kilogramos.

Este método ha resultado útil en la predicción del aclaramiento de algunos fármacos que experimentan procesos de biotransformación.

La Tabla 2 muestra los valores del peso corporal, MLP y masa cerebral de las principales especies utilizadas en alometría.

Tabla 2. Valores de peso corporal, máxima esperanza de vida (MLP) y peso cerebral (BW) de distintas especies animales.

Especie	Peso corporal (kg)	MLP (años)	BW(kg)
Ratón	0.025	2.76	0.000143
Rata	0.333	5.25	0.0025
Mono	5	22.91	0.660
Perro	12	18.39	0.0637
Hombre	70	93.39	1.53

1.4.4.1.4 REGLA DE LOS EXPONENTES

Mahmood y Balian ^[82] evaluaron los métodos de predicción basándose en la ecuación alométrica simple (ecuación 22), la aproximación corregida por MLP (ecuación 25) y la aproximación corregida por BW (ecuación 26) para predecir el aclaramiento de 40 fármacos en el hombre a partir de datos obtenidos en animales (mínimo tres especies). Concluyeron que el factor determinante en la selección del método para la predicción del aclaramiento era el valor del exponente, proponiendo así la “regla de los exponentes”. Según ésta se toma como referencia los exponentes obtenidos en la ecuación alométrica simple, del siguiente modo:

- Para exponentes entre 0.55 y 0.70 la ecuación alométrica simple es la más adecuada.
- Para exponentes entre 0.71 y 0.99 la ecuación alométrica simple sobrestima el valor del aclaramiento y es más adecuado el método del MLP.
- Para exponentes ≥ 1.0 el producto del aclaramiento por el peso cerebral es el que predice el aclaramiento con más exactitud.
- Para valores de exponentes superiores a 1.3 o inferiores a 0.55, las predicciones pueden no ser adecuadas con ninguno de los tres métodos evaluados.

Existe una modificación específica para predecir el aclaramiento de fármacos que experimentan excreción biliar. Para este tipo de fármacos, se introduce un factor adicional que es el flujo de bilis diario normalizado por el peso corporal (CF1) o normalizado por el peso de hígado (CF2). En estos casos se puede corregir el valor del aclaramiento por alguno de estos factores de corrección en la ecuación elegida previamente según la regla de los exponentes ^[83].

El aclaramiento de fármacos con alta extracción hepática está limitado por el flujo hepático, que a su vez está relacionado con el peso corporal mediante una ecuación alométrica. Por ello, para este tipo de fármacos, el aclaramiento se correlaciona alométricamente con el peso. Sin embargo, cuando el metabolismo no está limitado por el flujo hepático, el aclaramiento está determinado fundamentalmente por la actividad de los enzimas, que no se puede extrapolar alométricamente entre especies. Para fármacos con coeficientes de extracción medios o bajos se ha propuesto un método de predicción del aclaramiento que combina el aclaramiento *in vivo* de diversas especies animales con datos de estudios *in vitro* obtenidos con hepatocitos procedentes de las correspondientes especies animales y del hombre correlacionados a su vez con la masa corporal, según la siguiente ecuación:

$$CL_{an(invivo)} \cdot \frac{CL_h(\text{hepatocitos})}{CL_{an}(\text{hepatocitos})} = a \cdot W^b \quad \text{Ecuación 27}$$

Donde $CL_{an} (in vivo)$ es el aclaramiento *in vivo* en cada especie animal ensayada, $CL_h (\text{hepatocitos})$ es el aclaramiento *in vitro* en hepatocitos humanos y $CL_{an} (\text{hepatocitos})$ es el aclaramiento *in vitro* en hepatocitos de cada especie animal. A partir de esta ecuación se puede extrapolar el valor del aclaramiento en el hombre. Esta aproximación, mejora potencialmente la predicción del aclaramiento en aquellos fármacos cuyo aclaramiento hepático es muy diferente o sigue distintas rutas metabólicas entre las especies animales ^[84].

1.4.4.2 PREDICCIÓN DEL VOLUMEN DE DISTRIBUCIÓN

La predicción del volumen de distribución en el compartimento central (V_1) en el hombre resulta de gran interés para establecer la dosis a administrar ya que con el valor del V_1 se puede estimar la concentración plasmática a tiempo cero tras una administración intravenosa. Esta concentración inicial, juega un papel importante para establecer la inocuidad o toxicidad en la administración de fármacos por primera vez en humanos ^[85]. En general, el exponente de la ecuación alométrica para el V_1 está alrededor de 1 (0.9 - 1) (ecuación 28) por lo que es directamente proporcional al peso corporal, es decir, el volumen de distribución se convierte en un parámetro invariable para un fármaco cuando se normaliza por el peso.

$$V_1 = a \cdot W^b \quad \text{Ecuación 28}$$

1.4.4.3 ESCALADO ALOMÉTRICO MEDIANTE APROXIMACIÓN POBLACIONAL

A pesar de que el escalado alométrico, habitualmente se realiza utilizando los parámetros del aclaramiento y el volumen de distribución medios tras el análisis no compartimental en cada especie animal, en el escalado alométrico mediante la aproximación poblacional, se utilizan todos los datos de concentración plasmática de todas las especies para obtener los coeficientes y exponentes alométricos. De esta manera, el escalado alométrico mediante la aproximación poblacional proporciona estimas de todos los parámetros farmacocinéticos en humanos en lugar de proporcionar estimas de un único parámetro. Las principales características del escalado entre especies utilizando la aproximación poblacional son las siguientes:

- Se utilizan todos los datos concentración frente al tiempo así como los pesos individuales de los distintos animales de las diferentes especies.
- Los coeficientes y los exponentes que caracterizan la relación entre parámetros farmacocinéticos y las características de las distintas especies (peso corporal, peso del cerebro, esperanza de vida máxima, evolución de la enfermedad, etc.) se

estiman en un solo paso, seleccionando el modelo que mejor describe los datos de concentración frente al tiempo.

- Permite analizar datos dispersos (“sparse”) y no balanceados, situación que es frecuente en estudios con animales.
- Permite estimar la variabilidad interindividual (interespecies) y la variabilidad residual (intraespecies).
- Permite la inclusión de otras covariables además del peso corporal que describen el estado del animal (Ej. embarazo).
- Permite extrapolar el perfil farmacocinético completo del fármaco en el hombre.
- Permite establecer el diseño óptimo para el muestreo de estudios posteriores en el hombre.

1.4.4.4 CONDICIONES PARA EL ESCALADO ALOMÉTRICO

La selección de especies para la investigación farmacocinética en la fase preclínica del desarrollo de un fármaco está condicionada por diversos factores que incluyen los requisitos exigidos en los estudios de eficacia y seguridad y, en menor medida, el conocimiento de qué especies parecen ser las más predictivas de la farmacocinética en el hombre. Por este motivo, se suele disponer de datos de cómo mínimo una especie roedora y una especie no roedora. Las ratas son utilizadas casi universalmente en los estudios farmacocinéticos debido, en parte, a su accesibilidad y en parte a su extendido uso en la evaluación de la seguridad. La especie no roedora que se emplea es más variable, si bien las especies más frecuentes en la industria farmacéutica son el perro y el mono. Por tanto, a menudo se dispone de datos preclínicos de rata, perro y/o mono. La combinación de tres especies como ratón/rata, mono y perro es adecuada para predecir los parámetros farmacocinéticos en el hombre ^[86].

Algunos autores han propuesto el cálculo de parámetros farmacocinéticos en humanos a partir de datos obtenidos en una sola especie. El mono es la que proporciona mejores predicciones, pero no siempre es posible disponer de estos datos por razones éticas o económicas. Una buena alternativa es la rata, que ha proporcionado estimaciones adecuadas de parámetros farmacocinéticos en el hombre. El uso de cuatro o cinco especies mejora la predicción, pero no de forma significativa.

Las condiciones básicas para que se pueda aplicar correctamente el escalado entre especies son las siguientes:

- Farmacocinética de primer orden en todas las especies en el ámbito de dosis ensayadas.

- Porcentaje de unión a las proteínas plasmáticas similar y lineal en el intervalo de concentraciones utilizadas en todas las especies. En caso contrario, se debería utilizar la fracción de fármaco libre.
- Procesos de eliminación similares entre especies.
- Disponer de suficientes datos farmacocinéticos tras la administración intravenosa en más de dos especies animales.
- No incluir los datos obtenidos en el hombre dentro del escalado entre especies, sólo deben emplearse como valores de referencia.
- Los exponentes hallados al aplicar la ecuación alométrica simple para los parámetros farmacocinéticos deberán ser aproximadamente de 0.75 y 1.0 para el aclaramiento y el volumen de distribución, respectivamente ^[78].

2 OBJETIVO

Los objetivos principales de este trabajo han sido:

1. Desarrollar un método analítico fiable y adecuado para el análisis de las muestras plasmáticas de elomotecan en las especies animales ensayadas (ratón, rata, perro y mono).
2. Caracterizar el comportamiento farmacocinético preclínico del elomotecan tras la administración del fármaco a las cuatro especies animales tras diferentes regímenes de dosificación mediante la aplicación de modelos no lineales de efectos mixtos.
3. Desarrollar un modelo de escalado entre especies, utilizando la aproximación poblacional, que permita predecir el comportamiento del elomotecan en el hombre a partir de los datos plasmáticos obtenidos en los diferentes estudios realizados en las cuatro especies animales estudiadas.

3 PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo realizado consistió en las siguientes etapas:

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se realizó una búsqueda bibliográfica acerca de los diferentes aspectos relacionados con el presente trabajo: cáncer, camptotecinas, bioanálisis y farmacometría.

2. FASE EXPERIMENTAL

2.1. Bioanálisis

Se desarrolló cinco métodos bioanalíticos para la determinación de elomotecan y su principal metabolito (BN80960) en plasma de ratón, rata, perro, mono y humano mediante extracción en fase sólida on-line acoplada a la cromatografía líquida de alta resolución y a la espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray. Se validó los métodos en plasma de ratón, rata, perro y humano según la guía de la FDA para la validación de métodos bioanalíticos.

Las muestras plasmáticas obtenidas en los diferentes estudios farmacocinéticos fueron analizadas con los métodos desarrollados en varias secuencias de análisis. Los resultados de dichas secuencias analíticas fueron considerados válidos si se cumplieron los criterios de aceptación establecidos obteniéndose los datos de concentraciones plasmáticas de elomotecan vs tiempo.

2.2. Estudios farmacocinéticos

Se realizaron los diferentes estudios farmacocinéticos tras la administración del elomotecan en cuatro especies animales distintas, concretamente en ratón, rata, perro y mono. A los tiempos de muestreo establecidos en el diseño experimental, se obtuvieron las muestras plasmáticas que fueron analizadas mediante el método bioanalítico mencionado en el apartado 2.1.

3. FARMACOMETRÍA

3.1. Análisis de datos procedentes de estudios farmacocinéticos mediante la aproximación no compartimental

Se efectuó un análisis farmacocinético no compartimental mediante el programa WinNonlin para cada uno de los estudios realizados de manera independiente a partir de los datos de concentraciones plasmáticas de elomotecan vs tiempo. Se determinaron los principales parámetros farmacocinéticos para machos y hembras.

3.2. Análisis de datos procedentes de estudios farmacocinéticos mediante la aproximación poblacional

Con los datos obtenidos de concentraciones plasmáticas de elomotecan vs tiempo en los diferentes estudios farmacocinéticos realizados para cada especie animal tras la administración

intravenosa del fármaco, se efectuó un análisis de los datos mediante la aproximación poblacional con el programa NONMEM versión 7.2. Se desarrollaron los modelos no lineales de efectos mixtos para estimar los valores de los parámetros farmacocinéticos y de la varianza asociada a las distribuciones de los efectos aleatorios interindividuales (η) y residuales (ϵ) realizándose una discriminación de modelos durante el desarrollo. Finalmente, se realizó la validación interna del modelo mediante la predicción corregida de la evaluación predictiva visual (pc-VPC).

3.3. Escalado alométrico mediante aproximación poblacional

Con los datos obtenidos en los estudios farmacocinéticos realizados en las diferentes especies animales tras la administración intravenosa, se efectuó un análisis de los datos mediante la aproximación poblacional con el programa NONMEM. Se desarrollaron los modelos no lineales de efectos mixtos para estimar los valores de los parámetros farmacocinéticos y de la varianza asociada a las distribuciones de los efectos aleatorios interindividuales (η) y residuales (ϵ) realizándose una discriminación de modelos durante el desarrollo. Finalmente, se evaluó la capacidad predictiva de los diferentes modelos en el hombre determinándose el porcentaje de error entre el valor de los parámetros farmacocinéticos observados tras la administración del elomotecan en el estudio de Fase I y los valores predichos por el modelo alométrico poblacional.

4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

5. CONCLUSIONES

4 MATERIAL Y METODOS

4.1 METODOLOGÍA ANALÍTICA

4.1.1 ESTÁNDARES

- Elomotecan.
- BN80960. Principal producto de degradación y metabolito.
- BN81067. Estándar interno del elomotecan (Tri -deuterada).
- BN81068. Estándar interno del BN80960 (Tri -deuterada).

4.1.2 REACTIVOS

- Acetonitrilo para HPLC, Panreac (Montcada i Reixac).
- Metanol para HPLC, Panreac (Montcada i Reixac).
- Agua ultra pura obtenida de un sistema Milli-Q Plus, Millipore (Molsheim, Francia).
- Ácido acético glacial 100% (p.a.) Merck (Darmstadt, Alemania).
- Ácido fórmico 98-100% (p.a.) Merck (Darmstadt, Alemania).
- N,N-dimetilformamida (DMF) 99.5% Merck (Darmstadt, Alemania).
- Plasma de ratón, rata, perro y humano. Se descongeló a temperatura ambiente y se centrifugó a 1600 g durante 15 minutos.

4.1.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

4.1.3.1 SOLUCIONES STOCK

Las soluciones stock de cada uno de los estándares (elomotecan, BN80960, BN81067, BN81068) se prepararon de manera individualizada a la concentración de 1 mg/mL excepto para el BN80960 que fue de 0.5 mg/mL. Estas soluciones se prepararon disolviendo $5.00 \times 100/R \pm 0.01$ mg (R=riqueza en %) en 5 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) a excepción del BN80960 que se disolvió en 10 mL de DMF. Las soluciones stock de Elomotecan y BN80960 se prepararon por duplicado utilizándose una para la preparación de los estándares de calibración y la otra para la preparación de las muestras empleadas como controles de calidad o muestras de validación de la técnica analítica. Cada una de las seis soluciones stock se alicuotaron en viales de vidrio opaco de 2 mL y se almacenaron a -20°C.

4.1.3.2 SOLUCIONES DE ESTÁNDARES INTERNOS

La solución de trabajo de BN81067 y BN81068 utilizada como estándar interno (30 ng/mL) se preparó por dilución de 20 µL de las soluciones stock de BN81067 y BN81068 en 10 mL de CH₃CN/H₂O 10:90 (AcOH 0.1%) (**IS-2000**). De ésta, se tomó 150 µL y se diluyó con

CH₃CN/H₂O 10:90 (AcOH 0.1%) en un matraz aforado 10 mL obteniéndose la solución de trabajo de 30 ng/mL (**IS-30**). Estas soluciones se prepararon el día de su utilización y se mantuvieron en baño de agua-hielo durante todo el ensayo.

4.1.3.3 SOLUCIONES DE ELOMOTECAN Y BN80960

Para la preparación de las muestras de la curva de calibrado, se diluyeron 50 µL de la solución stock de elomotecan y 100 µL de la solución stock de BN80960 en 10 mL de CH₃CN/H₂O 10:90 (AcOH 0.1%), obteniéndose una solución de 5 µg/mL para ambos analitos. Esta solución se preparó por duplicado utilizándose una para la preparación de los estándares de calibración (**St-5000**) y la otra para la preparación de las muestras empleadas como controles de calidad o muestras de validación de la técnica analítica (**Sr-5000**) y se mantuvieron en baño de agua-hielo durante el ensayo.

4.1.3.4 SOLUCIONES DE ELOMOTECAN Y BN80960 EN PLASMA

4.1.3.4.1 SOLUCIONES PARA LA PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE CALIBRADO

Según el intervalo de trabajo establecido en la curva de calibrado empleada para la validación de la metodología analítica o para el análisis de las muestras plasmáticas de los diferentes estudios farmacocinéticos se prepararon las muestras requeridas de las que se detallan a continuación utilizando plasma de donantes no tratados:

St-500	100 µL (St-5000) + 900 µL de plasma blanco
St-250	250 µL (St-500) + 250 µL de plasma blanco
St-100	20 µL (St-5000) + 980 µL de plasma blanco
St-50	20 µL (St-5000) + 1980 µL de plasma blanco
St-40	400 µL (St-100) + 600 µL de plasma blanco
St-25	500 µL (St-50) + 500 µL de plasma blanco
St-10	200 µL (St-50) + 800 µL de plasma blanco
St-5	100 µL (St-50) + 900 µL de plasma blanco
St-2.5	100 µL (St-25) + 900 µL de plasma blanco
St-1	100 µL (St-10) + 900 µL de plasma blanco
St-0.5	100 µL (St-5) + 900 µL de plasma blanco
St-0.25	500 µL (St-0.5) + 500 µL de plasma blanco
St-0.1	100 µL (St-1) + 900 µL de plasma blanco
St-0.05	100 µL (St-0.5) + 900 µL de plasma blanco

Para minimizar la degradación del elomotecan, todas las soluciones se mantuvieron en baño de agua-hielo durante el ensayo.

4.1.3.4.2 SOLUCIONES PARA LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS EMPLEADAS COMO CONTROLES DE CALIDAD O MUESTRAS DE VALIDACIÓN

En la preparación de las muestras empleadas como controles de calidad o muestras de validación de la técnica analítica se utilizó plasma de donantes no tratados distinto del empleado para preparar la curva de calibrado. Según el ensayo, se prepararon las muestras requeridas de las que se detallan a continuación:

Sr-400	80 µL (Sr-5000) + 920 µL de plasma blanco
Sr-100	20 µL (Sr-5000) + 980 µL de plasma blanco
Sr-80	30 µL (Sr-5000) + 1845 µL de plasma blanco
Sr-50	20 µL (Sr-5000) + 1980 µL de plasma blanco
Sr-40	1000 µL (Sr-80) + 1000 µL de plasma blanco
Sr-25	625 µL (Sr-40) + 375 µL de plasma blanco
Sr-20	200 µL (Sr-100) + 800 µL de plasma blanco
Sr-10	100 µL (Sr-100) + 900 µL de plasma blanco
St-5	100 µL (Sr-50) + 900 µL de plasma blanco
Sr-1.5	75 µL (Sr-40) + 1925 µL de plasma blanco
Sr-1	50 µL (Sr-40) + 1950 µL de plasma blanco
Sr-0.75	30 µL (Sr-25) + 970 µL de plasma blanco
Sr-0.3	300 µL (Sr-1) + 700 µL de plasma blanco
Sr-0.25	250 µL (Sr-1) + 750 µL de plasma blanco
Sr-0.15	150 µL (Sr-1) + 850 µL de plasma blanco
Sr-0.1	100 µL (Sr-1) + 900 µL de plasma blanco
Sr-0.05	50 µL (St-1) + 950 µL de plasma blanco

Para minimizar la degradación del elomotecan, todas las soluciones se mantuvieron en baño de agua-hielo.

4.1.4 PROCESADO DE LAS MUESTRAS DE ELOMOTECAN Y BN80960

El procesado de las muestras se llevó a cabo disponiendo en sendos tubos eppendorff 150 µL de cada una de las muestras plasmáticas a excepción de las muestras de plasma humano, en las que se dispuso 500 µL de muestra con el objetivo de obtener el límite de cuantificación requerido.

Se adicionaron 25 μL de la solución de trabajo del estándar interno (IS-30) y 10 μL de una solución de ácido fórmico al 7.5 %. Tras la agitación, se transfirió la solución a un vial de inyección para ser analizada. En las muestras de plasma blanco (B) se adicionaron 25 μL de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 10:90 (AcOH 0.1%) en vez de la solución de estándar interno IS-30.

4.1.5 ANÁLISIS INSTRUMENTAL

La técnica analítica utilizada para el análisis de las muestras plasmáticas de las diferentes especies ensayadas fue la extracción en fase sólida on-line acoplada a la cromatografía líquida de alta eficacia y a la espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (On-line SPE-HPLC-MS/MS).

4.1.5.1 INSTRUMENTACIÓN

El espectrómetro de masas utilizado fue un API-3000 de *PE*Sciex (Concord, Canadá) trabajando con fuente de ionización Turboionspray[®]. La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se llevó a cabo utilizando una bomba Agilent 1100 series (Santa Clara, CA, Estados Unidos) empleando como inyector automático el sistema Gilson 233XL (Villiers-le-Bel, Francia). La extracción en fase sólida (SPE) "on-line" se realizó mediante el sistema Prospekt 2 de Spark Holland (Emmen, Holanda). La Figura 14 muestra el sistema On-line SPE-HPLC-MS/MS empleado.

También se utilizaron otros instrumentos como pipetas automáticas Biohit Proline (Helsinki, Finlandia), la centrifuga refrigerada CR312 Jouan (Saint Herblain, Francia), la balanza analítica AT-201 Mettler Toledo (Greifensee, Suiza), el vórtex Reax Top (Kelheim, Alemania) y material usual de laboratorio como matraces aforados, pipetas de vidrio y vasos de precipitados.



Figura 14. Sistema On-line SPE-HPLC-MS/MS utilizado para determinar los niveles de elomotecan y BN80960 en muestras plasmáticas de diferentes especies.

4.1.5.2 CONDICIONES INSTRUMENTALES

La Extracción en fase sólida on-line (SPE) se llevó a cabo mediante el uso de cartuchos C2 Analytichem (Spark Holland, Holanda).

El método de SPE consistió en las siguientes etapas:

1. Colocación de un cartucho nuevo en la pinza ("clamp").
2. Solvatación del cartucho con 2 mL de CH₃OH.
3. Equilibrado del cartucho con 2 mL de H₂O.
4. Inyección de la muestra.
5. Transferencia de la muestra del loop al cartucho C2 con 2 mL de H₂O.
6. Limpieza del cartucho con 2 mL de H₂O.
7. Elución de los analitos del cartucho con la fase móvil HPLC a un flujo 1 mL/min durante 1 minuto.
8. Limpieza del cartucho y del sistema con 2 mL de CH₃CN (0.1% AcOH).
9. Colocación del cartucho nuevamente en la placa.

Para la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) se utilizó una columna Kromasil C18 5 μ m, 50 x 4.6 mm i.d. (Tecknocroma, Sant Cugat del Vallés) y como precolumna cartuchos Hysphere C18-HD (Spark Holland, Holanda) que se cambió aproximadamente cada 12 muestras aprovechando la doble pinza que dispone el sistema Prospekt 2. El inyector se mantuvo a +4°C.

Como fase móvil se utilizó una mezcla de CH₃CN/H₂O (0.1% ácido fórmico). La separación de los analitos se consiguió con el gradiente descrito en la Tabla 3. El 20% del eluyente de la columna se introdujo en el espectrómetro de masas.

La fuente de ionización trabajó a 450 °C utilizando nitrógeno a un flujo de 7 L/min como gas auxiliar y aire cero como gas nebulizador. El voltaje fue de 5500 V. El espectrómetro de masas trabajó en modo positivo realizando un barrido del tipo MRM ("Múltiple Reaction Monitoring") y utilizando nitrógeno en la cámara de colisión. La energía de colisión fue de 45 eV para Elomotecan y BN81067 y de 40 eV para BN80960 y BN81068. Las transiciones masa/carga (m/z) monitorizadas fueron: m/z 522.5 a 363.3 para Elomotecan, m/z 540.5 a 363.3 para BN80960, m/z 525.5 a 363.3 para BN81067 y m/z 543.5 a 363.3 para BN81068.

Tabla 3. Gradiente HPLC.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A H ₂ O (0.1% AF)	%B CH ₃ CN (0.1% AF)
0	1.0	90	10
0.50	1.0	90	10
2.50	1.0	65	35
3.30	1.0	65	35
3.5	1.0	90	10
4.00	1.0	90	10

4.1.6 VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Se desarrollaron y validaron los métodos analíticos para la determinación de elomotecan y BN80960 en plasma de ratón, rata, perro y humano ^[43, 87]. Se estudió la selectividad, curvas de calibrado, exactitud, precisión, memoria de inyección, recuperación, efecto matriz, efecto de la dilución y la estabilidad.

4.1.6.1 SELECTIVIDAD

Para el ensayo de la selectividad se utilizaron seis muestras de plasma blanco (B) provenientes de 6 animales/voluntarios diferentes para cada una de las especies validadas.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: Se aceptó en la transición del analito a su tiempo de retención, un área interferente < 20% del área obtenida en la muestra del límite inferior de cuantificación (LOQ) y en la transición del estándar interno a su tiempo de retención, una área interferente < 5% del área de trabajo.

4.1.6.2 CURVA DE CALIBRADO

Cada curva de calibrado consistió en 10 muestras plasmáticas; una muestra de plasma blanco procesada sin estándar interno (B), una muestra de plasma blanco procesada con estándar interno (BIS) y 8 estándares de calibrado de concentración conocida (ver preparación en apartado 4.1.3.4.1). Las curvas de calibrado se procesaron por duplicado en tres días diferentes como indica el apartado 4.1.4 analizándose al principio y al final de la secuencia analítica como indica el apartado 4.1.5.

El plasma usado para la preparación de los estándares de calibración en cada uno de los tres días procedió de uno o varios donantes y diferente del utilizado para la preparación de las muestras empleadas para determinar la precisión y exactitud del método.

Con el objetivo de minimizar el número de ratones sacrificados para la validación de la metodología analítica en plasma de ratón, las curvas de calibrado se prepararon en plasma de rata por tratarse de una especie cercana.

Las 8 concentraciones empleadas para la validación de la metodología analítica en plasma de ratón y perro fueron: 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 25 y 50 ng/mL. Para la validación de la metodología analítica en plasma de rata, las concentraciones empleadas fueron: 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/mL y para la validación de la metodología analítica en plasma humano fueron 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10 y 25 ng/mL.

Para explicar la relación existente entre la respuesta (área del analito dividida por el área del estándar interno) y la concentración, se utilizó una ecuación cuadrática ($y = a \cdot x^2 + b \cdot x + c$) con un factor de ponderación del inverso de la concentración al cuadrado. El factor de ponderación se utilizó para corregir la heteroscedasticidad observada en la relación de las áreas entre el analito y su estándar interno. Se evaluó la precisión y exactitud (ver ecuaciones 29 y 30) de las concentraciones recalculadas así como los parámetros de la curva.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: Las curvas de calibrado se aceptaron si como mínimo 6 de las 8 concentraciones se desviaban menos del 15% del valor nominal, a excepción de la concentración inferior de la curva (LOQ) para el que se aceptó una desviación del 20% del valor nominal.

Se consideró el límite inferior de cuantificación (LOQ) la concentración más baja de la curva de calibrado que pudo ser determinada con aceptable precisión y exactitud ($\leq 20\%$) y el límite superior de cuantificación la concentración más alta de la curva de calibrado que pudo ser determinada con aceptable precisión y exactitud ($\leq 15\%$).

4.1.6.3 PRECISIÓN Y EXACTITUD

Para la preparación de las muestras correspondiente al estudio de la precisión y exactitud del método, se preparó una solución de 5 $\mu\text{g/mL}$ tal y como se describe en el apartado 4.1.3.3 a partir de la segunda solución stock de elomotecan y BN80960 y utilizando plasma de diferentes animales/voluntarios de los empleados para preparar las curvas de calibrado.

Se determinó la precisión y exactitud intra-ensayo e inter-ensayo analizando en tres días diferentes 5 replicados de 4 concentraciones diferentes. Para la validación de la metodología analítica en plasma de ratón y perro las concentraciones empleadas fueron: 0.1, 0.25, 25 y 40 ng/mL. Para la validación de la metodología analítica en plasma de rata, las concentraciones empleadas fueron 0.25, 1, 40 y 80 ng/mL y para la validación de la metodología analítica en plasma humano fueron 0.05, 0.1, 10 y 20 ng/mL.

La preparación, procesado y análisis de las muestras plasmáticas se describen en los apartados 4.1.3.4.2, 4.1.4 y 4.1.5, respectivamente.

Las respuestas obtenidas en las muestras empleadas como controles de calidad preparadas en plasma de rata, perro y humano fueron interpoladas en curvas de calibrado preparadas en la misma matriz. En el caso de las muestras preparadas en plasma de ratón fueron

interpoladas en curvas de calibrado preparadas en plasma de rata al tratarse de una especie próxima.

La precisión intra-ensayo e inter-ensayo se estimó como el coeficiente de variación porcentual CV (%) calculado como:

$$CV (\%) = \frac{SD}{C_m} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 29}$$

Donde SD es la desviación estándar y C_m es la concentración media experimental.

La exactitud intra-ensayo e inter-ensayo se estimó como el error relativo entre la concentración nominal y la concentración media experimental y se calculó como:

$$\text{Error (\%)} = \frac{C_m - C_n}{C_n} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 30}$$

Donde C_m es la concentración media experimental y C_n es la concentración nominal.

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN: Se aceptó un CV (%) del 15% y un error de $\pm 15\%$ excepto para la concentración del límite inferior de cuantificación en la que se aceptó una precisión del 20% y un error de $\pm 20\%$.

4.1.6.4 MEMORIA DE INYECCIÓN

La memoria de inyección se ensayó analizando una muestra de plasma blanco (B) tras el análisis del estándar correspondiente a la concentración del límite superior de cuantificación en cada una de las 4 especies validadas.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: Se aceptó en la transición del analito a su tiempo de retención, un área interferente $< 20\%$ del área obtenida en la muestra de límite inferior de cuantificación.

4.1.6.5 RECUPERACIÓN Y EFECTO MATRIZ

La recuperación se determinó analizando por triplicado tres concentraciones (1, 25 y 40 ng/mL) de elomotecan y BN80960 para cada especie validada. Las muestras se procesaron como indica la sección 4.1.4 pero en lugar de añadir la solución de trabajo del estándar interno, se añadió $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 10:90 (AcOH 0.1%).

Debido a que existe una gran dificultad para evaluar la recuperación en métodos de extracción de fase sólida en línea porque las muestras de referencia, no pueden prepararse por incorporación del analito sobre el extracto blanco, como es habitual en HPLC-MS para evitar el efecto matriz, se utilizó una aproximación experimental que emplea el estándar interno de cada compuesto como su propia referencia. En ésta, se asumió que la respuesta en el espectrómetro de masas era la misma para el analito y para su estándar interno marcado. Así, tras la inyección de la muestra plasmática, el eluyente del cartucho de extracción de fase sólida en línea pasó por una válvula adicional provista de un "loop" de 20 μL que contenía una

solución de estándar interno antes de introducirse en la columna cromatográfica. De esta manera el analito y su estándar interno son retenidos en la cabeza de columna y la comparación de los cocientes entre área y concentración de ambos productos permitió el cálculo de la recuperación para cada compuesto y concentración estudiada.

El efecto matriz se determinó mezclando mediante una "Te" el eluyente de la columna con una solución de elomotecan y BN80960 a la concentración de 20 ng/mL y de 500 ng/mL en CH₃CN:H₂O 10:90 (0.1% AcOH) a un flujo de 10 µL/min. Se comparó el perfil MRM tras la inyección de una muestra de plasma blanco y tras la inyección de una muestra de CH₃CN:H₂O 10:90 (0.1% AcOH).

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: La recuperación debía de ser consistente y reproducible en el intervalo de trabajo. En las muestras del estudio del efecto matriz, los analitos no debían eluir en la zona de incremento o supresión iónica.

4.1.6.6 EFECTO DE LA DILUCIÓN

El ensayo del efecto de la dilución se realizó para comprobar que la dilución de las muestras plasmáticas no tenía efecto en la exactitud y precisión con la que se determinaban las concentraciones de elomotecan y de BN80960.

Se preparó una muestra plasmática que contenía elomotecan y el BN80960 a la concentración de 10000 ng/mL y se diluyó 4000 veces con plasma blanco por quintuplicado.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: Se aceptó un CV (%) del 15% y un error de ± 15% respecto a la concentración nominal.

4.1.6.7 ESTUDIO DE ESTABILIDAD

La estabilidad del elomotecan y del BN80960 se investigó para comprobar que en las condiciones experimentales los analitos no sufrían degradación.

Se estudió la estabilidad de:

- Las soluciones stock (elomotecan, BN80960, BN81067 y BN81068) almacenadas durante 5 meses a -20°C. Tras el almacenaje se analizaron junto a muestras recién preparadas inyectando las muestras por quintuplicado.
- La solución de elomotecan y BN80960 en CH₃CN:H₂O 10:90 (AcOH 0.1%) durante 6 horas en baño de agua-hielo. Se preparó la muestra a 5 µg/mL como indica el apartado 4.1.3.3 y tras 6 horas en baño de agua-hielo, se analizó frente a una muestra recién preparada inyectando las muestras por quintuplicado.

Los resultados de las muestras no plasmáticas se expresaron para cada compuesto como el porcentaje respecto al valor de referencia (muestra recién preparada) calculado como:

$$\% \text{ Remanente} = 100 * (\text{área media de las muestras estabilidad} / \text{área media de las muestras referencia}) \quad \text{Ecuación 31}$$

- Las muestras plasmáticas de elomotecan y BN80960 a la concentración de 1 y 40 ng/mL mantenidas durante 6 horas en baño de agua-hielo. Tras este periodo, las muestras se procesaron por quintuplicado como indica la sección 4.1.4 y se analizaron junto a dos curvas de calibrado y muestras empleadas como controles de calidad recién preparadas por duplicado a 3 niveles de concentración (seis muestras).

- Las muestras plasmáticas de elomotecan y BN80960 a la concentración de 1 y 40 ng/mL procesadas por quintuplicado y mantenidas durante 24 horas en el inyector automático a +4°C. Tras las 24 horas, se analizaron junto a dos curvas de calibrado y muestras empleadas como controles de calidad recién preparadas por duplicado a 3 niveles de concentración (seis muestras).

- Las muestras plasmáticas de elomotecan y BN80960 a la concentración de 1 y 40 ng/mL tras tres ciclos de congelación a -70°C y descongelación en baño de agua-hielo. Tras los tres ciclos, se procesaron y analizaron 5 replicados de cada concentración junto a dos curvas de calibrado y muestras empleadas como controles de calidad recién preparadas por duplicado a 3 niveles de concentración (seis muestras).

- Las muestras plasmáticas de elomotecan y BN80960 a la concentración de 1 y 40 ng/mL almacenadas durante 3, 6 y 12 meses a -20°C y a -70°C. Tras cada tiempo, se procesaron y analizaron 5 replicados de cada concentración junto a dos curvas de calibrado y muestras empleadas como controles de calidad recién preparadas por duplicado a 3 niveles de concentración (seis muestras).

Las curvas de calibrado que se emplearon están definidas en el apartado 4.1.6.2. Las concentraciones de las muestras empleadas como controles de calidad empleadas en plasma de ratón y perro fueron: 0.3, 25 y 40 ng/mL. En plasma de rata las concentraciones empleadas fueron: 0.75, 40 y 80 ng/mL y en plasma humano fueron 0.15, 10 y 20 ng/mL.

Los resultados se expresaron para cada compuesto y concentración como el porcentaje respecto al valor nominal calculado como:

$$\% \text{ Remanente} = 100 * (\text{concentración media obtenida} / \text{concentración nominal}) \quad \text{Ecuación 32}$$

CRITERIO DE ACEPTACIÓN: Las muestras se consideraron estables en las condiciones estudiadas si el porcentaje de analito remanente fue superior al 85%.

4.1.7 DETERMINACIÓN DEL ELOMOTECAN EN LAS MUESTRAS DE PLASMA

La determinación analítica de elomotecan y BN80960 en las muestras de plasma provenientes de los estudios farmacocinéticos/toxicocinéticos descritos en el apartado 4.2 se llevó a cabo en varias secuencias de análisis. Una secuencia de análisis estuvo formada por muestras provenientes de los estudios farmacocinéticos/toxicocinéticos (muestras problema), dos curvas

de calibrado (ver apartado 4.1.6.2) y muestras empleadas como control de calidad preparadas por duplicado a 3 niveles de concentración (6 muestras). Una curva de calibrado se dispuso al principio de la secuencia analítica y la otra al final con el objetivo de minimizar la variabilidad instrumental. Para explicar la relación existente entre la respuesta (área del analito dividida por el área del estándar interno) y la concentración, se utilizó una ecuación cuadrática con un factor de ponderación del inverso de la concentración al cuadrado. Con los valores recalculados de ambas curvas de calibrado, empleando el programa Analyst, se obtuvo una curva de calibrado promedio. En ésta, se interpolaron las respuestas obtenidas en muestras empleadas como controles de calidad y las muestras problema obteniéndose así la concentración de analito. Las muestras empleadas como controles de calidad se dispusieron a lo largo de la secuencia analítica con el objetivo de monitorizar el correcto transcurso del análisis.

Las concentraciones conocidas de las muestras plasmáticas empleadas para elaborar las curvas de calibrado fueron:

- Concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 25 y 50 ng/mL para el análisis de muestras de plasma de ratón del estudio RT1 preparadas utilizando plasma de rata (ver apartado 4.1.6.2) y para el análisis de muestras de plasma de perro en los estudios P1, P2, P5, P6 y P7.
- Concentraciones de 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 40 y 50 ng/mL para el análisis de muestras de plasma de rata en los estudios R1 y R2.
- Concentraciones de 0.25, 0.5, 1, 5, 10, 25, 50 y 100 ng/mL para el análisis de muestras de plasma de rata en los estudios R3, R4 y R5 y para el análisis de muestras de plasma de perro en los estudios P3 y P4.
- Concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 100, 250 y 500 ng/mL para el análisis de muestras de plasma de mono del estudio MK1.

Los niveles de concentración de las muestras empleadas como controles de calidad se establecieron en función del intervalo de trabajo utilizado en cada estudio. Se empleó tres veces el límite inferior de cuantificación como concentración baja, una concentración intermedia del intervalo de trabajo y el 80% del límite superior de cuantificación como concentración alta. Las concentraciones que se emplearon en cada estudio fueron:

- Concentraciones de 0.3, 25 y 40 ng/mL para el análisis de muestras de plasma de ratón del estudio RT1 preparadas utilizando plasma de ratón y para el análisis de muestras de plasma de perro en los estudios P1, P2, P5, P6 y P7.
- Concentraciones de 1.5, 5 y 40 ng/mL para el análisis de muestras de plasma de rata en los estudios R1 y R2.

- Concentraciones de 0.75, 40 y 80 ng/mL para el análisis de muestras de plasma de rata en los estudios R3, R4 y R5 y para el análisis de muestras de plasma de perro en los estudios P3 y P4.

- Concentraciones de 0.3, 50 y 400 ng/mL para el análisis de muestras de plasma de mono del estudio MK1.

Las muestras de los estudios farmacocinéticos/toxicocinéticos se descongelaron en baño de agua-hielo. En aquellos casos en que fue necesario, las muestras problema se diluyeron con plasma blanco de la especie analizada con el objetivo que las concentraciones quedaran dentro del intervalo de trabajo. Las muestras se procesaron y se analizaron como indican los apartados 4.1.4 y 4.1.5, respectivamente.

Los criterios de aceptación de la secuencia de análisis se establecieron de acuerdo con las recomendaciones de la guía para la industria de la FDA ^[43]. Los resultados se aceptaron si:

- Como mínimo 4 de las 6 muestras empleadas como control de calidad se hallaron dentro del $\pm 15\%$ su valor nominal. Dos muestras podían no cumplir este criterio de aceptación siempre y cuando fueran de concentraciones diferentes ya que si eran de la misma concentración, la secuencia de análisis no fue aceptada.
- Como mínimo 6 de las 8 muestras de concentración conocida de la curva de calibrado se hallaron dentro del $\pm 15\%$ su valor nominal a excepción del límite inferior de cuantificación (LOQ) que puede desviarse del $\pm 20\%$ su valor nominal.
- El coeficiente de correlación de la curva de calibrado era igual o superior a 0.985.

Se determinó la exactitud y precisión de las concentraciones recalculadas de la curva de calibrado y de las muestras empleadas como control de calidad para cada estudio farmacocinético/toxicocinéticos. La sospecha de valores de concentración aberrantes se estudió mediante el test de Dixon ($p < 0.05$) ^[97].

4.2 DISEÑO DE ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS

Los estudios farmacocinéticos se llevaron a cabo en cuatro especies animales distintas, concretamente en ratón, rata, perro y mono. La Tabla 4 resume las características generales de estos estudios.

4.2.1 FORMULACIONES

Para la administración del elomotecan por vía intravenosa a las distintas especies animales ensayadas se utilizaron 4 vehículos diferentes:

- Vehículo 1: Solución de hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP β CD) al 20% (p/p) y NaCl al 0.18% (p/p) en agua ajustado a pH 3.1 ± 0.1 .

Tabla 4. Resumen de las características generales de cada uno de los estudios farmacocinéticos realizados.

ESTUDIO	ESPECIE	DOSIS	VEHICULO	ADMINISTRACIÓN	Peso (Kg)	Nº ANIMALES	ANIMALES SEXO / DOSIS	TIEMPO DE MUESTREO (h)
RT1	Ratón	1.75, 5.83, 8.75, 17.5 mg/kg	1	Única: Bolus I.V.	0.0201-0.0272	120	30F	0, 0.0166, 0.083, 0.25, 1, 2, 4, 8, 12, 24h
R1	Rata	10mg/kg	1	Única: Bolus I.V. y oral	0.182-0.218	16	8M	0, 0.0167, 0.1, 0.33, 0.75, 2, 4, 7, 10, 12, 22, 28h
R2	Rata	1mg/kg	1	Única: Bolus I.V.	0.271-0.339	12	6M	0, 0.0167, 0.1, 0.33, 1, 3, 5, 8, 11h
			2				6M	
R3	Rata	0.0125, 0.05, 0.2mg/kg/día	3	Repetida (5): infusión I.V. 10 min	0.200-0.286	36	6M + 6H	D1: 0, 0.05, 1, 3, 8, 24h D5: 0, 0.05, 1, 3, 8, 24h
R4	Rata	0.0125, 0.05, 0.2mg/kg/día	3	Repetida (28): infusión I.V. 10 min	0.198-0.335	36	6M + 6F	D1: 0, 0.05, 1, 3, 8, 24h D28: 0, 0.05, 1, 3, 8, 24h
R5	Rata	1, 4, 16mg/kg/semana	1	Repetida (8): infusión I.V. 10 min	0.194-0.304	36	6M + 6H	D1: 0, 0.05, 1, 4, 12, 24h D22: 0, 0.05, 1, 4, 12, 24h D50: 0, 0.05, 1, 4, 12, 24h
P1	Perro	0.2, 0.4, 0.6 mg/kg	1	Única: Bolus I.V.	10.2-15.5	18	3M +3H	0, 0.083, 0.25, 1, 2.5h
P2	Perro	0.1, 0.2, 0.4 mg/kg	1	Única: Bolus I.V.	12.1-13.8	18	3M +3H	0, 0.167, 1, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168h
P3	Perro	0.3, 0.45, 0.6mg/kg	4	Única: Infusión I.V. 15 min	6.4-7.5	6	1M +1H	0, 0.25, 1, 2, 8, 24, 48, 72, 120, 168 h
P4	Perro	0.025, 0.05, 0.075, 0.1mg/kg/día	1	Repetida (7): infusión I.V. 15 min	5.9-7.9	8	1M +1H	D1: 0, 0.25, 1, 2, 8, 24h D7: 0, 0.25, 1, 2, 8, 24h
P5	Perro	0.2, 0.8, 1.4mg/kg/día	1	Repetida (7): infusión I.V. 15 min	6.7-7.1	6	1M +1H	D1: 0, 0.25, 1.5, 6, 24h D7: 0, 0.25, 1.5, 6, 24h
P6	Perro	0.2, 0.8, 1.4mg/kg/semana	1	Repetida (3): infusión I.V. 15 min	6.0-8.0	6	1M +1H	D1: 0, 0.25, 1, 2, 8, 24, 48, 72, 120, 168h D15: 0, 0.25, 1, 2, 8, 24, 48, 72, 120, 168h
P7	Perro	0.01, 0.05, 0.25mg/kg/semana	4	Repetida (8): infusión I.V. 15 min	6.8-8.9	30	5M + 5H	D1: 0, 0.083, 0.25, 1, 2, 8, 24, 48, 72h D22: 0, 0.083, 0.25, 1, 2, 8, 24, 48, 72h D50: 0, 0.083, 0.25, 1, 2, 8, 24, 48, 72h
MK1	Mono	0.2, 0.8, 1.4mg/kg/día	1	Repetida (7): infusión I.V. 15 min	2.25-2.97	6	1M + 1H	D1: 0, 0.25, 1, 2, 8, 24h D7: 0, 0.25, 1, 2, 8, 24h

RT: ratón, R: rata, P: perro, MK: mono

M: macho, H: hembra

(1): 20% (p/p) hidroxipropil-beta-ciclodextrina con 0.18%(p/p) NaCl ajustado a pH = 3.1 ± 0.1

(2): propilenglicol : polioxietilenglicol 400 : ácido láctico : ácido acético 1N : H₂O (4:4:4:2:86)

(3): 0.56% (p/p) hidroxipropil-beta-ciclodextrina con 0.75%(p/p) NaCl ajustado a pH = 3.1 ± 0.1

(4): 1.12% (p/p) hidroxipropil-beta-ciclodextrina con 0.8% (p/p) NaCl ajustado a pH = 3.1 ± 0.1

- Vehículo 2: Solución de propilenglicol : polioxietilenglicol 400 : ácido láctico (85% en agua) : ácido acético 1N : agua (4:4:4:2:86).
- Vehículo 3: Solución de hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP β CD) al 0.56% (p/p) y NaCl al 0.75% (p/p) en agua ajustado a pH 3.1 \pm 0.1.
- Vehículo 4: Solución de hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP β CD) al 1.12% (p/p) y NaCl al 0.80% (p/p) en agua ajustado a pH 3.1 \pm 0.1.

La preparación de todos los vehículos se realizó en condiciones asépticas el mismo día de la administración.

En el caso de los vehículos que contienen HP β CD, se diluyó la cantidad adecuada de ésta en agua acidificada (ajustada a pH 3.1 \pm 0.1 con ácido acético 1 N) para inyección obteniéndose la concentración deseada. Seguidamente, se añadió la cantidad necesaria de NaCl. Tras disolución total de los reactivos bajo agitación magnética, se filtró la solución a través de un filtro de 0.22 μ m obteniéndose el vehículo final.

El día de la administración, se pesó la cantidad adecuada de elomotecan según la concentración que se quería alcanzar y se disolvió en el vehículo por agitación magnética durante un mínimo de 30 minutos. Finalmente, se filtró la solución a través de un filtro de membrana de 0.22 μ m.

Todos los estudios se realizaron de acuerdo a la legislación europea vigente sobre el uso y cuidado de animales de experimentación ^[88, 89]. Así, antes de realizar cada estudio, se redactó un protocolo que fue aprobado por un comité ético que certificaba la necesidad de utilizar dichos animales y velaba por su bienestar durante la realización del estudio. Todos los animales permanecieron en cuarentena y tras ser examinados por un veterinario, fueron incluidos en los diferentes estudios.

Durante el estudio, se mantuvieron los animales estabulados en salas de humedad y temperatura controladas (40-60% de humedad y 19-22°C de temperatura), con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas.

4.2.2 ESTUDIO FARMACOCINÉTICO EN EL RATÓN

4.2.2.1 ESTUDIO A DOSIS ÚNICA RT1

La administración del elomotecan en el estudio RT1 se realizó en el estabulario de Piedmont Research Center (EEUU) con los objetivos de evaluar la eficacia comparativa del elomotecan respecto al irinotecan y determinar los principales parámetros farmacocinéticos. Se utilizaron 120 ratones hembras atímicas de 7-10 semanas de edad con un peso de 20.1 a 27.2 gramos a los que se les implantó un tumor de adenocarcinoma de colon humano a partir de la línea de células tumoral HT29. Durante el estudio, los animales tuvieron libre acceso al agua y al pienso NIH31[®] (Harland Tekland Europe, Gran Bretaña) modificado e irradiado. Los animales fueron

distribuidos en grupos de 30 y recibieron a través de la vena de la cola un bolus intravenoso de elomotecan a la dosis de 1.75, 5.83, 8.75 o 17.5 mg/kg, respectivamente.

Se realizó un muestreo disperso (sparse sampling) de manera que se tomó una muestra por animal. Se obtuvieron muestras de 3 animales de cada grupo por punción cardíaca bajo anestesia con CO₂ a cada uno de los tiempos de muestreo teóricos: pre administración, 1, 5, 15 minutos y 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas post administración. Las muestras de sangre (1 mL) se dispusieron en tubos que contenían heparina (0.75mg/mL sangre) y se centrifugaron a 1600 g a +4°C durante 20 minutos. El plasma obtenido se separó y congeló a -70±10°C hasta el día de su análisis.

4.2.3 ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN LA RATA

4.2.3.1 ESTUDIO A DOSIS ÚNICA R1

El estudio farmacocinético a dosis única R1 en la rata se efectuó en el estabulario de Ipsen Pharma (Barcelona) y tuvo por objetivo determinar la biodisponibilidad oral del elomotecan. Se utilizaron 16 ratas Sprague-Dawley macho de 8 semanas de edad con un peso comprendido entre 182 y 218 gramos. Durante el estudio, los animales tuvieron libre acceso al agua. Se mantuvieron en ayunas desde las 14 horas previas a la administración del fármaco hasta 8 horas después de ésta. Después de este período, tuvieron libre acceso al pienso controlado SAFE R04C-25[®] (Scientific Animal Food and Engineering, Francia).

A ocho ratas se les administró el elomotecan a la dosis de 10 mg/kg mediante bolus intravenoso a través de la vena yugular y a las otras ocho ratas se les administró el fármaco por vía oral mediante sonda gástrica a la misma dosis (10 mg/kg). Tras la administración del elomotecan, se realizó un muestreo disperso (sparse sampling) de manera que a cada uno de los tiempos de muestreo teóricos: pre administración, 0.0166, 0.1, 0.333, 0.75, 2, 4, 7, 10, 12, 22 y 28 horas post administración se extrajo una muestra de sangre (1 mL) por punción del seno retro-orbital previa anestesia con isoflurano de dos animales mediante un capilar que contenía heparina. Las muestras de sangre se colocaron en tubos que se centrifugaron a 1600 g a +4°C durante 20 minutos. El plasma obtenido se separó y se congeló a -70±10°C hasta el día de su análisis.

4.2.3.2 ESTUDIO A DOSIS ÚNICA R2

El estudio farmacocinético a dosis única R2 en la rata se realizó en el estabulario de Ipsen Pharma (Barcelona) con el objetivo de evaluar posibles diferencias farmacocinéticas tras la administración del elomotecan mediante bolus intravenoso en dos vehículos distintos. Se utilizaron 12 ratas Sprague-Dawley macho (6 para cada vehículo ensayado) de 12-15 semanas de edad con un peso comprendido entre 271 y 339 gramos. Durante el estudio, los animales tuvieron libre acceso al agua. Se mantuvieron en ayunas desde las 14 horas previas a la administración hasta 8 horas después de ésta. Después de este período, tuvieron libre acceso al pienso controlado SAFE R04C-25[®] (Scientific Animal Food and Engineering, Francia).

El vehículo 1 consistió en una solución del 20% (p/p) hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP β CD) con 0.18%(p/p) NaCl ajustado a pH 3.1 ± 0.1 y el vehículo 2 en una solución de propilenglicol : polioxietilenglicol 400 : ácido láctico (85% en agua) : ácido acético 1N : agua (4:4:4:2:86).

El elomotecan se administró mediante bolus intravenoso a la dosis de 1 mg/kg a través de la vena yugular. Tras la administración del fármaco, se realizó un muestreo disperso (sparse sampling) de manera que para cada grupo, a cada uno de los tiempos de muestreo teóricos: pre administración 0.0166, 0.1, 0.333, 1, 2, 3, 8 y 11 horas post administración, se obtuvo las muestras de sangre (1 mL) por punción del seno retro-orbital previa anestesia con isoflurano de dos animales mediante un capilar que contenía heparina. Las muestras de sangre se colocaron en tubos que se centrifugaron a 1600 g a +4°C durante 20 minutos. El plasma obtenido se separó y se congeló a $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ hasta el día de su análisis.

4.2.3.3 ESTUDIO A DOSIS REPETIDAS R3

El estudio farmacocinético en la rata R3 se realizó en el estabulario de MDS Pharma Services (Francia) con el objetivo de evaluar el perfil farmacocinético del elomotecan tras su administración por vía intravenosa durante 5 días consecutivos. Se utilizaron 36 ratas Sprague-Dawley de 8 semanas de edad con un peso comprendido entre 256 y 286 gramos (ratas macho) y entre 200 y 227 gramos (ratas hembra). Durante el estudio, los animales tuvieron libre acceso al agua y al pienso controlado SAFE R04C-25[®] (Scientific Animal Food and Engineering, Francia). Los animales, fueron distribuidos en 3 grupos de manera que cada uno estaba constituido por seis ratas macho y seis ratas hembra y se les administró elomotecan a la dosis de 0.0125, 0.05 o 0.2mg/kg/día mediante infusión intravenosa de 10 minutos a través de la vena de la cola, usando una bomba de infusión Harvard a un flujo de 0.5 mL/ minuto. Los animales recibieron la misma dosis los 5 días.

El diseño del muestreo fue disperso (sparse sampling) de manera que se extrajo una muestra de sangre (1 mL) por punción del seno retro-orbital previa anestesia con isoflurano de tres animales de cada sexo y grupo mediante un capilar que contenía heparina. Los tiempos de muestreo teóricos fueron pre administración, 0.05, 1, 3, 8 y 24 horas post administración del día 1 y del día 5. Así, de cada animal se extrajeron 6 muestras de sangre que se colocaron en tubos que se centrifugaron a 1600 g a +4°C durante 20 minutos. El plasma obtenido se separó y se congeló a $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ hasta el día de su análisis.

4.2.3.4 ESTUDIO A DOSIS REPETIDAS R4

Se realizó el estudio toxicocinético en la rata R4 en el estabulario de MDS Pharma Services (Francia) con el objetivo de evaluar la toxicidad y el perfil farmacocinético tras la administración de elomotecan por vía intravenosa durante 28 días consecutivos. Se utilizaron 36 ratas Sprague-Dawley de 8 semanas de edad con un peso comprendido entre 294 y 335 gramos (ratas macho) y entre 198 y 239 gramos (ratas hembra). Durante el estudio, los animales tuvieron libre acceso al agua y al pienso controlado SAFE R04C-25[®] (Scientific Animal Food

and Engineering, Francia). Los animales fueron distribuidos en 3 grupos de manera que cada uno estaba constituido por seis ratas macho y seis ratas hembra. El elomotecan fue administrado mediante infusión intravenosa de 10 minutos a través de la vena de la cola usando una bomba de infusión Harvard a un flujo de 0.5 mL/ minuto a las dosis de 0.0125, 0.05 o 0.2mg/kg/día, respectivamente.

A cada uno de los tiempos de muestreo teóricos: pre administración, 0.05, 1, 3, 8 y 24 horas post administración del día 1 y del día 28, se extrajo una muestra de sangre (1 mL) (sparse sampling) por punción del seno retro-orbital previa anestesia con isoflurano de tres animales de cada sexo y grupo mediante un capilar que contenía heparina. Así, se extrajeron 6 muestras de sangre de cada animal que se colocaron en tubos que contenían heparina (0.75mg/ml sangre). Éstos fueron centrifugados a 1600 g a +4°C durante 20 minutos y el plasma obtenido se separó y se congeló a -70±10°C hasta el día de su análisis.

4.2.3.5 ESTUDIO A DOSIS REPETIDAS R5

Se realizó un estudio toxicocinético en la rata R5 en el estabulario de MDS Pharma Services (Francia) con el objetivo de evaluar la toxicidad y el perfil farmacocinético tras la administración semanal de elomotecan por vía intravenosa durante 8 semanas consecutivas. Se utilizaron 36 ratas Sprague-Dawley de 8 semanas de edad con un peso comprendido entre 279 y 304 gramos (ratas macho) y entre 194 y 234 gramos (ratas hembra). Durante el estudio, los animales tuvieron libre acceso al agua y al pienso controlado SAFE R04C-25® (Scientific Animal Food and Engineering, Francia). Los animales, fueron distribuidos en 3 grupos de manera que cada uno de ellos estaba formado por seis ratas macho y seis ratas hembra y se les administró elomotecan a las dosis de 1, 4 o 16 mg/kg/semana mediante infusión intravenosa de 10 minutos a través de la vena de la cola, usando una bomba de infusión Harvard a un flujo de 0.5 mL/ minuto.

Se realizó un muestreo disperso (sparse sampling) de manera que a cada uno de los tiempos de muestreo teóricos: pre administración, 0.05, 1, 4, 12 y 24 horas post administración del día 1, del día 22 y del día 50, se obtuvieron las muestras de sangre (1 mL) por punción del seno retro-orbital previa anestesia con isoflurano de tres animales de cada sexo y grupo mediante un capilar que contenía heparina. Así, de cada animal se extrajeron 9 muestras de sangre que se colocaron en tubos que se centrifugaron a 1600 g a +4°C durante 20 minutos. El plasma obtenido se separó y se congeló a -70±10°C hasta el día de su análisis.

4.2.4 ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN EL PERRO

4.2.4.1 ESTUDIO A DOSIS ÚNICA P1

El estudio farmacocinético P1 se realizó en el estabulario de "Centre Recherches Biologiques" (Francia) con el objetivo de determinar la exposición tras la administración por vía intravenosa de una dosis única de elomotecan en el perro anestesiado. Se utilizaron 18 perros Beagle (9 machos y 9 hembras) de 3-5 años de edad con un peso comprendido entre 11.1 y 15.5 kg

(machos) y entre 10.6 y 12.4 kg (hembras). Los animales, permanecieron en ayunas las 24 horas previas al inicio del estudio. Los animales fueron distribuidos en 3 grupos de manera que cada grupo estaba formado por tres perros macho y tres perro hembra. El día del estudio, se les administró tiopental (NESDONAL™, 20 mg/kg, i.v.) y 4 % de halotano. Una vez los animales fueron anestesiados, se les administró elomotecan a las dosis de 0.2, 0.4 o 0.6 mg/kg mediante bolus intravenoso a través de la vena cefálica

Se obtuvieron muestras de sangre (2.5 mL) de todos los animales antes de la administración del elomotecan y a 0.083, 0.25, 1 y 2.5 horas post administración a través de la vena cefálica no usada en la administración del elomotecan. Las muestras de sangre se dispusieron en tubos que contenían heparina. Éstos, se centrifugaron a 1600 g a +4°C durante 20 minutos. El plasma obtenido se separó y se congeló a -70±10°C hasta el día de su análisis.

4.2.4.2 ESTUDIO A DOSIS ÚNICA P2

Dicho estudio farmacocinético realizado en el estabulario de "Centre Recherches Biologiques" (Francia) tuvo por objetivo determinar la exposición tras la administración de una dosis única de elomotecan por vía intravenosa en el perro consciente. Se utilizaron 18 perros Beagle (9 machos y 9 hembras) de 3-5 años de edad con un peso comprendido entre 12.3 y 15.6 kg (machos) y entre 11.1 y 15.2 kg (hembras). Los animales tuvieron libre acceso al agua y permanecieron en ayunas desde las 14 horas previas a la administración del elomotecan hasta las 6 horas post administración. Tras el periodo de ayuno, a los animales se les suministró 400 gramos diarios de pienso controlado UAR-125® C3 (Usine d'Alimentation Rationnelle, Francia).

Los animales fueron distribuidos en 3 grupos de manera que cada grupo estaba formado por tres perros macho y tres perro hembra y se les administró elomotecan a la dosis de 0.1, 0.2 o 0.4 mg/kg mediante bolus intravenoso a través de la vena cefálica.

Se obtuvieron muestras de sangre (2.5 mL) de todos los animales antes de la administración y a 0.167, 1, 6, 24, 48, 72, 96, 120, 144, y 168 horas post administración a través de la vena cefálica no usada para la administración del elomotecan. Las muestras de sangre se dispusieron en tubos que contenían heparina. Éstos, se centrifugaron a 1600 g a +4°C durante 20 minutos. El plasma obtenido se separó y se congeló a -70±10°C hasta el día de su análisis.

4.2.4.3 ESTUDIO A DOSIS ÚNICA P3

La administración del elomotecan en el estudio P3 se realizó en el estabulario de MDS Pharma Services (Francia). Se trató de un estudio piloto que tuvo por objetivo determinar la exposición tras la administración de una dosis única de elomotecan por infusión intravenosa de 15 minutos. El fármaco se administró en una solución del 1.12% (p/p) HPβCD con 0.80%(p/p) NaCl ajustado a pH 3.1 ± 0.1 (vehículo 4). Se utilizaron 6 perros Beagle (3 machos y 3 hembras) de 5 a 6 meses de edad con un peso comprendido entre 7.8 y 8.4 kg (machos) y entre 6.4 y 7.5 kg (hembras). Los animales tuvieron libre acceso al agua y permanecieron en ayunas desde las 14 horas previas a la administración del elomotecan hasta las 6 horas post

administración. Tras el periodo de ayuno, a los animales se les suministró 300 gramos diarios de pienso controlado UAR-125[®] C3 (Usine d'Alimentation Rationnelle, Francia).

Los animales fueron distribuidos en 3 grupos de manera que cada grupo estaba formado por un perro macho y un perro hembra. Se les administró elomotecan mediante infusión intravenosa de 15 minutos usando una bomba de infusión Harvard a un flujo de 0.5 mL/minuto a través de la vena cefálica a la dosis de 0.3, 0.45 o 0.6 mg/kg, respectivamente.

Se obtuvieron muestras de sangre (2.5 mL) de todos los animales a los tiempos de muestreo teóricos: pre administración, 0.25, 1, 2, 8, 24, 48, 72, 120 y 168 horas post administración a través de la vena yugular. Las muestras de sangre se dispusieron en tubos que contenían heparina. Éstos, se centrifugaron a 1600 g a +4°C durante 20 minutos. El plasma obtenido se separó y se congeló a -70±10°C hasta el día de su análisis.

4.2.4.4 ESTUDIO A DOSIS REPETIDAS P4

El estudio a dosis repetidas P4 se realizó en el estabulario de MDS Pharma Services (Francia). En este estudio toxicocinético piloto se utilizaron 8 perros Beagle de 5 meses de edad con un peso comprendido entre 7.0 y 7.9 kg (macho) y entre 5.9 y 7.0 kg (hembra). Durante el estudio, los animales tuvieron libre acceso al agua y a 300 gramos diarios de pienso controlado UAR-125[®] C3 (Usine d'Alimentation Rationnelle, Francia).

Los animales fueron distribuidos en 4 grupos de manera que cada grupo estaba formado por un perro macho y un perro hembra. Los animales de un mismo grupo fueron administrados todos los días con la misma dosis de elomotecan. Durante 7 días consecutivos se les administró el fármaco a las dosis de 0.025, 0.05, 0.075 o 0.1 mg/kg/día. En todos los casos, la administración del elomotecan se realizó por infusión intravenosa de 15 minutos a través de la vena cefálica usando una bomba de infusión Harvard a un flujo de 0.5 mL/minuto.

Se obtuvieron muestras de sangre (2.5 mL) de todos los animales a los tiempos de muestreo teóricos: pre administración, 0.25, 1, 2, 8, y 24 horas post administración de los días 1 y 7 a través de la vena yugular. Las muestras de sangre se dispusieron en tubos que contenían heparina. Éstos, se centrifugaron a 1600 g a +4°C durante 20 minutos. El plasma obtenido se separó y se congeló a -70±10°C hasta el día de su análisis.

4.2.4.5 ESTUDIO A DOSIS REPETIDAS P5

El estudio a dosis repetidas en el perro P5 consistió en un estudio toxicocinético piloto que fue realizado en el estabulario de MDS Pharma Services (Francia). Se utilizaron 6 perros Beagle de 5 meses de edad con un peso comprendido entre 6.8 y 6.9 kg (machos) y entre 6.7 y 7.1 kg (hembras). Los animales tuvieron libre acceso al agua y permanecieron en ayunas desde las 14 horas previas a la administración del elomotecan hasta las 6 horas post administración. Tras el periodo de ayuno, a los animales se les suministró 300 gramos diarios de pienso controlado UAR-125[®] C3 (Usine d'Alimentation Rationnelle, Francia).

Los animales fueron distribuidos en 3 grupos de manera que cada grupo estaba formado por un perro macho y un perro hembra. Durante 7 días consecutivos, a los animales de cada grupo se les administró la misma dosis de elomotecan mediante infusión intravenosa de 15 minutos usando una bomba de infusión Harvard a un flujo de 0.5 mL/minuto a través de la vena cefálica. Las dosis empleadas fueron 0.2, 0.8 y 1.4 mg/kg/día.

Se obtuvieron muestras de sangre (2.5 mL) de todos los animales a los tiempos de muestreo teóricos: pre administración, 0.25, 1.5, 6 y 24 horas post administración del día 1 y del día 7 a través de la vena yugular. Las muestras de sangre se dispusieron en tubos que contenían heparina. Éstos, se centrifugaron a 1600 g a +4°C durante 20 minutos. El plasma obtenido se separó y se congeló a -70±10°C hasta el día de su análisis.

4.2.4.6 ESTUDIO A DOSIS REPETIDAS P6

Dicho estudio toxicocinético piloto se realizó en el estabulario de MDS Pharma Services (Francia). Se utilizaron 6 perros Beagle de 5 meses de edad con un peso comprendido entre 7.0 y 8.0 kg (machos) 6.0 y 6.8 kg (hembras). Los animales tuvieron libre acceso al agua y permanecieron en ayunas desde las 14 horas previas a la administración del elomotecan hasta 6 horas post administración. Tras el periodo de ayuno, a los animales se les suministró 300 gramos diarios de pienso controlado UAR-125[®] C3 (Usine d'Alimentation Rationnelle, Francia).

Los animales fueron distribuidos en 3 grupos de manera que cada grupo estaba formado por un perro macho y un perro hembra. Una vez a la semana, durante 3 semanas consecutivas, los animales de un mismo grupo recibieron la misma dosis de elomotecan. Las dosis empleadas fueron 0.2, 0.8 y 1.4 mg/kg/semana. En todos los casos, la administración del elomotecan se realizó por infusión intravenosa de 15 minutos a través de la vena cefálica usando una bomba de infusión Harvard a un flujo de 0.5 mL/minuto.

Se obtuvieron muestras de sangre (2.5 mL) de todos los animales a los tiempos de muestreo teóricos: pre administración, 0.25, 1, 2, 8, 24, 48, 72, 120 y 168 horas post administración del día 1 y del día 15 a través de la vena yugular. Las muestras de sangre se dispusieron en tubos que contenían heparina. Éstos, se centrifugaron a 1600 g a +4°C durante 20 minutos. El plasma obtenido se separó y se congeló a -70±10°C hasta el día de su análisis.

4.2.4.7 ESTUDIO A DOSIS REPETIDAS P7

El estudio P7 consistió en un estudio toxicocinético en el que el elomotecan se administró en el estabulario de Centre International Toxicologie (Francia). Se utilizaron 30 perros Beagle de 6 meses de edad con un peso comprendido entre 6.8 y 8.9 kg (machos) y entre 7.3 y 8.7 kg (hembras). Los animales tuvieron libre acceso al agua y permanecieron en ayunas desde las 14 horas previas a la administración del elomotecan hasta como mínimo 1 hora post administración. Tras el periodo de ayuno, a los animales se les suministró 300 gramos diarios de pienso controlado UAR-125[®] C3 (Usine d'Alimentation Rationnelle, Francia).

Los animales fueron distribuidos en 3 grupos de manera que cada grupo estaba formado por cinco perros macho y cinco perros hembra. Los animales de un mismo grupo recibieron siempre la misma dosis de elomotecan. Una vez a la semana, durante 8 semanas consecutivas, se les administró a los animales el fármaco a través de la vena cefálica por infusión intravenosa de 15 minutos, usando una bomba de infusión Harvard a un flujo de 0.5 mL/minuto a la dosis de 0.01, 0.05 o 0.25 mg/kg/semana.

Se obtuvieron muestras de sangre (2.5 mL) de todos los animales a los tiempos de muestreo teóricos pre administración, 0.083, 0.25, 1, 2, 8, 24, 48 y 72 horas post administración del día 1, del día 22 y del día 50 a través de la vena yugular. Las muestras de sangre se dispusieron en tubos que contenían heparina. Éstos, se centrifugaron a 1600 g a +4°C durante 20 minutos. El plasma obtenido se separó y se congeló a -70±10°C hasta el día de su análisis.

4.2.5 ESTUDIO FARMACOCINÉTICO EN EL MONO

4.2.5.1 ESTUDIO A DOSIS REPETIDA MK1

El estudio a dosis repetidas MK1 se realizó en el estabulario de MDS Pharma Services (Francia). Se trató de un estudio toxicocinético piloto en el que se utilizaron 6 monos *cynomolgus* de 2-3 años de edad con un peso comprendido entre 2.50 y 2.97 Kg (machos) y entre 2.25 y 2.60 Kg (hembras). Durante el estudio, los animales tuvieron libre acceso al agua y a 100 gramos diarios de pienso controlado MAZURI® Primate Diet (Harland Tekland Europe, Gran Bretaña).

Los animales fueron distribuidos en 3 grupos de manera que cada grupo estaba formado por un mono macho y un mono hembra. Los animales de un mismo grupo fueron administrados con la misma dosis de elomotecan durante 7 días consecutivos. Así, a los animales se le administró elomotecan a través de la vena cefálica por infusión intravenosa de 15 minutos usando una bomba de infusión Harvard a un flujo de 0.5 mL/minuto a las dosis de 0.2, 0.8 o 1.4 mg/kg/día.

Se obtuvieron muestras de sangre (1.5 mL) de todos los animales a cada uno de los tiempos de muestreo teóricos: pre administración, 0.25, 1, 2, 8 y 24 horas post administración del día 1 y del día 7 a través de la vena femoral. Las muestras de sangre se dispusieron en tubos que contenían heparina. Éstos, se centrifugaron a 1600 g a +4°C durante 20 minutos. El plasma obtenido se separó y se congeló a -70±10°C hasta el día de su análisis.

4.3 TRATAMIENTO FARMACOCINÉTICO DE LOS DATOS

El análisis farmacocinético de los datos concentración plasmática frente al tiempo obtenidos en los estudios anteriormente descritos se efectuó mediante dos aproximaciones: la aproximación no compartimental y la aproximación poblacional.

4.3.1 ANÁLISIS NO COMPARTIMENTAL

El análisis farmacocinético no compartimental se efectuó para cada uno de los estudios de manera individualizada. En el caso del ratón y la rata se analizaron los valores de las medianas de las concentraciones frente al tiempo. Las concentraciones por debajo del límite de cuantificación se consideraron igual a cero para el cálculo de las medianas. Las medianas sólo se calcularon si como mínimo, el 50% de los datos obtenidos a cada tiempo fueron superiores a cero. En el caso del perro y el mono, se analizaron los perfiles individuales de concentraciones frente al tiempo para cada animal. En este caso, las concentraciones inferiores al límite de cuantificación se eliminaron del análisis.

Los parámetros farmacocinéticos calculados fueron los siguientes:

- C_{max} : concentración máxima observada.
- t_{max} : tiempo en el que se alcanza la concentración máxima.
- C_0 : concentración a tiempo cero tras la administración de un bolus intravenoso calculada mediante regresión lineal de los dos primeros pares de valores concentración-tiempo de la curva log-lineal de concentración-tiempo.
- C_{max}/D : concentración máxima normalizada por la dosis.
- AUC_t : área bajo la curva de niveles plasmáticos desde tiempo cero al último punto experimental con concentración superior al límite de cuantificación de la metodología analítica calculada mediante el método trapezoidal.
- $AUC_{t_1-t_2}$: área bajo la curva de niveles plasmáticos del período comprendido entre dos administraciones, calculada mediante el método trapezoidal.
- AUC_{∞} : área bajo la curva de niveles plasmáticos desde tiempo cero hasta infinito.

$$AUC = AUC_t + \frac{C_t}{\lambda_z} \quad \text{Ecuación 33}$$

- AUC/D : área bajo la curva de niveles plasmáticos desde tiempo cero hasta infinito normalizada por la dosis.
- AUC_{extrap} : porcentaje de área extrapolada. Se consideró adecuado un valor de área extrapolada inferior al 20%.
- λ_z : pendiente de la fase monoexponencial terminal de la curva concentración frente al tiempo.
- $t_{1/2\lambda_z}$: semivida aparente de eliminación asociada a la fase monoexponencial terminal de la curva concentración plasmática frente al tiempo. Se determinó de acuerdo a la ecuación 1 descrita en el apartado 1.4.2.

- CL: aclaramiento plasmático. Se determinó de acuerdo a la ecuación 5 descrita en el apartado 1.4.2. El aclaramiento plasmático en estado de equilibrio estacionario se determinó de acuerdo a la ecuación 34.

$$CL_{ss} = \frac{D}{AUC_T} \quad \text{Ecuación 34}$$

- MRT: tiempo medio de residencia.

$$MRT = \frac{AUMC}{AUC} \quad \text{Ecuación 35}$$

Siendo AUMC el área bajo el primer momento de la curva desde tiempo cero hasta infinito.

- V_{ss} : volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario. Se determinó de acuerdo a la ecuación 7 descrita en el apartado 1.4.2.
- R_{ac} : índice de acumulación. Se calculó para el C_{max} y el AUC tras la administración repetida del elomotecan dividiéndose el valor del parámetro obtenido el día de la administración repetida por el valor del parámetro obtenido el primer día de administración.
- F: biodisponibilidad oral. Se calculó tras la administración oral del elomotecan en el estudio R1.

$$F = \frac{(AUC/D)_{oral}}{(AUC/D)_{i.v.}} \quad \text{Ecuación 36}$$

El cálculo de la biodisponibilidad oral a partir de la tasa de extracción se calculó a partir de la ecuación 37.

$$F = 1 - E \quad \text{Ecuación 37}$$

4.3.2 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL

El análisis farmacocinético poblacional para cada especie se efectuó a partir de los valores de concentración logotransformados tras la administración i.v. del elomotecan frente al tiempo utilizando la aproximación de los modelos no lineales de efectos mixtos implementados en el programa NONMEM versión 7.2^[59]. Se determinaron los valores poblacionales o típicos de los parámetros farmacocinéticos, así como la variabilidad interindividual de los mismos y el error residual asociado a las concentraciones.

Finalmente se desarrolló un modelo de escalado alométrico poblacional con los datos de todas las especies que permitiera predecir los parámetros farmacocinéticos del elomotecan en el hombre.

El proceso de modelización poblacional consistió en las siguientes etapas:

- Exploración de los datos experimentales.
- Desarrollo del modelo farmacocinético poblacional para cada especie animal de acuerdo con el siguiente esquema:
 - Modelo base.
 - Modelo de covariables.
 - Modelo final.
- Evaluación del modelo final.
- Desarrollo del modelo de escalado alométrico poblacional y evaluación del mismo.

4.3.2.1 EXPLORACIÓN DE DATOS EXPERIMENTALES

La exploración de los datos se basó en:

- Exploración gráfica de los perfiles de concentración frente al tiempo en cada especie animal.
- Estadística descriptiva de los valores de concentración frente al tiempo en cada especie animal, así como de las covariables registradas.

4.3.2.2 DESARROLLO DEL MODELO

4.3.2.2.1 DESARROLLO DEL MODELO BASE

El modelo base incluyó el modelo estructural y el modelo de efectos aleatorios interindividuales y residuales.

MODELO ESTRUCTURAL:

Para el desarrollo el modelo estructural se ajustó los modelos abiertos de uno, dos y tres compartimentos con eliminación de primer orden desde el compartimento central a los datos experimentales, utilizando las siguientes subrutinas:

- Modelo de un compartimento: ADVAN1 TRANS2, parametrizado como volumen de distribución (V_d) y aclaramiento total del fármaco (CL).
- Modelo de dos compartimentos: ADVAN3 TRANS4, parametrizado como volumen de distribución del compartimento central (V_1), aclaramiento total del fármaco (CL), aclaramiento intercompartimental (Q) y volumen de distribución del compartimento periférico (V_2).

- Modelo de tres compartimentos: ADVAN11 TRANS4, parametrizado como volumen de distribución del compartimento central (V1), aclaramiento total del fármaco (CL), aclaramiento intercompartimental correspondiente al compartimento superficial (Q2), volumen de distribución del compartimento periférico superficial (V2), aclaramiento intercompartimental correspondiente al compartimento profundo (Q3) y volumen de distribución del compartimento periférico profundo (V3).

MODELO DE EFECTOS ALEATORIOS INTERINDIVIDUALES:

La inclusión de la variabilidad interindividual se probó en todos los parámetros farmacocinéticos y se modeló de forma exponencial, asumiendo una distribución lognormal, en todos los casos. Los valores de las varianzas de las distribuciones de los efectos aleatorios interindividuales se obtuvieron a partir de los elementos diagonales de la matriz de varianza-covarianza diagonal proporcionada por el programa NONMEM. Asimismo, se investigó la significancia estadística de las covarianzas entre los efectos aleatorios de los distintos parámetros farmacocinéticos a partir de los elementos no diagonales de la matriz de varianza-covarianza completa.

MODELO DE EFECTOS ALEATORIOS RESIDUALES:

El modelo de error residual utilizado fue el modelo aditivo para datos logotransformados.

Los métodos de estimación utilizados durante todo el proceso de modelización fueron los métodos de estimación condicional de primer orden FOCE (first-order conditional estimation) y de estimación condicional de primer orden con interacción FOCEI (first-order conditional estimation with interaction).

Las estimas iniciales de los parámetros de efectos fijos se basaron en los valores estimados tras el análisis no compartimental de los datos. El límite inferior de los parámetros farmacocinéticos (θ) se fijó a 0 para asegurar un valor positivo. Los valores iniciales de las varianzas de las distribuciones de efectos aleatorios interindividuales se establecieron en 0.25 asumiendo una variabilidad interindividual del 50% expresada en CV % en todos los casos. Las mismas consideraciones se tuvieron en cuenta para establecer las estimas iniciales para el modelo de error residual.

CRITERIOS DE DISCRIMINACIÓN ENTRE MODELOS:

Sólo en los modelos válidos se comprobó si el ajustado de los datos era mejor o no respecto al modelo de referencia. Para que un modelo fuese considerado válido, debió finalizar el ajustado de NONMEM satisfactoriamente y el número de cifras significativas de todos los parámetros estimados debió ser igual o superior a 3.

El diagnóstico y discriminación entre modelos durante el desarrollo del modelo base se basó en las recomendaciones de la European Medicines Agency ^[52].

- Criterio estadístico

Para evaluar estadísticamente la diferencia entre dos modelos anidados se evaluó la disminución de la función objetiva. Para un nivel de significación de $p < 0.005$ la disminución de la función objetiva debió ser de 7.879. Para modelos no-anidados, se evaluó el criterio de información de Akaike (AIC) calculado como indica la ecuación 18 descrita en el apartado 1.4.3.3.3. El modelo que explicaba mejor los datos fue aquél en el que se obtuvo un valor más pequeño de AIC.

- Fiabilidad y precisión de las estimas de los parámetros

Se evaluó el coeficiente de variación porcentual (Relative standard error) de los parámetros (RSE%) mediante la ecuación 19 descrita en el apartado 1.4.3.3.3. A menor valor de RSE% mayor precisión en la estima del parámetro.

- Gráficos de bondad de ajustado

- Gráficos de los valores de concentración observados (DV) frente a los valores poblacionales predichos (PRED) o individuales predichos (IPRED) incluyendo la línea de identidad y la línea de tendencia de los datos. Los datos debían estar uniformemente agrupados alrededor de la línea de identidad a lo largo de todo el ámbito de concentraciones. El gráfico DV vs IPRED debía ajustar mejor los datos que el gráfico DV vs PRED ya que el primero incorpora la variabilidad interindividual.

- Gráfico de los residuales individuales ponderados (IWRES) frente a las predicciones individuales (IPRED). Este gráfico permitió evaluar si el modelo de error residual era correcto. Si era adecuado, la línea de tendencias de los datos debía ser aproximadamente horizontal.

- Gráfico de los residuales ponderados (WRES) (método de estimación FO) y residuales ponderados condicionales (CWRES) (método de estimación FOCE) frente al tiempo incluyendo una línea horizontal en cero y una línea de tendencia de los datos. Este gráfico permitió evaluar el modelo estructural. Los residuales debían estar aleatoriamente dispersos sobre la línea de cero sin mostrar ninguna tendencia marcada. En general, los residuales debían de estar comprendidos en ± 2 .

- Gráfico de distribución de la variabilidad interindividual. Esta debía de estar simétricamente distribuida alrededor de cero ya que es una premisa para el uso del programa NONMEM.

- Gráficos para cada individuo en el que se representó las concentraciones observadas (DV), las predicciones individuales basadas en las estimaciones individuales Bayesianas (IPRED) y las predicciones poblacionales (PRED) frente al tiempo. Los valores predichos debían de ser consistentes con los datos observados.

- Descenso en el valor del error residual.

La selección del modelo base óptimo se basó en el modelo que presentaba el valor más pequeño de la función objetiva (-2LL) (para modelos anidados), valores plausibles de los parámetros estimados así como una precisión aceptable de los mismos. Además, los gráficos de bondad de ajuste debían confirmar que el modelo desarrollado describía adecuadamente tanto la parte estructural como estadística.

VALOR DEL SHRINKAGE:

Antes de proceder a la inclusión de covariables se evaluó el valor del shrinkage ya que un valor elevado de shrinkage (>20%) podía significar un diagnóstico poco fiable de las estimas Bayesianas de los parámetros frente a las covariables ^[65]. Se estimó ε -shrinkage y η -shrinkage de la estima del parámetro como indican las ecuaciones 20 y 21, respectivamente que están descritas en el apartado 1.4.3.3.4.

4.3.2.2.2 DESARROLLO DEL MODELO DE COVARIABLES

Una vez se desarrolló el modelo base, se evaluó la influencia de las covariables disponibles para cada especie en los parámetros farmacocinéticos. Se investigó si las covariables disponibles eran capaces de describir parte de la variabilidad encontrada y si mejoraban significativamente el ajustado con respecto al modelo base. Para ello, se efectuó una exploración previa que consistió en:

- Identificación de las potenciales correlaciones existentes entre las covariables mediante inspección visual de los gráficos de correlación.
- Identificación de las covariables potencialmente estadísticamente significativas mediante:
 - Gráficos de efectos randomizados asociados a cada parámetro farmacocinético, estimado a partir del modelo base frente a covariables.
 - Gráficos de CWRES frente a las covariables.
 - Análisis multivariante usando los modelos aditivos generalizados “Stepwise Generalised Additive Modelling” (GAM) ^[90]. Dicho análisis se efectuó mediante los modelos GAM implementados en el programa Xpose. Dicha técnica no restrictiva a modelos lineales permitió identificar relaciones estadísticamente significativas entre estimas Bayesianas de los parámetros farmacocinéticos y las covariables mediante el criterio de información de Akaike (Akaike Information Criterion, AIC) ^[63].

Con la información obtenida tras la exploración inicial, se evaluó el impacto de estas covariables incluyéndolas de forma prospectiva una a una en los correspondientes parámetros farmacocinéticos del modelo. Las covariables continuas como el peso se incluyeron mediante relaciones alométricas (ecuación 38) o bien lineales (ecuación 39).

$$TVP_j = \theta_1 \cdot (COV/COV_{media})^{\theta_{COV}} \quad \text{Ecuación 38}$$

$$TVP_j = \theta_1 + \theta_{COV} \cdot COV \quad \text{Ecuación 39}$$

Las covariables categóricas como el sexo se incluyeron como:

$$TVP_j = \theta_1 \text{ si } COV = 1$$

$$TVP_j = \theta_2 \text{ si } COV = 2 \quad \text{Ecuación 40}$$

CRITERIOS DE SELECCIÓN DE COVARIABLES:

Para la inclusión de la covariable en el modelo se utilizó:

- Criterio estadístico. Cuando los modelos se diferenciaban en un parámetro, se evaluó la disminución de la función objetiva. Una disminución de la función objetiva de 7.879 se consideró significativa ($p < 0.005$) y supuso la inclusión de la covariable.
- Precisión en la estima de los parámetros. Se evaluó si al incluir la covariable en el modelo, el coeficiente de variación porcentual de los parámetros (RSE%) disminuía y por tanto se obtenía mayor precisión en la estima de los mismos.
- Disminución en la estimación de la varianza interindividual y residual.
- Gráficos de bondad de ajustado. Incluyó:
 - Gráficos de las estimas Bayesianas de los parámetros frente a las covariables, para examinar sus posibles relaciones.
 - Gráfico WRES frente PRED. Los residuales se debían encontrar aleatoriamente distribuidos alrededor de cero.
- Comprobación que la inclusión de la covariable tenía sentido desde un punto de vista biológico.

4.3.2.2.3 DESARROLLO DEL MODELO FINAL

Este modelo permitió obtener los valores de los parámetros poblacionales, la variabilidad interindividual y residual y la estimación de los parámetros individuales (estimaciones Bayesianas).

4.3.2.3 EVALUACION DEL MODELO FINAL

El modelo final se evaluó mediante técnicas de validación interna, concretamente se utilizó la técnica de la predicción corregida de la evaluación predictiva visual (prediction-corrected Visual Predictive Check, pc-VPC) ^[71]. Se simularon 1000 poblaciones iguales a la original a partir de los parámetros obtenidos en el modelo final. Tanto las concentraciones observadas como los valores simulados se normalizaron por los valores predichos poblacionales en varios cortes o secciones de la variable independiente. Se calcularon los intervalos de confianza del 95% de la mediana (percentil 50%) y de los percentiles 2.5% y 97.5% de los datos simulados. Se efectuaron las representaciones gráficas de los valores superpuestos de dichos intervalos junto con los

percentiles 50%, 2.5% y 97.5% de los datos observados. Si el modelo describía adecuadamente los datos observados, las líneas correspondientes a la mediana y a los percentiles 2.5% y 97.5% de los datos observados debían estar incluidos dentro de los intervalos de confianza del 95% de la mediana y percentiles 2.5% y 97.5% de los datos simulados.

4.3.2.4 DESARROLLO Y EVALUACIÓN DEL MODELO DE ESCALADO ALOMÉTRICO POBLACIONAL

Para desarrollar el modelo de escalado alométrico poblacional se utilizaron los valores logotransformados de concentración plasmática de elomotecan provenientes de la administración i.v. del fármaco de los estudios realizados en ratón, rata, perro y mono utilizando el programa de efectos mixtos NONMEM versión 7.2 ^[59]. El desarrollo del modelo alométrico poblacional base se realizó según se describe en el apartado 4.3.2.2 utilizando la ecuación alométrica simple (ecuación 22). Además, para la modelización del aclaramiento, se estudiaron las ecuaciones alométricas siguientes:

- Ecuación alométrica simple (ecuación 22).
- Ecuación alométrica corregida con la máxima esperanza de vida (MLP) (ecuación 25 - descrita en el apartado 1.4.4.1.2).
- Ecuación alométrica corregida con la masa cerebral (BW) (ecuación 26- descrita en el apartado 1.4.4.1.3).
- Ecuación seleccionada según la regla de los exponentes corregida por el flujo de bilis diario normalizado por el peso corporal (CF1).
- Ecuación seleccionada según la regla de los exponentes corregida por el flujo de bilis diario normalizado por el peso de hígado (CF2).

También se ensayó el modelo alométrico en el que los exponentes de la ecuación alométrica simple fueron fijados a los valores teóricos (0.75 para el aclaramiento y 1.0 para el volumen de distribución).

Para seleccionar el modelo alométrico poblacional final, se utilizaron los criterios de discriminación entre modelos mencionados anteriormente. Con éste, se predijo los parámetros farmacocinéticos típicos en el hombre (peso 70 kg).

Para evaluar la capacidad predictiva del modelo de escalado alométrico poblacional se consideraron los valores de los parámetros farmacocinéticos poblacionales reportados en el estudio de Fase I del elomotecan ^[41]. Con éstos, se determinó el porcentaje de error entre el valor observado y el predicho mediante la ecuación 23 descrita en el apartado 1.4.4. Finalmente, se exploró gráficamente el promedio de las concentraciones observadas en el estudio de Fase I y las concentraciones simuladas con cada uno de los modelos alométricos poblacionales estudiados, con el objetivo de confirmar la validez del modelo final seleccionado.

4.4 PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Los principales programas informáticos utilizados fueron:

- Analyst v 1.1 ^[91]. Programa para el control del espectrómetro de masas y del módulo de HPLC así como la adquisición y tratamiento de los datos del espectrómetro de masas y HPLC.
- Spark Link ^[92]. Programa para el control del módulo de extracción en fase sólida en línea.
- WinNonlin v 5.3 ^[93]. Programa informático para el tratamiento farmacocinético de los datos mediante la aproximación no compartimental.
- NONMEM v 7.2 ^[59]. Programa informático para el tratamiento farmacocinético de los datos mediante la aproximación de los modelos no lineales de efectos mixtos.
- R v 2.15.1 ^[94]. Programa gráfico-estadístico para la exploración de datos y resultados obtenidos tras el análisis poblacional.
- Xpose v 4.2 ^[95]. Paquete para R. Programa para el diagnóstico y evaluación de los modelos farmacocinéticos poblacionales desarrollados. Se empleó para la construcción de los gráficos de bondad de ajustado y para el procedimiento GAM (Modelos aditivos generalizados) herramienta aplicada durante la exploración de las covariables.
- PsN 3.5.2. ^[96]. 2 (Pearl-speak for NONMEM) Programa para Nonmem para el diagnóstico y evaluación validación de los modelos farmacocinéticos poblacionales desarrollados. Se utilizó para la validación de los modelos mediante la predicción corregida de la evaluación Predictiva Visual (pc-VPC).

5 RESULTADOS

5.1 RESULTADOS ANALÍTICOS

5.1.1 VALIDACION DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

5.1.1.1 SELECTIVIDAD

Las Figuras 15 a 18 muestran los perfiles MRM correspondientes a cada una de las transiciones utilizadas en la técnica analítica de una muestra representativa de plasma blanco (B) de ratón, rata, perro y humano, respectivamente.

En ninguna de las especies se observaron interferencias relevantes en ninguno de los seis blancos provenientes de seis animales/voluntarios diferentes en los tiempos de retención de los compuestos estudiados (t_R aproximado de 2.5 minutos para el elomotecan y BN81067 y 2.4 minutos para el BN80960 y BN81068).

Trazo superior (izquierda a derecha): Perfil MRM correspondiente a la transición del elomotecan y del BN81067 en muestra de plasma blanco de ratón. Trazo inferior (izquierda a derecha): Perfil MRM correspondiente a la transición del BN80960 y del BN81068 en muestra de plasma blanco de ratón.

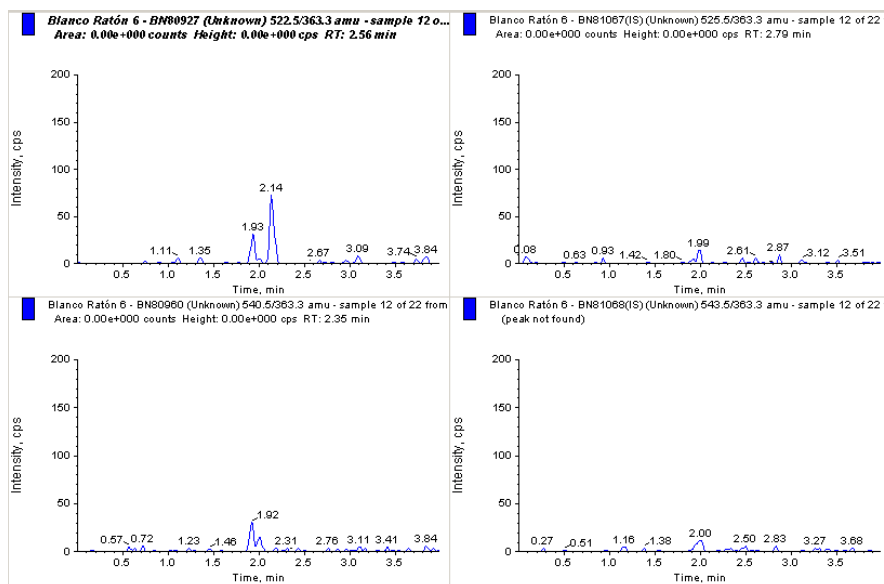


Figura 15. Ensayo de Selectividad. Muestra representativa de plasma blanco de ratón.

RESULTADOS

Trazo superior (izquierda a derecha): Perfil MRM correspondiente a la transición del elomotecan y del BN81067 en muestra de plasma blanco de rata. Trazo inferior (izquierda a derecha): Perfil MRM correspondiente a la transición del BN80960 y del BN81068 en muestra de plasma blanco de rata.

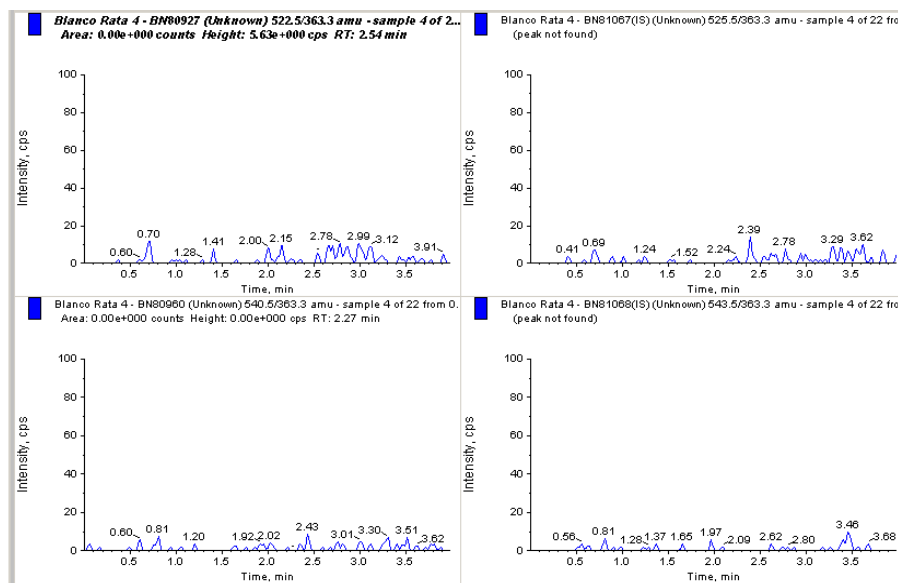


Figura 16. Ensayo de Selectividad. Muestra representativa de plasma blanco de rata.

Trazo superior (izquierda a derecha): Perfil MRM correspondiente a la transición del elomotecan y del BN81067 en muestra de plasma blanco de perro. Trazo inferior (izquierda a derecha): Perfil MRM correspondiente a la transición del BN80960 y del BN81068 en muestra de plasma blanco de perro.

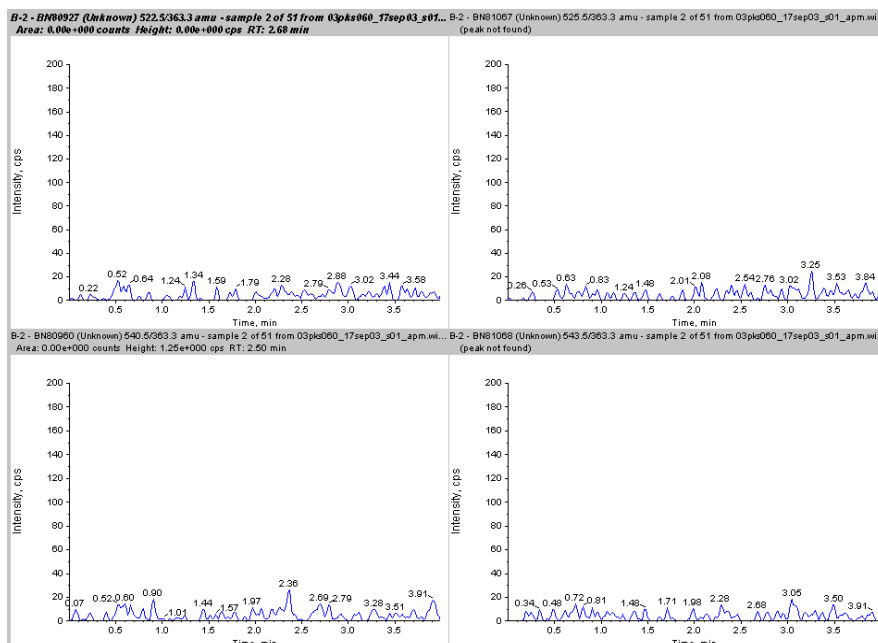


Figura 17. Ensayo de Selectividad. Muestra representativa de plasma blanco de perro.

Trazo superior (izquierda a derecha): Perfil MRM correspondiente a la transición del elomotecan y del BN81067 en muestra de plasma blanco humano. Trazo inferior (izquierda a derecha): Perfil MRM correspondiente a la transición del BN80960 y del BN81068 en muestra de plasma blanco humano.

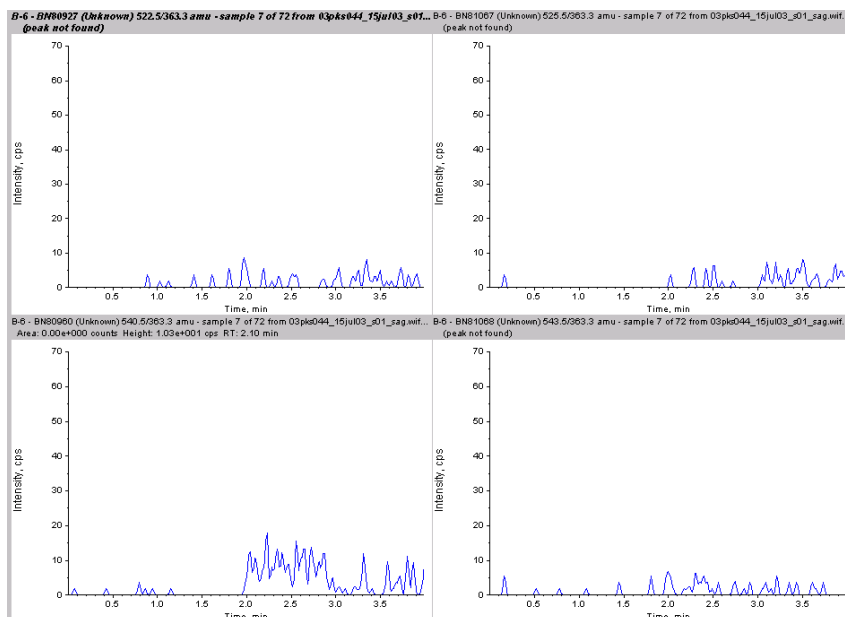


Figura 18. Ensayo de Selectividad. Muestra representativa de plasma blanco humano.

5.1.1.2 CURVA DE CALIBRADO

Ninguno de los estándares de calibrado se desvió más del 15% del valor nominal. El coeficiente de correlación promedio de los tres días de análisis (n=3) fue en todos los casos ≥ 0.997 . Para el elomotecan, las concentraciones recalculadas respecto a las concentraciones nominales de las 8 muestras plasmáticas de concentración conocida presentaron un error de -5.47% a 2.12% (rata), -2.87% a 2.05% (perro) y de -2.33% a 3.77% (humano). El coeficiente de variación osciló entre 3.20% y 11.9% (rata), 4.17% y 10.8% (perro) y entre 4.20% y 7.39% (humano).

Para el BN80960, la desviación respecto a la concentración nominal de los valores recalculados estuvo comprendida entre -2.75% y 4.05% (rata), -3.53% y 4.33% (perro) y entre -3.63% y 2.87% (humano). El coeficiente de variación osciló entre 4.47% y 10.1% (rata), 3.81% y 9.63% (perro) y entre 2.35% y 12.1% (humano).

Las Figuras 19 a 21 muestran los perfiles MRM correspondientes a cada una de las transiciones utilizadas en la técnica analítica en una muestra representativa del límite inferior de cuantificación (LOQ) en plasma de rata, perro y humano, respectivamente. El límite inferior de cuantificación para el elomotecan y BN80960 se estableció en 0.1 ng/mL para el análisis de muestras plasmáticas de ratón y perro, en 0.25 ng/mL para el análisis de muestras plasmáticas de rata y en 0.05 ng/mL para el análisis de muestras de plasma humano. El límite superior de cuantificación para el elomotecan y BN80960 se estableció en 50 ng/mL para el análisis de

RESULTADOS

muestras plasmáticas de ratón y perro, en 100 ng/mL para el análisis de muestras plasmáticas de rata, y en 25 ng/mL para el análisis de muestras de plasma humano.

Trazo superior (izquierda a derecha): Perfil MRM correspondiente a la transición del elomotecan y del BN81067 en muestra de plasma de rata preparada al límite inferior de cuantificación. Trazo inferior (izquierda a derecha): Perfil MRM correspondiente a la transición del BN80960 y del BN81068 en muestra de plasma de rata preparada al límite inferior de cuantificación.

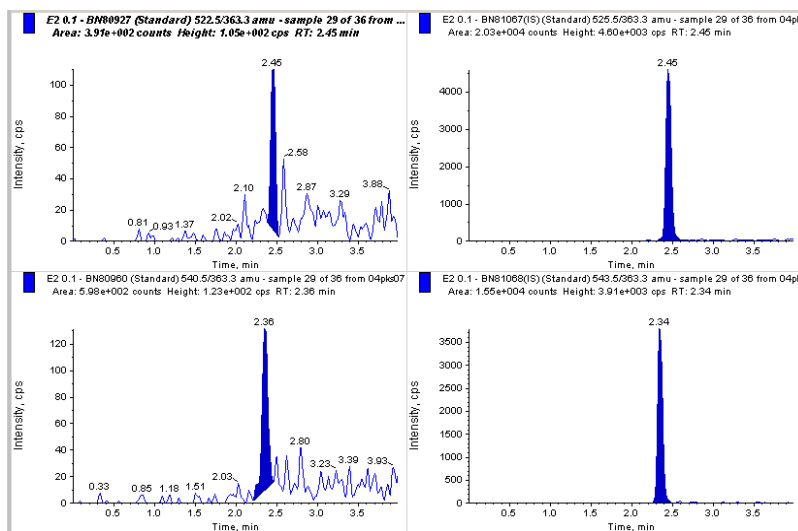


Figura 19. Muestra representativa del límite inferior de cuantificación de elomotecan y BN80960 preparada en plasma de rata.

Trazo superior (izquierda a derecha): Perfil MRM correspondiente a la transición del elomotecan y del BN81067 en muestra de plasma de rata preparada al límite inferior de cuantificación. Trazo inferior (izquierda a derecha): Perfil MRM correspondiente a la transición del BN80960 y del BN81068 en muestra de plasma de rata preparada al límite inferior de cuantificación.

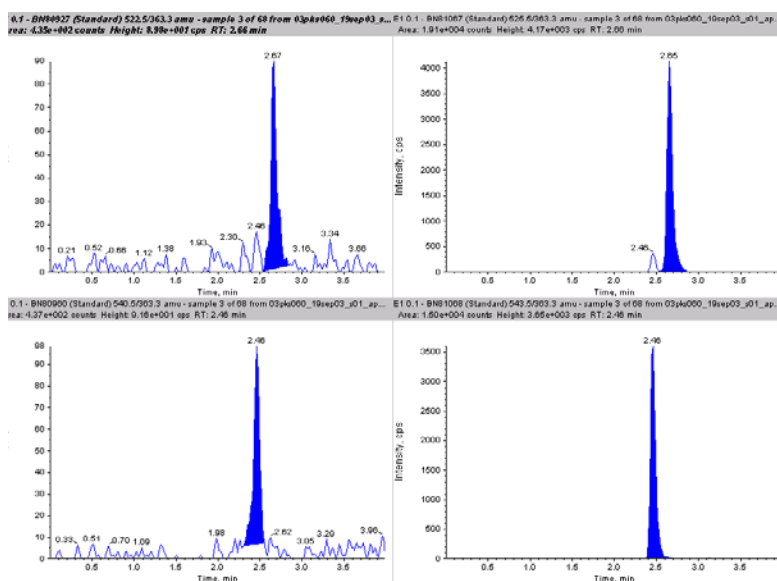


Figura 20. Muestra representativa del límite inferior de cuantificación de elomotecan y BN80960 preparada en plasma de perro.

Trazo superior (izquierda a derecha): Perfil MRM correspondiente a la transición del elomotecan y del BN81067 en muestra de plasma humano preparada al límite inferior de cuantificación. Trazo inferior (izquierda a derecha): Perfil MRM correspondiente a la transición del BN80960 y del BN81068 en muestra de plasma humano preparada al límite inferior de cuantificación.

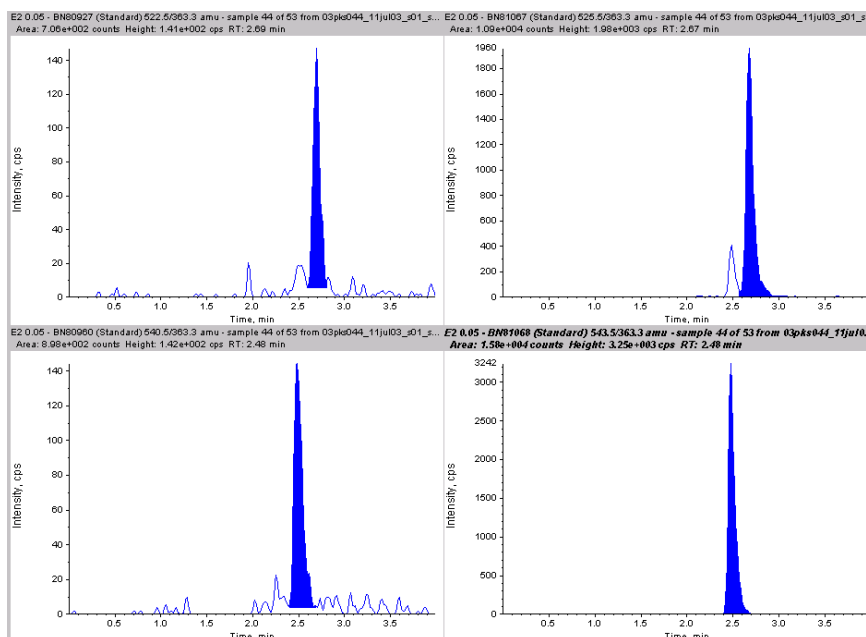


Figura 21. Muestra representativa del límite inferior de cuantificación de elomotecan y BN80960 preparada en plasma humano.

5.1.1.3 PRECISION Y EXACTITUD

Los resultados de la precisión y exactitud intra-ensayo e inter-ensayo se muestran en la Tabla 5 para el elomotecan y en la Tabla 6 para el BN80960. Los resultados de coeficiente de variación y error relativo obtenidos fueron inferiores a $\pm 20\%$ en el límite inferior de cuantificación (nivel 1) e inferiores a $\pm 15\%$ en el resto de concentraciones estudiadas.

Los resultados de precisión y exactitud obtenidos en plasma de ratón avalan la validez de la aproximación realizada en la que las muestras empleadas como controles de calidad fueron interpoladas en curvas de calibrado preparadas en plasma de rata. De esta manera se consiguió disminuir considerablemente el número de ratones sacrificados para la obtención de plasma blanco para su uso como matriz.

RESULTADOS

Tabla 5. Precisión y exactitud intra-ensayo e inter-ensayo para el elomotecan obtenidas tras el análisis de las muestras empleadas como control de calidad preparadas en plasma de ratón, rata, perro y humano.

Concentración Nominal ^(a) ng/mL	Ratón		Rata		Perro		Humano	
	Precisión %	Exactitud %	Precisión %	Exactitud %	Precisión %	Exactitud %	Precisión %	Exactitud %
Nivel 1								
Día 1 (n=5)	4.73	-4.74	10.9	-2.8	9.08	4.46	10.2	-1.36
Día 2 (n=5)	8.84	2.36	12.3	8.44	17.9	-9.04	17.0	11.1
Día 3 (n=5)	6.66	-2.08	14.0	6.92	11.5	12.0	8.01	9.72
Interensayo (n=15)	7.22	-1.49	12.6	4.19	14.8	2.49	12.8	6.48
Nivel 2								
Día 1 (n=5)	9.21	-1.52	8.76	5.42	7.33	-3.52	8.53	2.56
Día 2 (n=5)	2.67	3.60	5.29	0.880	14.9	-12.5	8.05	8.28
Día 3 (n=5)	6.08	0.800	4.92	8.80	4.72	9.04	5.19	1.76
Interensayo (n=15)	6.35	0.960	6.86	5.03	12.7	-2.32	7.47	4.20
Nivel 3								
Día 1 (n=5)	1.99	-0.080	4.34	-3.55	3.47	-10.2	2.40	-5.20
Día 2 (n=5)	3.48	10.6	7.37	-3.95	3.71	10.9	5.34	3.20
Día 3 (n=5)	8.14	7.70	6.44	7.30	4.53	4.48	5.06	-3.94
Interensayo (n=15)	6.44	5.94	7.89	-0.070	9.72	1.71	5.73	-1.98
Nivel 4								
Día 1 (n=5)	3.13	5.80	5.34	6.65	3.06	-13.4	2.20	0.750
Día 2 (n=5)	3.05	11.1	7.14	1.15	4.44	0.050	1.59	-4.90
Día 3 (n=5)	1.47	9.30	8.52	3.65	4.85	-1.85	3.57	3.80
Interensayo (n=15)	3.23	8.73	6.94	3.82	7.59	-5.07	4.59	-0.179

(a): Concentración Nominal 0.1, 0.25, 25, 40 ng/mL en plasma raton y perro
 Concentración Nominal 0.25, 1, 40, 80 ng/mL en plasma rata
 Concentración Nominal 0.05, 0.1, 10, 20 ng/mL en plasma humano

Tabla 6. Precisión y exactitud intra-ensayo e inter-ensayo para el BN80960 obtenidas tras el análisis de las muestras empleadas como control de calidad preparadas en plasma de ratón, rata, perro y humano.

Concentración Nominal ^(a) ng/mL	Ratón		Rata		Perro		Humano	
	Precisión %	Exactitud %	Precisión %	Exactitud %	Precisión %	Exactitud %	Precisión %	Exactitud %
Nivel 1								
Día 1 (n=5)	18.8	18.7	4.21	3.48	19.0	7.76	15.0	-15.7
Día 2 (n=5)	8.70	6.26	9.19	13.7	15.4	-3.54	5.17	-8.00
Día 3 (n=5)	9.96	10.6	12.9	-11.2	4.16	6.80	4.30	13.4
Interensayo (n=15)	12.9	11.4	13.4	1.99	14.2	3.67	15.4	-3.44
Nivel 2								
Día 1 (n=5)	10.0	5.04	12.7	6.54	12.8	-0.16	10.3	3.98
Día 2 (n=5)	7.81	2.88	6.16	-7.44	9.70	3.60	9.64	-4.84
Día 3 (n=5)	14.6	6.32	8.28	-12.7	3.67	11.3	6.35	2.20
Interensayo (n=15)	10.5	4.75	12.7	-4.53	9.74	5.00	9.13	0.45
Nivel 3								
Día 1 (n=5)	3.80	2.32	2.14	-7.15	7.50	-12.5	4.09	0.86
Día 2 (n=5)	3.60	7.68	3.20	-7.60	3.50	9.84	1.96	1.30
Día 3 (n=5)	3.74	10.9	5.72	-4.15	7.10	1.44	4.87	5.32
Interensayo (n=15)	4.96	6.96	4.10	-6.30	11.1	-0.400	4.12	2.49
Nivel 4								
Día 1 (n=5)	4.21	10.3	8.83	-6.15	7.17	-14.0	1.17	4.50
Día 2 (n=5)	3.17	6.95	2.39	-3.53	4.09	-1.80	2.81	-1.40
Día 3 (n=5)	3.32	2.65	4.61	3.28	2.85	-7.15	6.73	14.4
Interensayo (n=15)	4.52	6.63	6.82	-2.13	7.20	-7.65	7.62	5.83

(a): Concentración Nominal 0.1, 0.25, 25, 40 ng/mL en plasma raton y perro
 Concentración Nominal 0.25, 1, 40, 80 ng/mL en plasma rata
 Concentración Nominal 0.05, 0.1, 10, 20 ng/mL en plasma humano

5.1.1.4 MEMORIA DE INYECCIÓN

Tras el análisis de una muestra a la concentración del límite superior de cuantificación no se observaron picos interferentes en el análisis de una muestra de plasma blanco debido a memoria de inyección en ninguna de las especies validadas (ratón, rata, perro y humano).

5.1.1.5 RECUPERACIÓN Y EFECTO MATRIZ

Los tres replicados del ensayo de recuperación a las concentraciones de 1, 25 y 40 ng/mL mostraron resultados similares para ambos analitos. En plasma de ratón, rata, perro y humano, el elomotecan presentó una recuperación media de 61.8%, 59.9%, 58.7% y 62.6%, respectivamente y el BN80960 de 66.4%, 56.1%, 57.1% y 57.9%, respectivamente. Los resultados de recuperación obtenidos, a pesar de no ser muy elevados, fueron consistentes en el ámbito de concentraciones estudiado, así como similares en las diferentes especies validadas.

Tras la inyección de una muestra de plasma blanco, las interferencias producidas por sustancias endógenas en el perfil MRM fueron de baja intensidad y se produjeron principalmente en el primer minuto. Se considera que el efecto matriz fue despreciable ya que el elomotecan y el BN80960 eluyeron a un tiempo de retención superior. Este resultado se corroboró con los resultados obtenidos en el ensayo de precisión y exactitud. En éste, el plasma usado para la preparación de los estándares de calibración en cada uno de los tres días fue diferente del utilizado para la preparación de las muestras empleadas en el ensayo de precisión y exactitud de manera que el efecto inter-matriz pudo considerarse también despreciable.

5.1.1.6 EFECTO DE LA DILUCIÓN

Para el elomotecan, la exactitud y precisión de las muestras de plasma diluidas con la misma matriz fue de -6.10% y 6.33% en ratón, -3.68% y 11.5% en rata, 7.80% y 5.84% en perro y -1.00% y 6.37% en humano, respectivamente.

En el caso del BN80960, la exactitud y precisión de las muestras de plasma diluidas fue de 3.73% y 3.22% en ratón, -2.34% y 8.93% en rata, 1.58% y 4.57% en perro y de -1.30% y 7.14% en humano, respectivamente.

Los resultados obtenidos muestran que diluir 4000 veces una muestra plasmática usando plasma blanco de la misma especie no tiene efecto en la precisión ni en la exactitud con la que se determina la concentración plasmática en ninguna de las especies ensayadas.

5.1.1.7 ESTUDIO DE ESTABILIDAD

En la Tabla 7 se muestran los resultados de estabilidad de los estándares en solución y en la Tabla 8 los resultados de estabilidad de las muestras plasmáticas.

RESULTADOS

Los estándares diluidos de manera individualizada con N,N-dimetilformamida, se pueden almacenar durante 5 meses a -20°C ya que en todos los casos, el porcentaje de analito remanente fue igual o superior al 95.8%.

En las condiciones de trabajo, los analitos podían permanecer en baño de agua-hielo durante un periodo de 6 horas y una vez procesadas, las muestras plasmáticas se podían analizar a las 24 horas de su preparación ya que eran estables durante este periodo en el inyector automático a +4°C.

Los resultados obtenidos demostraron que 3 ciclos de congelación a -70°C y descongelación en baño de agua-hielo no tenían impacto en los niveles de elomotecan y BN80960 presentes en las muestras plasmáticas de todas las especies validadas.

En roedores, las muestras plasmáticas se pueden almacenar hasta un máximo de 3 meses a -20°C. En el caso de las muestras plasmáticas de perro y de humano, éstas pueden almacenarse hasta un máximo de 6 meses a -20°C debido a la inestabilidad del elomotecan. Este hecho está en concordancia con el incremento en la concentración de BN80960. Las muestras plasmáticas de todas las especies pueden almacenarse durante 12 meses a -70°C ya que fue el plazo máximo de estabilidad estudiado.

Tabla 7. Estabilidad de los estándares en solución.

Estabilidad en solución	% Remanente
Elomotecan (5 meses, DMF, -20°C, n=5)	100
BN80960 (5 meses, DMF, -20°C, n=5)	97.7
BN81067 (5 meses, DMF, -20°C, n=5)	100
BN81068 (5 meses, DMF, -20°C, n=5)	95.8
Elomotecan (6h, AcN-H2O 10:90 (0.1% ác.acetico),baño hielo, n=5)	100
BN80960 (6h, AcN-H2O 10:90 (0.1% ác.acetico),baño hielo, n=5)	96.5

Tabla 8. Estabilidad de los analitos en plasma de ratón, rata, perro y humano.

Estabilidad en plasma	% Remanente							
	Ratón		Rata		Perro		Humano	
	1 ng/mL	40 ng/mL	1 ng/mL	40 ng/mL	1 ng/mL	40 ng/mL	0.5 ng/mL	20 ng/mL
Elomotecan								
(6h, plasma, baño hielo, n=5)	97.0	91.7	100	100	100	100	100	95.6
(24h, autosampler, 4°C, n=5)	93.2	88.2	98.1	95.0	98.0	100	88.6	100
(3 ciclos cong/descong, n=5)	100	89.2	100	99.6	100	97.7	100	98.8
(3 meses, -20°C, n=5)	94.3	97.0	91.8	102	94.1	91.0	106	95.0
(6 meses, -20°C, n=5)	88.5	80.9	29.3	58.7	100	97.0	100	91.0
(12 meses, -20°C, n=5)	40.4	68.5	6.60	57.7	82.6	70.3	74.8	85.0
(12 meses, -70°C, n=5)	105	104	92.9	107	100	85.5	100	100
BN80960								
(6h, plasma, baño hielo, n=5)	100	97.3	93.5	98.7	100	89.9	100	100
(24h, autosampler, 4°C, n=5)	91.9	86.0	100	95.9	88.2	100	94.9	98.8
(3 ciclos cong/descong, n=5)	100	98.6	100	100	95.2	93.7	97.5	98.9
(3 meses, -20°C, n=5)	108	99.5	99.6	106	103	110	113	105
(6 meses, -20°C, n=5)	126	146	148	135	99.2	100	100	100
(12 meses, -20°C, n=5)	167	196	188	153	106	127	130	128
(12 meses, -70°C, n=5)	105	106	94.7	106	92.2	97.8	100	100

5.1.2 RESULTADOS OBTENIDOS DURANTE LA DETERMINACIÓN DEL ELOMOTECAN EN LAS MUESTRAS DE PLASMA PROCEDENTES DE LOS ESTUDIOS EXPERIMENTALES

5.1.2.1 RESULTADOS ANALÍTICOS EN EL RATÓN

Las muestras plasmáticas del estudio a dosis única en el ratón RT1 se analizaron en 4 secuencias analíticas a partir del método On-line SPE-HPLC-MS/MS validado previamente. En todas ellas, el intervalo de trabajo fue de 0.1 a 50 ng/mL. La exactitud de las concentraciones recalculadas de la curva de calibrado fue de -1.70 a 1.30% y la precisión de 4.37 a 11.0% para el elomotecan. El coeficiente de correlación obtenido fue de 0.995 a 0.998.

Los valores de concentraciones de las muestras empleadas como control de calidad interpolados en la curva de calibrado promedio permitieron aceptar los resultados obtenidos en las muestras problema de todas las secuencias analíticas (ver apartado 4.1.7). En la Tabla 9 se muestran los valores de concentración individuales obtenidos en las muestras empleadas en el estudio RT1 como control de calidad analizadas, así como la precisión (expresada como CV %) y exactitud (expresada como error %), del valor medio de concentración obtenido.

Tabla 9. Valores de concentración (ng/mL) de elomotecan obtenidos en las muestras empleadas como controles de calidad preparadas en plasma de ratón así como exactitud (% error) y precisión (CV %) inter-secuencia correspondientes al estudio a dosis única en el ratón RT1.

Secuencia	Concentración (ng/mL)		
	0.300 ng/mL	25.0 ng/mL	40.0 ng/mL
1	0.329	25.1	42.3
1	0.317	26.5	44.5
2	0.300	25.8	40.2
2	0.344	25.0	40.6
3	0.318	27.7	43.5
3	0.327	25.6	43.9
4	0.327	26.9	40.6
4	0.317	26.7	sl
Media	0.322	26.2	42.2
Error (%)	7.46	4.65	5.57
D.E.	0.0127	0.944	1.78
C.V. (%)	3.94	3.61	4.21

sl: Muestra perdida durante el análisis

5.1.2.2 RESULTADOS ANALÍTICOS EN LA RATA

Las muestras plasmáticas del estudio a dosis única en la rata R1 se analizaron en una secuencia analítica. El intervalo de trabajo fue de 0.5 a 50 ng/mL. Para elomotecan, la exactitud en las concentraciones recalculadas para las muestras de la curva de calibrado fue de -3.90 a 2.86% y la precisión de 0.2 a 10.8%. En el estudio R2, en el que las muestras plasmáticas

RESULTADOS

también se analizaron en una secuencia de análisis, la exactitud para el elomotecan determinada a partir de las concentraciones recalculadas de las muestras de la curva de calibrado fue de -5.50 a 6.40% y la precisión de 3.40 a 11.2%. El coeficiente de correlación fue en ambos casos de 0.997.

En las Tablas 10 y 11 se muestran los valores de concentración individuales obtenidos en las muestras empleadas como control de calidad así como la precisión y exactitud del valor medio de concentración obtenidos en los estudios R1 y R2, respectivamente. Estos resultados, permitieron aceptar los valores de concentración obtenidos en ambas secuencias analíticas (ver apartado 4.1.7).

Tabla 10. Valores de concentración (ng/mL) de elomotecan obtenidos en las muestras empleadas como controles de calidad preparadas en plasma de rata así como exactitud (% error) y precisión (CV %) intra-secuencia correspondientes al estudio a dosis única en la rata R1.

Secuencia	Concentración (ng/mL)		
	1.50 ng/mL	5.00 ng/mL	40.0 ng/mL
1	1.61	5.28	38.9
1	1.45	5.20	38.3
Media	1.53	5.24	38.6
Error (%)	2.00	4.80	-3.50
D.E.	0.113	0.057	0.424
C.V. (%)	7.39	1.08	1.10

Tabla 11. Valores de concentración (ng/mL) de elomotecan obtenidos en las muestras empleadas como controles de calidad preparadas en plasma de rata así como exactitud (% error) y precisión (CV %) intra-secuencia correspondientes al estudio a dosis única en la rata R2.

Secuencia	Concentración (ng/mL)		
	1.50 ng/mL	5.00 ng/mL	40.0 ng/mL
1	1.63	5.62	39.8
1	1.61	5.48	40.9
Media	1.62	5.55	40.4
Error (%)	8.00	11.0	0.875
D.E.	0.014	0.099	0.778
C.V. (%)	0.873	1.78	1.93

Las muestras plasmáticas de los estudios a dosis repetidas en la rata R3 y R4 se analizaron conjuntamente en cuatro secuencias analíticas empleando el método validado previamente. En todas ellas, el intervalo de trabajo fue de 0.25 a 100 ng/mL. Para el elomotecan, la exactitud de las concentraciones recalculadas de la curva de calibrado fue de -2.70 a 3.46% y la precisión de 4.97 a 11.5%. El coeficiente de correlación obtenido fue de 0.994 a 0.998.

En la Tabla 12 se muestran los valores de concentración individuales obtenidos en las muestras empleadas como control de calidad así como la precisión y exactitud inter-secuencia. En las secuencias analíticas 2 y 4, uno de los dos replicados de la concentración baja (0.750 ng/mL) fue superior al 15% del valor teórico. Los resultados obtenidos permitieron aceptar todas las secuencias analíticas (ver apartado 4.1.7). En el análisis de la precisión y exactitud inter-secuencia, se incluyeron todos los valores de concentración, y por eso, la precisión al nivel inferior fue de 17.8%. Si sólo se consideraran los valores de concentración de $\pm 15\%$ del valor nominal, la precisión sería de 7.63% y el error de -0.556%.

Tabla 12. Valores de concentración (ng/mL) de elomotecan obtenidos en las muestras empleadas como controles de calidad preparadas en plasma de rata así como exactitud (% error) y precisión (CV %) inter-secuencia correspondientes a los estudios a dosis repetidas en la rata R3 y R4.

Secuencia	Concentración (ng/mL)		
	0.750 ng/mL	40.0 ng/mL	80 ng/mL
1	0.747	41.2	79.4
1	0.844	41.5	77.6
2	0.983	39.3	90.9
2	0.767	42.3	79.9
3	0.723	42.3	82.3
3	0.717	43.7	87.3
4	0.677	42.0	86.6
4	1.090	45.0	80.9
Media	0.819	42.2	83.1
Error (%)	9.13	5.41	3.89
D.E.	0.146	1.69	4.64
C.V. (%)	17.8	4.01	5.58

Las muestras plasmáticas del estudio a dosis repetida en la rata R5 fueron analizadas en siete secuencias analíticas con el método validado previamente. En todas ellas, el intervalo de trabajo fue de 0.25 a 100 ng/mL. La exactitud de las concentraciones recalculadas de la curva de calibrado fue de -1.97 a 4.31% y la precisión de 5.08 a 12.0% para el elomotecan. El coeficiente de correlación fue de 0.989 a 0.999.

En la Tabla 13 se muestran los valores individuales de concentración obtenidos en las muestras empleadas como control de calidad así como la precisión y exactitud inter-secuencia. Se aceptaron todas las secuencias analíticas (ver apartado 4.1.7). Una muestra empleada como control de calidad a la concentración de 0.750 ng/mL en las secuencias analíticas 2, 5 y 6 fue superior al 15% del valor teórico y una muestra a la concentración de 40 ng/mL se perdió por un fallo instrumental en la secuencia 2. En el análisis de la precisión y exactitud inter-secuencia, se incluyeron todos los valores de concentración obtenidos.

Tabla 13. Valores de concentración (ng/mL) de elomotecan obtenidos en las muestras empleadas como controles de calidad preparadas en plasma de rata así como exactitud (% error) y precisión (CV %) inter-secuencia correspondientes al estudio a dosis repetidas en la rata R5.

Secuencia	Concentración (ng/mL)		
	0.750 ng/mL	40.0 ng/mL	80 ng/mL
1	0.725	41.4	78.9
1	0.825	44.7	83.6
2	0.822	43.7	85.9
2	0.595	sl	88.5
3	0.688	39.0	90.1
3	0.864	46.5	90.7
4	0.763	41.4	87.1
4	0.848	43.4	88.1
5	0.711	42.9	85.8
5	1.06	41.7	100.0
6	0.717	42.0	82.5
6	0.900	39.6	83.5
7	0.766	41.4	91.1
7	0.651	54.8	93.4
Media	0.781	43.3	87.8
Error (%)	4.14	8.17	9.75
D.E.	0.118	4.00	5.24
C.V. (%)	15.1	9.25	5.97

sl: Muestra perdida durante el análisis

5.1.2.3 RESULTADOS ANALÍTICOS EN EL PERRO

Las muestras plasmáticas de los estudios a dosis única en el perro P1 y P2 se analizaron a partir del método On-line SPE-HPLC-MS/MS validado en dos y cuatro secuencias analíticas, respectivamente. En todas ellas, el intervalo de trabajo fue de 0.1 a 50 ng/mL. Para el elomotecan, la exactitud de las concentraciones recalculadas de las muestras de la curva de calibrado fue de -5.45 a 3.20% y de -6.50 a 6.30% en los estudios P1 y P2, respectivamente. La precisión fue de 0.653 a 13.0% en el estudio P1 y de 4.54 a 9.14% en el estudio P2. Los coeficientes de correlación oscilaron entre 0.995 a 0.997 y entre 0.993 a 0.997 en los estudios P1 y P2, respectivamente.

En las Tablas 14 y 15 se muestran los valores de concentración individuales obtenidos en las muestras empleadas como control de calidad así como la precisión y exactitud inter-secuencia en los estudios P1 y P2, respectivamente. Los resultados obtenidos permitieron aceptar los valores de las concentraciones obtenidos en todas las secuencias de análisis de ambos estudios.

Tabla 14. Valores de concentración (ng/mL) de elomotecan obtenidos en las muestras empleadas como controles de calidad preparadas en plasma de perro así como exactitud (% error) y precisión (CV %) inter-secuencia correspondientes al estudio a dosis única P1.

Secuencia	Concentración (ng/mL)		
	0.300 ng/mL	25.0 ng/mL	40.0 ng/mL
1	0.315	23.9	sl
1	0.351	25.0	45.9
2	0.311	25.3	37.8
2	0.246	24.0	40.6
Media	0.306	24.6	41.4
Error (%)	1.92	-1.80	3.58
D.E.	0.0437	0.705	4.11
C.V. (%)	14.3	2.87	9.93

sl: Muestra perdida durante el análisis

Tabla 15. Valores de concentración (ng/mL) de elomotecan obtenidos en las muestras empleadas como controles de calidad preparadas en plasma de perro así como exactitud (% error) y precisión (CV %) inter-secuencia correspondientes al estudio a dosis única P2.

Secuencia	Concentración (ng/mL)		
	0.300 ng/mL	25.0 ng/mL	40.0 ng/mL
1	0.340	23.9	42.0
1	0.338	24.0	42.0
2	0.308	28.5	sl
2	0.236	sl	40.4
3	0.326	26.1	44.2
3	0.284	sl	37.7
4	0.285	25.3	40.3
4	0.266	23.6	35.2
Media	0.298	25.2	40.3
Error (%)	-0.708	0.933	0.643
D.E.	0.0368	1.87	2.99
C.V. (%)	12.4	7.39	7.44

sl: Muestra perdida durante el análisis

Las muestras plasmáticas de los estudios piloto en el perro P3 y P4 se analizaron a partir del método on-line SPE-HPLC-MS/MS en el intervalo de trabajo de 0.25 a 100 ng/mL. Para cada estudio, se emplearon dos secuencias analíticas. Para el elomotecan, la exactitud de las concentraciones recalculadas de las muestras de la curva de calibrado fue de -5.05 a 3.40% y de -2.68 a 5.65% en los estudios P3 y P4, respectivamente. La precisión fue de 2.29 a 12.45 y de 1.90 a 9.83% en los estudios P3 y P4, respectivamente. Los coeficientes de correlación fueron de 0.994 y 0.997 en el estudio P3 y de 0.993 y 0.997 en el estudio P4.

En las Tablas 16 y 17 se muestran los valores de concentración individuales obtenidos en las muestras empleadas como control de calidad así como la precisión y exactitud inter-secuencia en los estudios P3 y P4, respectivamente. Los resultados obtenidos permitieron aceptar los valores de las concentraciones obtenidas en todas las secuencias de análisis de ambos estudios.

Tabla 16. Valores de concentración (ng/mL) de elomotecan obtenidos en las muestras empleadas como controles de calidad preparadas en plasma de perro así como exactitud (% error) y precisión (CV %) inter-secuencia correspondientes al estudio a dosis única P3.

Secuencia	Concentración (ng/mL)		
	0.750 ng/mL	40.0 ng/mL	80.0 ng/mL
1	1.51*	38.6	72.6
1	0.861	34.6	65.7
2	0.695	37.1	74.3
2	0.646	34.1	93.6
Media	0.734	36.1	76.6
Error (%)	-2.13	-9.75	-4.31
D.E.	0.113	2.12	12.0
C.V. (%)	15.4	5.88	15.6

*Outlier. Test de Dixon. No se considera en la estadística

Tabla 17. Valores de concentración (ng/mL) de elomotecan obtenidos en las muestras empleadas como controles de calidad preparadas en plasma de perro así como exactitud (% error) y precisión (CV %) inter-secuencia correspondientes al estudio a dosis única P4.

Secuencia	Concentración (ng/mL)		
	0.750 ng/mL	40.0 ng/mL	80.0 ng/mL
1	0.809	36.5	69.9
1	0.618	44.5	80.0
2	0.695	37.1	74.3
2	0.646	34.1	93.6
Media	0.692	38.1	79.5
Error (%)	-7.73	-4.88	-0.688
D.E.	0.0842	4.49	10.3
C.V. (%)	12.2	11.8	13.0

Las muestras plasmáticas de los estudios a dosis repetidas en el perro P5, P6 y P7 fueron analizadas a partir del método On-line SPE-HPLC-MS/MS validado en dos, tres y once secuencias analíticas, respectivamente. En todas ellas, el intervalo de trabajo fue de 0.1 a 50 ng/mL. Las concentraciones recalculadas de las muestras de la curva de calibrado presentaron una exactitud de -3.05 a 1.45%, de -4.88 a 2.58% y de -3.13 a 4.05% en los estudios P5, P6 y P7, respectivamente. La precisión fue de 2.65 a 15.4%, de 2.39 a 6.85% y de 4.15 a 9.25% en los estudios P5, P6 y P7, respectivamente. Los coeficientes de correlación fueron de 0.997 a 0.998, de 0.997 a 0.999 y de 0.994 a 0.998 en los estudios P5, P6 y P7, respectivamente.

En las Tablas 18, 19 y 20 se muestran los valores de concentración individuales obtenidos en las muestras empleadas como control de calidad en los estudios P5, P6 y P7, respectivamente así como la precisión y exactitud inter-secuencia. En el estudio P5, se aplicó el test de Dixon ^[97] ($p < 0.05$) a los resultados obtenidos en el nivel inferior de concentración (0.3 ng/mL) de las muestras empleadas como control de calidad y se concluyó que el valor sospechoso era aberrante por lo que no se consideró para el cálculo ni de la precisión ni de la exactitud inter-secuencia. Los resultados obtenidos en la secuencia 2 del estudio P6, no se consideraron

ya que las muestras empleadas como controles de calidad no cumplieron el criterio de aceptación definido en el apartado 4.1.7 debido a un fallo analítico. Las muestras plasmáticas problema se analizaron en la secuencia analítica 3 ya que durante la validación de la metodología analítica se comprobó que las muestras plasmáticas podían sufrir hasta 3 ciclos de congelación/descongelación sin que esto afectará a los resultados obtenidos de elomotecan. En la estadística realizada en a partir de las muestras empleadas como control de calidad del estudio P7, se han incluido los valores aceptables y no aceptables y por ello, en el nivel inferior de concentración (0.3 ng/mL), la precisión fue de 18.0%. Si sólo se consideraran los valores de concentración de $\pm 15\%$ del valor nominal, la precisión sería de 9.51% y el error de -2.26%.

Tabla 18. Valores de concentración (ng/mL) de elomotecan obtenidos en las muestras empleadas como controles de calidad preparadas en plasma de perro así como exactitud (% error) y precisión (CV %) inter-secuencia correspondientes al estudio a dosis repetidas P5.

Secuencia	Concentración (ng/mL)		
	0.300 ng/mL	25.0 ng/mL	40.0 ng/mL
1	5.27*	25.6	39.6
1	0.272	24.5	39.2
2	0.308	24.9	38.9
2	0.285	24.8	40.0
Media	0.288	25.0	39.4
Error (%)	-3.89	-0.200	-1.44
D.E.	0.0182	0.465	0.479
C.V. (%)	6.32	1.87	1.21

*Outlier. Test de Dixon. No se considera en la estadística

Tabla 19. Valores de concentración (ng/mL) de elomotecan obtenidos en las muestras empleadas como controles de calidad preparadas en plasma de perro así como exactitud (% error) y precisión (CV %) inter-secuencia correspondientes al estudio a dosis repetidas P6.

Secuencia	Concentración (ng/mL)		
	0.300 ng/mL	25.0 ng/mL	40.0 ng/mL
1	0.298	23.9	37.8
1	0.268	25.5	38.3
2	0.296*	26.8*	39.2*
2	sl	sl	sl
3	0.326	25.3	40.0
3	0.299	25.9	41.2
Media	0.298	25.1	39.3
Error (%)	-0.750	0.450	-1.69
D.E.	0.0237	0.873	1.56
C.V. (%)	7.96	3.48	3.98

sl: Muestra perdida durante el análisis

*: Valor no considerado. Secuencia no aceptable

Tabla 20. Valores de concentración (ng/mL) de elomotecan obtenidos en las muestras empleadas como controles de calidad preparadas en plasma de perro así como exactitud (% error) y precisión (CV %) inter-secuencia correspondientes al estudio a dosis repetidas P7.

Secuencia	Concentración (ng/mL)		
	0.300 ng/mL	25.0 ng/mL	40.0 ng/mL
1	0.217	24.5	37.3
1	0.303	24.0	37.1
2	0.326	24.5	35.2
2	0.269	22.8	36.9
3	0.257	24.4	36.8
3	0.260	23.3	36.6
4	0.299	27.0	40.2
4	0.293	22.3	37.5
5	0.256	25.4	40.0
5	0.319	22.6	37.8
6	0.303	23.7	37.9
6	0.339	22.9	38.2
7	0.258	22.3	40.0
7	0.419	24.5	40.3
8	0.316	25.8	38.6
8	0.277	24.3	37.2
9	0.279	25.7	41.7
9	0.269	26.4	45.3
10	0.288	24.9	43.0
10	0.328	24.7	41.0
11	0.332	23.2	44.0
11	0.464	25.2	39.5
Media	0.303	24.29	39.19
Error (%)	1.08	-2.84	-2.03
D.E.	0.0546	1.32	2.60
C.V. (%)	18.0	5.42	6.62

5.1.2.4 RESULTADOS ANALÍTICOS MONO

Las muestras plasmáticas del estudio a dosis repetidas en el mono MK1 se analizaron en dos secuencias analíticas a partir del método On-line SPE-HPLC-MS/MS, que no fue validado en esta especie animal. El intervalo de trabajo fue de 0.1 a 500 ng/mL. En la Tabla 21 se muestran los valores de las concentraciones recalculadas de las curvas de calibrado preparadas en plasma de mono, exactitud y precisión inter-secuencia así como los coeficientes de correlación obtenidos en las secuencias de análisis.

En la Tabla 22 se muestra los valores de concentración individuales obtenidos en las muestras empleadas como control de calidad analizadas en el estudio MK1 así como la precisión (expresada como CV%) y exactitud (expresada como error %) del valor medio de concentración obtenido. Los valores de concentraciones de las muestras empleadas como control de calidad interpolados en la curva de calibrado promedio permitieron aceptar los resultados obtenidos en todas las secuencias analíticas (ver apartado 4.1.7).

Tabla 21. Valores re-calculados de concentración (ng/mL) de elomotecan obtenidos en las muestras de la curva de calibrado preparadas en plasma de mono, coeficiente de correlación (r) así como exactitud (% error) y precisión (CV %) inter-secuencia correspondientes al estudio a dosis repetidas en el mono MK1.

Secuencia	Concentración (ng/mL)								r
	0.100	0.500	1.00	5.00	10.0	100	250	500	
1	0.108	0.518	0.923	4.74	9.93	105	250	503	0.999
1	0.0914	0.520	1.02	4.99	10.1	99.4	253	490	
2	0.104	0.440	1.04	4.85	10.2	102	257	515	0.999
2	0.0963	0.521	1.05	4.79	9.97	101	248	477	
Media	0.100	0.500	1.01	4.84	10.1	102	252	496	0.999
Error (%)	-0.08	-0.05	0.83	-3.15	0.50	1.85	0.80	-0.75	
D.E.	0.007	0.040	0.058	0.108	0.124	2.36	3.92	16.4	
C.V. (%)	7.48	7.97	5.77	2.23	1.23	2.31	1.55	3.30	

Tabla 22. Valores de concentración (ng/mL) de elomotecan obtenidos en las muestras empleadas como controles de calidad preparadas en plasma de mono así como exactitud (% error) y precisión (CV %) inter-secuencia correspondientes al estudio a dosis repetidas en el mono MK1.

Secuencia	Concentración (ng/mL)		
	0.300 ng/mL	50.0 ng/mL	400 ng/mL
1	0.299	49.5	408
1	0.288	52.1	399
2	0.291	51.5	417
2	0.304	sl	415
Media	0.296	51.0	410
Error (%)	-1.50	2.07	2.44
D.E.	0.0073	1.361	8.14
C.V. (%)	2.48	2.67	1.99

sl: Muestra perdida durante el análisis

5.2 ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS Y FARMACOMETRÍA

5.2.1 ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN EL RATÓN

5.2.1.1 ESTUDIO DE DOSIS ÚNICA RT1

5.2.1.1.1 CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE ELOMOTECAN EN EL ESTUDIO RT1

Se obtuvieron y analizaron 110 muestras de las 120 posibles según el diseño experimental. En la Tabla 23 se muestran los valores de concentración plasmática de elomotecan obtenidos tras la administración del fármaco mediante un bolus intravenoso a la dosis de 1.75, 5.83, 8.75 y 17.5 mg/kg en ratones hembra atímicas. Se obtuvieron concentraciones superiores al límite de cuantificación desde el primer tiempo de muestreo (1 minuto) hasta el último tiempo de muestreo (24h). Sólo un animal que recibió la dosis más baja al tiempo de muestreo de 24 horas post administración presentó una concentración plasmática inferior al límite de cuantificación (0.1 ng/mL).

RESULTADOS

La Figura 22 muestra los perfiles superpuestos de las medianas (n=3) de las concentraciones plasmáticas de elomotecan respecto al tiempo tras la administración intravenosa del fármaco a la dosis de 1.75, 5.83, 8.75 y 17.5 mg/kg. Los perfiles obtenidos fueron similares para las diferentes dosis administradas y las concentraciones aumentaron con la dosis administrada.

Tabla 23. Valores individuales, promedios y medianas de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas tras la administración un bolus intravenoso del fármaco a las dosis de 1.75, 5.83, 8.75 y 17.5 mg/kg en ratones hembra atímicas del estudio RT1.

Dosis Teórica	Tiempo (h)	Concentración plasmática (ng/mL)						
		Replicado 1	Replicado 2	Replicado 3	Promedio	Mediana	D.E.	C.V. (%)
1.75 mg/ kg	0	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.0166	4610	4700	4370	4560	4610	171	3.74
	0.083	618	728	771	706	728	78.9	11.2
	0.25	488	345	463	432	463	76.4	17.7
	1	170	160	163	164	163	5.13	3.12
	2	76.4	66.0	129	90.5	76.4	33.8	37.3
	4	17.7	30.5	25.5	24.6	25.5	6.45	26.3
	8	2.10	3.20	3.83	3.04	3.20	0.88	28.8
	12	0.755	0.896	0.914	0.855	0.896	0.09	10.2
24	BQL	0.318	0.177	0.248	0.248	-	-	
5.83 mg/ kg	0	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.0166	36400	26000	23900	28767	26000	6694	23.3
	0.083	1920	2420	1580	1973	1920	423	21.4
	0.25	966	875	1120	987	966	124	12.5
	1	576	564	476	539	564	54.6	10.1
	2	262	280	246	263	262	17.0	6.48
	4	89.8	94.4	100	94.7	94.4	5.11	5.39
	8	9.02	14.4	16.9	13.4	14.4	4.03	30.0
	12	2.96	2.09	ne	2.53	2.53	0.615	24.4
24	0.187	0.223	0.212	0.207	0.212	0.018	8.90	
8.75 mg/ kg	0	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.0166	48200	32000	28000	36067	32000	10696	29.7
	0.083	5520	5060	6540	5707	5520	757	13.3
	0.25	1840	2410	ne	2125	2125	403	19.0
	1	919	1110	979	1003	979	97.7	9.74
	2	426	422	323	390	422	58.3	14.9
	4	202	163	ne	183	183	27.6	15.1
	8	18.1	19.3	27.9	21.8	19.3	5.35	24.6
	12	3.29	5.26	3.33	3.96	3.33	1.13	28.4
24	0.440	0.286	0.329	0.352	0.329	0.079	22.6	
17.5 mg/kg	0	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.0166	47500	57500	ne	52500	52500	7071	13.5
	0.25	3620	3720	5890	4410	3720	1283	29.1
	1	2080	1700	1930	1903	1930	191	10.1
	2	721	640	683	681	683	40.5	5.95
	4	391	423	441	418	423	25.3	6.05
	12	12.9	13.7	15.0	13.9	13.7	1.06	7.64
	24	1.33	1.52	1.78	1.54	1.52	0.23	14.6

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación
ne: Muestra no extraída

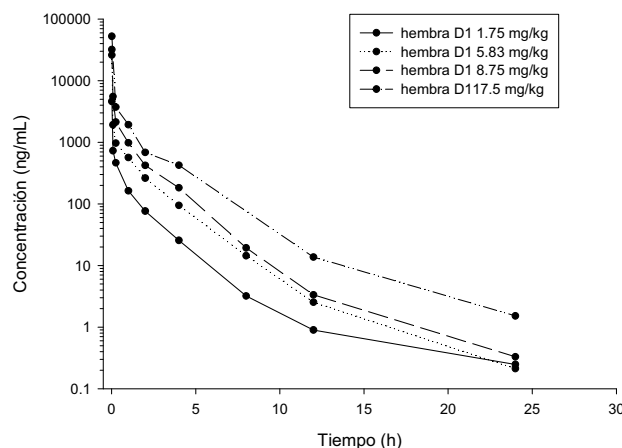


Figura 22. Perfiles superpuestos de las medianas (n=3) de las concentraciones plasmáticas de elomotecan frente al tiempo obtenidas tras la administración de un bolus intravenoso del fármaco a las dosis de 1.75, 5.83, 8.75 y 17.5 mg/kg en ratones hembra atímicas del estudio RT1.

5.2.1.1.2 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO NO COMPARTIMENTAL EN EL ESTUDIO RT1

En la Tabla 24 se muestran los valores de los parámetros farmacocinéticos calculados mediante la aproximación no compartimental a partir de la mediana (n=3) de los valores de la concentración para cada tiempo de muestreo y dosis.

La exposición fue determinada mediante el área bajo la curva (AUC) obteniéndose valores de 800.6, 3066, 5518 y 10810 (ng./mL)·h tras la administración de 1.75, 5.83, 8.75 y 17.5 mg/kg, respectivamente.

El área extrapolada fue de 0.024 a 0.122% indicando un muestreo adecuado para la estimación de la exposición del elomotecan en el ratón tras su administración a dosis única.

Tabla 24. Valores de los parámetros farmacocinéticos estimados a partir de las medianas de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas tras la administración de un bolus intravenoso del fármaco a las dosis de 1.75, 5.83, 8.75 y 17.5 mg/kg en ratones hembra del estudio RT1, con peso comprendido entre 20.1 a 27.2 gramos.

Dosis mg/kg	C _{max} * ng/mL	C _{max} */D -	AUC _t (ng/mL)·h	AUC (ng/mL)·h	AUC/D -	AUC extr. %	t _{1/2z} h	V _{ss} L·kg ⁻¹	CL L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹
1.75	4560	2606	799.6	800.6	457.5	0.122	1.38	2.36	2.19
5.83	28767	4934	3066	3066	526.0	0.025	2.74	2.03	1.90
8.75	36067	4122	5516	5518	630.6	0.024	2.83	1.58	1.59
17.5	52500	3000	10806	10810	617.7	0.031	2.26	2.49	1.62

* Valor correspondiente a C₀

5.2.1.2 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL EN EL RATÓN

El análisis farmacocinético poblacional en el ratón se realizó siguiendo el esquema de trabajo descrito en el apartado 4.3.2.

5.2.1.2.1 EXPLORACIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

Se analizaron simultáneamente las 110 concentraciones plasmáticas de elomotecan provenientes de la administración del fármaco mediante bolus intravenoso a las dosis de 1.75, 5.83, 8.75 y 17.5 mg/kg. La Figura 23 muestra todas las concentraciones plasmáticas normalizadas por la dosis en función del tiempo. La visualización de la gráfica sugiere un comportamiento farmacocinético lineal puesto que las concentraciones normalizadas por la dosis se superponen.

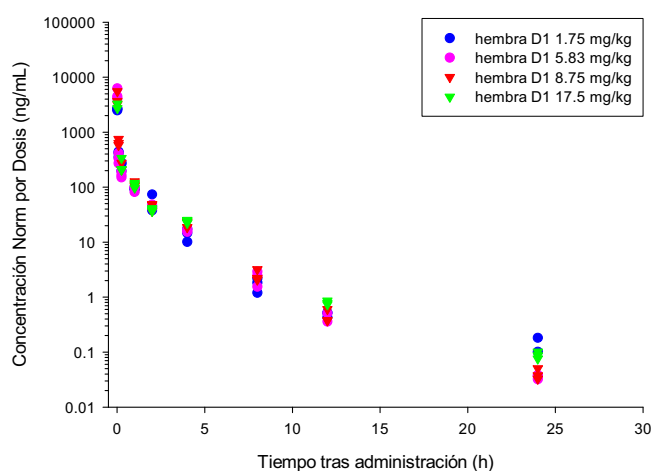


Figura 23. Concentraciones plasmáticas de elomotecan normalizadas por la dosis en función del tiempo obtenidas tras la administración de un bolus i.v. del fármaco a las dosis de 1.75, 5.83, 8.75 y 17.5 mg/kg en ratones hembra.

5.2.1.2.2 DESARROLLO DEL MODELO FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL

En la Tabla 25 se resume el desarrollo del modelo farmacocinético poblacional en el ratón. Se probaron los modelos abiertos de uno, dos y tres compartimentos con eliminación de primer orden desde el compartimento central. El modelo que mejor describió los datos de concentración plasmática de elomotecan frente al tiempo fue el modelo de tres compartimentos con eliminación de primer orden desde el compartimento central. La variabilidad interindividual se pudo incluir en el aclaramiento utilizando un modelo exponencial. La inclusión de las variabilidades interindividuales asociadas al volumen y al aclaramiento intercompartimental no mejoraron el modelo y por tanto no estaba justificada su inclusión en éste. El modelo de error residual fue el modelo aditivo para datos logotransformados. La estimación de los parámetros del modelo se efectuó con el método FOCEI.

Como covariables se ensayaron el peso del animal y la dosis administrada, expresada como variable continua y como variable categórica. La inclusión de la dosis o el peso del animal como covariable en el aclaramiento no resultó significativa en el modelo.

En la Figura 24 se muestra la distribución de los valores de los efectos aleatorios interindividuales (ETA's) asociados al aclaramiento plasmático. De acuerdo con dicha figura, la distribución está centrada aproximadamente alrededor de cero.

En las Figuras 25 y 26 se muestran los gráficos diagnósticos indicativos de la bondad de ajustado del modelo seleccionado a los datos experimentales. Los perfiles de concentraciones observadas vs tiempo, concentraciones individuales predichas vs tiempo y concentraciones poblacionales predichas vs tiempo fueron similares mostrando que el modelo describe adecuadamente los datos. Tanto los gráficos de concentraciones observadas vs concentraciones poblacionales como concentraciones observadas vs concentraciones individuales predichas mostraron una buena correlación con todos los datos agrupados alrededor de la línea de identidad. Los resultados de los IWRES y de los CWRES sugirieron una buena distribución de los datos experimentales y en ambos casos se observó una distribución aleatoria alrededor de cero. Como consecuencia, el modelo describe correctamente los datos experimentales tanto en lo que respecta a la parte estructural como estadística.

La estimación de los parámetros farmacocinéticos poblacionales y la precisión con la que han sido calculados se muestran en la Tabla 26. En todos los casos, la imprecisión fue inferior al 25% (RSE %) a excepción de la variabilidad interindividual asociada al CL que fue del 56%. La Tabla 27 muestra los valores de las microconstantes y macroconstantes calculados a partir de los parámetros obtenidos en el modelo farmacocinético poblacional final. El volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario fue de 0.0591 L y la semivida aparente de eliminación ($t_{1/2\gamma}$) fue de 3.63 horas.

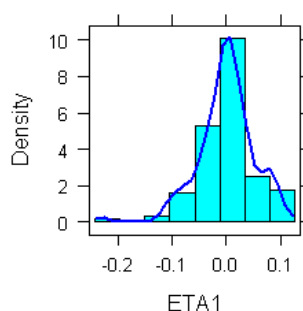


Figura 24. Distribución de los valores de los efectos aleatorios interindividuales asociados al CL (ETA1).

RESULTADOS

Tabla 25 (1ª parte). Resumen de las etapas de desarrollo del modelo farmacocinético poblacional en el ratón.

Secuencia	Estrategia	F. Objetiva	Comentarios	Decisión
RT1	Model IIV RE EM COV VAR	Monocomp CL Proporcional FOCEI - -	187.4 -	Incluir IIV V
RT2	Model IIV RE EM COV VAR	Monocomp CL, V Proporcional FOCEI - -	185.4 Disminucion 2.0 FOBJ No significativa	Incluir un nuevo compartimento
RT3	Model IIV RE EM COV VAR	Bicomp CL Proporcional FOCEI - -	-25.6 Disminucion 207 AIC Significativa RT3 modelo referencia	Incluir IIV V1
RT4	Model IIV RE EM COV VAR	Bicomp CL, V Proporcional FOCEI - -	-15.7 Aumenta FOBJ	Incluir IIV V2
RT5	Model IIV RE EM COV VAR	Bicomp CL, V2 Proporcional FOCEI - -	54.6 Aumenta FOBJ	Incluir IIV Q
RT6	Model IIV RE EM COV VAR	Bicomp CL, Q Proporcional FOCEI - -	-25.6 No mejora FOBJ	Incluir un nuevo compartimento
RT7	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL Proporcional FOCEI - -	-174.8 Disminucion 145.2 AIC Significativa RT7 modelo referencia	Incluir IIV V1
RT8	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V1 Proporcional FOCEI - -	-174.8 No mejora FOBJ	Incluir IIV V2
RT9	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V2 Proporcional FOCEI - -	-174.8 No mejora FOBJ	Incluir IIV V3
RT10	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V3 Proporcional FOCEI - -	-181.3 Disminucion 6.5 FOBJ Precision IIV CI 330%	Incluir IIV Q2
RT11	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, Q2 Proporcional FOCEI - -	-174.8 No mejora FOBJ	Incluir IIV Q3

IIV: Variabilidad interindividual

EM: Método de estimación. FOCEI First Order Conditional Estimation with ϵ - η Interaction

COV: Covariable

VAR: Covarianza entre variabilidades interindividuales

Tabla 25 (2ª parte). Resumen de las etapas de desarrollo del modelo farmacocinético poblacional en el ratón.

Secuencia	Model	Estrategia	F. Objetiva	Comentarios	Decisión
RT12	Model	Tricomp	-179.4	Disminucion 4.6 FOBJ Precision IIV CI 220%	Fijar error residual 15% (límite metódica analítica)
	IIV	CL, Q3			
	RE	Proporcional			
	EM	FOCEI			
	COV	-			
	VAR	-			
RT13	Model	Tricomp	-154.0	Aumenta FOBJ	Selección RT7 como modelo Base ETA shrinkage 46.3% EPS shrinkage 15.4% Incluir Dosis como covariable
	IIV	CL			
	RE	Proporcional			
	EM	FOCEI			
	COV	-			
	VAR	-			
RT14	Model	Tricomp	-174.2	Aumenta FOBJ No efecto de la Dosis en CI	Selección RT7 como modelo Final
	IIV	CL			
	RE	Proporcional			
	EM	FOCEI			
	COV	Dose			
	VAR	-			

IIV: Variabilidad interindividual

EM: Método de estimación. FOCEI First Order Conditional Estimation with ϵ - η Interaction

COV: Covariable

VAR: Covarianza entre variabilidades interindividuales

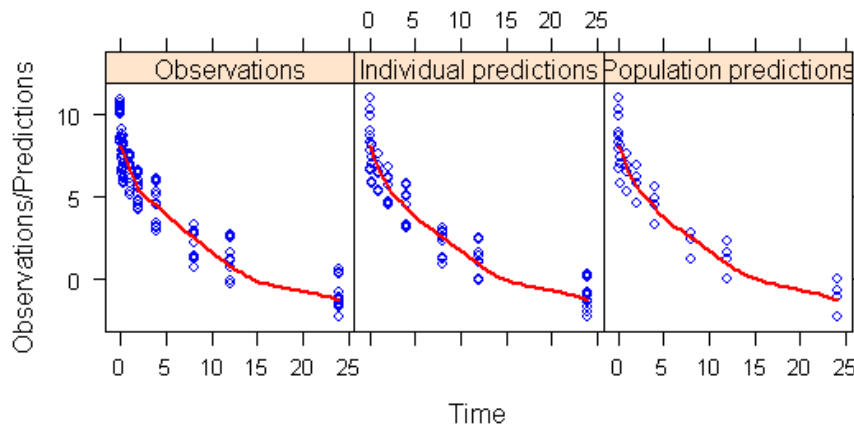


Figura 25. Gráficas de bondad de ajustado correspondientes al modelo farmacocinético final en el ratón. Perfiles de concentraciones observadas vs tiempo, concentraciones individuales predichas vs tiempo y concentraciones poblacionales predichas vs tiempo.

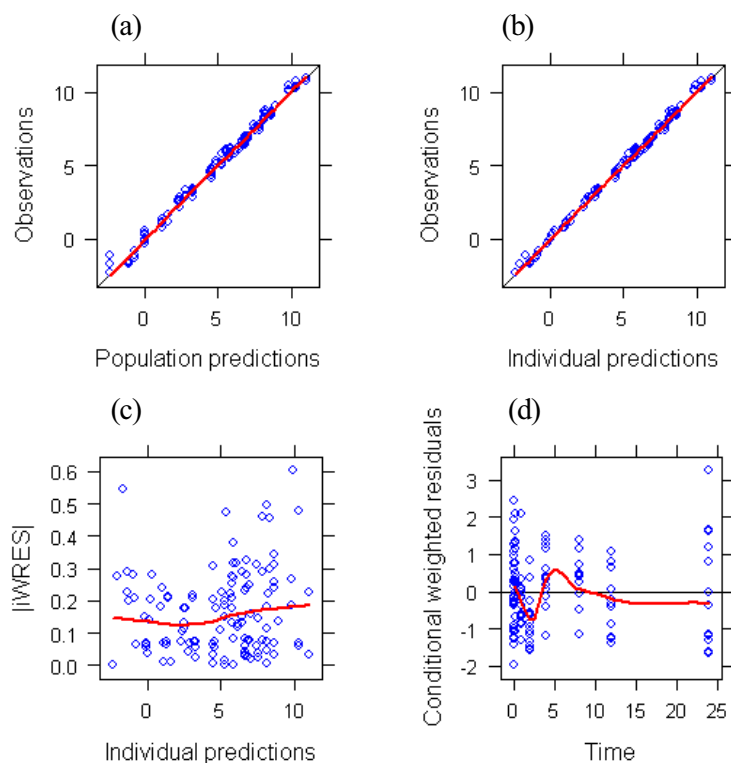


Figura 26. Gráficas de bondad de ajustado correspondientes al modelo farmacocinético final en el ratón. (a) conc. experimentales respecto a las conc. predichas poblacionales. (b) conc. experimentales respecto a las conc. individuales predichas (c) residuales individuales ponderados respecto a las conc. individuales predichas y (d) residuales ponderados condicionales respecto al tiempo.

Tabla 26. Parámetros farmacocinéticos poblacionales estimados a partir del modelo farmacocinético poblacional final en el ratón y precisión en su estimación (RSE %).

Parámetro	Valor	RSE (%)	
CL	L/h	0.0501	3.1
V1	L	0.004	10.3
Q2	L/h	0.0979	9.1
V2	L	0.0456	6.1
Q3	L/h	0.0019	20.9
V3	L	0.0095	14.7
IIV _{CL}	%	9.6	56.0
Error residual	%	25.0	22.0

Tabla 27. Parámetros farmacocinéticos expresados como microconstantes y macroconstantes de disposición en el ratón calculados a partir de los parámetros obtenidos en el modelo poblacional.

Parámetro	Valor
K	1/h 12.5
K ₁₂	1/h 24.5
K ₂₁	1/h 2.15
K ₁₃	1/h 0.475
K ₃₁	1/h 0.200
α	1/h 38.9
β	1/h 0.724
γ	1/h 0.191
t _{1/2α}	h 0.0178
t _{1/2β}	h 0.957
t _{1/2γ}	h 3.63
V _{ss}	L 0.0591

5.2.1.2.3 EVALUACIÓN DEL MODELO FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL

La evaluación del modelo farmacocinético poblacional se realizó mediante la predicción corregida de la evaluación predictiva visual (pc-VPC, prediction corrected Visual Predictive Check) indicando un adecuado comportamiento predictivo del mismo. La Figura 27 muestra pc-VPC para el modelo poblacional final en el ratón. La mediana de las concentraciones observadas así como los percentiles 2.5 y 97.5% de los datos observados quedaron incluidos dentro de las bandas correspondientes a los intervalos de confianza del 95% y los percentiles 2.5 y 97.5% de los datos simulados, respectivamente. Sin embargo, el modelo parece infraprededir los valores de concentración máxima.

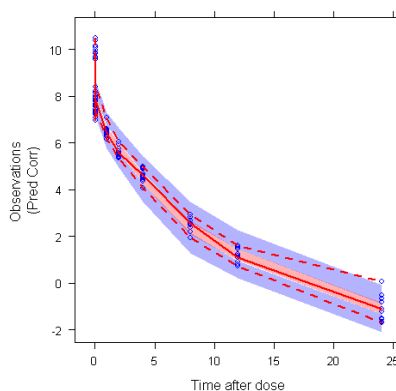


Figura 27. pc-VPC de las concentraciones de elomotecan frente al tiempo del modelo farmacocinético poblacional final del ratón. Los círculos corresponden a los datos experimentales. La línea roja continua corresponde a la mediana y las discontinuas corresponden al percentil 2.5 y 97.5% de las concentraciones observadas. Las áreas azules corresponden al IC del 95% del percentil 2.5 y 97.5% y el área roja corresponde al IC del 95% de la mediana de los perfiles de datos simulados.

5.2.1.3 PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS EN EL RATÓN

En la Tabla 28 se muestran los valores de los principales parámetros farmacocinéticos estimados tras el análisis no compartimental (valor mínimo y máximo) y el análisis poblacional de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas tras la administración del fármaco mediante bolus intravenoso a las dosis de 1.75, 5.83, 8.75 y 17.5 mg/kg a ratones hembra atímicas. Los valores del aclaramiento (CL) y del volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario (V_{SS}) tras el análisis poblacional de los datos observados están en concordancia con los valores observados en el análisis no compartimental. La semivida de eliminación estimada mediante la aproximación no compartimental es inferior al valor estimado mediante la aproximación poblacional, posiblemente debido a que en la estimación de la constante de eliminación de la fase terminal mediante el análisis no compartimental, no corresponde sólo a la constante γ , sino que refleja un proceso de disposición híbrido entre las fases β y γ .

Tabla 28. Valores de los principales parámetros farmacocinéticos estimados a partir del análisis no compartimental y poblacional de las concentraciones plasmáticas obtenidas tras la administración i.v. del elomotecan a ratones hembra atímicas del estudio RT1.

Parámetro		Análisis	
		No Compartimental	Poblacional
CL	L/h	0.0396 - 0.0546	0.0501
V_{SS}	L	0.0395 - 0.0623	0.0591
$t_{1/2\gamma}$	h	1.38 - 2.83	3.63

5.2.2 ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN LA RATA

5.2.2.1 ESTUDIO DE DOSIS ÚNICA R1

5.2.2.1.1 CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE ELOMOTECAN EN EL ESTUDIO R1

Se obtuvieron y analizaron todas las muestras establecidas en el diseño experimental. En las Tablas 29 y 30 se muestran los valores de concentración plasmática de elomotecan obtenidos tras la administración del fármaco en la rata a la dosis de 10 mg/kg mediante bolus intravenoso y vía oral, respectivamente. Se obtuvo concentraciones superiores al límite de cuantificación desde el primer tiempo de muestreo (1 minuto) hasta el último (28h).

Al disponerse sólo de dos valores de concentración por cada tiempo de muestreo, los valores de concentración promedio coincidieron con la mediana. En la Figura 28 se muestran los perfiles de las concentraciones plasmáticas promedio respecto al tiempo tras la administración del elomotecan a la dosis de 10 mg/kg por vía i.v. y p.o. Puesto que la C_{max} tras la

administración oral no pasó por la curva observada tras la administración intravenosa del fármaco, sugirió una baja disponibilidad oral del fármaco.

Tabla 29. Valores individuales y promedios de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas tras la administración de un bolus intravenoso del fármaco a la dosis de 10 mg/kg en ratas macho del estudio R1.

Dosis Teórica	Tiempo (h)	Concentración plasmática (ng/mL)								Promedio	D.E.	C.V. (%)
		Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Rata 6	Rata 7	Rata 8			
10 mg/ kg intravenosa	0	BQL	-	-	-	BQL	-	-	-	0.000	-	-
	0.0166	-	76300	-	-	-	73500	-	-	74900	1980	2.64
	0.1	-	-	13400	-	-	-	8480	-	10940	3479	31.8
	0.333	-	-	-	2350	-	-	-	2360	2355	7.07	0.30
	0.75	1800	-	-	-	1210	-	-	-	1505	417	27.7
	2	-	680.0	-	-	-	924.0	-	-	802	173	21.5
	4	-	-	299	-	-	-	281	-	290	12.7	4.39
	7	-	-	-	82.8	-	-	-	151	117	48.2	41.3
	10	22.30	-	-	-	15.00	-	-	-	18.7	5.16	27.7
	12	-	15.9	-	-	-	24.9	-	-	20.4	6.36	31.2
	22	-	-	1.35	-	-	-	1.09	-	1.22	0.18	15.1
28	-	-	-	0.68	-	-	-	1.09	0.89	0.29	32.8	

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación

-Muestra no obtenida

Tabla 30. Valores individuales y promedios de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas tras la administración de un bolus oral del fármaco a la dosis de 10 mg/kg en ratas macho del estudio R1.

Dosis Teórica	Tiempo (h)	Concentración plasmática (ng/mL)								Promedio	D.E.	C.V. (%)
		Rata 9	Rata 10	Rata 11	Rata 12	Rata 13	Rata 14	Rata 15	Rata 16			
10 mg/ kg Oral	0	BQL	-	-	-	BQL	-	-	-	0.000	-	-
	0.083	-	1.55	-	-	-	6.19	-	-	3.9	3	84.78
	0.25	-	-	36	-	-	-	42.6	-	39.3	5	11.9
	0.5	-	-	-	78.7	-	-	-	48.0	63.4	21.71	34.27
	1	30.6	-	-	-	37.9	-	-	-	34.3	5	15.1
	2	-	31.9	-	-	-	27.6	-	-	29.8	3	10.2
	4	-	-	12.1	-	-	-	33	-	22.6	14.8	65.54
	6	-	-	-	33.3	-	-	-	23.7	28.5	6.8	23.8
	9	22.80	-	-	-	17.00	-	-	-	19.9	4.10	20.6
	11	-	46.7	-	-	-	9.65	-	-	28.2	26.20	93.0
	22	-	-	1.11	-	-	-	4.84	-	2.98	2.64	88.7
28	-	-	-	11.8	-	-	-	6.46	9.13	3.78	41.4	

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación

-Muestra no obtenida

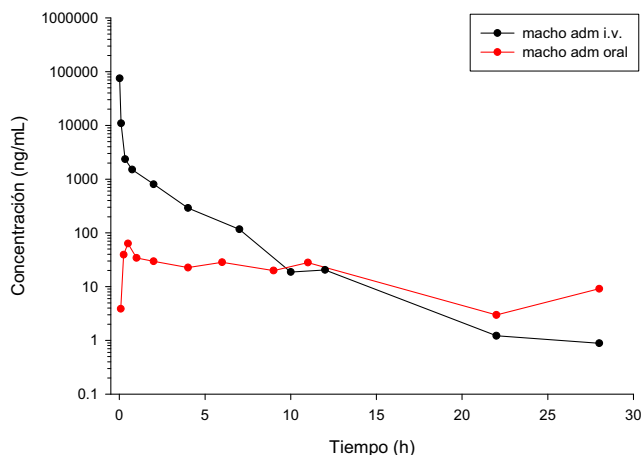


Figura 28. Perfiles superpuestos de los promedios (n=2) de las concentraciones plasmáticas de elomotecan frente al tiempo obtenidas tras la administración de un bolus intravenoso y oral del fármaco a la dosis de 10 mg/kg en ratas macho del estudio R1.

5.2.2.1.2 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO NO COMPARTIMENTAL EN EL ESTUDIO R1

En la Tabla 31 se muestra los valores de los parámetros farmacocinéticos calculados mediante la aproximación no compartimental a partir de los valores promedios de concentración (n=2) para cada tiempo de muestreo y vía de administración.

La exposición fue determinada mediante el área bajo la curva (AUC) obteniéndose valores de 9657.0 y 513 ng·h/mL tras la administración de 10 mg/kg de elomotecan por vía intravenosa y oral, respectivamente.

La concentración máxima de elomotecan por vía oral se alcanzó a los 30 minutos de su administración. La biodisponibilidad tras la administración oral del elomotecan fue muy baja (5.3%) por lo que se descartó la administración oral del compuesto en la rata.

Tabla 31. Valores de los parámetros farmacocinéticos estimados a partir de los valores promedios de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas tras la administración de un bolus intravenoso y oral del fármaco a la dosis de 10 mg/kg en ratas macho del estudio R1.

Dosis mg/kg	C _{max} ng/mL	C _{max} /D	AUC (ng/mL)·h	AUC/D	AUC extr. %	t _{1/2z} h	V _{ss} L·kg ⁻¹	CL L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹	F %
10 i.v.	110148*	11015	9657	965.7	0.032	3.38	1.36	1.1	-
10 oral	63.4	6.34	513	51.3	11.3	8.32	-	-	5.3

* Valor correspondiente a C₀

5.2.2.2 ESTUDIO DE DOSIS ÚNICA R2

5.2.2.2.1 CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE ELOMOTECAN EN EL ESTUDIO R2

Se obtuvieron y analizaron todas las muestras establecidas en el diseño experimental. En las Tablas 32 y 33 se muestran los valores de concentración de elomotecan obtenidos tras la administración de un bolus i.v. del fármaco a la dosis de 1 mg/kg usando los vehículos 1 y 2, respectivamente (ver composición en el apartado 4.2.1). Se obtuvo concentraciones superiores al límite de cuantificación desde el primer tiempo de muestreo (1 minuto) hasta el último (11h) en ambas formulaciones.

Al disponerse sólo de dos valores de concentración por cada tiempo de muestreo, los valores de concentración promedio coincidieron con la mediana. En la Figura 29 se muestran las concentraciones plasmáticas promedio respecto al tiempo tras la administración del elomotecan en el vehículo 1 y 2 o a la dosis de 1 mg/kg por bolus intravenoso en ratas macho. Aunque la concentración en el primer minuto fue superior tras la administración del elomotecan en el vehículo 1, el perfil obtenido en ambas prácticamente se superpuso.

Tabla 32. Valores individuales y promedios de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas tras la administración de un bolus intravenoso del fármaco en el vehículo 1 a la dosis de 1 mg/kg en ratas macho del estudio R2.

Dosis Teórica	Concentración plasmática (ng/mL)									
	Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Rata 6	Promedio	D.E.	C.V. (%)
1 mg/kg vehículo 1: 20% (p/p) HPBC	0	BQL	-	-	BQL	-	-	0.000	-	-
	0.0166	-	5390	-	-	3830	-	4610	1103	23.9
	0.1	-	-	484	-	-	439	462	31.8	6.89
	0.333	206	-	-	149	-	-	178	40.3	22.7
	1	-	59.7	-	-	61.0	-	60.4	0.919	1.52
	2	-	-	29.0	-	-	55.8	42.4	19.0	44.7
	3	16.2	-	-	14.1	-	-	15.2	1.48	9.80
	8	-	4.73	-	-	3.58	-	4.16	0.813	19.6
	11	-	-	1.30	-	-	3.36	2.33	1.46	62.5

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación
-Muestra no obtenida

Tabla 33. Valores individuales y promedios de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas tras la administración de un bolus intravenoso del fármaco en el vehículo 2 a la dosis de 1 mg/kg en ratas macho del estudio R2.

Dosis Teórica	Concentración plasmática (ng/mL)									
	Tiempo (h)	Rata 7	Rata 8	Rata 9	Rata 10	Rata 11	Rata 12	Promedio	D.E.	C.V. (%)
1 mg/kg vehículo 2: PEG-PPG-L	0	BQL	-	-	BQL	-	-	0.000	-	-
	0.0166	-	1680	-	-	2690	-	2185.0	714	32.7
	0.1	-	-	476	-	-	603	539.5	89.8	16.6
	0.333	221	-	-	136	-	-	178.5	60.1	33.7
	1	-	88.8	-	-	119	-	103.9	21.4	20.6
	2	-	-	36.0	-	-	54.8	45.4	13.3	29.3
	3	23.4	-	-	18.1	-	-	20.8	3.75	18.1
	8	-	5.59	-	-	8.81	-	7.20	2.28	31.6
	11	-	-	1.72	-	-	3.08	2.40	0.962	40.1

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación
-Muestra no obtenida

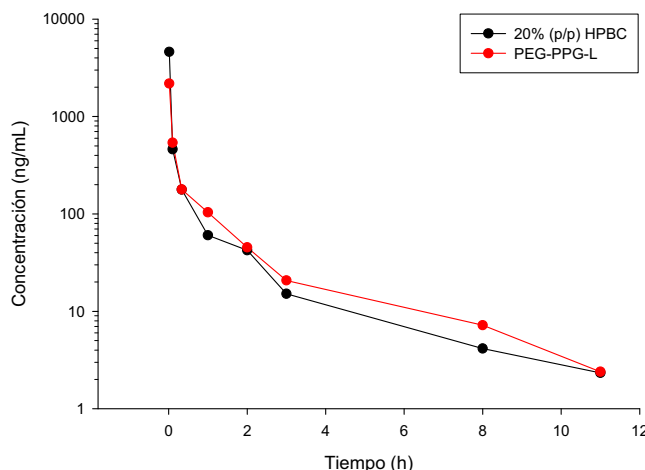


Figura 29. Perfiles superpuestos de los promedios (n=2) de las concentraciones plasmáticas de elomotecan frente al tiempo obtenidas tras la administración de un bolus intravenoso del fármaco a la dosis de 1 mg/kg en el vehículo 1 (línea negra) y 2 (línea roja) en ratas macho del estudio R2.

5.2.2.2 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO NO COMPARTIMENTAL EN EL ESTUDIO R2

En la Tabla 34 se muestran los valores de los parámetros farmacocinéticos calculados mediante la aproximación no compartimental a partir de los valores promedios de concentración (n=2) para cada tiempo de muestreo y vehículo.

Los valores de la exposición, determinada mediante el área bajo la curva (AUC), aclaramiento (CL) y semivida aparente de eliminación fueron similares tras la administración de elomotecan en ambos vehículos. Así, el uso de una solución del 20% (p/p) hidroxipropil-beta-ciclodextrina con 0.18%(p/p) NaCl ajustado a pH 3.1 ± 0.1 y una solución de propilenglicol : polioxietilenglicol 400 : ácido láctico (85% en agua) : ácido acético 1 N : agua (4:4:4:2:86) aparentemente no influyó en el perfil farmacocinético tras su administración intravenosa en ratas pero sí parece que influyó en la magnitud de la distribución ya que el valor del volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario (V_{ss}) fue de 2.28 y 3.26 L/kg, respectivamente.

Tabla 34. Valores de los parámetros farmacocinéticos estimados a partir de los valores promedios de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas tras la administración de un bolus intravenoso de elomotecan en el vehículo 1 y 2 en ratas macho del estudio R2.

Dosis mg/kg	C_{max}^* ng/ml	C_{max}/D -	AUC (ng/ml)·h	AUC/D -	AUC extr. %	$t_{1/2z}$ h	V_{ss} l·kg ⁻¹	CL l·kg ⁻¹ ·h ⁻¹
1 vehículo 1	7153	7153	599.7	599.7	0.90	1.94	2.28	1.72
1 vehículo 2	2892	2892	567.2	567.2	1.10	1.85	3.26	1.79

* Valor correspondiente a C_0

5.2.2.3 ESTUDIO DE DOSIS REPETIDAS R3

5.2.2.3.1 CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE ELOMOTECAN EN EL ESTUDIO R3

Se obtuvieron y analizaron 215 de las 216 muestras establecidas en el diseño experimental. En las Tablas 35 y 36 se muestran los valores de concentración plasmática de elomotecan obtenidos tras la administración diaria del fármaco por infusión de 10 minutos a la dosis de 0.0125, 0.05 o 0.2mg/kg/día durante 1 y 5 días en ratas macho y hembra, respectivamente. Se obtuvieron valores superiores al límite de cuantificación desde el tiempo 0.05h a 3h post administración en la dosis de 0.0125 mg/kg/día y de 0.05 a 8h post administración en la dosis de 0.05 y 0.2mg/kg/día.

La Figura 30 muestra de forma comparativa la mediana ($n=3$) de las concentraciones plasmáticas de elomotecan respecto al tiempo a las diferentes dosis administradas para machos (a) y hembras (b). Los perfiles de la concentración mediana respecto al tiempo fueron similares el día 1 y el día 5 de la administración tanto en machos como en hembras a las diferentes dosis estudiadas. Sin embargo, a la dosis de 0.05 mg/kg/día el primer día de administración, el perfil de la concentración mediana respecto al tiempo se consideró anómalo para ambos sexos ya que la mediana de la concentración a las 8 horas fue superior que a las 3 horas post administración para machos y la mediana de la concentración a las 3 horas fue especialmente baja para hembras.

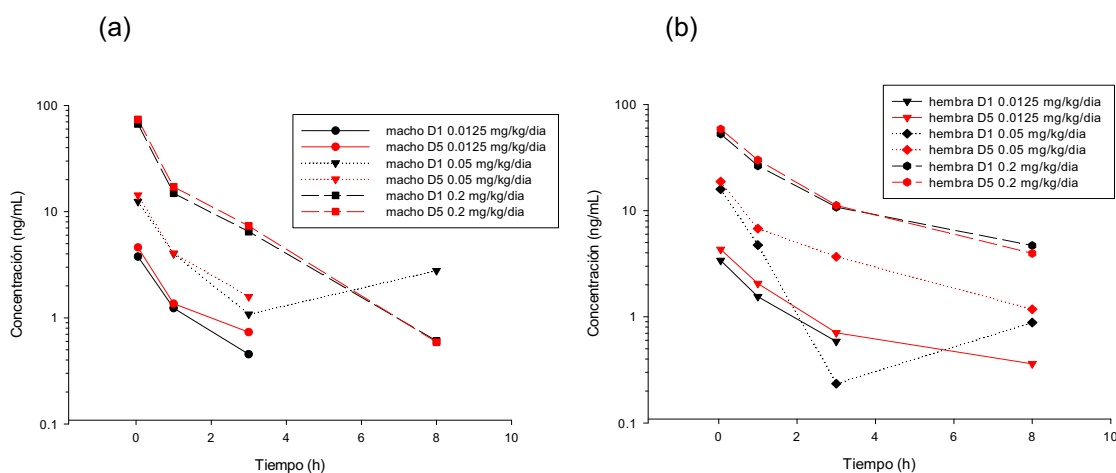


Figura 30. Perfiles superpuestos de las medianas ($n=3$) de las concentraciones plasmáticas de elomotecan frente al tiempo, obtenidas los días 1 y 5 tras la administración diaria del fármaco por infusión de 10 minutos a las dosis de 0.0125, 0.05 y 0.2 mg/kg/día durante 5 días en ratas macho (a) y ratas hembra (b) del estudio R3.

RESULTADOS

Tabla 35. Valores individuales, promedios y medianas de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas el día 1 y el día 5 tras la administración diaria del fármaco por infusión de 10 minutos a las dosis de 0.0125, 0.05 y 0.2 mg/kg/día en ratas macho del estudio R3.

Dosis Teórica	Tiempo (h)	Concentración plasmática (ng/mL)									
		Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Rata 6	Promedio	Mediana	D.E.	C.V. (%)
0.0125 mg/kg/día Día 1	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	4.56	3.11	3.77	3.81	3.77	0.726	19.0
	1	1.24	0.862	1.23	-	-	-	1.11	1.23	0.215	19.4
	3	-	-	-	0.343	0.454	0.482	0.426	0.454	0.074	17.2
	8	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
0.0125 mg/kg/día Día 5	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	4.60	4.15	4.89	4.55	4.60	0.373	8.2
	1	1.42	1.36	1.01	-	-	-	1.26	1.36	0.221	17.5
	3	-	-	-	0.558	0.731	0.749	0.679	0.731	0.105	15.5
	8	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
0.05 mg/kg/día Día 1	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	ne	13.6	11.3	12.5	12.5	1.63	13.1
	1	1.42	4.02	4.50	-	-	-	3.31	4.02	1.66	50.0
	3	-	-	-	0.915	1.08	1.60	1.20	1.08	0.358	29.8
	8	4.70	2.78	BQL	-	-	-	2.49	2.78	2.36	94.8
0.05 mg/kg/día Día 5	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	19.20	12.40	14.30	15.3	14.3	3.51	22.9
	1	3.92	4.16	4.05	-	-	-	4.04	4.05	0.12	3.0
	3	-	-	-	1.54	1.58	2.30	1.81	1.58	0.428	23.7
	8	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
0.2 mg/kg/día Día 1	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	65.7	72.9	67.0	68.5	67.0	3.84	5.6
	1	5.85	14.9	16.2	-	-	-	12.3	14.9	5.64	45.8
	3	-	-	-	6.46	7.57	6.48	6.84	6.48	0.635	9.3
	8	0.463	0.648	0.606	-	-	-	0.572	0.606	0.0970	16.9
0.2 mg/kg/día Día 5	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	73.9	85.6	69.1	76.2	73.9	8.49	11.1
	1	13.0	20.2	17.1	-	-	-	16.8	17.1	3.61	21.5
	3	-	-	-	7.33	8.16	6.74	7.41	7.33	0.713	9.6
	8	0.320	0.589	0.743	-	-	-	0.551	0.589	0.214	38.9
24	-	-	-	BQL	BQL	BQL	0.000	-	-	-	

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación

ne: Muestra no extraída

-Muestra no obtenida

Tabla 36. Valores individuales, promedios y medianas de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas el día 1 y el día 5 tras la administración diaria del fármaco por infusión de 10 minutos a las dosis de 0.0125, 0.05 y 0.2 mg/kg/día en ratas hembra del estudio R3.

Dosis Teórica	Tiempo (h)	Concentración plasmática (ng/mL)									
		Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Rata 6	Promedio	Mediana	D.E.	C.V. (%)
0.0125 mg/kg/día Día 1	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	4.33	3.40	3.29	3.67	3.40	0.571	15.6
	1	1.55	1.51	1.72	-	-	-	1.59	1.55	0.112	7.00
	3	-	-	-	0.793	0.584	0.586	0.654	0.586	0.120	18.4
	8	BQL	0.310	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
0.0125 mg/kg/día Día 5	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	4.89	4.31	3.59	4.26	4.31	0.651	15.3
	1	1.53	2.06	2.40	-	-	-	2.00	2.06	0.438	22.0
	3	-	-	-	0.708	0.698	0.905	0.770	0.708	0.117	15.2
	8	BQL	0.361	0.394	-	-	-	0.378	0.361	0.023	6.2
0.05 mg/kg/día Día 1	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	15.9	16.0	14.7	15.5	15.9	0.723	4.7
	1	4.73	1.91	7.23	-	-	-	4.62	4.73	2.66	57.6
	3	-	-	-	2.88	0.234	0.166	1.09	0.234	1.55	142
	8	0.366	1.13	0.884	-	-	-	0.793	0.884	0.390	49.2
0.05 mg/kg/día Día 5	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	18.8	20.6	14.6	18.0	18.8	3.08	17.1
	1	4.80	8.14	6.77	-	-	-	6.57	6.77	1.68	25.6
	3	-	-	-	3.68	3.92	2.99	3.53	3.68	0.483	13.7
	8	0.482	1.18	1.23	-	-	-	0.964	1.18	0.418	43.4
0.2 mg/kg/día Día 1	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	52.70	55.1	44.7	50.8	52.7	5.45	10.7
	1	26.5	31.9	24.9	-	-	-	27.8	26.5	3.67	13.2
	3	-	-	-	11.6	8.45	10.8	10.3	10.8	1.64	15.9
	8	4.69	5.25	3.47	-	-	-	4.47	4.69	0.910	20.4
0.2 mg/kg/día Día 5	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	58.7	64.6	54.6	59.3	58.7	5.03	8.5
	1	30.0	31.7	27.8	-	-	-	29.8	30.0	1.96	6.6
	3	-	-	-	11.2	9.53	11.5	10.7	11.2	1.06	9.9
	8	4.66	3.96	2.96	-	-	-	3.86	3.96	0.854	22.1
0.2 mg/kg/día Día 5	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	58.7	64.6	54.6	59.3	58.7	5.03	8.5
	1	30.0	31.7	27.8	-	-	-	29.8	30.0	1.96	6.6
	3	-	-	-	11.2	9.53	11.5	10.7	11.2	1.06	9.9
	8	4.66	3.96	2.96	-	-	-	3.86	3.96	0.854	22.1

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación

-Muestra no obtenida

5.2.2.3.2 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO NO COMPARTIMENTAL EN EL ESTUDIO R3

En la Tabla 37 se muestran los valores de los parámetros farmacocinéticos calculados mediante la aproximación no compartimental a partir de la mediana (n=3) de los valores de la concentración para cada tiempo de muestreo y dosis en ratas machos y hembras. El perfil anómalo observado tras la primera administración a la dosis de 0.05mg/kg/día en ambos sexos causó que la fase terminal no pudiera determinarse adecuadamente y en consecuencia, los valores de los parámetros farmacocinéticos no pudieron determinarse.

En ambos sexos, los valores de C_{max} observados el día 5 fueron ligeramente superiores a los observados el día 1. No se apreciaron diferencias relevantes entre ambos sexos. El aclaramiento (CL) fue ligeramente superior en ratas macho que en hembras. La semivida aparente de eliminación fue similar el día 1 y el día 5 de administración.

En la Tabla 38 se muestran los índices de acumulación del elomotecan a las diferentes dosis ensayadas. Los resultados obtenidos sugieren que no existe acumulación del fármaco ni en machos ni en hembras tras la administración diaria durante 5 días del elomotecan por infusión de 10 minutos a la dosis de 0.0125, 0.05 o 0.2mg/kg/día.

Tabla 37. Valores de los parámetros farmacocinéticos estimados a partir de la mediana de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas los días 1 y 5 tras la administración diaria del fármaco por infusión de 10 minutos a las dosis de 0.0125, 0.05 y 0.2 mg/kg/día durante 5 días en ratas macho y hembra del estudio R3.

	Dosis mg/kg/día	C_{max} ng/mL	C_{max}/D -	AUC_t (ng/mL)·h	AUC (ng/mL)·h	AUC/D -	AUC extr. %	$t_{1/2z}$ h	V_{ss} L·kg ⁻¹	CL L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹
Machos Día 1	0.0125	3.77	302	3.81	4.41	353	13.8	1.01	3.31	2.27
	0.05*	12.5	250	20.4	-	-	-	-	-	-
	0.2	67.0	335	67.2	68.6	343	2.0	1.51	4.57	2.60
Machos Día 5	0.0125	4.60	368	4.67	5.92	474	19.3	1.21	3.39	1.89
	0.05	14.3	286	13.3	15.6	311	13.1	0.98	4.31	3.02
	0.2	73.9	370	75.2	76.4	382	1.6	1.43	4.31	2.54
Hembras Día 1	0.0125	3.40	272	4.30	5.27	422	18.4	1.20	3.30	1.90
	0.05*	15.9	318	14.6	-	-	-	-	-	-
	0.2	52.7	264	109	128	640	14.7	2.99	5.45	1.40
Hembras Día 5	0.0125	4.31	345	8.11	9.62	770	15.1	3.06	4.56	1.17
	0.05	18.8	376	32.8	37.5	750	12.6	2.83	4.54	1.25
	0.2	58.7	294	115	129	646	10.5	2.53	4.93	1.50

* Pendiente de la fase terminal no pudo ser determinada

Tabla 38. Índices de acumulación obtenidos el día 5 tras la administración diaria del elomotecan por infusión de 10 minutos a las dosis de 0.0125, 0.05 y 0.2 mg/kg/día en ratas macho y hembra del estudio R3.

	Dosis mg/kg/día	C _{max} ng/mL	R _{acCmax}	AUC (ng/mL)·h	R _{acAUC}
Machos Día 1	0.0125	3.77		4.41	
	0.05*	12.5		-	
	0.2	67.0		68.6	
Machos Día 5	0.0125	4.60	1.2	5.92	1.3
	0.05	14.3	1.1	15.6	-
	0.2	73.9	1.1	76.4	1.1
Hembras Día 1	0.0125	3.40		5.27	
	0.05*	15.9		-	
	0.2	52.7		128	
Hembras Día 5	0.0125	4.31	1.3	9.62	1.8
	0.05	18.8	1.2	37.5	-
	0.2	58.7	1.1	129	1.0

5.2.2.4 ESTUDIO DE DOSIS REPETIDAS R4

5.2.2.4.1 CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE ELOMOTECAN EN EL ESTUDIO R4

Sólo dos muestras de las 216 establecidas en el diseño experimental no se pudieron analizar debido a problemas durante la extracción. Las Tablas 39 y 40 muestran los valores de concentración plasmática de elomotecan obtenidos tras la administración diaria del fármaco por infusión de 10 minutos a las dosis de 0.0125, 0.05 o 0.2mg/kg/día durante 1 y 28 días en ratas macho y hembra, respectivamente. Se obtuvieron valores superiores al límite de cuantificación desde el tiempo 0.05h a 3-8h post administración.

La Figura 31 muestra los perfiles superpuestos de la mediana (n=3) de las concentraciones plasmáticas de elomotecan respecto al tiempo tras la administración diaria del fármaco por infusión de 10 minutos a la dosis de 0.0125, 0.05 o 0.2 mg/kg/día durante 1 y 28 días en ratas macho (a) y hembra (b). Los perfiles de la concentración mediana respecto al tiempo fueron similares entre sexos y entre el día 1 y el día 28 de la administración a las diferentes dosis estudiadas. La mediana de las concentraciones plasmáticas de elomotecan a 1 hora post administración a la dosis de 0.0125 mg/kg/día del 28 día en ratas hembra no pudo determinarse ya que sólo se disponía de un valor de concentración plasmática.

RESULTADOS

Tabla 39. Valores individuales, promedios y medianas de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas el día 1 y 28 tras la administración diaria del fármaco por infusión de 10 minutos a las dosis de 0.0125, 0.05 y 0.2 mg/kg/día en ratas macho del estudio R4.

Dosis Teórica	Tiempo (h)	Concentración plasmática (ng/mL)									
		Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Rata 6	Promedio	Mediana	D.E.	C.V. (%)
0.0125 mg/kg/día Día 1	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	3.31	3.41	2.8	3.17	3.31	0.327	10.3
	1	0.476	0.958	1.17	-	-	-	0.87	0.96	0.356	41.0
	3	-	-	-	0.228	0.373	0.414	0.338	0.373	0.098	28.9
	8	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
0.0125 mg/kg/día Día 28	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	4.21	4.29	4.39	4.30	4.29	0.090	2.1
	1	0.883	1.02	1.22	-	-	-	1.04	1.02	0.169	16.3
	3	-	-	-	0.460	0.45	0.823	0.578	0.460	0.213	36.8
	8	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
0.05 mg/kg/día Día 1	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	14.3	11.5	12.4	12.7	12.4	1.43	11.2
	1	3.11	3.50	3.81	-	-	-	3.47	3.50	0.351	10.1
	3	-	-	-	1.15	1.21	1.72	1.36	1.21	0.313	23.0
	8	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
0.05 mg/kg/día Día 28	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	16.0	15.6	17.5	16.4	16.0	1.00	6.1
	1	3.19	5.03	4.79	-	-	-	4.34	4.79	1.00	23.1
	3	-	-	-	2.10	1.93	2.02	2.02	2.02	0.085	4.2
	8	0.251	0.311	0.320	-	-	-	0.294	0.311	0.038	12.8
0.2 mg/kg/día Día 1	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	51.2	53.2	44.2	49.5	51.2	4.73	9.5
	1	12.5	18.4	13.6	-	-	-	14.8	13.6	3.14	21.2
	3	-	-	-	5.40	5.33	3.13	4.62	5.33	1.29	27.9
	8	0.431	1.06	BQL	-	-	-	0.497	0.431	0.445	89.5
0.2 mg/kg/día Día 28	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	70.9	68.8	65.7	68.5	68.8	2.62	3.8
	1	18.8	18.1	15.5	-	-	-	17.5	18.1	1.74	10.0
	3	-	-	-	7.91	6.92	5.73	6.85	6.92	1.09	15.9
	8	0.927	1.66	0.623	-	-	-	1.070	0.927	0.533	49.8
24	-	-	-	BQL	BQL	BQL	0.000	-	-	-	

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación
-Muestra no obtenida

Tabla 40. Valores individuales, promedios y medianas de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas el día 1 y 28 tras la administración diaria del fármaco por infusión de 10 minutos a las dosis de 0.0125, 0.05 y 0.2 mg/kg/día en ratas hembra del estudio R4.

Dosis Teórica	Tiempo (h)	Concentración plasmática (ng/mL)									
		Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Rata 6	Promedio	Mediana	D.E.	C.V. (%)
0.0125 mg/kg/día Día 1	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	3.23	3.36	3.13	3.24	3.23	0.115	3.6
	1	1.86	1.21	1.33	-	-	-	1.47	1.33	0.346	23.58
	3	-	-	-	0.437	0.739	0.837	0.671	0.739	0.208	31.1
	8	0.212	0.274	BQL	-	-	-	0.162	0.212	0.044	27.1
0.0125 mg/kg/día Día 28	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	4.98	3.20	4.66	4.28	4.66	0.949	22.2
	1	1.58	ne	ne	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	0.727	1.07	1.04	0.946	1.04	0.190	20.1
	8	0.366	BQL	BQL	-	-	-	-	-	-	-
0.05 mg/kg/día Día 1	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	13.6	11.0	11.8	12.1	11.8	1.332	11.0
	1	4.00	5.98	4.95	-	-	-	4.98	4.95	0.99	19.9
	3	-	-	-	2.51	2.48	2.45	2.48	2.480	0.03	1
	8	0.323	0.495	0.443	-	-	-	0.420	0.443	0.088	21.0
0.05 mg/kg/día Día 28	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	21.9	14.5	17.7	18.0	17.7	3.71	20.6
	1	4.83	5.36	6.12	-	-	-	5.44	5.36	0.65	11.9
	3	-	-	-	2.47	2.56	2.59	2.54	2.56	0.062	2.5
	8	0.562	0.565	0.955	-	-	-	0.694	0.57	0.226	32.6
0.2 mg/kg/día Día 1	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	46.1	49.2	52.6	49.3	49.2	3.25	6.6
	1	15.1	21.1	21.6	-	-	-	19.3	21.1	3.62	18.8
	3	-	-	-	10.1	13.9	5.73	9.91	10.1	4.09	41.3
	8	1.90	2.18	1.95	-	-	-	2.01	1.95	0.149	7.4
0.2 mg/kg/día Día 28	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	79.5	84.7	74.5	79.6	79.5	5.10	6.4
	1	19.1	24.8	32.0	-	-	-	25.3	24.8	6.46	25.6
	3	-	-	-	9.53	15.4	8.94	11.3	9.53	3.57	31.6
	8	1.30	3.01	2.01	-	-	-	2.11	2.01	0.859	40.8
0.2 mg/kg/día Día 28	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	79.5	84.7	74.5	79.6	79.5	5.10	6.4
	1	19.1	24.8	32.0	-	-	-	25.3	24.8	6.46	25.6
	3	-	-	-	9.53	15.4	8.94	11.3	9.53	3.57	31.6
	8	1.30	3.01	2.01	-	-	-	2.11	2.01	0.859	40.8

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación

ne: Muestra no extraída

-Muestra no obtenida

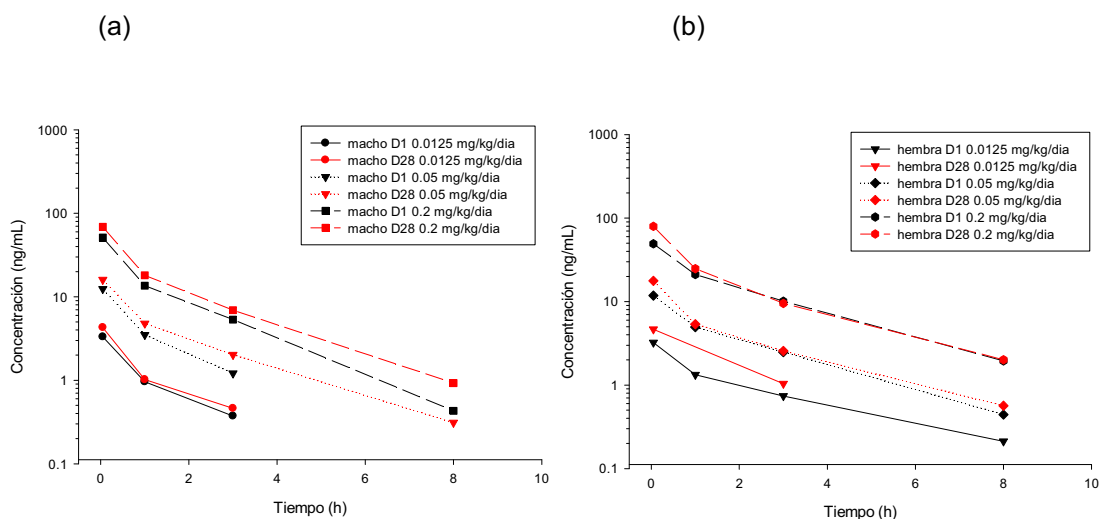


Figura 31. Perfiles superpuestos de las medianas (n=3) de las concentraciones plasmáticas de elomotecan frente al tiempo obtenidas los días 1 y 28 tras la administración diaria del fármaco por infusión de 10 minutos a las dosis de 0.0125, 0.05 y 0.2mg/kg/día durante 28 días en ratas macho (a) y ratas hembra (b) del estudio R4.

5.2.2.4.2 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO NO COMPARTIMENTAL EN EL ESTUDIO R4

En la Tabla 41 se muestran los valores de los parámetros farmacocinéticos calculados mediante la aproximación no compartimental a partir de la mediana (n=3) de los valores de la concentración para cada tiempo de muestreo y dosis en ratas machos y hembras.

Los valores de C_{max} observados fueron similares entre ambos sexos y en todos los casos, los valores observados el día 28 fueron ligeramente superiores a los observados el día 1. La exposición, determinada mediante el área bajo la curva (AUC), fue superior en hembras que en machos y en todos los casos, fue ligeramente superior el día 28 que el día 1 de administración.

El aclaramiento (CL) fue superior en ratas macho que en hembras. Dicha tendencia está en concordancia con los valores obtenidos en la semivida aparente de eliminación ya que los valores obtenidos fueron superiores en ratas hembras que en ratas macho.

En la Tabla 42 se muestran los índices de acumulación del elomotecan obtenidos el día 28 a las diferentes dosis ensayadas. Los resultados obtenidos sugieren que no existe acumulación del fármaco ni en machos ni en hembras tras la administración diaria durante 28 días del elomotecan por infusión de 10 minutos a la dosis de 0.0125, 0.05 o 0.2mg/kg/día.

Los resultados obtenidos en este estudio están en concordancia con los resultados obtenidos en el estudio R3 en el que el elomotecan se administró durante 5 días por infusión de 10 minutos a las dosis de 0.0125, 0.05 o 0.2mg/kg/día. En la Tabla 43 se muestran los valores de los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos en ambos estudios.

Tabla 41. Valores de los parámetros farmacocinéticos estimados a partir de la mediana de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas los días 1 y 28 tras la administración diaria del fármaco por infusión de 10 minutos a las dosis de 0.0125, 0.05 y 0.2 mg/kg/día durante 28 días en ratas macho y hembra del estudio R4.

	Dosis mg/kg/día	C _{max} ng/mL	C _{max} /D -	AUC _t (ng/mL)·h	AUC (ng/mL)·h	AUC/D -	AUC extr. %	t _{1/2z} h	V _{ss} L·kg ⁻¹	CL L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹
Machos Día 1	0.0125	3.31	265	3.13	3.60	288	13.3	0.992	3.59	2.53
	0.05	12.4	248	11.3	12.8	255	11.4	0.925	4.11	3.12
	0.2	51.2	256	55.6	56.5	283	1.55	1.40	4.34	2.56
Machos Día 28	0.0125	4.29	343	3.68	4.33	346	13.3	0.988	4.05	2.83
	0.05	16.0	320	20.2	21.0	420	3.77	1.79	5.13	2.37
	0.2	68.8	344	76.0	78.2	391	2.77	1.65	4.96	2.60
Hembras Día 1	0.0125	3.23	258	6.24	7.04	563	11.5	2.67	4.55	1.30
	0.05	11.8	236	20.9	22.1	443	5.80	2.01	4.80	1.80
	0.2	49.2	246	87.4	93.1	466	6.13	2.05	4.19	1.55
Hembras Día 28	0.0125	4.66	373	5.40	7.63	610	26.9	1.50	3.65	1.61
	0.05	17.7	354	24.4	26.2	524	6.68	2.18	5.07	1.90
	0.2	79.5	398	103	108	542	5.09	1.98	4.40	1.87

Tabla 42. Índices de acumulación obtenidos el día 28 tras la administración diaria del elomotecan por infusión de 10 minutos a las dosis de 0.0125, 0.05 y 0.2 mg/kg/día en ratas macho y hembra del estudio R4.

	Dosis mg/kg/día	C _{max} ng/mL	R _{acCmax}	AUC (ng/mL)·h	R _{acAUC}
Machos Día 1	0.0125	3.31		3.60	
	0.05	12.4		12.8	
	0.2	51.2		56.5	
Machos Día 28	0.0125	4.29	1.3	4.33	1.2
	0.05	16.0	1.3	21.0	1.6
	0.2	68.8	1.3	78.2	1.4
Hembras Día 1	0.0125	3.23		7.04	
	0.05	11.8		22.1	
	0.2	49.2		93.1	
Hembras Día 28	0.0125	4.66	1.4	7.63	1.1
	0.05	17.7	1.5	26.2	1.2
	0.2	79.5	1.6	108	1.2

Tabla 43. Comparación de los parámetros farmacocinéticos observados en los estudios R3 y R4.

	Dosis mg/kg/día	C _{max} ng/mL		AUC (ng/mL)·h		t _{1/2z} h		V _{ss} L·kg ⁻¹		CL L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹	
		R3	R4	R3	R4	R3	R4	R3	R4	R3	R4
Machos Día 1	0.0125	3.77	3.31	4.41	3.60	1.01	0.992	3.31	3.59	2.27	2.53
	0.05	12.5	12.4	-	12.8	-	0.925	-	4.11	-	3.12
	0.2	67.0	51.2	68.6	56.5	1.51	1.40	4.57	4.34	2.60	2.56
Machos Día 5/28*	0.0125	4.60	4.29	5.92	4.33	1.21	0.988	3.39	4.05	1.89	2.83
	0.05	14.3	16.0	15.6	21.0	0.98	1.79	4.31	5.13	3.02	2.37
	0.2	73.9	68.8	76.4	78.2	1.43	1.65	4.31	4.96	2.54	2.60
Hembras Día 1	0.0125	3.40	3.23	5.27	7.04	1.20	2.67	3.30	4.55	1.90	1.30
	0.05	15.9	11.8	-	22.1	-	2.01	-	4.80	-	1.80
	0.2	52.7	49.2	128	93.1	2.99	2.05	5.45	4.19	1.40	1.55
Hembras Día 5/28*	0.0125	4.31	4.66	9.62	7.63	3.06	1.50	4.56	3.65	1.17	1.61
	0.05	18.8	17.7	37.5	26.2	2.83	2.18	4.54	5.07	1.25	1.90
	0.2	58.7	79.5	129	108	2.53	1.98	4.93	4.40	1.50	1.87

* Día 5 en el estudio R3 y día 28 en el estudio R4

- Valor no determinado

5.2.2.5 ESTUDIO DE DOSIS REPETIDAS R5

5.2.2.5.1 CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE ELOMOTECAN EN EL ESTUDIO R5

No fue posible obtener las muestras en el día 50 en una de las ratas hembra que recibió elomotecan a la dosis de 16 mg/kg/semana debido a la muerte del animal. Las Tablas 44 y 45 muestran los valores de concentración plasmática de elomotecan obtenidos tras la administración semanal del fármaco por infusión de 10 minutos a las dosis de 1, 4 o 16 mg/kg/semana durante 1, 22 y 50 días en ratas macho y hembra, respectivamente. Se obtuvieron valores superiores al límite de cuantificación desde el primer tiempo de muestreo (0.05h) hasta el último (24h post administración) todos los días en los que se obtuvo la muestra plasmática.

La Figura 32 muestra los perfiles superpuestos de la mediana (n=3) de las concentraciones plasmáticas de elomotecan respecto al tiempo tras la administración semanal del fármaco a las diferentes dosis administradas para machos (a) y hembras (b). Los perfiles de la concentración mediana respecto al tiempo fueron similares en ambos sexos y en los diferentes días de administración a las diferentes dosis estudiadas. Sin embargo, a la dosis de 1 mg/kg/semana el día 50 de administración (última administración), el perfil de la concentración mediana respecto al tiempo se consideró anómalo para machos ya que la mediana de la concentración a la hora fue superior que a 0.05 horas post administración. Además, las fases terminales de los perfiles observados a la dosis de 16 mg/kg/semana fueron ligeramente diferentes a las fases terminales de los perfiles observados a la dosis de 1 y 4 mg/kg/semana en ambos sexos y a los diferentes días de administración analizados.

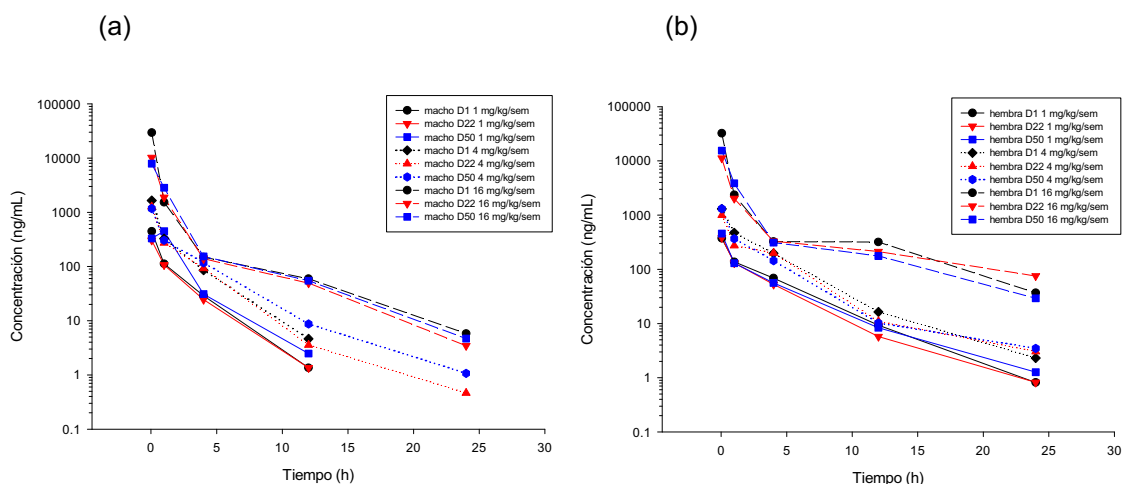


Figura 32. Perfiles superpuestos de las medianas (n=3) de las concentraciones plasmáticas de elomotecan frente al tiempo obtenidas los días 1, 22 y 50 tras la administración semanal del fármaco por infusión de 10 minutos a las dosis de 1, 4 y 16 mg/kg/semana durante 8 semanas en ratas macho (a) y ratas hembra (b) del estudio R5.

Tabla 44. Valores individuales, promedios y medianas de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas el día 1, 22 y 50 tras la administración semanal del fármaco por infusión de 10 minutos a las dosis de 1, 4 y 16 mg/kg/semana durante 8 semanas en ratas macho del estudio R5.

Dosis Teórica	Concentración plasmática (ng/mL)										
	Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Rata 6	Promedio	Mediana	D.E.	C.V. (%)
1 mg/kg/semana Día 1	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	444	224	490	386	444	142	36.8
	1	111	112	122	-	-	-	115	112	6.08	5.29
	4	-	-	-	27.5	28.8	35.7	30.7	28.8	4.41	14.4
	12	1.35	0.879	1.86	-	-	-	1.36	1.35	0.491	36.0
	24	-	-	-	BQL	BQL	BQL	0.000	-	-	-
1 mg/kg/semana Día 22	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	449	231	304	328	304	111	33.8
	1	111	95.6	107	-	-	-	105	107	7.99	7.64
	4	-	-	-	23.7	26.4	24.5	24.9	24.5	1.39	5.58
	12	1.76	1.06	1.35	-	-	-	1.39	1.35	0.352	25.3
	24	-	-	-	BQL	BQL	BQL	0.000	-	-	-
1 mg/kg/semana Día 50	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	354	281	329	321	329	37.1	11.5
	1	380	449	451	-	-	-	427	449	40.4	9.48
	4	-	-	-	39.2	21.9	30.9	30.7	30.9	8.65	28.2
	12	3.15	1.94	2.48	-	-	-	2.52	2.48	0.606	24.0
	24	-	-	-	0.486	BQL	BQL	0.000	-	-	-
4 mg/kg/semana Día 1	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	1360	1650	2040	1683	1650	341	20.3
	1	544	273	327	-	-	-	381	327	143	37.6
	4	-	-	-	147	31.5	85.2	87.9	85.2	57.8	65.8
	12	4.80	3.08	4.63	-	-	-	4.17	4.63	0.948	22.7
	24	-	-	-	0.293	BQL	BQL	0.000	-	-	-
4 mg/kg/semana Día 22	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	1070	1470	1260	1267	1260	200	15.8
	1	272	205	327	-	-	-	268	272	61.1	22.8
	4	-	-	-	112	84.3	92.4	96.2	92.4	14.2	14.8
	12	3.54	3.56	5.50	-	-	-	4.20	3.56	1.13	26.8
	24	-	-	-	0.967	BQL	0.463	0.477	0.463	0.484	101
4 mg/kg/semana Día 50	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	1170	821	1460	1150	1170	320	27.8
	1	304	500	299	-	-	-	368	304	115	31.2
	4	-	-	-	128.00	101	117.00	115	117	13.6	11.8
	12	8.71	7.26	8.98	-	-	-	8.32	8.71	0.925	11.1
	24	-	-	-	1.25	0.451	1.07	0.924	1.07	0.419	45.4
16 mg/kg/semana Día 1	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	29400	34900	20900	28400	29400	7053	24.8
	1	1540	1300	1530	-	-	-	1457	1530	136	9.3
	4	-	-	-	111	216	149	159	149	53.2	33.5
	12	59.2	37.8	60.8	-	-	-	52.6	59.2	12.8	24.4
	24	-	-	-	5.79	13.9	4.83	8.17	5.79	4.98	61.0
16 mg/kg/semana Día 22	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	10200	9170	10600	9990	10200	738	7.4
	1	1880	1270	2170	-	-	-	1773	1880	459	25.9
	4	-	-	-	107	171	139	139	139	32.0	23.0
	12	34.2	49.2	66.9	-	-	-	50.1	49.2	16.4	32.7
	24	-	-	-	2.98	9.3	3.45	5.24	3.45	3.52	67.2
16 mg/kg/semana Día 50	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	4650	11500	7890	8013	7890	3427	42.8
	1	4130.0	1930	2840	-	-	-	2967	2840	1105	37.3
	4	-	-	-	98.9	153	168	140	153	36.3	26.0
	12	52.9	54.7	70.7	-	-	-	59.4	54.7	9.80	16.5
	24	-	-	-	4.43	10.4	4.69	6.51	4.69	3.37	51.9

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación
-Muestra no obtenida

RESULTADOS

Tabla 45. Valores individuales, promedios y medianas de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas el día 1, 22 y 50 tras la administración semanal del fármaco por infusión de 10 minutos a las dosis de 1, 4 y 16 mg/kg/semana durante 8 semanas en ratas hembra del estudio R5.

Dosis Teórica	Concentración plasmática (ng/mL)										
	Tiempo (h)	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Rata 6	Promedio	Mediana	D.E.	C.V. (%)
1 mg/kg/semana Día 1	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	427	373	336	379	373	45.8	12.1
	1	119	137	152	-	-	-	136	137	16.5	12.1
	4	-	-	-	68.7	51.8	78.8	66.4	68.7	13.6	20.5
	12	9.32	6.66	13.0	-	-	-	9.66	9.32	3.18	33.0
	24	-	-	-	0.816	0.388	1.48	0.895	0.816	0.550	61.5
1 mg/kg/semana Día 22	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	489	320.00	383	397	383	85.4	21.5
	1	131	116	161	-	-	-	136	131	22.9	16.8
	4	-	-	-	52.8	52.6	66.5	57.3	52.8	7.97	13.9
	12	5.74	5.15	10.1	-	-	-	7.00	5.74	2.70	38.6
	24	-	-	-	0.766	0.823	2.07	1.22	0.823	0.737	60.4
1 mg/kg/semana Día 50	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	504	416	456	459	456	44.1	9.61
	1	134	91.3	130	-	-	-	118	130	23.6	19.9
	4	-	-	-	50.6	56.1	70.6	59.1	56.1	10.3	17.5
	12	8.33	7.04	10.1	-	-	-	8.49	8.33	1.54	18.1
	24	-	-	-	1.27	0.519	1.39	1.06	1.27	0.472	44.5
4 mg/kg/semana Día 1	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	1370	1300	1090	1253	1300	146	11.6
	1	472	477	329	-	-	-	426	472	84.0	19.7
	4	-	-	-	191	197	253	214	197	34.2	16.0
	12	10.4	21.7	16.4	-	-	-	16.2	16.4	5.65	35.0
	24	-	-	-	1.79	2.31	3.43	2.51	2.31	0.838	33.4
4 mg/kg/semana Día 22	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	1640	1000	763	1134	1000	454	40.0
	1	266	273	330	-	-	-	290	273	35.1	12.1
	4	-	-	-	198	200	213	204	200	8.14	4.00
	12	4.90	18.3	11.0	-	-	-	11.4	11.0	6.71	58.9
	24	-	-	-	3.94	2.82	3.05	3.27	3.05	0.592	18.1
4 mg/kg/semana Día 50	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	1310	1310	1350	1323	1310	23.1	1.75
	1	429	366	256	-	-	-	350	366	87.6	25.0
	4	-	-	-	136	144	201	160	144	35.4	22.1
	12	7.05	17.2	10.2	-	-	-	11.5	10.2	5.20	45.2
	24	-	-	-	2.40	3.48	4.11	3.33	3.48	0.865	26.0
16 mg/kg/semana Día 1	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	32400	52800	26000	37067	32400	13996	37.8
	1	2360	2420	1750	-	-	-	2177	2360	371	17.0
	4	-	-	-	1200	233	323	585	323	534	91.3
	12	130.00	350	318	-	-	-	266	318	119	44.7
	24	-	-	-	55.4	36.8	21	37.7	36.8	17.2	45.6
16 mg/kg/semana Día 22	0	BQL	BQL	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	8020	11200	15900	11707	11200	3964	33.9
	1	1960	2030	3110	-	-	-	2367	2030	645	27.2
	4	-	-	-	330	312	386	343	330	38.6	11.3
	12	74.0	363	212	-	-	-	216	212	145	66.8
	24	-	-	-	17.6	75.2	89.5	60.8	75.2	38.1	62.6
16 mg/kg/semana Día 50	0	BQL	ne	BQL	-	-	-	0.000	-	-	-
	0.05	-	-	-	15500	15500	17100	16033	15500	924	5.76
	1	2440	ne	5290	-	-	-	3865	3865	2015	52.1
	4	-	-	-	311	136	422	290	311	144	49.8
	12	81.7	ne	271	-	-	-	176	176	134	75.9
	24	-	-	-	28.4	55.9	29.2	37.8	29.2	15.7	41.4

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación

ne: Muestra no extraída

-Muestra no obtenida

5.2.2.5.2 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO NO COMPARTIMENTAL EN EL ESTUDIO R5

En la Tabla 46 se muestran los valores de los parámetros farmacocinéticos calculados mediante la aproximación no compartimental a partir de la mediana (n=3) de los valores de la concentración para cada tiempo de muestreo y dosis en ratas machos y hembras.

No se obtuvo el valor real de C_{max} ya que el primer punto de toma de muestra fue a los 3 minutos y el fármaco se administró durante 10 minutos. La exposición, determinada mediante el área bajo la curva (AUC) fue mayor en ratas hembra que en ratas macho y no fue posible establecer una tendencia clara en los valores de exposición normalizada por la dosis en función de la dosis administrada. La semivida aparente de eliminación fue en general inferior en machos que en hembras y mostró una tendencia a aumentar con la dosis administrada en ambos sexos todos los días de administración. El valor de la semivida aparente de eliminación fue de 1.81 a 4.20 horas para ratas machos y de 3.15 a 9.25 horas para ratas hembras.

En la Tabla 47 se muestran los índices de acumulación del elomotecan obtenidos el día 22 y el día 50 tras la administración semanal del elomotecan por infusión de 10 minutos a la dosis de 1, 4 o 16 mg/kg/semana durante 8 semanas. Los resultados obtenidos sugieren que no existe acumulación del fármaco ni en ratas machos ni en ratas hembras.

Tabla 46. Valores de los parámetros farmacocinéticos estimados a partir de la mediana de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas los días 1, 22 y 50 tras la administración semanal del fármaco por infusión de 10 minutos a las dosis de 1, 4 y 16 mg/kg/semana durante 8 semanas en ratas macho y hembra del estudio R5.

	Dosis mg/kg/sem	C_{max} ng/mL	C_{max}/D -	AUC_t (ng/mL)·h	AUC (ng/mL)·h	AUC/D -	AUC extr. %	$t_{1/2z}$ h	V_{ss} L·kg ⁻¹	CL L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹
Machos Día 1	1.00	444	444	508	511	511	0.69	1.81	4.00	2.06
	4.00	1650	413	1623	1636	409	0.78	1.90	4.67	2.49
	16.0	29400	1838	13381	13420	839	0.29	4.20	1.59	1.21
Machos Día 22	1.00	304	304	427	430	430	0.9	1.91	4.92	2.36
	4.00	1260	315	1413	1415	354	0.09	2.69	6.23	2.90
	16.0	10200	638	8111	8129	508	0.25	3.69	3.43	1.91
Machos Día 50	1.00	449	449	945	953	953	0.83	2.20	2.02	1.06
	4.00	1170	293	1636	1640	410	0.23	3.01	6.75	2.43
	16.0	7890	493	8869	8896	556	0.33	3.92	3.46	1.75
Hembras Día 1	1.00	373	373	820	823	823	0.43	3.15	4.91	1.28
	4.00	1300	325	2455	2464	616	0.36	3.19	5.32	1.66
	16.0	32400	2025	19833	20236	1265	1.99	6.07	2.72	0.80
Hembras Día 22	1.00	383	383	701	705	705	0.49	3.39	4.91	1.44
	4.00	1000	250	1883	1912	478	1.49	6.48	8.32	2.15
	16.0	11200	700	12211	13218	826	7.87	9.25	7.98	1.18
Hembras Día 50	1.00	456	456	780	786	786	0.78	3.71	4.88	1.28
	4.00	1310	328	1964	1984	496	0.73	3.88	6.33	2.01
	16.0	15500	969	16456	16699	1044	1.60	5.74	2.83	0.93

Tabla 47. Índices de acumulación obtenidos los días 22 y 50 tras la administración semanal del elomotecan por infusión de 10 minutos a las dosis de 1, 4 y 16 mg/kg/semana en ratas macho y hembra del estudio R5.

	Dosis mg/kg/sem	C _{max} ng/mL	R _{ac} C _{max}	AUC (ng/mL)·h	R _{ac} AUC
Machos Día 1	1.00	444		511	
	4.00	1650		1636	
	16.0	29400		13420	
Machos Día 22	1.00	304	0.7	430	0.8
	4.00	1260	0.8	1415	0.9
	16.0	10200	0.3	8129	0.6
Machos Día 50	1.00	449	1.0	953	1.9
	4.00	1170	0.7	1640	1.0
	16.0	7890	0.3	8896	0.7
Hembras Día 1	1.00	373		823	
	4.00	1300		2464	
	16.0	32400		20236	
Hembras Día 22	1.00	383	1.0	705	0.9
	4.00	1000	0.8	1912	0.8
	16.0	11200	0.3	13218	0.7
Hembras Día 50	1.00	456	1.2	786	1.0
	4.00	1310	1.0	1984	0.8
	16.0	15500	0.5	16699	0.8

5.2.2.6 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL EN LA RATA

El análisis farmacocinético poblacional del elomotecan en la rata se realizó a partir de los datos tras la administración intravenosa del mismo obtenidos en los estudios R1, R2, R3, R4 y R5 siguiendo el esquema de trabajo descrito en el apartado 4.3.2.

5.2.2.6.1 EXPLORACIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

Se analizaron simultáneamente los 810 valores de concentración plasmáticas provenientes de 128 animales. De éstas, 60 provenían de la administración única del elomotecan mediante bolus i.v. en ratas macho a la dosis de 1 mg/kg (24 muestras) y 10 mg/kg (36 muestras) y 750 provenían de la administración repetida del elomotecan por infusión de 10 minutos en ratas macho (377 muestras) y en ratas hembra (373 muestras) a la dosis de 0.0125 mg/kg/día, 0.05 mg/kg/día, 0.2 mg/kg/día, 1 mg/kg/semana, 4 mg/kg/semana y 16 mg/kg/semana.

El fármaco se administró en tres vehículos diferentes. Un 44.8% de los datos se obtuvo tras la administración del elomotecan en el vehículo 1, un 2.2% en el vehículo 2 y un 53% en el vehículo 3.

Un 8.89% de las muestras (72 muestras) presentaron una concentración plasmática inferior al límite de cuantificación.

La Figura 33 muestra todas las concentraciones plasmáticas normalizadas por la dosis en función del tiempo tras la administración del elomotecan. La visualización de la gráfica sugiere

un comportamiento farmacocinético de como mínimo dos fases tras la administración i.v. del fármaco.

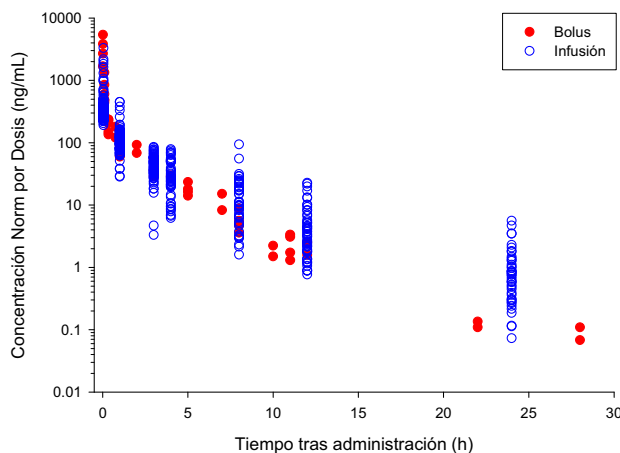


Figura 33. Concentraciones plasmáticas de elomotecan normalizadas por la dosis en función del tiempo obtenidas tras la administración de un bolus i.v. del fármaco a las dosis únicas de 1 y 10 mg/kg y tras la infusión en 10 minutos a las dosis repetidas de 0.0125, 0.05 y 0.2 mg/kg/día y de 1, 4 y 16 mg/kg/semana en ratas macho y hembra.

5.2.2.6.2 DESARROLLO DEL MODELO FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL

En la Tabla 48 se resume el desarrollo del modelo farmacocinético poblacional en la rata. Se probaron los modelos abiertos de uno, dos y tres compartimentos con eliminación de primer orden desde el compartimento central. El modelo que mejor describió los datos de concentración de elomotecan frente al tiempo fue el modelo de tres compartimentos con eliminación de primer orden desde el compartimento central.

La variabilidad interindividual pudo ser incluida en el aclaramiento (CL), en el volumen del compartimento central (V1) y en el volumen del compartimento periférico superficial (V2) utilizando un modelo exponencial. La variabilidad interindividual no se pudo incluir en el resto de parámetros puesto que no resultó ser estadísticamente significativa y por lo tanto, no estaba justificada su inclusión en el modelo.

En la Figura 34 se muestra la distribución de los valores de los efectos aleatorios interindividuales (ETA's) asociados al CL, V1 y V2. Como se puede observar, en todos los casos, la distribución está centrada aproximadamente alrededor de cero. Se comprobó que la inclusión de la covarianza no mejoraba el ajustado del modelo ya que la disminución de la función objetiva no fue significativa o bien no fue posible estimar el valor de dicha covarianza.

Como covariables se ensayaron el sexo, el peso del animal, el vehículo empleado en la formulación y la dosis administrada. La dosis administrada se incluyó como variable continua y categórica. La Figura 35 muestra la exploración gráfica del impacto de las covariable en CL, V1 y V2.

El análisis GAM (Generalised Additive Modeling) sugirió que:

- Dosis. Podía tener efecto sobre los parámetros CL, V1 y V2.
- Peso. Podía tener efecto sobre los parámetros CL V1 y V2.
- Sexo. Podía tener efecto sobre el parámetro CL.

Tras la exploración gráfica de los efectos aleatorios interindividuales asociados a las covariables y el análisis GAM, se decidió probar el efecto del sexo y el peso sobre el aclaramiento y el efecto del peso en V1 y V2. Se observó que el peso y el sexo tenían un efecto muy significativo sobre el aclaramiento y que el peso no tenía efecto ni en V1 ni en V2.

El modelo final seleccionado (R21) fue un modelo de tres compartimentos con eliminación de primer orden con variabilidad interindividual asociada a CL, V1 y V2. Se identificó el sexo y el peso como covariables del aclaramiento El modelo de error residual fue el modelo aditivo para datos logotransformados. La estimación de los parámetros del modelo se efectuó con el método FOCEI.

En la Figura 36 se muestran los gráficos diagnósticos indicativos de la bondad de ajustado del modelo final a los datos experimentales. Tanto los gráficos de concentraciones observadas vs concentraciones poblacionales como concentraciones observadas vs concentraciones individuales predichas mostraron una buena correlación con todos los datos agrupados alrededor de la línea de identidad. Los resultados de los IWRES y de los CWRES sugirieron una buena distribución de los datos experimentales y en ambos casos se observó una distribución aleatoria alrededor de cero. Sólo un par de valores de CWRES mostraron una magnitud elevada (-6) por lo que se podrían eliminar del modelo por considerarse aberrantes. En general, el modelo describe correctamente los datos experimentales tanto en los que respecta a la parte estructural como estadística.

La estimación de los parámetros farmacocinéticos poblacionales y la precisión con la que han sido calculados se muestran en la Tabla 49. El coeficiente de variación porcentual (RSE%) de los parámetros fue igual o inferior al 39%. El valor del error residual se considera ligeramente alto (39.0%). En la Tabla 50 se muestra los valores de las microconstantes y macroconstantes calculados a partir de los parámetros obtenidos en el modelo farmacocinético poblacional final. El volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario fue de 1.25 L y la semivida aparente de eliminación ($t_{1/2\gamma}$) fue de 4.05 h en ratas hembras y de 3.45 h en ratas macho.

Tabla 48 (1ª parte). Resumen de las etapas de desarrollo del modelo farmacocinético poblacional en la rata.

Secuencia	Estrategia	F. Objetiva	Comentarios	Decisión
R1	Model IIV RE EM COV VAR	Monocomp CL Proporcional FOCEI - -	495.3 -	Incluir IIV V
R2	Model IIV RE EM COV VAR	Monocomp CL, V Proporcional FOCEI - -	495.3 No estima IIV en V	Incluir un nuevo compartimento
R3	Model IIV RE EM COV VAR	Bicomp CL Proporcional FOCEI - -	69.7 Disminucion 421.6 AIC Significativa R3 modelo referencia	Incluir IIV V1
R4	Model IIV RE EM COV VAR	Bicomp CL, V1 Proporcional FOCEI - -	35.2 Disminucion 34.5 FOBJ Significativa	Incluir IIV V2
R5	Model IIV RE EM COV VAR	Bicomp CL, V2 Proporcional FOCEI - -	35.2 Disminucion 34.5 FOBJ Significativa	Incluir IIV Q
R6	Model IIV RE EM COV VAR	Bicomp CL, Q Proporcional FOCEI - -	25.5 Disminucion 44.2 FOBJ Significativa	Incluir IIV V1, V2 y Q
R7	Model IIV RE EM COV VAR	Bicomp CL, V1, V2, Q Proporcional FOCEI - -	-50.3 Disminucion 120.0 FOBJ Significativa Precisión IIV V2 760%	Incluir un nuevo compartimento
R8	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL Proporcional FOCEI - -	37.2 Disminucion 28.5 AIC Significativa R8 modelo referencia	Incluir IIV V1
R9	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V1 Proporcional FOCEI - -	-19.0 Disminucion 56.2 FOBJ Significativa	Incluir IIV V2
R10	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V2 Proporcional FOCEI - -	13.4 Disminucion 23.8 FOBJ Significativa	Incluir IIV V3

IIV: Variabilidad interindividual

RE: Error Residual

EM: Método de estimación. FOCEI First Order Conditional Estimation with ϵ - η Interaction

COV: Covariable

VAR: Covarianza entre variabilidades interindividuales

RESULTADOS

Tabla 48 (2ª parte). Resumen de las etapas de desarrollo del modelo farmacocinético poblacional en la rata.

Secuencia	Estrategia	F. Objetiva	Comentarios	Decisión
R11	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V3 Proporcional FOCEI - -	29.9 Disminucion 7.3 FOBJ No significativa	Incluir IIV Q2
R12	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, Q2 Proporcional FOCEI - -	17.8 Disminucion 19.4 FOBJ Significativa	Incluir IIV Q3
R13	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, Q3 Proporcional FOCEI - -	1.8 Disminucion 35.4 FOBJ Significativa	Incluir IIV V1, V2, Q2 y Q3
R14	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V1, V2, Q2, Q3 Proporcional FOCEI - -	-75.1 Disminucion 35.4 FOBJ Significativa No estima IIV en Q3 y Q2	Eliminar IIV Q3, Q2
R15	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V1, V2 Proporcional FOCEI - -	-75.1 Disminucion 35.4 FOBJ Significativa R15 modelo referencia	Incluir covarianza $ETA_{Cl} + ETA_{V1}$
R16	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V1, V2 Proporcional FOCEI - $ETA_{Cl} + ETA_{V1}$	-75.3 Disminucion 0.2 FOBJ No significativa	Incluir covarianza $ETA_{V1} + ETA_{V2}$
R17	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V1, V2 Proporcional FOCEI - $ETA_{V1} + ETA_{V2}$	-98.9 Disminucion 23.8 FOBJ Significativa No estima valor covarianza	Incluir covarianza $ETA_{Cl} + ETA_{V2}$
R18	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V1, V2 Proporcional FOCEI - $ETA_{Cl} + ETA_{V1}$	-77.0 Disminucion 1.7 FOBJ No significativa GAM indica DOSE, FORM no efecto variabilidad	Selección R15 como modelo Base ETA shrinkage 13.1%, 29.7%, 55.8% EPS shrinkage 17.6% Incluir SEX como covariable CL
R19	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V1, V2 Proporcional FOCEI SEX _{Cl} -	-186.1 Disminucion 111.0 FOBJ Significativa	Incluir WGT como covariable CL
R20	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V1, V2 Proporcional FOCEI WGT _{Cl} -	-164.5 Disminucion 89.4 FOBJ Significativa	Incluir SEX, WGT como covariable CL

IIV: Variabilidad interindividual

RE: Error Residual

EM: Método de estimación. FOCEI First Order Conditional Estimation with ϵ - η Interaction

COV: Covariable

VAR: Covarianza entre variabilidades interindividuales

Tabla 48 (3ªparte). Resumen de las etapas de desarrollo del modelo farmacocinético poblacional en la rata.

Secuencia	Model	Estrategia	F. Objetiva	Comentarios	Decisión
R21	Model	Tricomp	-195.0	Disminucion 119.9 FOBJ Significativa	Incluir WGT como covariable V1
	IIV	CL, V1, V2			
	RE	Proporcional			
	EM	FOCEI			
	COV	SEX _{Cl} , WGT _{Cl}			
	VAR	-			
R22	Model	Tricomp	-195.2	Disminucion 0.2 FOBJ No significativa	Incluir WGT como covariable V2
	IIV	CL, V1, V2			
	RE	Proporcional			
	EM	FOCEI			
	COV	SEX _{Cl} , WGT _{Cl} WGT _{V1}			
	VAR	-			
R23	Model	Tricomp	-196.6	Disminucion 1.6 FOBJ No significativa	Selección R21 como modelo Final
	IIV	CL, V1, V2			
	RE	Proporcional			
	EM	FOCEI			
	COV	SEX _{Cl} , WGT _{Cl} WGT _{V2}			
	VAR	-			

IIV: Variabilidad interindividual

RE: Error Residual

EM: Método de estimación. FOCEI First Order Conditional Estimation with ϵ - η Interaction

COV: Covariable

VAR: Covarianza entre variabilidades interindividuales

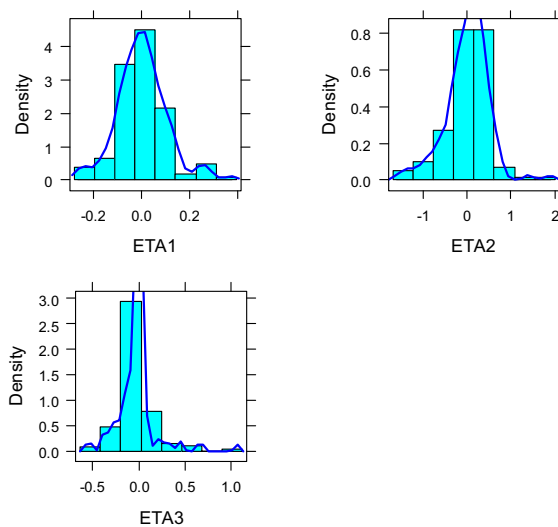


Figura 34. Distribución de los valores de los efectos aleatorios interindividuales asociados al CL (ETA1), a V1 (ETA2) y a V2(ETA3).

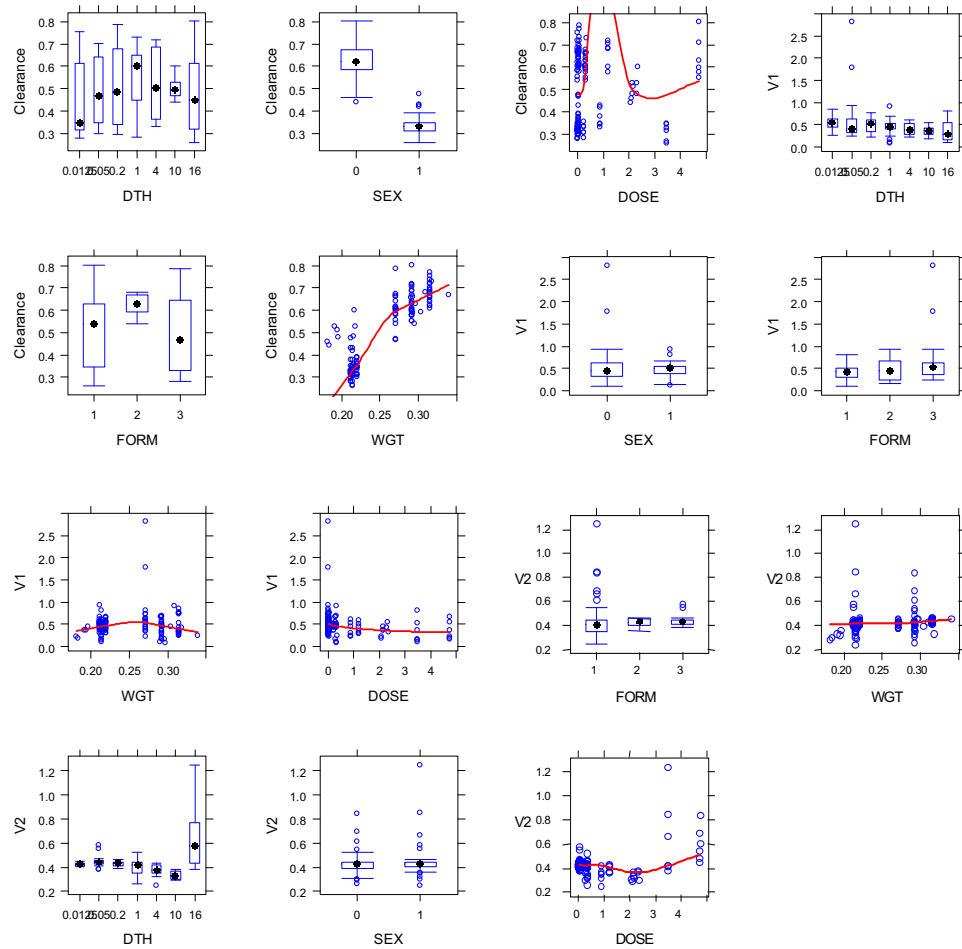


Figura 35. Representación gráfica de los valores individuales de los parámetros que aceptaron variabilidad interindividual (CL, V1 y V2) frente a las covariables disponibles (peso, sexo, vehículo y dosis expresada como variable continua y categórica).

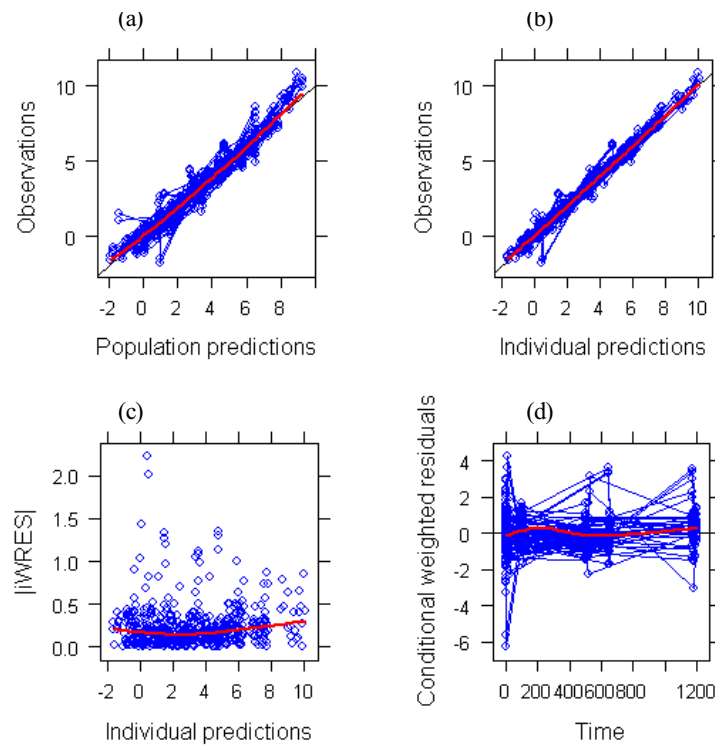


Figura 36. Gráficas de bondad de ajustado correspondientes al modelo farmacocinético final en la rata. (a) conc. experimentales respecto a las conc. predichas poblacionales. (b) conc. experimentales respecto a las conc. individuales predichas (c) residuales individuales ponderados respecto a las conc. individuales predichas y (d) residuales ponderados condicionales respecto al tiempo.

Tabla 49. Parámetros farmacocinéticos poblacionales estimados a partir del modelo farmacocinético poblacional finales la rata y precisión en su estimación (RSE %).

Parámetro		Valor	RSE (%)
CL _{hembra}	L/h	$0.37 \cdot (\text{WGT}/0.255)^{0.65}$	5.40, 39.0
CL _{macho}	L/h	$0.58 \cdot (\text{WGT}/0.255)^{0.65}$	4.50, 39.0
V1	L	0.43	9.20
Q2	L/h	0.11	28.0
V2	L	0.43	18.2
Q3	L/h	0.61	15.0
V3	L	0.39	15.9
IIV _{CL}	%	16.0	35.0
IIV _{V1}	%	65.0	30.0
IIV _{V2}	%	44.0	29.0
Error residual	%	39.0	18.0

Tabla 50. Parámetros farmacocinéticos expresados como microconstantes y macroconstantes de disposición en una rata de peso medio (255 gramos) calculados a partir de los parámetros obtenidos en el modelo poblacional.

Parámetro		Valor Rata Hembra	Valor Rata Macho
K	1/h	0.860	1.35
K ₁₂	1/h	0.256	0.256
K ₂₁	1/h	0.256	0.256
K ₁₃	1/h	1.42	1.42
K ₃₁	1/h	1.56	1.56
α	1/h	3.63	3.97
β	1/h	0.555	0.677
γ	1/h	0.171	0.201
t _{1/2α}	h	0.191	0.175
t _{1/2β}	h	1.25	1.02
t _{1/2γ}	h	4.05	3.45
V _{ss}	L	1.25	1.25

5.2.2.6.3 EVALUACIÓN DEL MODELO FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL

La evaluación del modelo farmacocinético poblacional se realizó mediante la predicción corregida de la evaluación predictiva visual (pc-VPC, prediction corrected Visual Predictive Checks). La Figura 37 muestra pc-VPC para el modelo poblacional final en la rata tras la administración semanal (a) y diaria (b) de elomotecan. En general, la mediana de las concentraciones observadas así como los percentiles 2.5 y 97.5% de los datos observados quedaron incluidos dentro de las bandas correspondientes a los intervalos de confianza del 95% de los percentiles 50%, 2.5% y 97.5% de los datos simulados, respectivamente. Se observaron algunos valores de concentración plasmática de elomotecan que no pudieron ser explicados adecuadamente con el modelo. Estos valores de concentración, correspondieron a las muestras sospechosas observadas en el estudio R3. Dichos valores, no fueron eliminados del análisis poblacional ya que no se dispuso de ninguna prueba de que pudiese haberse producido un error en la obtención o análisis de dichas muestras.

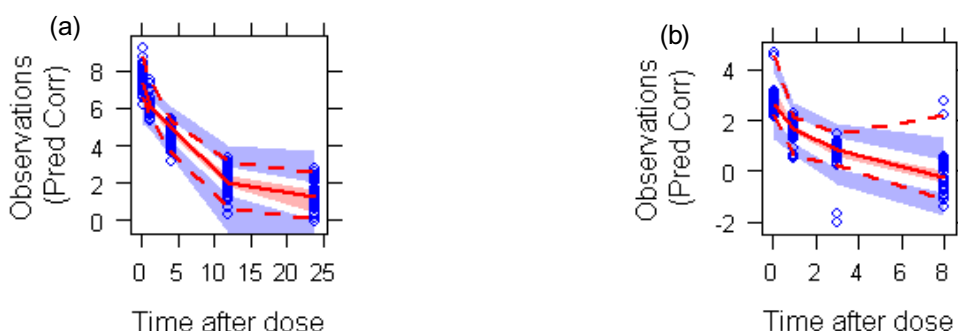


Figura 37. pc-VPC de las concentraciones de elomotecan frente al tiempo del modelo farmacocinético poblacional final de la rata tras la administración semanal (a) y diaria (b). Los círculos corresponden a los datos experimentales. La línea roja continua corresponde a la mediana y las discontinuas corresponden al percentil 2.5 y 97.5% de las concentraciones observadas. Las áreas azules corresponden al IC del 95% del percentil 2.5 y 97.5% y el área roja corresponde al IC del 95% de la mediana de los perfiles de datos simulados.

5.2.2.7 PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS EN LA RATA

En la Tabla 51 se muestran los valores de los principales parámetros farmacocinéticos estimados tras el análisis no compartimental (valor mínimo y máximo) y el análisis poblacional de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas tras la administración del fármaco a ratas macho y hembra. Los valores del aclaramiento (CL) y del volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario (V_{ss}) y semivida de eliminación en ratas macho y hembra tras el análisis poblacional de los datos observados están en concordancia con los valores observados tras el análisis no compartimental.

Tabla 51. Valores de los principales parámetros farmacocinéticos estimados a partir del análisis no compartimental y poblacional de las concentraciones plasmáticas obtenidas tras la administración i.v. del de elomotecan a ratas macho y hembra de los estudios R1, R2, R3, R4 y R5.

Parámetro		Análisis	
		No Compartimental	Poblacional
CL hembra	L/h	0.204 - 0.548	$0.37*(WG/0.255)^{0.65}$
CL macho	L/h	0.270 - 0.796	$0.58*(WG/0.255)^{0.65}$
V_{ss} hembra	L	0.694 - 2.12	1.25
V_{ss} macho	L	0.347 - 1.72	1.25
$t_{1/2\gamma}$ hembra	h	1.20 - 9.25	4.05
$t_{1/2\gamma}$ macho	h	0.98 - 4.20	3.45

5.2.3 ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN EL PERRO

5.2.3.1 ESTUDIO DE DOSIS UNICA P1

5.2.3.1.1 CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE ELOMOTECAN EN EL ESTUDIO P1

Se obtuvieron todas las muestras establecidas en el diseño experimental y éstas se pudieron cuantificar desde el primer tiempo de muestreo (5 minutos) al último (2.5h). En las Tabla 52 y 53 se muestran las concentraciones de elomotecan obtenidas tras la administración del fármaco a las dosis de 0.2, 0.4 y 0.6 mg/kg mediante bolus intravenoso en perros macho y hembras, respectivamente.

La Figura 38 muestra los valores promedio y la desviación estándar de las concentraciones plasmáticas respecto al tiempo a las tres dosis administradas en perros macho (a) y hembra (b). La concentración media observada en perros macho tras la administración del fármaco a la dosis de 0.6 mg/kg es ligeramente inferior a la observada en perros hembra. El perfil de las concentraciones promedio frente el tiempo fue similar en perros macho y hembra para una misma dosis administrada.

RESULTADOS

Tabla 52. Valores individuales, promedios y medianas de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas tras la administración de un bolus intravenoso del fármaco a la dosis de 0.2, 0.4 y 0.6 mg/kg en perros macho del estudio P1.

Dosis Teórica	Concentración plasmática (ng/mL)							
	Tiempo (h)	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Promedio	Mediana	D.E.	C.V. (%)
0.2 mg/kg	0	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.083	160	309	183	217	183	80.2	36.9
	0.25	157	250	197	201	197	46.7	23.2
	1	105	190	152	149	152	42.6	28.6
	2.5	93.2	131.0	113	112	113	18.9	16.8
0.4 mg/kg	0	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.083	587	670	496	584	587	87.0	14.9
	0.25	421	340	374	378	374	40.7	10.8
	1	247	245	282	258	247	20.8	8.07
	2.5	192	181	197	190	192	8.19	4.31
0.6 mg/kg	0	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.083	373	734	529	545	529	181	33.2
	0.25	429	456	356	414	429	51.7	12.5
	1	427	387	274	363	387	79.3	21.9
	2.5	275	333	228	279	275	52.6	18.9

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación

Tabla 53. Valores individuales, promedios y medianas de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas tras la administración de un bolus intravenoso del fármaco a la dosis de 0.2, 0.4 y 0.6 mg/kg en perros hembra del estudio P1.

Dosis Teórica	Concentración plasmática (ng/mL)							
	Tiempo (h)	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Promedio	Mediana	D.E.	C.V. (%)
0.2 mg/kg	0	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.083	150	237	208	198	208	44.3	22.3
	0.25	181	262	151	198	181	57.4	29.0
	1	124	159	85.1	123	124	37.0	30.1
	2.5	93.7	94.8	127	105	95	18.9	18.0
0.4 mg/kg	0	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.083	355	386	498	413	386	75.2	18.2
	0.25	280	293	420	331	293	77.3	23.4
	1	227	240	329	265	240	55.5	20.9
	2.5	194	179	188	187	188	7.55	4.04
0.6 mg/kg	0	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.083	836	840	560	745	836	161	21.5
	0.25	473	644	617	578	617	91.9	15.9
	1	317	389	441	382	389	62.3	16.3
	2.5	244	265	281	263	265	18.6	7.05

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación

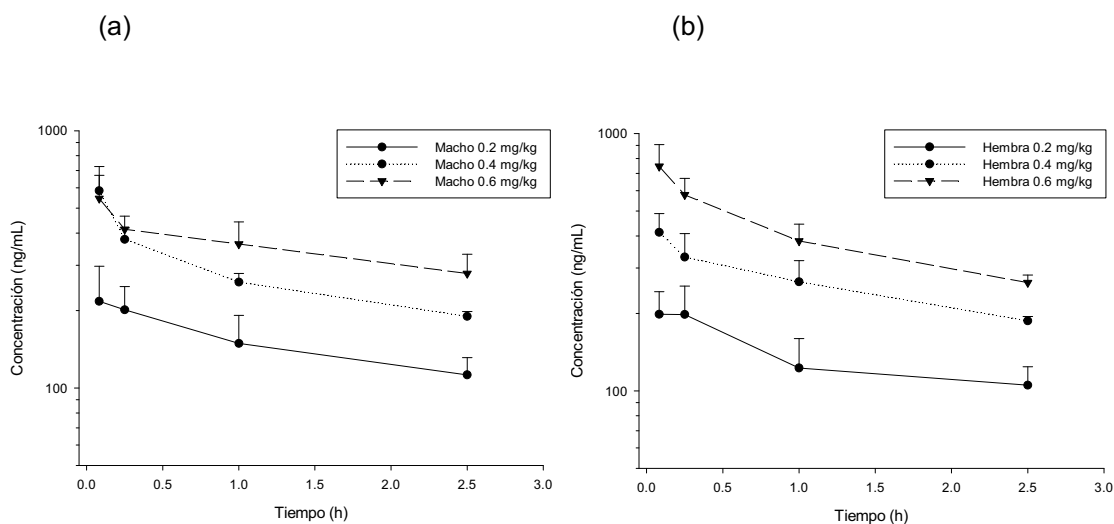


Figura. 38. Perfiles superpuestos de los promedios ($n=3$) y D.E. de las concentraciones plasmáticas de elomotecan frente al tiempo obtenidas tras la administración de un bolus intravenoso del fármaco a la dosis de 0.2, 0.4 y 0.6 mg/kg en perros macho (a) y en perros hembra (b) del estudio P1.

5.2.3.1.2 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO NO COMPARTIMENTAL EN EL ESTUDIO P1

En la Tabla 54 se muestran los valores de los parámetros farmacocinéticos calculados mediante la aproximación no compartimental a partir de los valores individuales de concentración frente al tiempo en perros machos y hembras. Dado que el porcentaje del área bajo la curva extrapolada fue muy elevado, la estimación de los parámetros AUC, semivida aparente de eliminación, volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario y aclaramiento fueron estimados con baja fiabilidad. Además, la estimación de C_0 en algunos animales no fue correcta ya que presentaron un valor de concentración mayor en el segundo tiempo de muestreo (0.25 h) que en el primero (0.083 h). En consecuencia, los resultados obtenidos tras el análisis no compartimental de los datos concentración tiempo del estudio P1, deben tomarse con cautela. Aun así, los valores de los diferentes parámetros farmacocinéticos fueron similares en ambos sexos y no se apreciaron cambios relevantes en los valores de aclaramiento plasmático y volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario tras la administración de las diferentes dosis estudiadas.

Tabla 54. Valores de los parámetros farmacocinéticos estimados a partir de las concentraciones plasmáticas individuales de elomotecan obtenidas tras la administración de un bolus intravenoso del fármaco a las dosis de 0.2, 0.4 y 0.6 mg/kg en perros macho y hembra del estudio P1.

	Dosis mg/kg	C _{max} * ng/mL	C _{max} */D -	AUC _t (ng/mL)·h	AUC (ng/mL)·h	AUC/D -	AUC extr. %	t _{1/2z} h	V _{ss} L·kg ⁻¹	CL L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹
Machos	0.20	162	808	287	730	3652	60.8	3.30	1.10	0.274
	0.20	343	1717	479	945	4723	49.2	2.46	0.70	0.212
	0.20	183	915	377	847	4237	55.6	2.89	1.50	0.236
Machos	0.40	692	1731	717	1311	3278	45.3	2.15	0.90	0.305
	0.40	939	2347	690	1363	3407	49.4	2.58	1.00	0.294
	0.40	571	1427	722	1430	3575	49.5	2.49	1.00	0.280
Machos	0.60	373	622	945	2247	3745	57.9	3.28	1.23	0.267
	0.60	930	1550	1025	3508	5847	70.8	5.17	1.27	0.171
	0.60	644	1073	735	1953	3255	62.3	3.70	1.64	0.307
Hembras	0.20	150	750	318	655	3277	51.5	2.50	1.30	0.305
	0.20	237	1185	410	627	3134	34.7	1.59	0.70	0.319
	0.20	244	1219	296	4863	24315	93.9	0.91	1.00	0.041
Hembras	0.40	399	999	590	1844	4610	68.0	4.48	1.40	0.217
	0.40	443	1107	605	1435	3588	57.8	3.21	1.30	0.279
	0.40	542	1355	788	1311	3278	39.9	1.93	0.80	0.305
Hembras	0.60	1110	1849	907	1788	2979	49.3	2.50	1.18	0.336
	0.60	959	1598	1076	1783	2972	39.6	1.85	0.88	0.336
	0.60	560	933	1083	1903	3172	43.1	2.02	0.92	0.315

* Valor correspondiente a C₀

5.2.3.2 ESTUDIO DE DOSIS ÚNICA P2

5.2.3.2.1 CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE ELOMOTECAN EN EL ESTUDIO P2

Se obtuvieron y analizaron todas las muestras definidas en el diseño experimental a excepción de un perro macho tratado a la dosis de 0.4 mg/kg que murió a las 72 horas post administración del fármaco. En las Tablas 55 y en 56 se muestran las concentraciones de elomotecan obtenidas tras la administración de un bolus intravenoso del fármaco a la dosis de 0.1, 0.2 y 0.4 mg/kg en perros macho y hembra, respectivamente. Se obtuvieron concentraciones superiores al límite de cuantificación desde el primer tiempo de muestreo (10 minutos) hasta las 120-168 horas post administración.

La Figura 39 muestra los valores medios y la desviación estándar de las concentraciones plasmáticas respecto al tiempo a las tres dosis administradas en perros macho (a) y hembras (b). Los perfiles observados fueron similares en perros macho y hembra y entre las diferentes dosis administradas.

Tabla 55. Valores individuales, promedios y medianas de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas tras la administración de un bolus intravenoso del fármaco a la dosis de 0.1, 0.2 y 0.4 mg/kg en perros macho del estudio P2.

Dosis Teórica	Concentración plasmática (ng/mL)							
	Tiempo (h)	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Promedio	Mediana	D.E.	C.V. (%)
0.1 mg/kg	0	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.167	61.5	62.3	78.6	67.5	62.3	9.65	14.3
	1	48.9	43.7	66.1	52.9	48.9	11.7	22.2
	6	34.2	31.5	39.3	35.0	34.2	3.96	11.3
	24	15.2	14.0	16.3	15.2	15.2	1.15	7.58
	48	4.18	4.53	6.04	4.92	4.53	0.988	20.1
	72	1.19	1.56	2.13	1.63	1.56	0.474	29.1
	96	0.352	0.58	0.721	0.551	0.58	0.186	33.8
	120	0.148	0.321	0.253	0.241	0.253	0.087	36.2
	144	BQL	BQL	0.141	0.000	0.000	-	-
168	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-	
0.2 mg/kg	0	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.167	167	135	131	144	135	19.7	13.7
	1	129	110	103	114	110	13.5	11.8
	6	80.1	71.9	69.9	74.0	71.9	5.40	7.31
	24	24.8	19.5	26.5	23.6	24.8	3.65	15.5
	48	5.36	3.58	8.57	5.84	5.36	2.53	43.3
	72	1.32	0.992	2.80	1.70	1.32	0.963	56.5
	96	0.414	0.189	1.14	0.581	0.414	0.497	85.5
	120	0.180	BQL	0.363	0.181	0.180	0.182	101
	144	BQL	BQL	0.122	0.000	0.000	-	-
168	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-	
0.4 mg/kg	0	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.167	271	254	193	239	254	41.0	17.1
	1	202	177	171	183	177	16.4	8.97
	6	134	101	126	120	126	17.2	14.3
	24	46.0	47.2	53.6	48.9	47.2	4.09	8.35
	48	10.6	15.4	20.3	15.4	15.4	4.85	31.4
	72	3.05	8.69	ad	5.87	5.87	3.99	67.9
	96	0.824	5.07	ad	2.95	2.95	3.00	102
	120	0.260	2.01	ad	1.14	1.14	1.24	109
	144	0.102	1.07	ad	0.586	0.586	0.684	117
168	BQL	0.361	ad	0.000	0.000	-	-	

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación

ad: Muerte del animal

RESULTADOS

Tabla 56. Valores individuales, promedios y medianas de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas tras la administración de un bolus intravenoso del fármaco a la dosis de 0.1, 0.2 y 0.4 mg/kg en perros hembra del estudio P2.

Dosis Teórica	Concentración plasmática (ng/mL)							
	Tiempo (h)	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Promedio	Mediana	D.E.	C.V. (%)
0.1 mg/ kg	0	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.167	85.1	90.6	149	108	90.6	35.4	32.7
	1	56.1	58.0	80.4	64.8	58.0	13.5	20.8
	6	30.1	34.7	37.8	34.2	34.7	3.87	11.3
	24	11.5	8.38	15.0	11.6	11.5	3.31	28.5
	48	4.46	1.74	5.58	3.93	4.46	1.97	50.3
	72	1.98	0.364	2.04	1.46	1.98	0.951	65.1
	96	0.838	BQL	0.892	0.577	0.838	0.500	86.7
	120	0.424	BQL	0.339	0.254	0.339	0.224	88.2
	144	0.214	BQL	0.169	0.128	0.169	0.113	88.3
168	0.131	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-	
0.2 mg/ kg	0	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.167	155	195	162	171	162	21.4	12.5
	1	113	127	93.1	111	113	17.0	15.3
	6	66.7	80.2	61.4	69.4	66.7	9.69	14.0
	24	26.3	22.0	26.1	24.8	26.1	2.43	9.79
	48	9.50	5.01	12.3	8.94	9.50	3.68	41.2
	72	5.15	1.22	4.54	3.64	4.54	2.12	58.2
	96	1.94	0.421	2.47	1.61	1.94	1.06	66.0
	120	0.936	0.174	1.40	0.837	0.936	0.619	74.0
	144	0.390	BQL	0.515	0.302	0.390	0.269	89.1
168	0.232	BQL	0.316	0.183	0.232	0.164	89.6	
0.4 mg/ kg	0	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.167	444	563	352	453	444	106	23.4
	1	251	387	233	290	251	84.2	29.0
	6	165	189	120	158	165	35.0	22.2
	24	60.9	60.4	43.4	54.9	60.4	10.0	18.1
	48	18.8	10.7	14.3	14.6	14.3	4.06	27.8
	72	5.82	3.96	5.77	5.18	5.77	1.06	20.4
	96	2.12	0.918	2.31	1.78	2.12	0.755	42.3
	120	0.760	0.274	1.05	0.695	0.760	0.392	56.4
	144	0.201	BQL	0.336	0.179	0.201	0.169	94.4
168	BQL	BQL	0.188	0.000	0.000	-	-	

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación

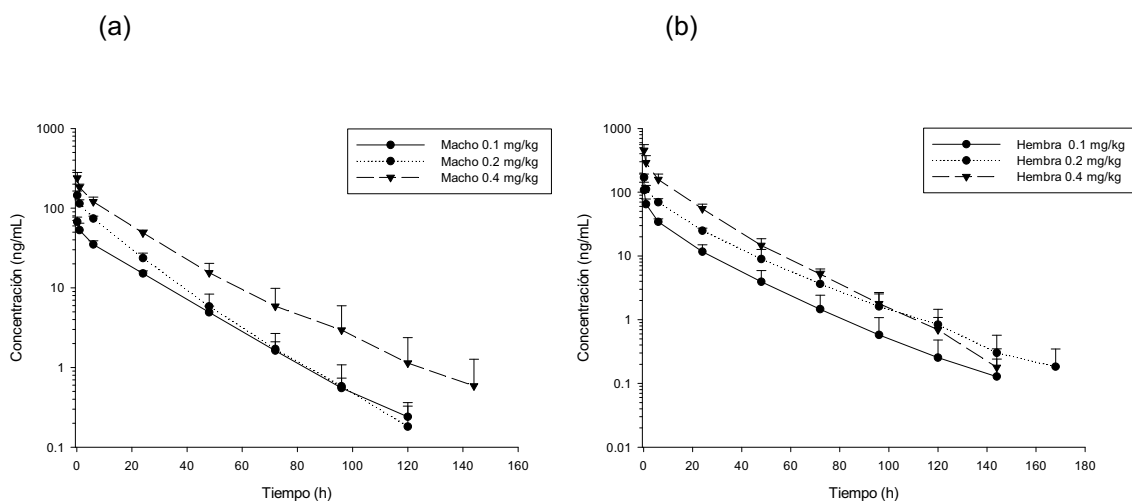


Figura 39. Perfiles superpuestos de los promedios ($n=3$) y D.E. de las concentraciones plasmáticas de elomotecan frente al tiempo obtenidas tras la administración de un bolus intravenoso del fármaco a la dosis de 0.1, 0.2 y 0.4 mg/kg en perros macho (a) y en perros hembra (b) del estudio P2.

5.2.3.2.2 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO NO COMPARTIMENTAL EN EL ESTUDIO P2

En la Tabla 57 se muestran los valores de los parámetros farmacocinéticos estimados mediante la aproximación no compartimental para cada animal. El animal que murió durante la realización del estudio, presentó un valor de exposición ($AUC = 4097 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}$), ligeramente superior al observado en los otros dos perros macho.

Los parámetros farmacocinéticos estimados fueron del mismo orden para perros macho y hembra a las tres dosis administradas a excepción de C_{max} que fue superior en perros hembra que en perros macho. Los valores obtenidos de aclaramiento (CL de 0.086 a $0.130 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ en perros machos y de 0.082 a $0.134 \text{ L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ en perros hembras) sugieren una eliminación lenta del elomotecan en el perro ya que el valor fisiológico del flujo sanguíneo en el hígado es de $1.85 \text{ L/h} \cdot \text{kg}^{[98]}$, asumiendo un cociente de partición sangre/plasma de 0.6. Estos resultados están en concordancia con los resultados de la semivida aparente de eliminación ($t_{1/2\lambda Z}$ de 10.7 a 21.1 horas en perros machos y $t_{1/2\lambda Z}$ de 9.8 a 21.5 horas en perros hembras).

Tabla 57. Valores de los parámetros farmacocinéticos estimados a partir de las concentraciones plasmáticas individuales de elomotecan obtenidas tras la administración de un bolus intravenoso del fármaco a las dosis de 0.1, 0.2, 0.4 mg/kg en perros macho y hembra del estudio P2.

	Dosis mg/kg	C _{max} * ng/mL	C _{max} */D -	AUC _t (ng/mL)·h	AUC (ng/mL)·h	AUC/D -	AUC extr. %	t _{1/2z} h	V _{ss} L·kg ⁻¹	CL L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹
Machos	0.10	66.3	663	930	936	9363	0.62	16.4	2.40	0.109
	0.10	64.0	640	968	971	9707	0.25	14.1	2.04	0.104
	0.10	81.4	814	1190	1192	11923	0.22	16.6	1.86	0.086
Machos	0.20	139	693	1923	1925	9627	0.14	15.4	2.13	0.105
	0.20	176	879	1913	1915	9574	0.11	12.3	1.63	0.106
	0.20	140	700	1581	1584	7918	0.18	10.7	1.84	0.130
Machos	0.40	271	678	3426	3438	8596	0.36	21.1	3.11	0.118
	0.40	288	719	3338	3339	8348	0.04	13.2	2.05	0.123
	0.40	198	496	3723	4097	10243	9.14	20.0	2.81	0.099
Hembras	0.10	91.6	916	939	942	9417	0.31	20.9	2.60	0.110
	0.10	164	1644	1208	1210	12097	0.12	17.8	1.78	0.086
	0.10	98.2	982	759	764	7640	0.62	9.8	1.76	0.134
Hembras	0.20	164	818	2065	2070	10352	0.26	20.0	2.35	0.098
	0.20	215	1074	1854	1856	9282	0.13	12.8	1.71	0.114
	0.20	188	939	2039	2048	10238	0.40	21.5	2.65	0.099
Hembras	0.40	395	987	3521	3525	8812	0.11	17.5	2.34	0.117
	0.40	599	1497	4862	4866	12165	0.09	12.2	1.19	0.082
	0.40	485	1214	4520	4524	11311	0.10	14.7	1.72	0.090

* Valor correspondiente a C₀

5.2.3.3 ESTUDIO DE DOSIS UNICA P3

5.2.3.3.1 CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE ELOMOTECAN EN EL ESTUDIO P3

Un perro macho tratado a la dosis de 0.45 mg/kg y un perro hembra tratada a la dosis de 0.6 mg/kg murieron transcurridos 4 días de la administración del fármaco. En la Tabla 58 se muestran las concentraciones de elomotecan obtenidas tras la administración del fármaco a las dosis de 0.3, 0.45 y 0.6 mg/kg mediante infusión de 15 minutos en perros macho y hembras. Las muestras pudieron ser cuantificadas desde el primer tiempo de muestreo (0.25 horas) hasta las 72 horas en perros macho y hasta las 120 horas en perros hembra.

La Figura 40 muestra las concentraciones plasmáticas frente al tiempo a las tres dosis administradas en perros macho (a) y hembras (b), respectivamente. Los perfiles observados sugieren que no existe linealidad en el ámbito de dosis estudiado ya que el perfil de las concentraciones plasmáticas frente al tiempo tras recibir la dosis de 0.45 mg/kg es superior al perfil de las concentraciones plasmáticas frente al tiempo tras recibir la dosis de 0.6 mg/kg.

Tabla 58. Concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas tras la administración del fármaco por infusión de 15 minutos a la dosis de 0.3, 0.45 y 0.6 mg/kg en perros macho y hembra del estudio P3.

Dosis Teórica	Concentración plasmática (ng/mL)		
	Tiempo (h)	Perro 1 Macho	Perro 2 Hembra
0.3 mg/ kg	0	BQL	BQL
	0.25	222	175
	1	151	172
	2	147	127
	8	72.4	79.9
	24	35.7	26.4
	48	9.68	9.72
	72	2.16	3.82
	120	BQL	0.177
	168	BQL	BQL
0.45 mg/ kg	0	BQL	BQL
	0.25	331	375
	1	281	351
	2	235	255
	8	108	183
	24	52.9	119
	48	17.3	37.5
	72	6.75	18.1
	120	ad	0.304
	168	ad	BQL
0.6 mg/ kg	0	BQL	BQL
	0.25	387	341
	1	334	243
	2	278	214
	8	126	121
	24	46.3	54.9
	48	8.87	11.5
	72	3.96	9.13
	120	BQL	ad
	168	BQL	ad

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación

ad: Muerte del animal

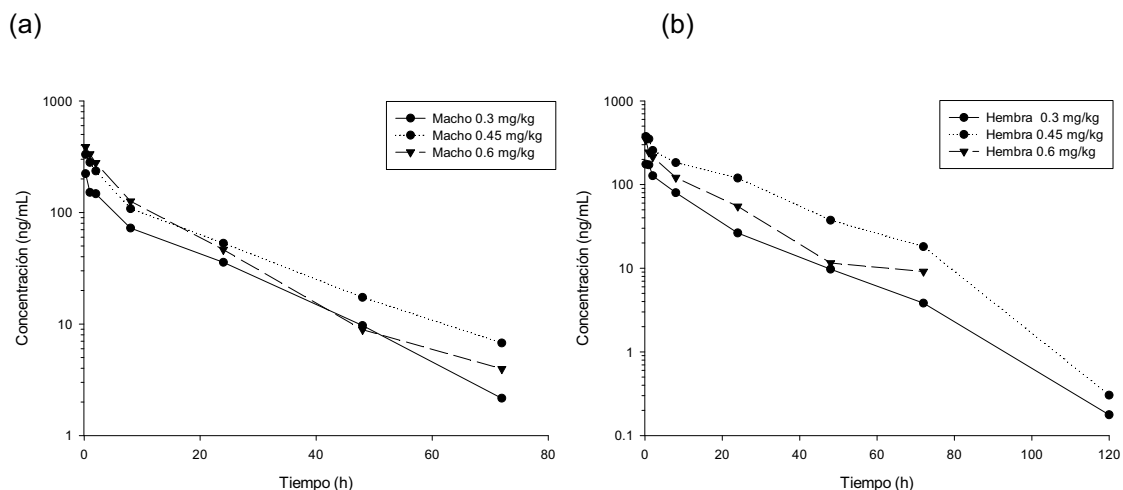


Figura 40. Perfiles superpuestos de las concentraciones plasmáticas individuales de elomotecan frente al tiempo obtenidas tras la administración del fármaco por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.3, 0.45 y 0.6mg/kg en perros macho (a) y en perros hembra (b) del estudio P3.

5.2.3.3.2 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO NO COMPARTIMENTAL EN EL ESTUDIO P3

Para cada animal, se determinaron los parámetros farmacocinéticos mediante la aproximación no compartimental. En la Tabla 59 se muestran los valores de los parámetros obtenidos. Los valores de la exposición del macho que recibió 0.45 mg/kg y de la hembra que recibió 0.6 mg/kg de elomotecan podrían estar sesgados debido al fallecimiento de los animales. Debido a las limitaciones del estudio en el número de animales (un animal por sexo y dosis), no se puede establecer conclusiones sobre la linealidad farmacocinética del compuesto.

Los valores del aclaramiento (0.110 a $0.160 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ en machos y 0.070 a $0.150 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ en hembras) obtenidos, sugieren una eliminación lenta del elomotecan en el perro ya que el valor fisiológico del flujo sanguíneo en el hígado es de $1.85 \text{ L/h}\cdot\text{kg}$ [98]. Los resultados obtenidos, están en concordancia con los obtenidos en el estudio P2.

Tabla 59. Valores de los parámetros farmacocinéticos estimados a partir de las concentraciones plasmáticas individuales del elomotecan obtenidas tras la administración del fármaco por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.3, 0.45 y 0.6 mg/kg en perros macho y hembra en el estudio P3.

	Dosis mg/kg	C _{max} ng/ml	C _{max} /D -	AUC _t (ng/ml)·h	AUC (ng/ml)·h	AUC/D -	AUC extr. %	t _{1/2z} h	V _{ss} l·kg ⁻¹	CL l·kg ⁻¹ ·h ⁻¹
Machos	0.30	222	740	2375	2417	8057	1.76	12.6	2.16	0.120
	0.45*	331	736	3774	3923	8718	3.79	15.9	2.30	0.110
	0.60	387	645	3734	3793	6321	1.54	12.5	2.33	0.160
Hembras	0.30	175	583	2292	2296	7654	0.17	13.0	2.39	0.130
	0.45	375	833	6848	6859	15241	0.15	12.8	1.49	0.070
	0.6*	341	568	3722	3905	6509	4.70	11.1	3.06	0.150

5.2.3.4 ESTUDIO DE DOSIS REPETIDAS P4

5.2.3.4.1 CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE ELOMOTECAN EN EL ESTUDIO P4

Se obtuvieron y analizaron todas las muestras establecidas en el diseño experimental y éstas se pudieron cuantificar desde el primer tiempo de muestreo (0.25 h) al último (24 h). En la Tabla 60 se muestran las concentraciones de elomotecan obtenidas tras la administración diaria del fármaco por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 mg/kg/día durante 1 y 7 días en perros macho y hembra.

La Figura 41 muestra los perfiles de concentraciones plasmáticas respecto al tiempo halladas después de la primera dosis y tras siete días de tratamiento a las diferentes dosis administradas a los perros machos (a) y hembras (b). Las fases terminales de los perfiles observados fueron similares en todos los casos. El día 7, los perfiles observados fueron superiores a los observados el día 1, sugiriendo una posible acumulación del fármaco.

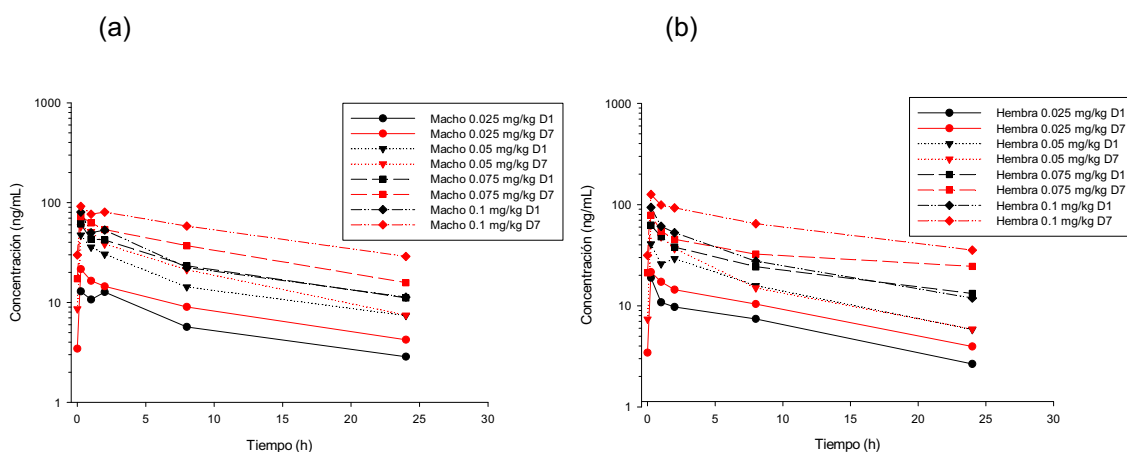


Figura 41. Perfiles superpuestos de las concentraciones plasmáticas individuales de elomotecan frente al tiempo obtenidas los días 1 y 7 tras la administración diaria del fármaco por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.025, 0.05, 0.075 y 0.1mg/kg/día durante 7 días en perros macho (a) y (b) del estudio P4.

RESULTADOS

Tabla 60. Concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas los días 1 y 7 tras la administración diaria del fármaco por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.025, 0.05, 0.075 y 0.1mg/kg/día durante 7 días en perros macho y hembra del estudio P4.

Dosis Teórica	Concentración plasmática (ng/mL)		
	Tiempo (h)	Perro 1 Macho	Perro 2 Hembra
0.025 mg/kg día 1	0	BQL	BQL
	0.25	12.9	18.9
	1	10.7	10.8
	2	12.7	9.72
	8	5.69	7.42
	24	2.86	2.66
0.025 mg/kg día 7	0	3.44	3.44
	0.25	21.6	21.5
	1	16.5	17.2
	2	14.5	14.4
	8	9.02	10.4
	24	4.23	3.96
0.05 mg/kg día 1	0	BQL	BQL
	0.25	47.3	40.8
	1	35.8	25.9
	2	30.4	29.2
	8	14.3	15.8
	24	7.39	5.82
0.05 mg/kg día 7	0	8.61	7.37
	0.25	57.4	62.8
	1	51.3	47.9
	2	38.4	36.7
	8	21.3	15.0
	24	7.47	5.88
0.075 mg/kg día 1	0	BQL	BQL
	0.25	61.1	62.7
	1	43.2	48.1
	2	42.2	38.0
	8	23.3	24.3
	24	11.1	13.2
0.075 mg/kg día 7	0	17.3	21.2
	0.25	72.5	78.5
	1	62.7	54.8
	2	53.6	45.3
	8	37.0	32.4
	24	15.8	24.5
0.1 mg/kg día 1	0	BQL	BQL
	0.25	80.4	93.9
	1	50.0	61.0
	2	53.1	52.7
	8	22.4	27.6
	24	11.3	11.9
0.1 mg/kg día 7	0	29.9	31.5
	0.25	91.8	126
	1	76.7	99.2
	2	80.5	92.8
	8	58.2	64.7
	24	28.9	35.5

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación

5.2.3.4.2 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO NO COMPARTIMENTAL EN EL ESTUDIO P4

En la Tabla 61 se muestran los valores de los parámetros farmacocinéticos calculados mediante la aproximación no compartimental a partir de los valores de concentración plasmática frente al tiempo a las diferentes dosis administradas en perros macho y hembra. En general, los valores de C_{max} observados fueron mayores en perros hembra que en perros macho. Dado que el porcentaje del área bajo la curva extrapolada obtenido el día 1 fue muy elevado (>20%), el valor del AUC_t se consideró el parámetro representativo de la exposición. En todos los casos, los valores de AUC_t normalizados por la dosis del día 7 fueron superiores a los observados el día 1. Los valores del aclaramiento obtenidos el día 7, fueron ligeramente inferiores a los valores observados el día 1 en perros machos y hembras. Este efecto, fue más evidente a la dosis de 0.1 mg/kg/día.

La Tabla 62 muestra los índices de acumulación del elomotecan a las diferentes dosis ensayadas. Los resultados obtenidos sugieren que existe una ligera acumulación del fármaco en perros macho y hembras tras la administración diaria del fármaco por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.025, 0.05, 0.075, 0.1 mg/kg/día durante 7 días.

Debido a las limitaciones del estudio en el número de animales (un animal de cada sexo por cada dosis), no se puede establecer conclusiones sobre la toxicidad o linealidad farmacocinética del compuesto.

Tabla 61. Valores de los parámetros farmacocinéticos estimados a partir de las concentraciones plasmáticas individuales del elomotecan obtenidas los días 1 y 7 tras la administración del fármaco por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.025, 0.05, 0.075 y 0.1 mg/kg/día durante 7 días en perros macho y hembra del estudio P4.

	Dosis mg/kg	C_{max} ng/mL	C_{max}/D -	AUC_t (ng/mL)·h	AUC_t (ng/mL)·h	AUC/D -	$AUC\ extr.$ %	$t_{1/2z}$ h	V_{ss} L·kg ⁻¹	CL^* L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹
Machos Día 1	0.025	12.9	516	136	139	5555	22.9	10.5	2.15	0.142
	0.05	47.3	946	355	362	7239	21.6	10.0	1.60	0.110
	0.075	61.1	815	527	537	7164	25.0	11.4	1.74	0.107
	0.1	80.4	804	570	578	5784	20.9	10.0	1.99	0.139
Machos Día 7	0.025	21.6	864	204	204	8151		12.1	2.15	0.123
	0.05	57.4	1148	481	481	9628		8.81	1.33	0.104
	0.075	72.5	967	789	789	10524		12.1	1.66	0.095
	0.1	91.8	918	1241	1241	12406		15.1	1.76	0.081
Hembras Día 1	0.025	18.9	756	144	147	5869	23.0	11.0	2.08	0.134
	0.05	40.8	816	338	343	6867	18.3	9.26	1.61	0.121
	0.075	62.7	836	549	562	7488	32.6	14.3	1.86	0.092
	0.1	93.9	939	643	652	6519	20.9	10.3	1.77	0.123
Hembras Día 7	0.025	21.5	860	212	212	8476		11.3	1.92	0.118
	0.05	62.8	1256	465	465	9290		8.0	1.23	0.108
	0.075	78.5	1047	768	791	10545		25.5	3.43	0.095
	0.1	126	1260	1446	1446	14464		16.3	1.62	0.069

* Día 7 corresponde a CL_{ss}

Tabla 62. Índices de acumulación obtenidos el día 7 tras la administración diaria del elomotecan por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.025, 0.05, 0.075 y 0.1 mg/kg/día en perros macho y hembra del estudio P4.

	Dosis mg/kg/día	C _{max} ng/mL	R _{acCmax}	AUC _t (ng/mL)·h	R _{acAUC}
Machos Día 1	0.025	12.9		139	
	0.05	47.3		362	
	0.075	61.1		537	
	0.1	80.4		578	
Machos Día 7	0.025	21.6	1.7	204	1.5
	0.05	57.4	1.2	481	1.3
	0.075	72.5	1.2	789	1.5
	0.1	91.8	1.1	1241	2.1
Hembras Día 1	0.025	18.9		147	
	0.05	40.8		343	
	0.075	62.7		562	
	0.1	93.9		652	
Hembras Día 7	0.025	21.5	1.1	212	1.4
	0.05	62.8	1.5	465	1.4
	0.075	78.5	1.3	791	1.4
	0.1	126	1.3	1446	2.2

5.2.3.5 ESTUDIO DE DOSIS REPETIDAS P5

5.2.3.5.1 CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE ELOMOTECAN EN EL ESTUDIO P5

No fue posible obtener las muestras planificadas en el diseño experimental a partir de 1.5 horas post administración del día 7 en el perro macho tratado a la dosis de 0.2mg/kg/día ni en los animales tratados a dosis superiores (0.8 y 1.4 mg/kg/día) debido al fallecimiento de dichos animales. En la Tabla 63 se muestran las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas en el estudio de dosis repetidas P5 en el que se administró el fármaco a las dosis de 0.2, 0.8 y 1.4 mg/kg/día por infusión de 15 minutos durante 7 días consecutivos en perros macho y hembra.

La Figura 42 muestra los perfiles de las concentraciones plasmáticas del elomotecan respecto al tiempo obtenidos en machos (a) y hembras (b). Tras la primera administración del fármaco, los perfiles observados fueron similares en perros macho y hembra. En los perfiles observados el día 7 en los animales administrados con elomotecan a la dosis de 0.2 mg/kg/día, se evidenció que las concentraciones plasmáticas frente el tiempo obtenidas fueron superiores a las observadas tras la administración de la primera dosis.

Tabla 63. Concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas los días 1 y 7 tras la administración diaria del fármaco por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.2, 0.8 y 1.4 mg/kg/día durante 7 días en perros macho y hembra en el estudio P5.

Dosis Teórica	Concentración plasmática (ng/mL)		
	Tiempo (h)	Perro 1 Macho	Perro 2 Hembra
0.2 mg/kg/día día 1	0	BQL	BQL
	0.25	176	169
	1.5	113	121
	6	62.4	66.2
	24	17.9	17.2
0.2 mg/kg/día día 7	0	126	86.2
	0.25	396	291
	1.5	350	255
	6	ad	131
	24	ad	95.1
0.8 mg/kg/día día 1	0	BQL	BQL
	0.25	518	712
	1.5	375	463
	6	272	293
	24	111	137
0.8 mg/kg/día día 7	0	ad	ad
	0.25	ad	ad
	1.5	ad	ad
	6	ad	ad
	24	ad	ad
1.4 mg/kg/día día 1	0	BQL	BQL
	0.25	1130	1180
	1.5	724	770
	6	401	485
	24	157	224
1.4 mg/kg/día día 7	0	ad	ad
	0.25	ad	ad
	1.5	ad	ad
	6	ad	ad
	24	ad	ad

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación

ad: Muerte del animal

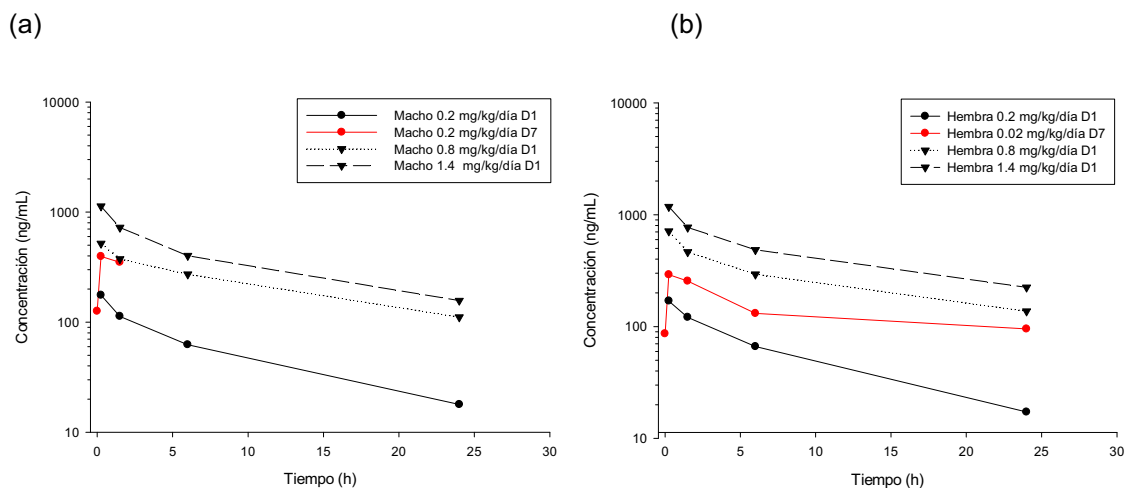


Figura 42. Perfiles comparativos de las concentraciones plasmáticas de elomotecan frente al tiempo obtenidos tras la administración diaria del fármaco por infusión de 15 minutos a las dosis a las dosis de 0.2, 0.8 y 1.4 mg/kg/día durante 1 y 7 días en perros macho (a) y hembra (b).

5.2.3.5.2 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO NO COMPARTIMENTAL EN EL ESTUDIO P5

Los parámetros farmacocinéticos hallados mediante la aproximación no compartimental para cada dosis y sexo tras la primera administración del fármaco, se muestran en la Tabla 64.

El parámetro representativo de la exposición C_{max}/D sugirió un comportamiento lineal en el ámbito de dosis estudiado en ambos sexos. El parámetro AUC no se considera significativo de la exposición ya que el porcentaje de área bajo la curva extrapolado sólo es inferior al 20% en el caso de la administración de la dosis más baja (0.2 mg/kg/día).

Tabla 64. Valores de los parámetros farmacocinéticos estimados a partir de las concentraciones plasmáticas individuales tras la primera administración de elomotecan mediante infusión de 15 minutos a la dosis de 0.2, 0.8, 1.4 mg/kg/día en perros macho y hembra del estudio P5.

	Dosis mg/kg	C_{max} ng/mL	C_{max}/D -	AUC_t (ng/mL)·h	AUC (ng/mL)·h	AUC/D -	AUC extr. %	$t_{1/2z}$ h	V_{ss} L·kg ⁻¹	CL L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹
Machos Día 1	0.20	176	880	1225	1447	7236	15.4	8.85	1.71	0.138
	0.80	518	648	5295	7375	9219	28.2	13.1	2.03	0.109
	1.40	1130	807	8425	10818	7727	22.1	10.9	2.00	0.129
Hembras Día 1	0.20	169	845	1264	1465	7326	13.7	8.32	1.60	0.137
	0.80	712	890	6178	8811	11014	29.9	13.7	1.77	0.091
	1.40	1180	843	10204	14447	10319	29.4	13.5	1.86	0.097

5.2.3.6 ESTUDIO DE DOSIS REPETIDAS P6

5.2.3.6.1 CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE ELOMOTECAN EN EL ESTUDIO P6

Se obtuvieron las muestras a los tiempos de muestreo establecidos en el diseño experimental tras la administración de elomotecan a la dosis de 0.2 mg/kg/semana. Los animales tratados a dosis superiores (0.8 y 1.4 mg/kg/semana) fallecieron entre los días 5 y 7 post administración. En la Tabla 65, se muestran las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas en el estudio de dosis repetidas P6 tras la administración del fármaco mediante infusión de 15 minutos a las dosis de 0.2, 0.8 y 1.4mg/kg/semana durante 3 semanas consecutivas en perros macho y hembra.

La Figura 43 muestra los perfiles de las concentraciones plasmáticas de elomotecan respecto al tiempo en machos (a) y hembras (b). Se observó un cambio en el perfil de eliminación del fármaco en los perros hembra tratados con 0.8 y 1.4 mg/kg/semana a partir de las 48 horas post administración posiblemente debido a un cambio en el estado fisiológico del animal. Los perfiles observados el día 15 en los animales administrados con elomotecan a la dosis de 0.2 mg/kg/semana, parecen indicar que no hubo acumulación del fármaco tras tres administraciones de elomotecan a la dosis de 0.2 mg/kg/semana.

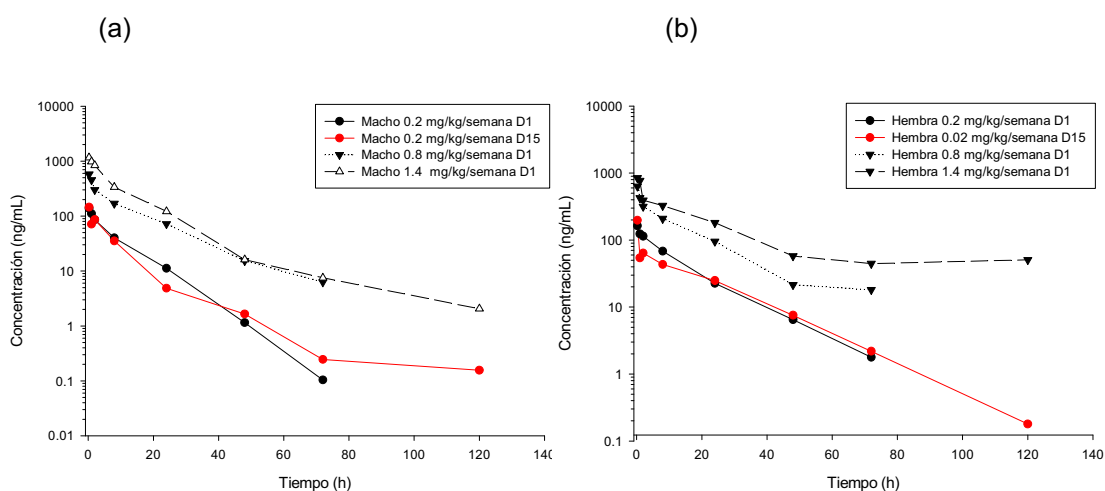


Figura 43. Perfiles superpuestos de las concentraciones plasmáticas individuales de elomotecan frente al tiempo obtenidas los días 1 y 15 tras la administración semanal del fármaco por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.2, 0.8 y 1.4mg/kg/semana durante 3 semanas en perros macho (a) y hembra (b) del estudio P6.

RESULTADOS

Tabla 65. Concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas los días 1 y 15 tras la administración semanal del fármaco por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.2, 0.8 y 1.4 mg/kg/semana durante 3 semanas en perros macho y hembra del estudio P6.

Concentración plasmática (ng/mL)							
Dosis Teórica	Tiempo (h)	Perro 1 Macho	Perro 2 Hembra	Dosis Teórica	Tiempo (h)	Perro 1 Macho	Perro 2 Hembra
0.2 mg/ kg/semana día 1	0	BQL	BQL	0.2 mg/ kg/semana día 15	0	BQL	BQL
	0.25	138	163		0.25	145	197
	1	111	124		1	71.2	54.2
	2	85.8	114		2	86.3	64.0
	8	40.0	68.3		8	35.3	43.2
	24	11.2	22.6		24	4.86	24.9
	48	1.15	6.49		48	1.65	7.54
	72	0.104	1.78		72	0.245	2.19
	120	BQL	BQL		120	0.156	0.179
168	BQL	BQL	168	BQL	BQL		
0.8 mg/ kg/semana día 1	0	BQL	BQL	0.8 mg/ kg/semana día 15	0	ad	ad
	0.25	578	633		0.25	ad	ad
	1	454	424		1	ad	ad
	2	300	317		2	ad	ad
	8	169	209		8	ad	ad
	24	71.9	95.3		24	ad	ad
	48	15.3	21.5		48	ad	ad
	72	6.27	18.1		72	ad	ad
	120	ad	ad		120	ad	ad
168	ad	ad	168	ad	ad		
1.4 mg/ kg/semana día 1	0	BQL	BQL	1.4 mg/ kg/semana día 15	0	ad	ad
	0.25	1160	846		0.25	ad	ad
	1	976	771		1	ad	ad
	2	835	392		2	ad	ad
	8	336	326		8	ad	ad
	24	122	181		24	ad	ad
	48	16.1	57.7		48	ad	ad
	72	7.52	44.5		72	ad	ad
	120	2.05	50.7		120	ad	ad
168	ad	ad	168	ad	ad		

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación

ad: Muerte del animal

5.2.3.6.2 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO NO COMPARTIMENTAL EN EL ESTUDIO P6

En la Tabla 66 se muestran los parámetros farmacocinéticos calculados mediante aproximación no compartimental a partir de los valores de concentración plasmática obtenidos a cada tiempo de muestreo y dosis en perros macho y hembra tras la primera administración.

El área bajo la curva resultó más elevado en hembras que en machos en las tres dosis administradas. El valor de C_{max} aumentó proporcionalmente con la dosis en el caso de perros macho y disminuyó menos que proporcionalmente en el caso de perros hembra. La semivida aparente de eliminación tras la administración de 0.8 y 1.4 mg/kg/semana en hembras se considera orientativa ya que a partir de las 48 horas post administración se observó un cambio en el perfil farmacocinético.

Tabla 66. Valores de los parámetros farmacocinéticos estimados a partir de las concentraciones plasmáticas obtenidas tras la primera administración de elomotecan por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.2, 0.8 y 1.4 mg/kg/semana en perros macho y hembra del estudio P6.

	Dosis mg/kg	C _{max} ng/ml	C _{max} /D -	AUC _t (ng/ml)·h	AUC (ng/ml)·h	AUC/D -	AUC extr. %	t _{1/2z} h	V _{ss} l·kg ⁻¹	CL l·kg ⁻¹ ·h ⁻¹
Machos Día 1	0.20	138	690	1047	1048	5239	0.10	7.11	2.00	0.191
	0.80	578	723	5137	5248	6560	2.11	13.6	2.52	0.152
	1.40	1160	829	10244	10315	7368	0.69	24.4	1.98	0.136
Hembras Día 1	0.20	163	815	1840	1874	9369	1.81	13.1	1.75	0.107
	0.80	633	791	6374	6794	8492	6.18	20.0	2.64	0.118
	1.40	846	604	13452	16839	12028	20.11	61.8	5.72	0.083

5.2.3.7 ESTUDIO DE DOSIS REPETIDAS P7

5.2.3.7.1 CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE ELOMOTECAN EN EL ESTUDIO P7

Se obtuvieron y analizaron todas las muestras establecidas en el diseño experimental obteniéndose valores superiores al límite de cuantificación desde el tiempo 0.083 a 48-72 horas post administración. Las Tablas 67 y 68 muestran las concentraciones de elomotecan obtenidas tras la administración semanal del fármaco por infusión i.v. de 15 minutos a las dosis de 0.01, 0.05 y 0.25 mg/kg/semana durante 1, 22 y 50 días de tratamiento en perros macho y hembra, respectivamente.

La Figura 44 muestra los valores promedio y la desviación estándar (D.E.) de las concentraciones plasmáticas respecto al tiempo halladas tras la administración de elomotecan por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.01, 0.05 y 0.25 mg/kg/semana durante 1, 22 y 50 días de tratamiento en perros macho (a) y hembra (b). Los perfiles de la concentración media respecto al tiempo fueron similares en ambos sexos y en los diferentes días de administración a las diferentes dosis estudiadas.

RESULTADOS

Tabla 67 (1ª parte). Valores individuales, promedios y medianas de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas los días 1, 22 y 50 tras la administración semanal del fármaco por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.01, 0.05 y 0.25mg/kg/semana en perros macho del estudio P7.

Dosis	Concentración plasmática (ng/mL)										
	Teórica	Tiempo (h)	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Perro 4	Perro 5	Promedio	Mediana	D.E.	C.V. (%)
0.01 mg/kg/semana Día 1		0	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
		0.083	7.52	7.86	11.5	10.1	10.7	9.54	10.1	1.76	18.5
		0.25	6.88	7.08	9.60	9.09	9.71	8.47	9.09	1.38	16.3
		1	5.02	4.74	6.71	5.80	6.76	5.81	5.80	0.933	16.1
		2	3.73	4.14	5.65	4.59	4.65	4.55	4.59	0.718	15.8
		8	2.69	2.67	3.40	3.52	3.19	3.09	3.19	0.396	12.8
		24	0.966	0.762	1.04	1.81	1.10	1.14	1.04	0.398	35.0
		48	0.168	0.111	0.146	0.440	0.176	0.208	0.168	0.132	63.4
	72	BQL	BQL	BQL	0.119	BQL	0.000	0.000	-	-	
0.01 mg/kg/semana Día 22		0	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
		0.083	7.85	9.40	11.8	9.08	10.1	9.65	9.4	1.45	15.1
		0.25	6.50	6.88	9.03	7.30	9.22	7.79	7.3	1.26	16.1
		1	5.63	4.83	6.90	5.58	5.56	5.70	5.6	0.75	13.1
		2	4.89	4.39	5.77	4.39	5.42	4.97	4.9	0.62	12.4
		8	2.65	2.93	3.86	3.67	2.93	3.21	2.9	0.53	16.38
		24	0.997	0.841	1.28	1.14	1.09	1.07	1.1	0.16	15.3
		48	0.169	0.184	0.182	0.334	0.359	0.246	0.2	0.09	37.7
	72	BQL	BQL	BQL	0.143	BQL	0.000	0.000	-	-	
0.01 mg/kg/semana Día 50		0	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
		0.083	9.10	8.42	13.6	9.99	12.1	10.6	10.0	2.16	20.3
		0.25	7.35	7.12	12.0	8.09	9.77	8.87	8.09	2.04	23.0
		1	5.84	6.00	8.43	5.67	6.30	6.45	6.00	1.13	17.6
		2	4.47	4.68	6.74	4.91	5.22	5.20	4.91	0.903	17.3
		8	2.45	2.78	3.98	2.73	2.79	2.95	2.78	0.594	20.2
		24	1.13	1.33	1.53	1.32	1.16	1.29	1.32	0.160	12.4
		48	0.315	0.334	0.396	0.521	0.422	0.398	0.396	0.082	20.5
	72	BQL	BQL	BQL	0.163	0.167	0.000	0.000	-	-	
0.05 mg/kg/semana Día 1		0	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
		0.083	45.0	43.4	45.0	42.4	43.4	43.8	43.4	1.13	2.59
		0.25	43.0	35.3	42.0	30.9	34.2	37.1	35.3	5.22	14.1
		1	28.8	23.0	34.0	27.4	24.8	27.6	27.4	4.23	15.3
		2	27.4	21.7	25.2	24.5	19.7	23.7	24.5	3.02	12.8
		8	13.4	13.8	15.0	14.4	13.7	14.1	13.8	0.639	4.54
		24	4.05	4.26	7.17	3.45	4.95	4.78	4.26	1.44	30.2
		48	0.585	1.21	1.46	0.515	2.10	1.17	1.21	0.66	55.9
	72	BQL	0.343	0.294	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-	
0.05 mg/kg/semana Día 22		0	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
		0.083	38.2	40.0	39.4	39.3	47.6	40.9	39.4	3.80	9.29
		0.25	35.4	34.1	34.6	30.9	38.3	34.7	34.6	2.66	7.67
		1	26.6	23.0	25.9	23.1	28.6	25.4	25.9	2.40	9.42
		2	22.8	21.9	27.3	20.0	23.8	23.2	22.8	2.70	11.7
		8	14.0	13.9	14.5	12.1	12.3	13.4	13.9	1.09	8.12
		24	4.19	5.41	6.85	3.73	3.41	4.72	4.19	1.41	30.0
		48	0.529	1.71	1.37	0.539	0.390	0.908	0.539	0.593	65.3
	72	BQL	0.411	0.234	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-	
0.05 mg/kg/semana Día 50		0	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
		0.083	48.6	40.6	54.7	39.7	58.5	48.4	48.6	8.34	17.2
		0.25	39.2	36.4	42.0	34.8	48.2	40.1	39.2	5.29	13.2
		1	37.7	24.7	32.6	25.4	38.9	31.9	32.6	6.66	20.9
		2	26.2	22.6	27.7	26.5	30.2	26.6	26.5	2.75	10.3
		8	14.6	16.2	18.2	15.0	13.1	15.4	15.0	1.91	12.4
		24	5.32	8.06	9.38	6.08	2.24	6.22	6.08	2.74	44.1
		48	0.802	2.38	2.07	1.19	0.143	1.32	1.19	0.916	69.6
	72	0.161	0.971	0.669	0.257	BQL	0.412	0.257	0.399	96.8	

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación

Tabla 67 (2ª parte). Valores individuales, promedios y medianas de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas los días 1, 22 y 50 tras la administración semanal del fármaco por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.01, 0.05 y 0.25mg/kg/semana en perros macho del estudio P7.

Dosis Teórica	Concentración plasmática (ng/mL)									
	Tiempo (h)	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Perro 4	Perro 5	Promedio	Mediana	D.E.	C.V. (%)
0.25 mg/kg/semana Día 1	0	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.083	203	230	322	201	218	235	218	50.2	21.4
	0.25	189	178	310	180	196	211	189	56.0	26.6
	1	139	138	232	139	177	165	139	41.0	24.8
	2	108	109	184	112	122	127	112	32.3	25.5
	8	63.8	70.7	129	69.3	77.7	82.1	70.7	26.7	32.5
	24	24.6	28.0	38.2	20.4	29.4	28.1	28.0	6.62	23.5
	48	9.07	8.47	11.0	5.12	6.13	7.96	8.47	2.35	29.6
72	2.21	2.41	2.63	0.480	1.04	1.75	2.21	0.941	53.6	
0.25 mg/kg/semana Día 22	0	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.083	203	169	250	217	199	208	203	29.5	14.2
	0.25	199	148	181	175	163	173	175	19.2	11.1
	1	131	116	144	144	128	133	131	11.8	8.92
	2	113	87.9	125	112	107	109	112	13.5	12.4
	8	72.8	66.3	95.6	80.4	60.0	75.0	72.8	13.8	18.4
	24	30.1	28.0	53.1	22.4	20.2	30.8	28.0	13.1	42.7
	48	12.7	8.47	17.7	4.83	3.75	9.49	8.47	5.78	60.9
72	4.06	1.72	6.42	0.820	0.512	2.71	1.72	2.50	92.3	
0.25 mg/kg/semana Día 50	0	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.083	187	202	328	215	191	225	202	58.8	26.2
	0.25	197	177	272	177	175	200	177	41.5	20.8
	1	146	156	215	136	139	158	146	32.6	20.6
	2	115	122	193	136	153	144	136	31.1	21.6
	8	75.9	70.4	93.6	76.0	73.8	77.9	75.9	9.04	11.6
	24	32.5	31.2	37.9	22.9	32.2	31.3	32.2	5.39	17.2
	48	12.0	10.7	8.16	5.83	6.51	8.64	8.16	2.66	30.7
72	2.89	2.40	1.79	0.974	1.23	1.86	1.79	0.797	42.9	

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación

RESULTADOS

Tabla 68 (1ª parte). Valores individuales, promedios y medianas de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas los días 1, 22 y 50 tras la administración semanal del fármaco por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.01, 0.05 y 0.25mg/kg/semana en perros hembra del estudio P7.

Dosis Teórica	Concentración plasmática (ng/mL)									
	Tiempo (h)	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Perro 4	Perro 5	Promedio	Mediana	D.E.	C.V. (%)
0.01 mg/kg/semana Día 1	0	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.083	8.93	7.77	7.67	10.7	10.1	9.03	8.93	1.36	15.0
	0.25	6.75	7.23	5.70	9.84	9.26	7.76	7.23	1.74	22.4
	1	4.63	4.26	4.74	6.98	6.11	5.34	4.74	1.15	21.6
	2	4.31	3.96	3.87	5.59	4.96	4.54	4.31	0.728	16.0
	8	2.49	2.43	2.09	3.56	3.25	2.76	2.49	0.615	22.2
	24	0.586	1.09	0.721	0.863	1.52	0.956	0.863	0.366	38.3
	48	BQL	0.230	BQL	0.107	0.525	0.172	0.107	0.219	127
72	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-	
0.01 mg/kg/semana Día 22	0	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.083	8.28	7.01	7.20	9.90	13.1	9.10	8.28	2.51	-
	0.25	7.28	6.49	5.82	7.23	9.79	7.32	7.23	1.50	-
	1	4.95	4.59	5.11	6.29	7.05	5.60	5.11	1.03	18.4
	2	3.77	4.57	4.02	4.21	5.28	4.37	4.21	0.587	13.4
	8	2.15	2.93	2.55	3.44	3.36	2.89	2.93	0.545	18.9
	24	0.612	1.08	0.872	0.943	1.26	0.953	0.943	0.242	25.3
	48	BQL	0.249	BQL	0.180	0.391	0.164	0.180	0.168	102
72	BQL	BQL	BQL	BQL	0.147	0.000	0.000	-	-	
0.01 mg/kg/semana Día 50	0	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.083	9.34	7.80	7.77	11.6	10.8	9.46	9.34	1.73	18.3
	0.25	7.50	6.24	6.59	9.06	9.71	7.82	7.50	1.52	19.4
	1	4.84	4.52	4.37	5.73	6.28	5.15	4.84	0.824	16.0
	2	4.61	4.36	4.60	5.68	5.58	4.97	4.61	0.615	12.4
	8	2.56	3.04	2.79	3.31	3.54	3.05	3.04	0.392	12.9
	24	0.690	1.43	1.08	1.04	1.43	1.13	1.08	0.310	27.3
	48	BQL	0.520	0.222	0.223	0.454	0.284	0.223	0.208	73.2
72	BQL	0.160	BQL	BQL	0.205	0.000	0.000	-	-	
0.05 mg/kg/semana Día 1	0	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.083	49.3	54.5	62.2	41.8	46.0	50.8	49.3	7.90	15.6
	0.25	39.7	43.1	45.2	39.0	35.9	40.6	39.7	3.64	8.96
	1	30.9	34.1	35.5	33.6	24.4	31.7	33.6	4.41	13.9
	2	25.0	33.0	30.3	25.7	21.7	27.1	25.7	4.49	16.5
	8	11.7	20.4	16.2	14.7	14.2	15.4	14.7	3.21	20.8
	24	4.37	8.12	4.92	2.51	6.32	5.25	4.92	2.11	40.2
	48	1.36	2.12	0.877	0.307	2.01	1.33	1.36	0.765	57.3
72	0.205	0.346	BQL	BQL	0.528	0.216	0.205	0.228	106	
0.05 mg/kg/semana Día 22	0	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.083	47.6	39.4	51.8	37.5	40.8	43.4	40.8	6.04	13.9
	0.25	34.1	29.9	43.1	34.3	29.3	34.1	34.1	5.52	16.2
	1	26.5	24.4	27.4	27.4	22.9	25.7	26.5	2.00	7.76
	2	19.7	21.9	22.5	25.5	20.2	22.0	21.9	2.29	10.4
	8	13.5	16.8	13.2	15.4	11.5	14.1	13.5	2.06	14.6
	24	4.81	5.91	4.40	2.99	4.82	4.59	4.81	1.05	23.0
	48	1.23	1.39	0.738	0.267	1.72	1.07	1.23	0.571	53.4
72	0.344	0.232	0.104	BQL	0.473	0.231	0.232	0.188	81.4	
0.05 mg/kg/semana Día 50	0	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
	0.083	49.2	43.8	54.2	46.2	45.4	47.8	46.2	4.10	8.58
	0.25	35.9	40.8	48.6	40.9	35.5	40.3	40.8	5.29	13.1
	1	30.5	30.4	29.4	33.0	25.3	29.7	30.4	2.80	9.44
	2	23.6	30.9	23.8	32.6	21.8	26.5	23.8	4.86	18.3
	8	14.3	19.2	15.5	16.2	14.3	15.9	15.5	2.02	12.7
	24	5.81	6.25	5.35	3.92	6.65	5.60	5.81	1.06	18.9
	48	1.92	1.85	1.70	0.486	2.19	1.63	1.85	0.663	40.7
72	0.573	0.524	0.439	BQL	0.850	0.477	0.524	0.308	64.6	

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación

Tabla 68 (2ª parte). Valores individuales, promedios y medianas de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas los días 1, 22 y 50 tras la administración semanal del fármaco por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.01, 0.05 y 0.25mg/kg/semana en perros hembra del estudio P7.

Dosis	Concentración plasmática (ng/mL)										
	Teórica	Tiempo (h)	Perro 1	Perro 2	Perro 3	Perro 4	Perro 5	Promedio	Mediana	D.E.	C.V. (%)
0.25 mg/ kg/semana Día 1		0	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
		0.083	180	182	248	252	264	225	248	40.8	18.1
		0.25	140	207	213	187	255	200	207	41.9	20.9
		1	112	140	181	138	178	150	140	29.3	19.6
		2	111	103	130	116	128	118	116	11.4	9.71
		8	67.7	63.8	60.1	67.7	71.3	66.1	67.7	4.29	6.48
		24	33.8	22.2	27.5	27.5	22.9	26.8	27.5	4.65	17.3
		48	9.03	6.11	6.56	9.24	5.76	7.34	6.56	1.66	22.7
	72	3.29	1.07	1.63	2.70	1.48	2.03	1.63	0.925	45.5	
0.25 mg/ kg/semana Día 22		0	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
		0.083	139	198	216	227	270	210	216	47.7	22.7
		0.25	128	173	217	178	252	190	178	47.0	24.8
		1	101	119	144	113	178	131	119	30.6	23.4
		2	74.8	96.0	112	96.9	120	99.9	96.9	17.4	17.4
		8	49.0	51.7	65.5	58.4	79.0	60.7	58.4	12.1	19.9
		24	17.0	21.5	27.2	29.3	24.1	23.8	24.1	4.83	20.3
		48	4.78	4.64	7.44	10.8	6.36	6.80	6.36	2.52	37.0
	72	1.03	0.924	1.31	4.38	2.11	1.95	1.31	1.44	73.6	
0.25 mg/ kg/semana Día 50		0	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	0.000	0.000	-	-
		0.083	186	245	309	241	218	240	241	45.2	18.9
		0.25	153	169	244	186	220	194	186	37.2	19.2
		1	124	140	154	135	140	139	140	10.8	7.80
		2	108	81.8	153	114	136	119	114	27.3	23.0
		8	68.2	73.7	73.9	76.2	63.8	71.2	73.7	5.06	7.11
		24	21.4	25.3	23.8	41.4	31.8	28.7	25.3	8.06	28.0
		48	8.30	7.82	6.03	15.7	10.1	9.59	8.30	3.71	38.7
	72	2.09	2.75	1.29	5.17	3.50	2.96	2.75	1.48	50.0	

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación

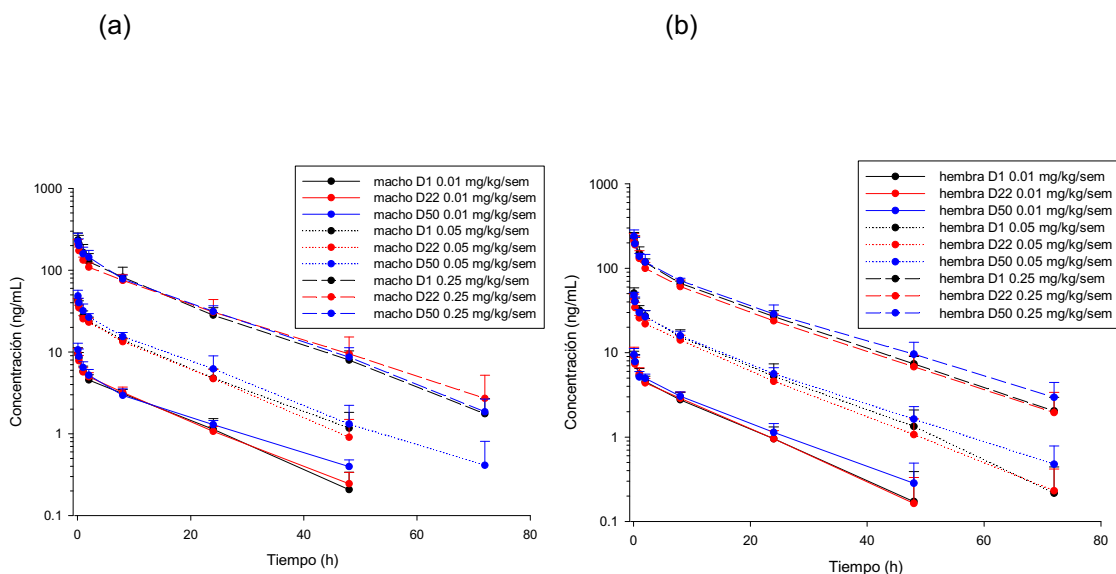


Figura 44. Perfiles superpuestos de los promedios (n=5) y D.E. de las concentraciones plasmáticas de elomotecan frente al tiempo obtenidos los días 1, 22 y 50 tras la administración semanal del fármaco por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.01, 0.05 y 0.25 mg/kg/semana durante 8 semanas en perros macho (a) y en perros hembra (b) del estudio P7.

5.2.3.7.2 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO NO COMPARTIMENTAL EN EL ESTUDIO P7

En la Tabla 69 se muestran los valores de los parámetros farmacocinéticos medios calculados mediante la aproximación no compartimental a partir de los valores individuales obtenidos para cada animal.

No se obtuvo el valor real de C_{max} ya que el primer punto de toma de muestra fue a los 5 minutos y el fármaco se administró durante 15 minutos. La exposición, determinada mediante el área bajo la curva (AUC_{τ}) fue ligeramente superior en perros macho que en perros hembra. El valor del aclaramiento (CL) y del V_{ss} fueron similares todos los días de tratamiento, a todas las dosis administradas y en ambos sexos, sugiriendo cinética lineal en el ámbito de dosis ensayada y farmacocinética invariante con el tiempo. Los resultados obtenidos para la semivida aparente de eliminación ($t_{1/2\lambda z}$ de 9.75 a 14.0 horas en perros machos y $t_{1/2\lambda z}$ de 10.5 a 13.8 horas en perros hembras) están en concordancia con los resultados obtenidos de CL y sugieren una eliminación lenta del elomotecan.

La Tabla 70 muestra los índices de acumulación del elomotecan a las diferentes dosis ensayadas. Los resultados obtenidos sugieren que no existe acumulación del fármaco en perros macho y hembras tras la administración semanal del fármaco por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.01, 0.05 y 0.25 mg/kg/semana durante 8 semanas.

Tabla 69. Valores de los parámetros farmacocinéticos medios calculados a partir de los valores de los parámetros farmacocinéticos individuales estimados a partir de las concentraciones plasmáticas individuales obtenidas tras la administración semanal de elomotecan por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.01, 0.05 y 0.25mg/kg/semana los días 1, 22 y 50 en perros macho y hembra en el estudio P7.

	Dosis mg/kg/sem	C_{max} ng/mL	C_{max}/D -	AUC_{τ} (ng/mL)·h	AUC_{τ} (ng/mL)·h	AUC/D -	$AUC_{extr.}$ %	$t_{1/2\lambda z}$ h	V_{ss} L·kg ⁻¹	CL* L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹
Machos Día 1	0.01	9.54	954	80.4	82.5	8248	2.59	9.97	1.66	0.119
	0.05	43.8	877	373	387	7736	3.38	11.1	1.87	0.127
	0.25	235	939	2234	2267	9067	1.42	11.7	1.80	0.114
Machos Día 22	0.01	9.65	965	82.6	84.9	8494	2.81	11.3	1.75	0.117
	0.05	40.9	818	356	362	7240	1.71	9.75	1.88	0.139
	0.25	208	830	2171	2228	8913	2.27	12.7	2.03	0.119
Machos Día 50	0.01	10.6	1064	90.3	95.7	9566	5.71	14.0	1.98	0.107
	0.05	48.4	968	441	450	8991	1.58	10.9	1.77	0.124
	0.25	227	906	2313	2346	9383	1.51	11.7	1.93	0.118
Hembras Día 1	0.01	9.03	903	68.9	75.5	7547	9.08	10.4	1.96	0.142
	0.05	50.8	1015	421	429	8572	1.65	10.5	1.61	0.115
	0.25	230	921	1998	2036	8144	1.83	12.6	1.97	0.119
Hembras Día 22	0.01	9.10	910	70.5	76.4	7644	8.66	10.8	1.75	0.124
	0.05	43.4	868	365	370	7399	1.27	10.5	1.83	0.126
	0.25	210	841	1794	1833	7334	2.01	12.7	2.17	0.130
Hembras Día 50	0.01	9.46	946	82.5	87.1	8707	5.69	11.9	1.69	0.109
	0.05	47.8	955	443	453	9064	2.29	12.4	1.97	0.101
	0.25	240	961	2145	2206	8826	2.73	13.8	1.97	0.109

* Día 22 y 50 corresponde a CL_{ss}

Tabla 70. Índices de acumulación obtenidos los días 22 y 50 tras la administración semanal del elomotecan por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.01, 0.05 y 0.25 mg/kg/semana en perros macho y hembra del estudio P7.

	Dosis mg/kg/sem	C _{max} ng/mL	R _{ac} C _{max}	AUC (ng/mL)·h	R _{ac} AUC
Machos Día 1	0.01	9.54		82.5	
	0.05	43.8		387	
	0.25	235		2267	
Machos Día 22	0.01	9.65	1.0	84.9	1.0
	0.05	40.9	0.9	362	0.9
	0.25	208	0.9	2228	1.0
Machos Día 50	0.01	10.6	1.1	95.7	1.2
	0.05	48.4	1.1	450	1.2
	0.25	227	1.0	2346	1.0
Hembras Día 1	0.01	9.03		75.5	
	0.05	50.8		429	
	0.25	230		2036	
Hembras Día 22	0.01	9.10	1.0	76.4	1.0
	0.05	43.4	0.9	370	0.9
	0.25	210	0.9	1833	0.9
Hembras Día 50	0.01	9.46	1.0	87.1	1.2
	0.05	47.8	0.9	453	1.1
	0.25	240	1.0	2206	1.1

5.2.3.8 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL

El análisis farmacocinético poblacional del elomotecan en el perro se realizó a partir de los datos obtenidos en los estudios P1, P2, P3, P4, P5, P6 y P7 siguiendo el esquema de trabajo descrito en el apartado 4.3.2.

5.2.3.8.1 EXPLORACIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

Se analizaron simultáneamente los 1357 valores de concentración plasmática provenientes de 92 animales. De éstas, 283 provenían de la administración única del elomotecan mediante bolus i.v. en perros macho y hembras a la dosis de 0.1, 0.2, 0.4 y 0.6 mg/kg y 1074 concentraciones plasmáticas, provenían de la administración del elomotecan por infusión de 15 minutos en perros macho y hembras. Un total de 56 concentraciones provenían de la administración única a la dosis de 0.3, 0.45 y 0.6 mg/kg, 134 de la administración repetida durante 7 días a la dosis de 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2, 0.8 y 1.4 mg/kg/día, 74 de la administración repetida durante 3 semanas a la dosis de 0.2, 0.8 y 1.4 mg/kg/semana y 810 de la administración repetida durante 8 semanas a la dosis de 0.01, 0.05 y 0.25 mg/kg/semana.

Un bajo porcentaje de muestras (9.87% que equivale a 134 muestras) presentó una concentración plasmática inferior al límite de cuantificación.

El fármaco se administró en dos vehículos diferentes. Un 36.2% de los datos experimentales se obtuvo tras la administración del elomotecan en el vehículo 1 y un 63.8% en el vehículo 4.

La Figura 45 muestra los valores de las concentraciones plasmáticas normalizadas por la dosis frente al tiempo post-última administración obtenidos en los estudios realizados en el perro. La visualización de la gráfica sugiere un comportamiento farmacocinético de como mínimo dos fases tras la administración i.v. del fármaco y una importante variabilidad interindividual.

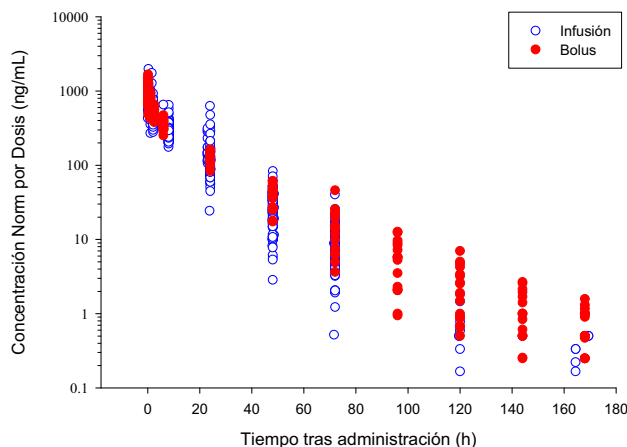


Figura 45. Concentraciones plasmáticas de elomotecan normalizadas por la dosis en función del tiempo obtenidas tras la administración de un bolus i.v. del fármaco a las dosis de 0.1, 0.2, 0.4 y 0.6 mg/kg y tras la infusión en 15 minutos a las dosis de 0.3, 0.45 y 0.6 mg/kg, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.2, 0.8 y 1.4 mg/kg/día y 0.01, 0.05, 0.2, 0.25, 0.8 y 1.4 mg/kg/semana.

5.2.3.8.2 DESARROLLO DEL MODELO FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL

En la Tabla 71 se describen las etapas correspondientes al desarrollo del modelo farmacocinético poblacional en el perro. Se probaron los modelos abiertos de uno, dos y tres compartimentos con eliminación de primer orden desde el compartimento central. El modelo que mejor describió los datos de concentración plasmática de elomotecan frente al tiempo fue el modelo de tres compartimentos con eliminación de primer orden desde el compartimento central.

La variabilidad interindividual se pudo ser incluir en el aclaramiento (CL), el aclaramiento intercompartimental (Q2) y en el volumen del compartimento periférico profundo (V3) utilizando un modelo exponencial. La variabilidad interindividual no se pudo incluir en el resto de parámetros puesto que no pudo estimarse o resultó ser estadísticamente no significativa y por lo tanto, no estaba justificada su inclusión en el modelo.

En la Figura 46 se muestra la distribución de los valores de los efectos aleatorios interindividual (ETA's) asociada al parámetro del CL, Q2 y V3. Como se puede observar, la distribución está centrada aproximadamente alrededor de cero en todos los casos. Se comprobó que la inclusión de la covarianza no mejoraba el ajustado del modelo ya que la disminución de la función objetiva no fue significativa o bien no fue posible estimar el valor de dicha covarianza.

Como covariables se ensayaron el sexo (49.7% de los datos fueron de perros macho y 50.3% de perros hembra), el peso (con un valor comprendido de 5.6 a 15.5 Kg), el vehículo y la dosis administrada. La dosis administrada se incluyó como variable continua y categórica. La Figura 47 muestra la exploración gráfica del impacto de las covariable en CL, V3 y Q2.

El análisis GAM (Generalised Additive Modeling) sugirió que:

- Peso. Podía tener efecto sobre los parámetros CL y V3.
- Formulación. Podía tener efecto sobre el parámetro CL y Q2.

Tras la exploración gráfica de los efectos aleatorios interindividuales asociados a las covariables y el análisis GAM, se decidió probar el efecto del peso y de la formulación sobre los parámetros farmacocinéticos mencionados previamente. Los resultados obtenidos mostraron un efecto muy significativo del peso sobre V3 y de la formulación sobre Q2. Ni el peso ni la formulación mostraron un efecto significativo en la descripción de la variabilidad asociada al CL.

Así, el modelo final seleccionado (P15) fue un modelo de tres compartimentos con eliminación de primer orden con variabilidad interindividual asociada a CL, Q2 y V3. Se identificó el peso como covariable de V3 y la formulación como covariable de Q2. El modelo de error residual empleado fue el modelo aditivo para datos logotransformados. La estimación de los parámetros del modelo se efectuó con el método FOCEI.

En la Figura 48 se muestran los gráficos diagnósticos indicativos de la bondad de ajustado del modelo final a los datos experimentales. Tanto los gráficos de concentraciones observadas vs concentraciones poblacionales como concentraciones observadas vs concentraciones individuales predichas mostraron una buena correlación con todos los datos agrupados alrededor de la línea de identidad. Los resultados de los IWRES y de los CWRES sugirieron una buena distribución de los datos experimentales y en ambos casos se observó una distribución aleatoria alrededor de cero. En general, el modelo describe correctamente los datos experimentales tanto en la parte estructural como estadística.

En la Tabla 72 se muestra la estimación de los parámetros farmacocinéticos poblacionales y la precisión con la que se han calculado. El coeficiente de variación porcentual (RSE%) fue igual o inferior al 42.6%. Los valores de las microconstantes y macroconstantes calculados a partir de los parámetros obtenidos en el modelo farmacocinético poblacional final se muestran en la Tabla 73. El volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario fue de 18.1 L en un perro de peso medio de 9.5 kg y la semivida aparente de eliminación ($t_{1/2\gamma}$) fue de 18.7 h si el elomotecan se administró en el vehículo 1 y de 13.6 h si se administró en el vehículo 4.

RESULTADOS

Tabla 71 (1ª parte). Resumen de las etapas de desarrollo del modelo farmacocinético poblacional en el perro.

Secuencia	Modelo	Estrategia	F. Objetiva	Comentarios	Decisión
P1	Modelo IIV RE EM COV VAR	Monocomp CL Proporcional FOCE - -	1169.2	-	Incluir un nuevo compartimento
P2	Modelo IIV RE EM COV VAR	Bicomp CL Proporcional FOCE - -	178.4	Disminucion 986.8 AIC Significativa P2 modelo referencia	Incluir un nuevo compartimento
P3	Modelo IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL Proporcional FOCE - -	-95.0	Disminucion 269.4 AIC Significativa P3 modelo referencia	No considerar valores de concentración inferiores al límite de cuantificación
P4	Modelo IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL Proporcional FOCEI - -	-1304.9	Disminucion 1209.9 FOBJ Significativa P4 modelo referencia	Incluir IIV V1
P5	Modelo IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V1 Proporcional FOCEI - -	-1355.4	Disminucion 50.5 FOBJ Significativa No estima Precision parametros	Incluir IIV V2
P6	Modelo IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V2 Proporcional FOCEI - -	-1333.8	Aumenta FOBJ	Incluir IIV V3
P7	Modelo IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V3 Proporcional FOCEI - -	-1414.2	Disminucion 109.3 FOBJ Significativa	Incluir IIV Q2
P8	Modelo IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, Q2 Proporcional FOCEI - -		Error 134	Incluir IIV Q3
P9	Modelo IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, Q3 Proporcional FOCEI - -	-1307.6	Aumenta FOBJ	Incluir IIV V1, V3 y Q2
P10	Modelo IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V1, V3, Q2 Proporcional FOCEI - -	-1457.1	Disminucion 42.9 FOBJ Significativa No estima Precision parametros	Eliminar IIV Q2

IIV: Variabilidad interindividual

RE: Error Residual

EM: Método de estimación. FOCEI First Order Conditional Estimation with ϵ - η Interaction

COV: Covariable

VAR: Covarianza entre variabilidades interindividuales

Tabla 71 (2ª parte). Resumen de las etapas de desarrollo del modelo farmacocinético poblacional en el perro.

Secuencia	Estrategia	F. Objetiva	Comentarios	Decisión
P11	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V1, V3 Proporcional FOCEI - -	-1417.0 Disminución 2.8 FOBJ No significativa	Eliminar IIV V1 Incluir IIV Q2
P12	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V3, Q2 Proporcional FOCEI - -	-1453.8 Disminución 39.6 FOBJ Significativa GAM indica WGT, FORM	Selección P12 como modelo ETA shrinkage 14.6%, 43.6%, EPS shrinkage 7.5% Incluir WGT como covariable CL
P13	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V3, Q2 Proporcional FOCEI WGT _{CL} -	-1453.8 No Disminución FOBJ No estima Precision parametros	Incluir WGT como covariable V3
P14	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V3, Q2 Proporcional FOCEI WGT _{V3} -	-1604.6 Disminución 150.8 FOBJ Significativa	Incluir FORM como covariable -
P15	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V3, Q2 Proporcional FOCEI WGT _{V3} FORM _{Q2} -	-1628.2 Disminución 57.2 FOBJ Significativa	Incluir FORM como covariable CI
P16	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V3, Q2 Proporcional FOCEI FORM _{CL} -	-1628.6 Disminución 0.4 FOBJ No significativa	Incluir covarianza $ETA_{A1} + ETA_{Q2}$
P17	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V3, Q2 Proporcional FOCEI WGT _{V3} FORM _{Q2} $ETA_{A1} + ETA_{Q2}$	-1631.2 Disminución 3.0 FOBJ No significativa	Incluir covarianza $ETA_{A1} + ETA_{V3}$
P18	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V3, Q2 Proporcional FOCEI WGT _{V3} FORM _{Q2} $ETA_{A1} + ETA_{V3}$	-1628.2 No Disminución FOBJ	Incluir covarianza $ETA_{Q2} + ETA_{V3}$
P19	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL, V3, Q2 Proporcional FOCEI WGT _{V3} FORM _{Q2} $ETA_{Q2} + ETA_{V3}$	-1635.9 Disminución 7.7 FOBJ No significativa No estima Precision parametros	Selección P15 como modelo

IIV: Variabilidad interindividual

RE: Error Residual

EM: Método de estimación. FOCEI First Order Conditional Estimation with ϵ - η Interaction

COV: Covariable

VAR: Covarianza entre variabilidades

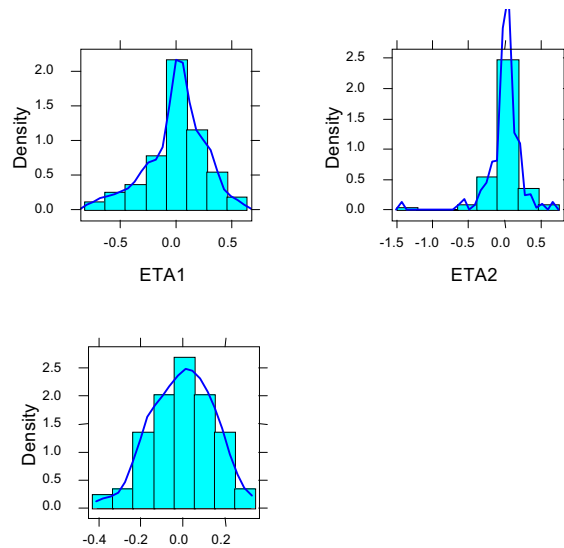


Figura 46. Distribución de los valores de los efectos aleatorios interindividuales asociados al CL (ETA1), a Q2 (ETA2) y a V3 (ETA3).

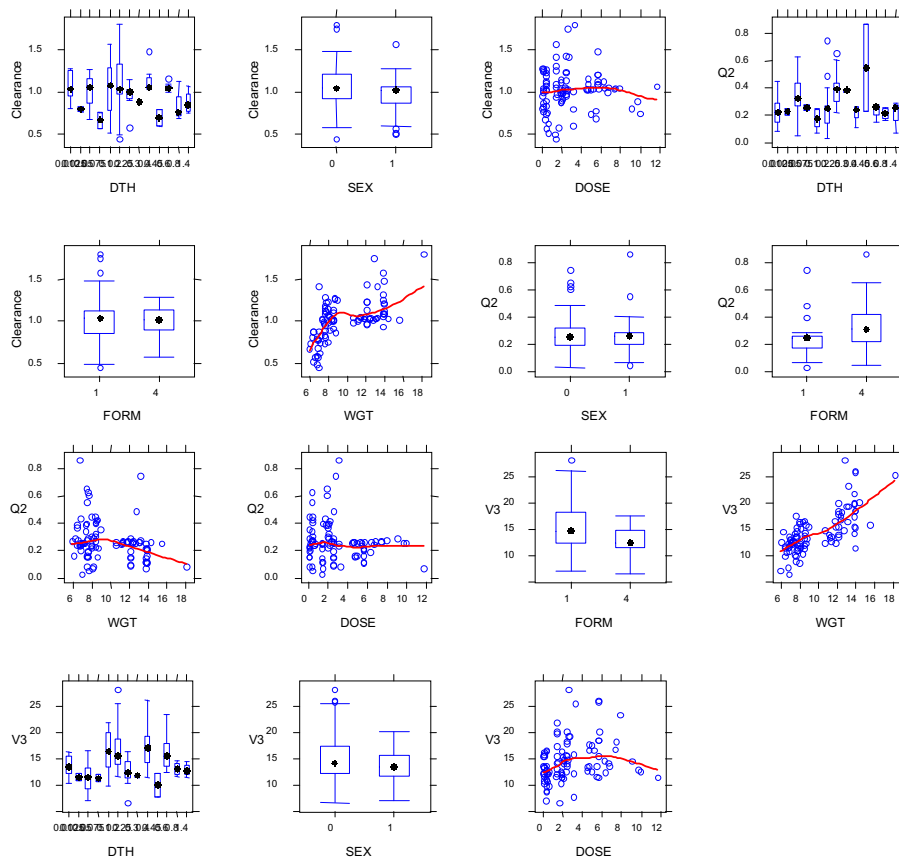


Figura 47. Representación gráfica de los valores individuales de los parámetros que aceptaron variabilidad interindividual (CL, Q2 y V3) frente a las covariables disponibles (peso, sexo, vehículo y dosis expresada como variable continua y categórica).

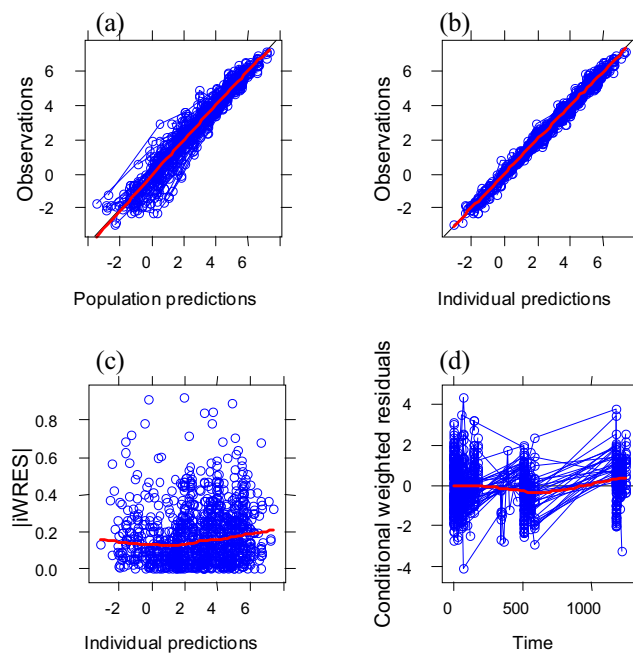


Figura 48. Gráficas de bondad de ajustado correspondientes al modelo farmacocinético final en el perro. (a) conc. experimentales respecto a las conc. predichas poblacionales. (b) conc. experimentales respecto a las conc. individuales predichas (c) residuales individuales ponderados respecto a las conc. individuales predichas y (d) residuales ponderados condicionales respecto al tiempo.

Tabla 72. Parámetros farmacocinéticos poblacionales estimados a partir del modelo farmacocinético poblacional final en el perro y precisión en su estimación (RSE %).

Parámetro	Valor	RSE (%)	
CL	L/h	0.96	3.6
V1	L	1.06	17.8
Q2 _{Form1}	L/h	0.13	42.6
Q2 _{Form4}	L/h	0.78	29.5
V2	L	2.61	19.1
Q3	L/h	55.2	4.0
V3	L	$14.42 \cdot (\text{WGT}/9.5)^{1.1}$	3.3, 12.1
IIV _{CL}	%	29.0	19.0
IIV _{Q2}	%	55.0	41.0
IIV _{V3}	%	18.0	31.0
Error residual	%	25.0	6.6

Tabla 73. Parámetros farmacocinéticos expresados como microconstantes y macroconstantes de disposición en un perro de peso medio (9.5 Kg) calculados a partir de los parámetros obtenidos en el modelo poblacional.

Parámetro		Valor Perro (Form1)	Valor Perro (Form4)
K	1/h	0.906	0.906
K ₁₂	1/h	0.123	0.736
K ₂₁	1/h	0.050	0.299
K ₁₃	1/h	52.1	52.1
K ₃₁	1/h	3.83	3.83
α	1/h	56.9	57.4
β	1/h	0.082	0.354
γ	1/h	0.037	0.051
t _{1/2α}	h	0.012	0.012
t _{1/2β}	h	8.47	1.96
t _{1/2γ}	h	18.7	13.6
V _{ss}	L	18.1	18.1

5.2.3.8.3 EVALUACIÓN DEL MODELO FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL

La evaluación del modelo farmacocinético poblacional se realizó mediante la predicción corregida de la evaluación predictiva visual (pc-VPC, prediction corrected Visual Predictive Checks). La Figura 49 muestra pc-VPC para el modelo poblacional final en el perro tras la administración del elomotecan en el vehículo 1 (a) y en el vehículo 4 (b). A pesar que el modelo sobrepredice ligeramente las concentraciones observadas tras la administración del elomotecan en el vehículo 1 e infrapredice ligeramente las concentraciones observadas tras la administración del elomotecan en el vehículo 4, puede considerarse que en conjunto, el modelo explica de manera adecuada los valores de concentración plasmática observados en todos los estudios realizados.

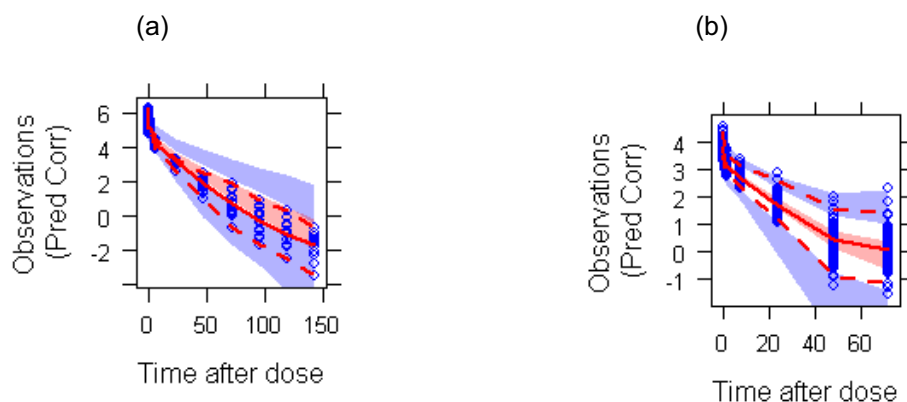


Figura 49. Pc-VPC de las concentraciones de elomotecan frente al tiempo en el modelo farmacocinético poblacional final del perro tras la administración del elomotecan en el vehículo 1 (a) y en el vehículo 4 (b). Los círculos corresponden a los datos experimentales. La línea roja continua corresponde a la mediana y las discontinuas corresponden al percentil 2.5 y 97.5% de las concentraciones observadas. Las áreas azules corresponden al IC del 95% del percentil 2.5 y 97.5% y el área roja corresponde al IC del 95% de la mediana de los perfiles de datos simulados.

5.2.3.9 PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS EN EL PERRO

En la Tabla 74 se muestran los valores de los principales parámetros farmacocinéticos estimados tras el análisis no compartimental (valor mínimo y máximo) y el análisis poblacional de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas tras la administración del fármaco a perros macho y hembra. Los valores del aclaramiento (CL) y del volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario (V_{ss}) y semivida de eliminación en perros macho y hembra tras el análisis poblacional de los datos observados están en concordancia con los valores observados tras el análisis no compartimental.

Tabla 74. Valores de los principales parámetros farmacocinéticos estimados a partir del análisis no compartimental y poblacional de las concentraciones plasmáticas obtenidas tras la administración i.v. del de elomotecan a perros macho y hembra de los estudios P1, P2, P3, P4, P5, P6 y P7.

Parámetro		Análisis	
		No Compartimental	Poblacional
CL	L/h	0.66 - 5.72	0.96
V_{ss}	L	6.68 - 54.7	18.1
$t_{1/2\gamma}$ Form 1	h	0.91 - 25.5	18.7
$t_{1/2\gamma}$ Form 4	h	9.97 - 15.9	13.6

5.2.4 ESTUDIOS FARMACOCINÉTICOS EN EL MONO

5.2.4.1 ESTUDIO DE DOSIS REPETIDAS MK1

5.2.4.1.1 CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE ELOMOTECAN EN EL ESTUDIO MK1

Se obtuvieron y analizaron todas las muestras definidas en el diseño experimental obteniéndose valores superiores al límite de cuantificación desde el primer tiempo de muestreo (15 minutos) hasta el último (24h). Durante la administración del día 7, se produjo un problema técnico que provocó que la dosis real administrada en el mono macho fuese de 0.97 mg/kg en lugar de 1.4 mg/kg. En la Tabla 75 se muestran los valores de las concentraciones plasmáticas obtenidos tras la administración diaria del elomotecan por infusión intravenosa de 15 minutos a las dosis de 0.2, 0.8 y 1.4 mg/kg/día durante 1 y 7 días en monos macho y hembra.

La Figura 50 muestra las concentraciones plasmáticas de elomotecan frente al tiempo a las diferentes dosis administradas después de la primera dosis y tras siete días de tratamiento para monos macho (a) y hembra (b), respectivamente. Para una misma dosis administrada, los perfiles observados fueron similares los días 1 y 7 de la administración tanto en machos como en hembras sugiriendo que no existe acumulación del fármaco en el mono en las condiciones estudiadas.

RESULTADOS

Tabla 75. Concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas los días 1 y 7 tras la administración diaria del fármaco de elomotecan por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.2, 0.8 y 1.4 mg/kg/día durante 7 días en monos macho y hembra del estudio MK1.

Dosis Teórica	Concentración plasmática (ng/mL)		
	Tiempo (h)	Mono 1 Macho	Mono 2 Hembra
0.2 mg/ kg/día día 1	0	BQL	BQL
	0.25	109	112
	1	68.9	69.8
	2	43.2	42.7
	8	5.84	4.98
	24	0.230	BQL
0.2 mg/ kg/día día 7	0	BQL	0.431
	0.25	76.5	106
	1	50.7	65.6
	2	34.5	42.3
	8	4.22	5.63
	24	0.131	0.258
0.8 mg/ kg/día día 1	0	BQL	BQL
	0.25	351	350
	1	276	236
	2	148	102
	8	28.3	19.7
	24	2.24	0.935
0.8 mg/ kg/día día 7	0	2.10	1.98
	0.25	324	370
	1	202	231
	2	142	177
	8	27.1	27.0
	24	1.64	1.13
1.4 mg/ kg/día día 1	0	BQL	BQL
	0.25	730	572
	1	483	375
	2	309	227
	8	32.5	19.0
	24	1.36	0.798
1.4 mg/ kg/día día 7	0	3.52	2.50
	0.25	243	640
	1	170	392
	2	141	274
	8	23.4	30.2
	24	1.40	1.34

BQL: Concentración inferior al límite de cuantificación

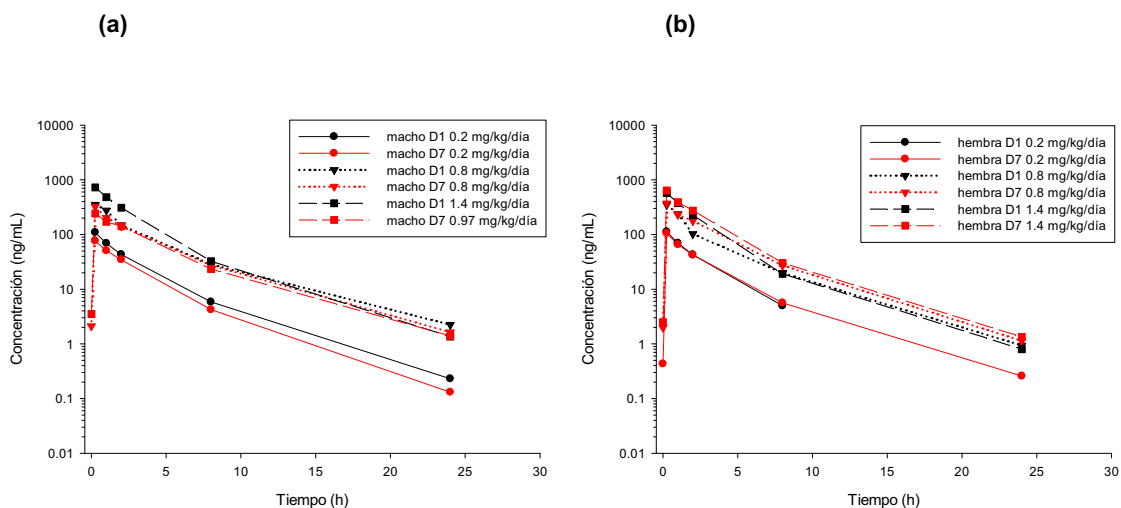


Figura 50. Perfiles superpuestos de las concentraciones plasmáticas individuales de elomotecan frente al tiempo obtenidas los días 1 y 7 tras la administración diaria del fármaco por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.2, 0.8 y 1.4 mg/kg/día durante 7 días en monos macho (a) y hembra (b) del estudio MK1.

5.2.4.1.2 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO NO COMPARTIMENTAL EN EL ESTUDIO MK1

En la Tabla 76 se muestran los valores de los parámetros farmacocinéticos calculados mediante la aproximación no compartimental a partir de los valores individuales de concentración plasmática frente al tiempo a las diferentes dosis administradas en monos macho y hembra. La concentración máxima se obtuvo en todos los casos a los 15 minutos post administración. Los valores obtenidos en ambos sexos fueron similares y no sugieren cambios relevantes tras 7 días de exposición. Los valores de AUC_t normalizados por la dosis del día 7 fueron similares a los observados el día 1 en monos macho y ligeramente superiores a los observados el día 1 en monos hembra.

En la Tabla 77 se muestran los índices de acumulación del elomotecan a las diferentes dosis ensayadas. Los resultados obtenidos sugieren que no existe acumulación del fármaco ni en monos macho ni en monos hembra tras la administración diaria del elomotecan por infusión de 15 minutos a la dosis de 0.2, 0.8 o 1.4 mg/kg/día durante 7 días.

RESULTADOS

Tabla 76. Valores de los parámetros farmacocinéticos estimados a partir de las concentraciones plasmáticas individuales del elomotecan obtenidas los días 1 y 7 tras la administración del fármaco por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.2, 0.8 y 1.4 mg/kg/día durante 7 días en monos macho y hembra del estudio MK1.

	Dosis mg/kg	C _{max} ng/mL	C _{max} /D -	AUC _t (ng/mL)·h	AUC _τ (ng/mL)·h	AUC/D -	AUC extr. %	t _{1/2λz} h	V _{ss} L·kg ⁻¹	CL* L·kg ⁻¹ ·h ⁻¹
Machos Día 1	0.20	109	545	274	275	1375	0.33	3.01	2.42	0.727
	0.80	351	439	1082	1093	1366	1.02	3.77	3.40	0.732
	1.40	730	521	1823	1828	1306	0.28	2.93	2.36	0.766
Machos Día 7	0.20	76.5	383	204	204	1022	0.24	2.82	3.08	0.978
	0.80	324	405	966	974	1217	0.79	3.52	2.96	0.821
	0.97	243	251	857	863	890	0.73	3.34	4.53	1.13
Hembras Día 1	0.20	112	560	241	255	1274	5.23	1.87	2.03	0.785
	0.80	350	438	819	823	1029	0.51	3.32	3.36	0.972
	1.40	572	409	1311	1314	939	0.21	2.83	2.96	1.07
Hembras Día 7	0.20	106	530	267	268	1338	0.39	3.10	2.46	0.747
	0.80	370	463	1080	1084	1355	0.43	3.10	2.66	0.738
	1.40	640	457	1601	1606	1147	0.32	2.99	2.73	0.872

*Día 7 corresponde a CL_{ss}

Tabla 77. Índices de acumulación obtenidos el día 7 tras la administración diaria del elomotecan por infusión de 15 minutos a las dosis de 0.2, 0.8 y 1.4 mg/kg/día en monos macho y hembra del estudio MK1.

	Dosis mg/kg/día	C _{max} ng/mL	R _{ac} C _{max}	AUC (ng/mL)·h	R _{ac} AUC
Machos Día 1	0.20	109		275	
	0.80	351		1093	
	1.40	730		1828	
Machos Día 7	0.20	76.5	0.7	204	0.7
	0.80	324	0.9	974	0.9
	0.97	243	-	863	-
Hembras Día 1	0.20	112		255	
	0.80	350		823	
	1.40	572		1314	
Hembras Día 7	0.20	106	0.9	268	1.1
	0.80	370	1.1	1084	1.3
	1.40	640	1.1	1606	1.2

5.2.4.2 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL EN EL MONO

El análisis farmacocinético poblacional en el mono se realizó siguiendo el esquema de trabajo descrito en el apartado 4.3.2.

5.2.4.2.1 EXPLORACIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

Se analizaron simultáneamente las 72 concentraciones plasmáticas de elomotecan provenientes de la administración diaria del fármaco mediante infusión de 15 minutos a las dosis teóricas de 0.2, 0.8 y 1.4 mg/kg/día durante 7 días a 6 monos (3 monos macho y 3 hembra). Sólo una muestra obtenida tras 24 horas de la primera administración a la dosis más

baja, presentó una concentración plasmática inferior al límite de cuantificación (0.1ng/mL). La Figura 51 muestra las concentraciones plasmáticas normalizadas por la dosis en función del tiempo. La visualización de la gráfica sugiere un comportamiento farmacocinético lineal puesto que las concentraciones normalizadas por la dosis se superponen.

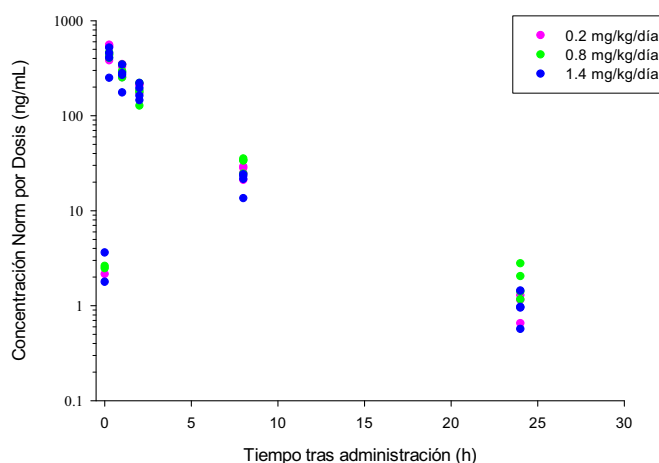


Figura 51. Concentraciones plasmáticas de elomotecan normalizadas por la dosis en función del tiempo obtenidas tras la administración del fármaco por infusión en 15 minutos a las dosis de 0.2, 0.8 y 1.4 mg/kg/día en monos macho y hembra.

5.2.4.2.2 DESARROLLO DEL MODELO FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL

En la Tabla 78 se resume el desarrollo del modelo farmacocinético poblacional en el mono. Se probaron los modelos abiertos de uno, dos y tres compartimentos con eliminación de primer orden desde el compartimento central. El modelo que mejor describió los datos de concentración plasmática de elomotecan frente al tiempo fue el modelo de dos compartimentos con eliminación de primer orden desde el compartimento central. La variabilidad interindividual pudo ser incluida en el aclaramiento utilizando un modelo exponencial. La inclusión de las variabilidades interindividuales asociadas al volumen y al aclaramiento intercompartimental no mejoraron el modelo y por tanto no estaba justificada su inclusión en éste. El modelo de error residual empleado fue el modelo aditivo para datos logotransformados. La estimación de los parámetros del modelo se efectuó con el método FOCEI.

En la Figura 52 se muestra la distribución de los valores de los efectos aleatorios interindividuales (ETA's) asociados al aclaramiento plasmático (CL). Debido al bajo número de animales (n=6), la distribución no es normal.

Como covariables se dispuso del sexo, el peso del animal y la dosis administrada expresada como variable continua y como variable categórica. La Figura 53 muestra la exploración gráfica del impacto de las covariable en el aclaramiento. Como puede observarse no existe una

tendencia en ninguna de ellas que pueda ayudar a explicar la variabilidad en la estimación del aclaramiento, por ello, se consideró el modelo estructural base como el modelo final.

En la Figura 54 se muestran los gráficos diagnósticos indicativos de la bondad de ajustado del modelo final a los datos experimentales. Tanto los gráficos de concentraciones observadas vs concentraciones poblacionales como concentraciones observadas vs concentraciones individuales predichas mostraron una buena correlación con todos los datos agrupados alrededor de la línea de identidad. Los resultados de los IWRES y de los CWRES sugirieron una buena distribución de los datos experimentales y en ambos casos se observó una distribución aleatoria alrededor de cero. En general, el modelo describe correctamente los datos experimentales tanto en los que respecta a la parte estructural como estadística.

En la Tabla 79 se muestra la estimación de los parámetros farmacocinéticos poblacionales y la precisión con la que han sido calculados. En todos los casos, la imprecisión fue igual o inferior al 18% (RSE %) a excepción de la variabilidad interindividual asociada al CL que fue del 51%. Los valores de las microconstantes y macroconstantes calculados a partir de los parámetros obtenidos en el modelo farmacocinético poblacional final se muestran en la Tabla 80. El volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario fue de 7.83 L y la semivida aparente de eliminación ($t_{1/2\gamma}$) fue de 3.74 horas.

Tabla 78. Resumen de las etapas de desarrollo del modelo farmacocinético poblacional en el mono.

Secuencia	Estrategia	F. Objetiva	Comentarios	Decisión	
MK1	Model IIV RE EM COV VAR	Monocomp CL Proporcional FOCEI - -	-40.6 -		Incluir un nuevo compartimento
MK2	Model IIV RE EM COV VAR	Bicomp CL Proporcional FOCEI - -	-112.9	Disminucion 64.3 AIC Significativa MK2 modelo referencia	Incluir un nuevo compartimento
MK3	Model IIV RE EM COV VAR	Tricomp CL Proporcional FOCEI - -	-117.7	Disminucion 0.8 AIC No significativa	Incluir IIV V1
MK4	Model IIV RE EM COV VAR	Bicomp CL, V1 Proporcional FOCEI - -	-116.8	Disminucion 3.9 FOBJ No significativa	Incluir IIV V2
MK5	Model IIV RE EM COV VAR	Bicomp CL, V2 Proporcional FOCEI - -	-112.9	No Disminucion FOBJ	Incluir IIV Q
MK6	Model IIV RE EM COV VAR	Bicomp CL, Q Proporcional FOCEI - -	-112.9	No Disminucion FOBJ	Selección MK2 como modelo base y modelo final ETA shrinkage 1.1% EPS shrinkage 4.2%

IIV: Variabilidad interindividual

RE: Error Residual

EM: Método de estimación. FOCEI First Order Conditional Estimation with ϵ - η Interaction

COV: Covariable

VAR: Covarianza entre variabilidades interindividuales

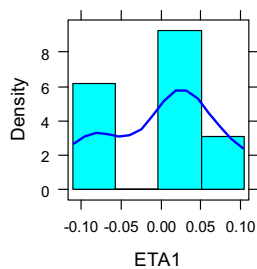


Figura 53. Distribución de los valores de los efectos aleatorios interindividuales asociados al CL (ETA 1).

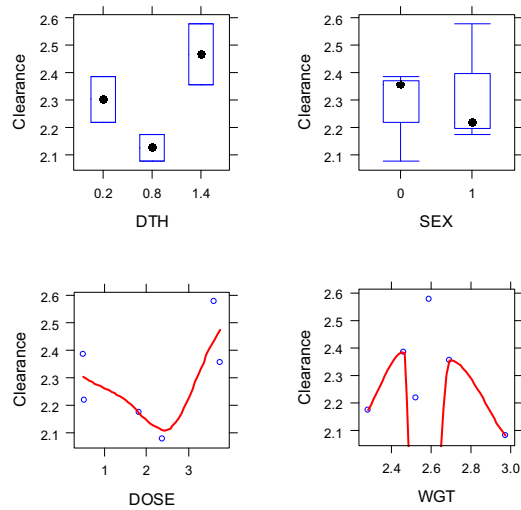


Figura 54. Representación gráfica de los valores individuales del parámetro que aceptó variabilidad interindividual (CL) frente a las covariables disponibles (peso, sexo y dosis expresada como variable continua y categórica).

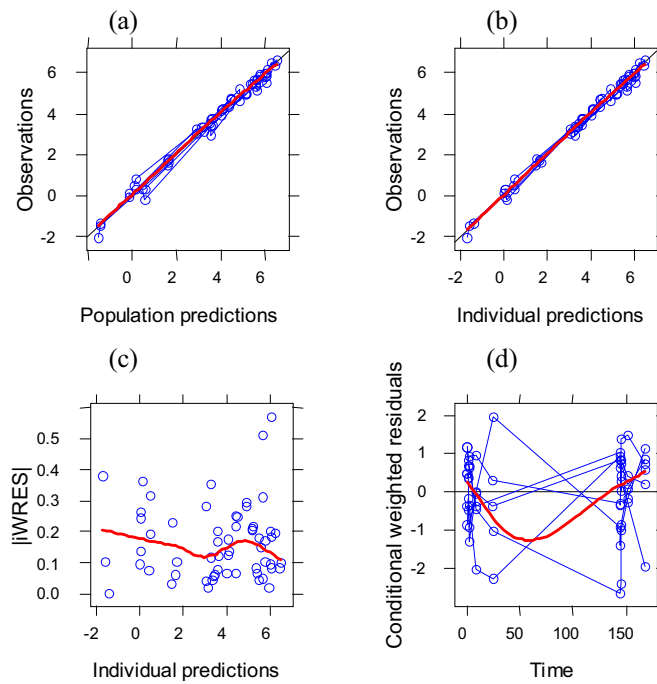


Figura 55. Gráficas de bondad de ajustado para el modelo farmacocinético final en el mono. (a) Conc. predichas poblacionales respecto a las conc. experimentales. (b) Conc. individuales predichas respecto a las conc. experimentales (c) Conc. individuales predichas respecto a los residuales individuales ponderados (d) residuales ponderados condicionales respecto al tiempo.

Tabla 79. Parámetros farmacocinéticos poblacionales estimados a partir del modelo farmacocinético poblacional final en el mono y precisión en su estimación (RSE %).

Parámetro		Valor	RSE (%)
CL	L/h	2.29	4.3
V1	L	5.41	7.2
Q	L/h	0.69	13.6
V2	L	2.42	9.8
IIV _{CL}	%	7.8	51.0
Error residual	%	21.0	18.0

Tabla 80 Parámetros farmacocinéticos expresados como microconstantes y macroconstantes de disposición en el mono calculados a partir de los parámetros obtenidos en el modelo poblacional.

Parámetro		Valor
K	1/h	0.423
K ₁₂	1/h	0.128
K ₂₁	1/h	0.285
α	1/h	0.650
β	1/h	0.186
t _{1/2α}	h	1.07
t _{1/2β}	h	3.74
V _{ss}	L	7.83

5.2.4.2.3 EVALUACIÓN DEL MODELO FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL

La evaluación del modelo farmacocinético poblacional se realizó mediante la predicción corregida de la evaluación predictiva visual (pc-VPC, prediction corrected Visual Predictive Checks). La Figura 56 muestra pc-VPC para el modelo poblacional final en el mono. La mediana de las concentraciones observadas así como los percentiles 2.5 y 97.5% de los datos observados quedaron incluidos dentro de las bandas correspondientes a los intervalos de confianza del 95% de los percentiles 50%, 2.5% y 97.5% de los datos simulados, respectivamente. Los resultados obtenidos indicaron un adecuado comportamiento predictivo del modelo farmacocinético poblacional final del mono.

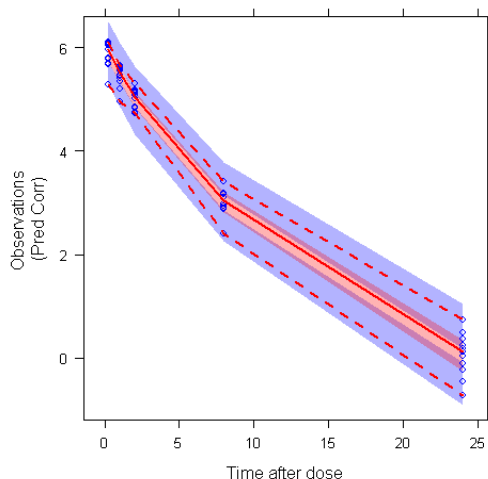


Figura 56. pc-VPC de las concentraciones de elomotecan frente al tiempo del modelo farmacocinético poblacional final del mono. Los círculos corresponden a los datos experimentales. La línea roja continua corresponde a la mediana y las discontinuas corresponden al percentil 2.5 y 97.5% de las concentraciones observadas. Las áreas azules corresponden al IC del 95% del percentil 2.5 y 97.5% y el área roja corresponde al IC del 95% de la mediana de los perfiles de datos simulados.

5.2.4.3 PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS EN EL MONO

En la Tabla 81 se muestran los valores de los principales parámetros farmacocinéticos estimados tras el análisis no compartimental (valor mínimo y máximo) y el análisis poblacional de las concentraciones plasmáticas de elomotecan obtenidas tras la administración del fármaco a monos macho y hembra. Los valores del aclaramiento (CL) y del volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario (V_{ss}) y semivida de eliminación tras el análisis poblacional de los datos observados están en concordancia con los valores observados tras el análisis no compartimental.

Tabla 81. Valores de los principales parámetros farmacocinéticos estimados a partir del análisis no compartimental y poblacional de las concentraciones plasmáticas obtenidas tras la administración i.v. del de elomotecan a monos macho y hembra del estudio MK1.

Parámetro		Análisis	
		No Compartimental	Poblacional
CL	L/h	1.88 - 2.93	2.29
V_{ss}	L	5.26 -11.7	7.83
$t_{1/2\beta}$	h	1.87 - 3.77	3.74

5.2.5 MODELO DE ESCALADO ALOMÉTRICO POBLACIONAL

El desarrollo del modelo de escalado alométrico poblacional para el elomotecan se realizó utilizando solamente los datos obtenidos tras la administración intravenosa del elomotecan a las diferentes especies animales siguiendo el esquema de trabajo descrito en el apartado 4.3.2.3.

5.2.5.1 EXPLORACIÓN DE LOS DATOS EXPERIMENTALES

Se analizaron simultáneamente valores de concentración plasmática del elomotecan provenientes de estudios realizados en ratón, rata, perro y mono. Así, se dispuso de:

- 110 concentraciones plasmáticas provenientes de 110 ratones (peso medio 25 gramos).
- 810 concentraciones plasmáticas provenientes de 152 ratas (peso medio de 255 gramos)
- 1357 concentraciones plasmáticas provenientes de 92 perros (peso medio de 9.54 kilogramos)
- 72 concentraciones plasmáticas provenientes de 6 monos (peso medio de 2.59 kilogramos)

La Figura 57 muestra las concentraciones plasmáticas normalizadas por la dosis y el peso en función del tiempo, tras la administración del elomotecan por infusión intravenosa (a) y por bolus intravenoso (b) en las diferentes especies ensayadas. Puede observarse que los perfiles farmacocinéticos tras infusión i.v. son similares en todas las especies con la excepción del perro en el que la eliminación del fármaco fue más lenta que en el resto (presenta valores de concentración plasmática después de 168 horas de la última administración).

La Figura 58 muestra la exploración gráfica de los valores típicos poblacionales de aclaramiento (CL) (a) y del volumen de distribución en el compartimento central (V1) (b) obtenidos tras el análisis farmacocinético poblacional representados frente al peso medio de las diferentes especies animales estudiadas. En estas gráficas se observan una buena correlación para los dos parámetros y el peso. El coeficiente de correlación de los datos obtenidos fue de 0.89 y 0.87 para CL y V1, respectivamente.

La Tabla 82 muestra los valores de los principales parámetros farmacocinéticos estimados a partir del análisis poblacional en las diferentes especies estudiadas así como las covariables que se han mostrado significativas en la estimación de dichos parámetros.

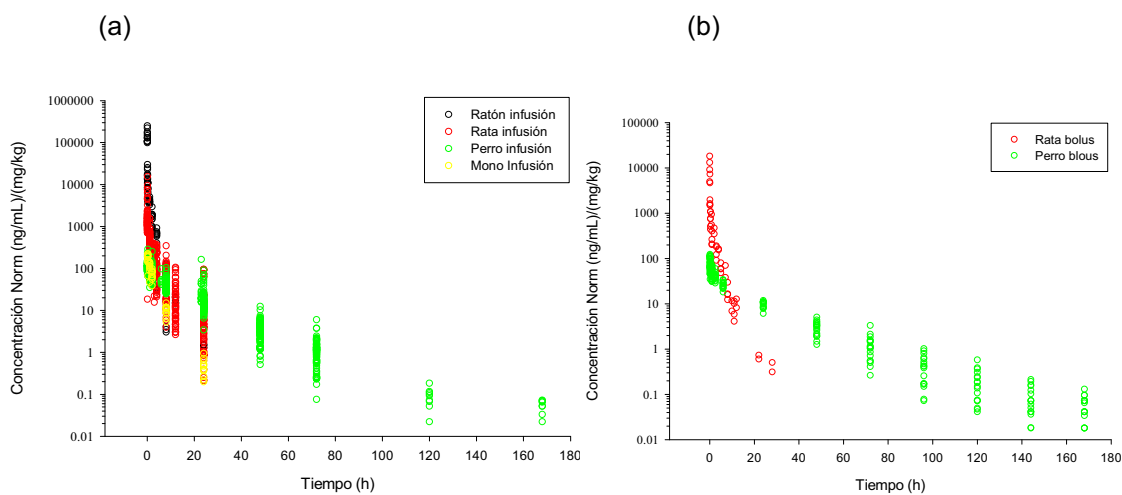


Figura 57. Concentraciones plasmáticas de elomotecan normalizadas por la dosis y el peso en función del tiempo obtenidas tras la administración del fármaco por infusión de 10-15 minutos en ratones hembra atímicas, ratas, perros y monos macho y hembra (a) y tras la administración de un bolus i.v. (b) en ratas macho y perros macho y hembra.

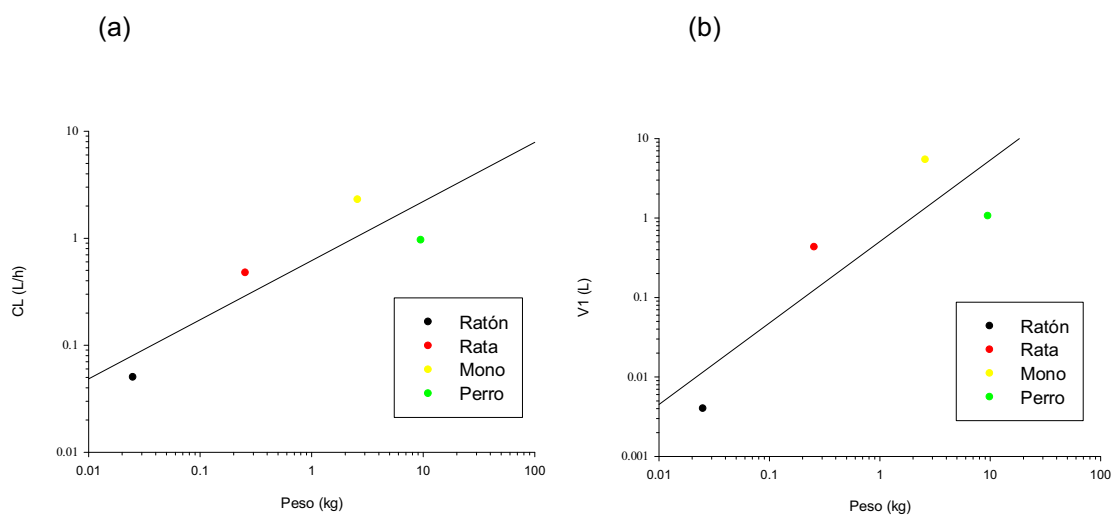


Figura 58. Valores de aclaramiento (CL) (a) y volumen de distribución en el compartimento central (V1) (b) obtenidos tras el análisis farmacocinético poblacional frente al peso medio observado en las especies animales estudiadas (ratones, ratas, perros y monos).

Tabla 82. Valores de los principales parámetros farmacocinéticos estimados a partir del análisis poblacional de las concentraciones plasmáticas obtenidas tras la administración i.v. del elomotecan a ratones, ratas, perros (modelo tres compartimentos) y monos (modelo dos compartimentos).

Parámetro		Ratón		Rata		Perro		Mono	
		Valor	IIV (%)	Valor	IIV (%)	Valor	IIV (%)	Valor	IIV (%)
CL	L/h	0.0501	9.6	$0.37*(WGT/0.255)^{0.65}$ (a) $0.58*(WGT/0.255)^{0.65}$ (b)	16.0	0.96	29.0	2.29	7.8
V1	L	0.004	-	0.43	65.0	1.06	-	5.41	-
Q2	L/h	0.0979	-	0.11	-	0.13 (c) 0.78 (d)	55.0	0.69	-
V2	L	0.0456	-	0.43	44.0	2.61	-	2.42	-
Q3	L/h	0.0019	-	0.61	-	55.2	-	-	-
V3	L	0.0095	-	0.39	-	$14.42*(WGT/9.5)^{1.1}$	18.0	-	-
Error residual	%	25.0	-	39.0	-	25.0	-	21.0	-

(a) Valor de CL obtenido para ratas hembra

(b) Valor de CL obtenido para ratas macho

(c) Valor de Q2 obtenido en Formulación 1

(d) Valor de Q2 obtenido en Formulación 4

5.2.5.2 DESARROLLO DEL MODELO DE ESCALADO ALOMÉTRICO POBLACIONAL

La Tabla 83 resume las etapas correspondientes al desarrollo del modelo de escalado alométrico poblacional para el elomotecan a partir de los datos de concentración plasmática frente al tiempo obtenidos en ratón, rata, perro y mono. Dado que tras el análisis farmacocinético poblacional de las diferentes especies animales, el modelo abierto de un compartimento no fue significativo en ningún caso, este modelo no se exploró y se probaron los modelos abiertos de dos y tres compartimentos con eliminación de primer orden desde el compartimento central. El modelo que mejor describió los datos de concentración de elomotecan frente al tiempo incluyendo el peso como covariable fue el modelo de tres compartimentos. La variabilidad interindividual se pudo incluir en el aclaramiento utilizando un modelo exponencial. La inclusión de las variabilidades interindividuales asociadas a los volúmenes (V1, V2, V3) y a los aclaramientos intercompartimental (Q2 y Q3) no mejoraron el ajustado y por tanto no estaba justificada su inclusión.

La Figura 59 muestra la distribución de los valores de los efectos aleatorios interindividuales (ETA's) asociados al aclaramiento plasmático. Como se puede observar, la distribución está centrada aproximadamente alrededor de cero.

Los parámetros farmacocinéticos se modelaron alométricamente mediante la ecuación alométrica simple a partir del peso corporal de los animales. Además, para la modelización del aclaramiento plasmático (CL) se ensayó también la posible influencia del peso del cerebro (BW), de la máxima esperanza de vida (MLP), del flujo de bilis por día normalizado por el peso corporal (CF1) y del flujo de bilis por día normalizado por el peso de hígado (CF2) como factores de corrección. También se modelaron sólo los coeficientes alométricos del elomotecan mediante la hipótesis de que los exponentes alométricos seguían la tendencia general de los

exponentes alométricos (valores de 0.75 para CL, Q1, Q2) y 1.0 para los volúmenes de distribución (V1, V2 y V3)). De todos los modelos ensayados, el factor de corrección que permitió describir mejor los datos experimentales fue la inclusión del flujo de bilis por día normalizado por el peso corporal (CF1).

El modelo alométrico final seleccionado (A11) fue un modelo de tres compartimentos con eliminación de primer orden con variabilidad interindividual asociada a CL en el que el escalado de los parámetros farmacocinéticos se realizó a partir de la ecuación alométrica simple. El CL se corrigió adicionalmente por el flujo diario de bilis normalizado por el peso corporal. El modelo de error residual empleado fue el modelo aditivo para datos logotransformados. La estimación de los parámetros del modelo se efectuó con el método FOCEI.

La Figura 60 muestra los gráficos diagnósticos indicativos de la bondad de ajustado del modelo final a los datos experimentales. Tanto los gráficos de concentraciones observadas vs concentraciones poblacionales predichas como concentraciones observadas vs concentraciones individuales predichas mostraron una buena correlación con la mayoría de los datos agrupados alrededor de la línea de identidad. Los resultados de los IWRES y de los CWRES sugirieron una buena distribución de los datos experimentales y en ambos casos se observó una distribución aleatoria alrededor de cero. Sólo un par de valores de CWRES mostraron una magnitud elevada ($CWRES > 5$) por lo que se podrían considerar como aberrantes (outliers), pero se decidió mantenerlos en el modelo. En base a estos resultados, puede considerarse que el modelo describe correctamente los datos experimentales tanto en lo que respecta a la parte estructural como estadística.

La Tabla 84 muestra las ecuaciones alométricas de los parámetros farmacocinéticos que mejor describieron los datos experimentales de las especies animales estudiadas (modelo A11), así como la precisión con la que han sido calculados los coeficientes y exponentes alométricos de dichos parámetros farmacocinéticos mediante la aproximación poblacional. El coeficiente de variación porcentual de los parámetros (RSE%) fue aceptable (1.2 al 27.2%). Los exponentes alométricos del aclaramiento y del volumen de distribución del compartimento central fueron de 0.781 y 0.721, respectivamente, valores similares a los aceptados generalmente de 0.75 para el aclaramiento y de 1.0 para volúmenes de distribución.

La Tabla 85 muestra las ecuaciones alométricas de los parámetros farmacocinéticos obtenidas en el resto de aproximaciones alométricas ensayadas así como la precisión con la que han sido calculados los coeficientes y exponentes alométricos de los parámetros farmacocinéticos.

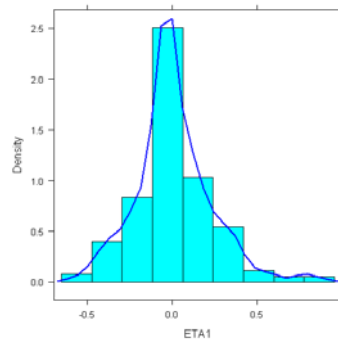


Figura 59. Distribución de los valores de los efectos aleatorios interindividuales asociados al CL (ETA1) del modelo alométrico final.

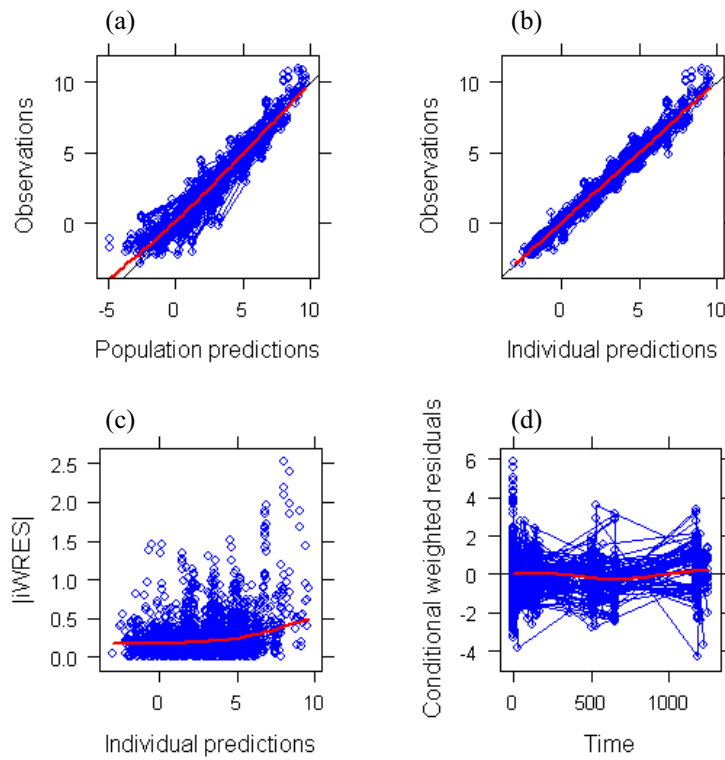


Figura 60. Gráficas de bondad de ajustado correspondientes al modelo final de escalado alométrico poblacional. (a) conc. experimentales respecto a las conc. poblacionales predichas. (b) conc. experimentales respecto a las conc. predichas individuales (c) residuales individuales ponderados respecto a las conc. individuales predichas y (d) residuales ponderados condicionales respecto al tiempo.

RESULTADOS

Tabla 83. Resumen de las etapas de desarrollo del modelo de escalado alométrico poblacional para el elomotecan.

Secuencia	Estrategia	F. Objetiva	Comentarios	Decisión
A1	Model IIV RE Proporcional EM FOCEI COV - ALO simple	203.3	WGT en Parámetros farmacocinéticos	Incluir un nuevo compartimento
A2	Model IIV RE Proporcional EM FOCEI COV - ALO simple	-541.1	Disminucion 740.4 AIC Significativa exp CL=0.389, V1=0.709	A2 modelo referencia Incluir IIV V1
A3	Model IIV RE Proporcional EM FOCEI COV - ALO simple	-1190.7	Disminucion 649.6 FOBJ Significativa IIV V1 130%, exp V1=0.449 No estima precision parámetros	Incluir IIV Q2
A4	Model IIV RE Proporcional EM FOCEI COV - ALO simple	-812.0	Disminucion 270.9 FOBJ Significativa IIV Q2 95%, exp Q2=0.0095 No estima precision parámetros	Incluir IIV V2
A5	Model IIV RE Proporcional EM FOCEI COV - ALO simple	-603.6	Disminucion 62.5 FOBJ Significativa IIV V2 68%, exp Q2=0.0095 No estima precision parámetros	Incluir IIV Q3
A6	Model IIV RE Proporcional EM FOCEI COV - ALO simple	-516.7	Aumenta FOBJ	Incluir IIV V3
A7	Model IIV RE Proporcional EM FOCEI COV - ALO simple	-541.1	No disminucion FOBJ	Fijar exponentes alométricos a 0.75 y 1
A8	Model IIV RE Proporcional EM FOCEI COV - ALO Fijos	130.11	Aumenta AIC	BW factor corrección de CL
A9	Model IIV RE Proporcional EM FOCEI COV - ALO BW	-432.4	Aumenta FOBJ No estima precision parámetros	MLP factor corrección de CL
A10	Model IIV RE Proporcional EM FOCEI COV - ALO MLP	-636.7	Disminucion 95.6 FOBJ Significativa exp CL=0.731, exp V1=0.714	A10 modelo referencia Flujo biliar corregido peso corporal en CL
A11	Model IIV RE Proporcional EM FOCEI COV - ALO Flujo biliar	-737.5	Disminucion 100.8 FOBJ Significativa exp CL=0.781, exp V1=0.721	A11 modelo referencia Flujo biliar corregido peso hígado en CL
A12	Model IIV RE Proporcional EM FOCEI COV - ALO Flujo biliar	-668.0	Aumenta FOBJ	Selección A11 como modelo final ETA shrinkage 21.99% EPS shrinkage 5.75%

IIV: Variabilidad interindividual

RE: Error Residual

EM: Método de estimación. FOCEI First Order Conditional Estimation with e-? Interaction

COV: Covariable

Tabla 84. Ecuaciones alométricas de los parámetros farmacocinéticos estimadas a partir del modelo seleccionado (A11), en el que el CL se corrigió por el flujo diario de bilis normalizado por el peso corporal (CF1), junto con la precisión en la estimación de los coeficientes y exponentes alométricos (RSE %).

Parámetro		Valor	RSE (%)
CL	L/h	0.080*CF1*(WGT) ^{0.781}	2.3, 1.2
V1	L	0.620*(WGT) ^{0.721}	11.4, 5.2
Q2	L/h	0.068*(WGT) ^{0.374}	27.2, 23.9
V2	L	0.663*(WGT) ^{0.664}	16.2, 6.7
Q3	L/h	6.541*(WGT) ^{0.885}	13.5, 5.0
V3	L	2.176*(WGT) ^{0.800}	4.4, 2.0
IIV _{CL}	%	29.0	16.0
Error residual	%	44.0	8.2

Tabla 85. Ecuaciones alométricas de los parámetros farmacocinéticos estimadas a partir de las diferentes aproximaciones poblacionales para el escalado alométrico entre especies (alometría simple, corrección CL por peso del cerebro (BW), por máxima esperanza de vida (MLP), exponentes alométricos fijos y flujo de bilis por día normalizado por el peso del hígado (CF2)) y precisión en la estimación de los coeficientes y exponentes alométricos (RSE %).

Aproximación	Alometría simple		Peso cerebro		Máximo potencial de vida		
Parámetro	Valor	RSE (%)	Valor	RSE (%)	Valor	RSE (%)	
CL	L/h	0.562*(WGT) ^{0.389}	3.4, 3.8	(0.006*(WGT) ^{1.334}) / BW	-	(4.934*(WGT) ^{0.731}) / MLP	2.9, 1.7
V1	L	0.638*(WGT) ^{0.709}	10.3, 5.4	0.621*(WGT) ^{0.712}	-	0.630*(WGT) ^{0.714}	10.8, 5.4
Q2	L/h	0.068*(WGT) ^{0.365}	28.1, 21.8	6.438*(WGT) ^{0.857}	-	0.066*(WGT) ^{0.371}	27.1, 21.6
V2	L	0.726*(WGT) ^{0.599}	14.8, 7.7	2.556*(WGT) ^{0.804}	-	0.692*(WGT) ^{0.631}	15.3, 7.1
Q3	L/h	6.211*(WGT) ^{0.903}	12.6, 4.7	0.237*(WGT) ^{1.099}	-	6.354*(WGT) ^{0.895}	13.0, 4.8
V3	L	2.172*(WGT) ^{0.805}	4.5, 2.2	0.418*(WGT) ^{0.01}	-	2.171*(WGT) ^{0.805}	4.5, 2.1
ETA _{CL}	%	45.0	9.9	40.0	-	36.0	19.0
Error residual	%	44.0	8.5	46.0	-	44.0	8.3

- Valor RSE(%) no estimado por el programa NONMEM

Aproximación	Exponentes fijos		Flujo bilis diario norm. peso hígado		
Parámetro	Valor	RSE (%)	Valor	RSE (%)	
Cl	L/h	0.64*(WGT) ^{0.75}	5.0	0.122*CF2*(WGT) ^{0.636}	2.3, 1.8
V1	L	0.23*(WGT) ¹	18.8	0.611*(WGT) ^{0.725}	11.6, 5.1
Q2	L/h	0.33*(WGT) ^{0.75}	16.6	0.074*(WGT) ^{0.346}	28.0, 27.5
V2	L	1.42*(WGT) ¹	9.1	0.682*(WGT) ^{0.653}	16.7, 6.7
Q3	L/h	14.04*(WGT) ^{0.75}	10.6	6.676*(WGT) ^{0.883}	12.5, 4.6
V3	L	1.26*(WGT) ¹	6.0	2.220*(WGT) ^{0.788}	4.1, 1.9
ETA _{cl}	%	69.0	7.2	37.0	12
Error residual	%	49.0	7.2	43.0	8.2

5.2.5.3 EVALUACIÓN DEL MODELO DE ESCALADO ALOMÉTRICO POBLACIONAL

La evaluación de la capacidad predictiva del modelo de escalado poblacional se realizó determinando los porcentajes de error entre los valores de los parámetros farmacocinéticos poblacionales reportados en el estudio de Fase I del elomotecan^[41] y los valores predichos con el modelo de escalado alométrico poblacional (A11). Los porcentajes de error se calcularon a partir de la ecuación 23 descrita en el apartado 1.4.4.

Como puede observarse en la Tabla 86, el porcentaje de error en la estimación de los valores de los parámetros farmacocinéticos fue elevado en todos los parámetros, por lo que los datos observados en las diferentes especies animales no se puede predecir adecuadamente (% error superior al 30%) los valores de los parámetros farmacocinéticos en el hombre a excepción del volumen del compartimento central V1.

Tabla 86. Valores observados y predichos de los parámetros farmacocinéticos en un hombre de (70 kg) y exactitud en su predicción (% error).

Parámetro		Valor poblacional	Valor Alométrico	Error (%)
CL	L/h	22.4	2.21	90.1
V1	L	18.5	13.3	28.3
Q2	L/h	69.5	0.33	99.5
V2	L	65.8	11.1	83.1
Q3	L/h	13.1	281	-2044
V3	L	118	65.1	44.8
Vss	L	202	89.5	55.7

Finalmente, se simularon las concentraciones plasmáticas de elomotecan frente al tiempo que se alcanzarían tras la administración de la dosis recomendada de fármaco (60 mg)^[41] a partir de los diferentes modelos alométricos ensayados. Las concentraciones plasmáticas predichas se representaron junto a las concentraciones plasmáticas promedio de elomotecan observadas tras la administración de 60 mg de fármaco en el estudio clínico de fase I^[41]. La Figura 61 muestra los perfiles superpuestos del promedio de las concentraciones plasmáticas de elomotecan observadas (n=12) tras la administración del fármaco frente al tiempo y de las concentraciones plasmáticas predichas frente al tiempo obtenidas a partir de los distintos modelos de escalado alométrico. Como se puede observar, el perfil predicho a partir del modelo seleccionado no se superpone con los valores observados por lo que confirma que este modelo de escalado no es adecuado para predecir el comportamiento farmacocinético del elomotecan en el hombre. De los diferentes modelos ensayados, el modelo alométrico que utiliza los exponentes alométricos fijos (0.75 y 1.0 para aclaramientos y volúmenes respectivamente) sí que es capaz de predecir el perfil farmacocinético del elomotecan en el hombre. Los porcentajes de error en la estimación de los valores del aclaramiento y volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario para este modelo fueron de -30.9% y 0.7%, respectivamente.

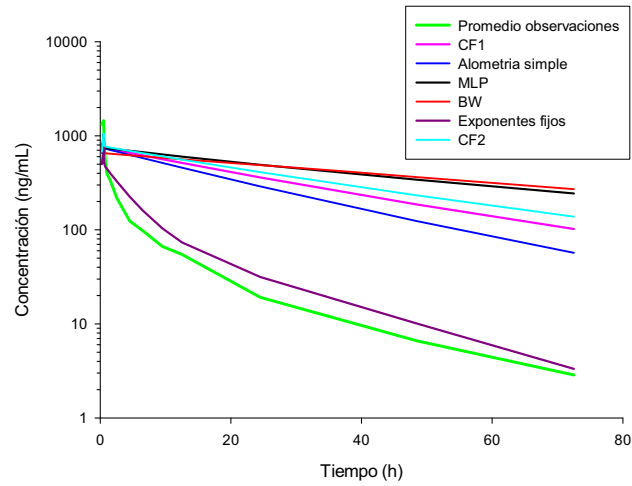


Figura 61. Perfiles superpuestos de las concentraciones plasmáticas de elomotecan predichas en el hombre frente al tiempo obtenidas a partir de los diferentes modelos de escalado alométrico y de las concentraciones plasmáticas promedio observadas ($n=12$) frente al tiempo tras la administración de 60 mg de elomotecan en el estudio clínico de Fase I.

6 DISCUSIÓN

El elomotecan es un compuesto semisintético antitumoral que pertenece al grupo de las homocamptotecinas, una nueva familia de análogos de la camptotecina con actividad sobre la topoisomerasa I (Topo I) y sobre la topoisomerasa II (Topo II). El elomotecan, como el resto de las homocamptotecinas, se caracteriza por tener un anillo de 7 miembros por introducción de un grupo metileno entre el alcohol y el grupo carboxílico formando así una β -hidroxilactona. Este cambio en la estructura respecto a la camptotecinas, proporciona una menor electrofilia a la molécula y mejora la estabilidad del anillo de lactona al enlentecer su apertura; en consecuencia, como el anillo de lactona es imprescindible para su actividad farmacológica, mejora también la actividad del compuesto. Cabe mencionar que no existe equilibrio entre el elomotecan y su forma carboxílica (BN80960), ya que cuando se produce la apertura del anillo de lactona, ésta es irreversible ^[37, 38].

Los estudios de la actividad *in vitro* mostraron que el elomotecan era más activo frente a nueve líneas celulares tumorales humanas que el irinotecan, destacando la línea HT29 (colon) en la que este último es uno de los fármacos de elección. El estudio de la actividad *in vivo* con modelos de xenotransplantes de tumores humanos en ratones usando las líneas celulares de adenocarcinoma de próstata PC3 y DU145 mostraron que el elomotecan administrado dos veces al día durante 14 días a la dosis de 5 mg/kg por vía oral fue más eficaz que el irinotecan ^[39].

Tras la administración del elomotecan marcado con carbono 14 por vía intravenosa a la dosis de 3 mg/kg a ratas con el conducto biliar canulado, se observó que la vía mayoritaria de excreción era la vía biliar y en bilis se identificaron 15 metabolitos. De éstos, 5 podían considerarse metabolitos principales ya que cada uno de ellos, representó más del 10% de la dosis administrada. Esto sugirió que el elomotecan se metaboliza ampliamente en la rata siguiendo una ruta metabólica compleja.

Los diferentes estudios preclínicos realizados con el elomotecan se han llevado a cabo para: conocer el comportamiento farmacocinético del fármaco en diferentes especies animales, relacionar las concentraciones del elomotecan con su actividad farmacológica, determinar las concentraciones tóxicas en las diferentes especies estudiadas y aportar la información necesaria para la selección de la dosis a administrar en el hombre.

Como etapa previa a los estudios de farmacocinética preclínica, es clave disponer de una metodología analítica apropiada para cuantificar el principio activo en plasma. Por ello, el desarrollo y validación de la metodología analítica para obtener datos fiables de concentración plasmática del elomotecan tras su administración a los animales objeto de estudio constituye una parte relevante del trabajo de esta tesis. La técnica analítica elegida para la determinación simultánea del elomotecan y del BN80960 fue la espectrometría de masas por su elevada selectividad. En el desarrollo del método bioanalítico se consideró importante que la manipulación de la muestra fuese mínima, que el método fuese preciso, exacto y común para el análisis de las muestras de las diferentes especies ensayadas, así como alcanzar un límite de

cuantificación que permitiera describir la cinética del elomotecan y del BN80960 en las diferentes especies ensayadas.

Durante la puesta a punto del método bioanalítico, se probó la precipitación de proteínas y la extracción en fase sólida en línea como técnicas extractivas. Los resultados obtenidos mediante ambas técnicas fueron aceptables, pero finalmente se seleccionó la extracción en fase sólida en línea ya que supone una menor manipulación de la muestra y por tanto es menos laboriosa. Se probaron diferentes cartuchos de extracción en fase sólida (C2, C8, C18, C18HD y CN), diferentes columnas cromatográficas (XTerra, Kromasil y Luna) y distintos gradientes para eluir el elomotecan y el BN80960. Finalmente, se seleccionaron los cartuchos C2, la columna Kromasil y un gradiente realizado con acetonitrilo (0.1% ácido fórmico) y agua (0.1% ácido fórmico) con el que se consiguió la elución de ambos compuestos y el equilibrio a condiciones iniciales de la columna en sólo 4 minutos. Las condiciones del espectrómetro de masas que dependen del compuesto, como puede ser la energía de colisión, se seleccionaron individualmente para cada analito para obtener la mejor respuesta. Las condiciones de la fuente de ionización, al ser comunes a todos los compuestos, se seleccionaron para obtener un compromiso en la respuesta del elomotecan y del BN80960. Así, la determinación del elomotecan y del BN80960 en las muestras plasmáticas se realizó mediante una extracción en fase sólida en línea acoplada a la cromatografía líquida de alta eficacia y a la espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (On-line SPE-HPLC-MS/MS).

Una vez se disponía de la técnica analítica, se prepararon muestras plasmáticas que contenían elomotecan y BN80960 y se observó que a temperatura ambiente, el elomotecan se degradaba en menos de 6 horas. Por ello, y con el objetivo de asegurar la estabilidad del fármaco, las muestras se mantuvieron en baño de agua-hielo en todo momento. Este aspecto, también se tuvo en cuenta durante la obtención de las muestras de los animales. Durante el análisis, las muestras se acidificaron con una solución de ácido fórmico ya que a pH ácido, la degradación del elomotecan no está favorecida.

Una vez finalizada la puesta a punto de la metodología analítica, se realizó una validación completa en plasma de ratón, rata, perro y humano según las recomendaciones establecidas en la guía de FDA para la validación de métodos bioanalíticos ^[43]. Así, se estudió la selectividad, intervalo de concentraciones de las curvas de calibrado, precisión y exactitud, memoria de inyección, recuperación, efecto matriz, efecto de la dilución y estabilidad. El método no se validó en plasma de mono ya que no se consideró la segunda especie de toxicología y sólo estaba previsto la realización de un estudio piloto con 6 animales.

A partir de 150 µL de plasma, los límites de cuantificación alcanzados fueron de 0.1 ng/mL en plasma de ratón y perro y de 0.25 ng/mL en plasma de rata. Sin embargo, para obtener el límite de cuantificación requerido (0.05 ng/mL) en plasma humano fue necesario aumentar el volumen de muestra plasmática a 500 µL. Los límites de cuantificación establecidos fueron

suficientes para describir adecuadamente el perfil farmacocinético del elomotecan en todas las especies, incluido el hombre.

Puesto que en los estudios de toxicocinética, se administran dosis elevadas del fármaco, se preveía obtener concentraciones de elomotecan muy superiores al límite superior de cuantificación del intervalo validado en todas las especies. Por este motivo se evaluó el efecto que la dilución de la muestra podía tener en el resultado analítico. Los resultados obtenidos tras diluir 4000 veces la muestra con plasma blanco confirmaron que, la dilución de la muestra no tiene efecto en la precisión y exactitud con la que se determina el elomotecan y el BN80960. Además, el ensayo de la memoria de inyección (carry over) garantizó que tras el análisis de una muestra de concentración elevada, la siguiente muestra analizada no estaba afectada por la primera.

Los ensayos de estabilidad se realizaron para verificar que en las condiciones experimentales los analitos no sufrían degradación y por tanto los datos de concentración plasmática obtenidos eran correctos. Se analizó la estabilidad de las soluciones "stock" (elomotecan, BN80960, BN81067 y BN81068) tras el almacenamiento durante 5 meses a -20°C y del elomotecan y BN80960 disueltos en $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 10:90 (AcOH 0.1%) a la concentración de $5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ durante 6 horas en baño de agua-hielo. Se estudió la estabilidad del elomotecan y del BN80960 en plasma a corto plazo manteniendo las muestras plasmáticas durante 6 horas en baño de agua-hielo y tras ser procesadas, se mantuvieron durante 24 horas en el inyector automático a 4°C antes de ser analizadas. También se estudió el efecto de la congelación y descongelación de las muestras tras tres ciclos de congelación a -70°C y descongelación en baño de agua-hielo y finalmente, se estudió la estabilidad del elomotecan y del BN80960 a largo plazo almacenando las muestras plasmáticas durante 3, 6 y 12 meses a -20°C y -70°C . El análisis de las muestras plasmáticas de ratón y rata tras 6 meses de almacenamiento a -20°C mostró que el elomotecan se degradaba en estas condiciones de almacenamiento por lo que se canceló el estudio a 12 meses. Toda la información obtenida en los ensayos de estabilidad realizados, se tuvo en cuenta para el almacenamiento y análisis de las muestras provenientes de los estudios farmacocinéticos/toxicocinéticos. Debido a la degradación del elomotecan a -20°C , las muestras plasmáticas de ratón y rata se pudieron almacenar 3 meses y las de perro y humano se pudieron almacenar 6 meses a esta temperatura. Sin embargo, a -70°C , las muestras plasmáticas de ratón, rata, perro y humano pudieron almacenarse durante 12 meses, que fue el periodo máximo de almacenamiento estudiado.

Tras la realización de todos los ensayos y el análisis de los resultados obtenidos, se concluyó que los métodos bioanalíticos desarrollados fueron selectivos, exactos, precisos y permitían determinar el elomotecan y el BN80960 en las muestras plasmáticas de ratón, rata, perro y humano con fiabilidad.

Una vez validado el método bioanalítico, se monitorizó la exactitud y precisión del método durante el análisis de las muestras plasmáticas de los estudios farmacocinéticos/toxicocinéticos

con el objetivo de asegurar que el método continuaba siendo adecuado para su uso en rutina para la determinación del elomotecan y del BN80960. Para ello, se establecieron unos criterios de aceptación/rechazo de las secuencias de análisis basados en las recomendaciones definidas en la guía de la FDA ^[43] para la validación de métodos bioanalíticos. Sólo se aceptaron las concentraciones plasmáticas de aquellas muestras provenientes de los estudios farmacocinéticos/ toxicocinéticos analizadas en secuencias de análisis aceptadas desde un punto de vista bioanalítico. Los resultados analíticos obtenidos durante el análisis en rutina de las muestras plasmáticas, confirmaron la robustez y fiabilidad de los métodos desarrollados, ya que prácticamente la totalidad de las secuencias analíticas realizadas (98%) fueron aceptadas.

Durante el desarrollo y validación de la metodología analítica se incluyeron dos analitos, el elomotecan y el metabolito y/o producto de degradación BN80960. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de BN80960 obtenidas en estudios iniciales, mostraron que este metabolito representaba una exposición despreciable respecto a la obtenida para el elomotecan (inferior al 10%). Además, estudios realizados en paralelo sobre la actividad de dicho compuesto demostraron que no tenía actividad antitumoral y que no existía conversión hacia el elomotecan. Por todo ello, aunque se dispone de las concentraciones de BN80960 en todos los estudios, no se ha considerado de interés incluirlo en la presente memoria.

A partir de los niveles de concentraciones plasmáticas de elomotecan frente al tiempo de los diferentes estudios preclínicos, se realizó un tratamiento farmacocinético de los datos. Se aplicaron dos metodologías, la aproximación no compartimental con el programa WinNonlin versión 5.3 y la aproximación poblacional, utilizando modelos no lineales de efectos mixtos con el programa NONMEM versión 7.2, con el objetivo de estimar los parámetros farmacocinéticos y su variabilidad y poder explicar así el comportamiento del elomotecan en las diferentes especies animales ensayadas.

El estudio farmacocinético del elomotecan en ratón, tuvo como objetivo principal determinar los parámetros farmacocinéticos en esta especie y la proporcionalidad entre concentraciones y dosis, con el fin de poder establecer una relación entre los estudios de eficacia en esta especie y las concentraciones de fármaco. Para ello, se emplearon ratones hembra atímicas a los que se había implementado un tumor de adenocarcinoma de colon humano a partir de células tumorales HT29, con el fin de mimetizar los estudios de eficacia y emplear animales en condiciones similares a los ensayos farmacológicos. En el ámbito de dosis estudiado (1.75 a 17.5 mg/kg), el elomotecan presentó un comportamiento farmacocinético lineal. El aclaramiento del elomotecan en ratón fue de 0.0501 L/h (0.0396 – 0.0546 L/h en análisis no compartimental, NC) (Tabla 28). Este valor se corresponde con aproximadamente el 46% del flujo sanguíneo hepático en esta especie (0.108 L/h) ^[98], si se considera que la relación de concentración sangre/plasma es 1, puede considerarse el aclaramiento plasmático intermedio. El volumen de distribución del elomotecan, de 0.059 L (0.0395-0.0623 L, NC) con mayor distribución en los compartimentos periféricos, indica que el fármaco se halla en un 98.3% fuera del plasma, valor que señala que además de unirse en un porcentaje elevado a proteínas plasmáticas se une

también a proteínas tisulares. Este volumen, de aproximadamente 2 L/Kg, se considera un volumen intermedio. La semivida de eliminación osciló entre 1.38 y 2.83 horas (NC). En el análisis poblacional se determinaron tres semividas de disposición de aproximadamente 0.018, 0.96 y 3.63 horas, asociadas cada una de ellas con el 31, 63 y 5.7 %, respectivamente del área bajo la curva de niveles plasmáticos. Estos valores hallados en las tres fases de disposición, concuerdan con los valores de semivida calculados en el análisis no compartimental, ya que en este análisis, los valores reflejan procesos de disposición híbridos entre las fases intermedia y lenta de disposición (β y γ). La tasa de extracción de elomotecan fue de 0.5, valor que indicaría que la máxima biodisponibilidad oral del fármaco, sería del 50% en esta especie. De los estudios de farmacología realizados comparativamente con irinotecan, se halló que el elomotecan inhibió el crecimiento del tumor en un 49% a la dosis de 17.5 mg/kg en ratones hembra atímicas en el modelo de células tumorales HT29. Se obtuvieron resultados similares con irinotecan a la dosis de 120 mg/kg. De los resultados conjuntos de farmacocinética y farmacología se desprende que en el ratón, se precisa una exposición al fármaco de alrededor de 10810 (ng/mL) · h para obtener eficacia en el modelo de adenocarcinoma de colon. En los modelos in vivo PC3 y DU145 de adenocarcinoma de próstata, elomotecan mostró un incremento del 125% y 175% de supervivencia respectivamente frente a los ratones control cuando se ensayó a dosis de 5 mg/kg dos veces al día por vía oral ^[40], correspondiendo a una exposición estimada de aproximadamente de 3088 (ng/mL)·h.

Las dosis de elomotecan ensayadas en rata por vía intravenosa (de 0.0125 a 16 mg/kg) indicaron también un comportamiento farmacocinético lineal en este ámbito de dosis en esta especie animal. En el análisis mediante la aproximación poblacional de los datos, se identificaron como covariables significativas del aclaramiento plasmático el peso y el sexo. Los valores de aclaramiento fueron superiores en ratas macho (0.58 L/h, para una rata macho de peso medio de 255 g) que en ratas hembra (0.37 L/h, para una rata hembra de peso medio de 255 g). (Tabla 49). Esta diferencia respecto al sexo, podría explicarse por los enzimas implicados en la biotransformación del compuesto. Se conoce que la isoforma CYP3A4 es la que interviene mayoritariamente en el metabolismo del fármaco en humanos. En rata, aunque no se dispone de un estudio específico de identificación de las isoformas responsables del metabolismo de elomotecan, las isoformas de la familia 3A presentes son la 3A1 y la 3A2. Se conoce también que la expresión de la isoforma 3A1 es dominante en la rata macho ^[99]. Las diferencias en el aclaramiento de los dos sexos concuerdan también con los resultados hallados en el estudio de excreción biliar en ratas canuladas, en el que se observó un porcentaje de dosis excretado en bilis, superior en ratas macho que en ratas hembra (92 vs 78% de la dosis administrada en un período de 48 horas post-administración). El volumen de distribución de 1.25 L (0.347 a 2.12 L, NC) se consideró medio-alto con aproximadamente 5 L/kg respecto al volumen acuoso de la rata. En esta especie, el volumen del compartimento central representa un 34% del volumen total, y la fracción de elomotecan en plasma es de aproximadamente 1.1%, por lo que también, al igual que en ratón, se encuentra mayoritariamente distribuido en compartimentos periféricos y fijado a proteínas plasmáticas y

tisulares. La tasa de extracción estimada es de 0.4 y 0.7 en ratas hembra y macho respectivamente, si se tiene en cuenta que el coeficiente de reparto sangre/plasma es 1, y que el valor fisiológico del flujo sanguíneo en hígado de rata de 0.828 L/h^[98]. Estos valores de tasa de extracción se corresponderían con biodisponibilidades orales máximas de 60 y 30% en ratas hembra y macho respectivamente. Sin embargo, el estudio de biodisponibilidad oral efectuado en ratas macho a la dosis de 10 mg/kg, proporcionó un valor de biodisponibilidad del 5.3%. Este resultado, podría ser debido a la presencia de un efecto de primer paso, o bien a una falta de absorción del producto por vía oral. Los resultados no publicados, de un estudio de balance de masas, efectuado en rata a la dosis de 3 mg/kg por vía oral e intravenosa, pusieron de manifiesto que la absorción del producto se encuentra alrededor del 17% (valores entre 12 y 22%, a partir del vehículo 1). Por tanto, el valor de biodisponibilidad del 5% es coherente con la máxima biodisponibilidad esperada a partir de la tasa de extracción y el porcentaje de absorción del producto (30 % de 17 es aproximadamente 5). Es de esperar que formulaciones que incrementasen la absorción del producto, proporcionaran paralelamente un aumento de la biodisponibilidad oral. En este caso, la absorción a partir de una formulación que contenía un 20% de hidroxipropil-beta-ciclodextrinas, no se tradujo en un valor máximo de biodisponibilidad. En los estudios que se llevaron a cabo para estudiar la influencia de diferentes vehículos, el fármaco se administró únicamente por vía intravenosa, por lo que se desconoce el efecto que pudiera tener una formulación del producto más favorable para la absorción. En el estudio que se ensayó la solución de producto en Hidroxipropil-beta-ciclodextrina al 20% (vehículo 1), frente a una mezcla de solventes orgánicos (vehículo 2) el objetivo se centró en evaluar la posible diferencia en la distribución del producto debido a la formación de complejo entre elomotecan y hidroxipropil-beta-ciclodextrina. Los resultados obtenidos en el análisis no compartimental parecen indicar que el vehículo empleado afecta a la magnitud de la distribución ($V_{d_{ss_vehículo\ 1}}$, 2.28 L/kg y $V_{d_{ss_vehículo\ 2}}$, 3.26 L/kg) pero no al perfil farmacocinético, a excepción de los tiempos iniciales tras la administración del producto. Estas diferencias no fueron significativas en el análisis poblacional, posiblemente debido al limitado número de datos provenientes de la utilización del vehículo 2. Así, cuando el elomotecan se administra empleando una mezcla de solventes orgánicos, la distribución es más rápida y mayor. Estos resultados indican que debido a la formación del complejo fármaco-ciclodextrina en el vehículo 1, el elomotecan necesita un tiempo para liberarse del vehículo. Como puede observarse en la Figura 29, las concentraciones plasmáticas observadas tras la administración del elomotecan en ambos vehículos se igualan a partir de los 6 minutos, por lo que a partir de este tiempo, puede considerarse que el fármaco se ha liberado y se distribuye libremente según sus características físico-químicas. Puesto que desde un punto de vista cinético, ambos vehículos podían resultar adecuados para la administración del elomotecan, se estudió la estabilidad de ambas formulaciones. Se observó que el elomotecan se degradaba en el vehículo 2, mientras que en la solución que contenía hidroxipropil-beta-ciclodextrina (vehículo 1) era estable durante un mes a 5°C. A partir de estos resultados, se descartó el vehículo 2 (solución de propilenglicol :

polioxietilenglicol 400 : ácido láctico (85% en agua) : ácido acético 1N : agua (4:4:4:2:86)) para futuros estudios del elomotecan.

El valor poblacional de la semivida de eliminación del fármaco fue de 4.05 y 3.45 horas en ratas hembra y macho respectivamente, valor que puede considerarse medio-alto en esta especie. En el estudio de biodisponibilidad oral, los valores de semivida determinados mediante análisis no compartimental fueron de 3.38 y 8.32 horas por vía intravenosa y oral respectivamente. Ello sería indicativo probablemente a un proceso prolongado de absorción del fármaco desde el tracto gastrointestinal dando lugar a un fenómeno de "flip-flop" ^[76].

En los estudios de toxicocinética, en los que el producto se administró a dosis diarias durante 5 y 28 días y a dosis semanales durante 8 semanas, los índices de acumulación fueron próximos a la unidad, de acuerdo con el valor de la semivida del fármaco y la pauta posológica establecida. Cabe destacar sin embargo, que se calcularon valores entre 1 y 1.8 cuando el fármaco se administró diariamente y entre 0.7 y 1.9 cuando se administró semanalmente. Estos valores más alejados de la unidad, no se pudieron asociar a la dosis administrada ni a la duración del tratamiento. El aclaramiento plasmático y volumen de distribución del elomotecan no se modificaron con el tiempo de administración. El conjunto de resultados hallados tras dosis repetidas, permitió concluir que el elomotecan presenta en la rata, una cinética lineal frente al tiempo. Los estudios de toxicología permitieron hallar como dosis sin efectos adversos observados (NOAEL), la dosis de 0.2 mg/kg/día. A dosis superiores los animales mostraron una pérdida de apetito que se tradujo en una disminución en el incremento de peso respecto al grupo control. También se observó alopecia, anemia, menor tamaño del bazo y de la glándula tiroides y disminución proporcional de los leucocitos en función de las dosis administradas, que fue reversible a las 4 semanas sin tratamiento. La exposición (AUC) observada a la dosis NOAEL, tras 28 días de tratamiento fue de 78.2 y 108 (ng/mL) ·h en ratas macho y hembra respectivamente.

En perro se llevaron a cabo un total de siete estudios, y en todos ellos se utilizaron los mismos animales empleados para estudios de farmacología, de seguridad, toxicidad subcrónica o crónica. Se administraron dosis únicas en forma de bolus en el perro anestesiado (0.2 a 0.6 mg/kg) para evaluar efecto de elomotecan sobre la hemodinamia y en el perro consciente (0.1 a 0.4 mg/kg) se realizó un estudio de telemetría para conocer el posible efecto cardiovascular del producto. Desde un punto de vista de seguridad, el producto no produjo cambios hemodinámicos ni efecto sobre presión sanguínea, frecuencia cardíaca ni cambios en el electrocardiograma hasta dosis de 0.4 mg/kg. En el estudio en perro anestesiado, aunque únicamente se pudieron extraer muestras durante las 2.5 primeras horas tras la administración del fármaco, se observó una tendencia a una menor distribución del fármaco debido al efecto de la anestesia, con concentraciones plasmáticas máximas superiores a las alcanzadas en perro consciente (a la dosis de 0.2 mg/kg, los valores de C_{max} oscilaron entre 150-313 ng/mL en perro anestesiado y entre 139-215 en perro consciente). Además, se llevaron a cabo estudios toxicocinéticos piloto, con el fin de hallar las dosis adecuadas para el estudio de

toxicidad crónica. Debido a la muerte de algún animal (un perro macho tratado a la dosis de 0.4 mg/kg murió a las 72 horas post administración tras presentar episodios de diarrea y vómito), se decidió realizar un estudio preliminar de toxicidad aguda tras la administración única del elomotecan por infusión de 15 minutos en el vehículo 4 (vehículo con menor porcentaje de hidroxipropil-beta-ciclodextrina, 1.12% frente a 20% en el vehículo 1).

El aclaramiento de elomotecan en perro fue de 0.96 L/h (0.66 – 5.72 L/h, NC), con una variabilidad interindividual del 29%. Dado que la relación entre concentración sanguínea y concentración plasmática en esta especie es de aproximadamente 0.6, el aclaramiento sanguíneo del elomotecan en perro sería de aproximadamente 1.6 L/h. Este valor ($E=0.086$) es relativamente bajo ya que representa únicamente alrededor de un 8.6% del flujo sanguíneo hepático del perro (18.5 L/h). El volumen de distribución (V_{ss}) fue intermedio, con un valor de 18.1 L, siendo el volumen del compartimento periférico profundo donde el fármaco se halla en mayor proporción. Teniendo en cuenta el volumen plasmático y el volumen de distribución del fármaco, puede considerarse que únicamente el 3% de elomotecan se halla en plasma, mientras que el 97% restante se encuentra fuera del plasma. Se observó una diferencia en la velocidad de distribución del fármaco, en función del vehículo empleado (vehículo 1 o 4 con mayor o menor proporción de hidroxipropil-beta-ciclodextrina). Al utilizar mayor proporción de ciclodextrina, la distribución del fármaco se modifica, siendo menor la velocidad de retorno del fármaco del compartimento periférico al compartimento central ($K_{21} = 0.05 \text{ h}^{-1}$ frente a $K_{21} = 0.299 \text{ h}^{-1}$). Los resultados hallados para los dos parámetros farmacocinéticos primarios (aclaramiento plasmático y volumen de distribución), son coherentes con el valor relativamente elevado hallado para la semivida del fármaco, (13.6 horas cuando se administra elomotecan con el vehículo 4, y 18.7 horas cuando se administra con el vehículo 1). Estos valores ponen de manifiesto la influencia en el comportamiento farmacocinético del elomotecan según el vehículo utilizado para su administración intravenosa. Tras la administración del fármaco a dosis semanales repetidas de 0.01 a 0.25 mg/kg/semana, durante 8 semanas, no se observó acumulación de fármaco y a partir del estudio toxicológico se concluyó que la dosis no letal más elevada fue la de 0.25 mg/kg y la dosis sin efectos adversos (NOAEL) la de 0.01 mg/kg.

La administración del elomotecan en el mono se realizó mediante infusión de 15 minutos de una dosis de 0.2, 0.8 o 1.4 mg/kg durante 7 días consecutivos. El análisis no compartimental de los datos realizados a partir de la mediana de las concentraciones frente al tiempo para cada dosis administrada, presentó unos valores de los parámetros que estuvieron en concordancia con los valores obtenidos tras el análisis poblacional. Así, el aclaramiento estimado mediante la aproximación no compartimental fue de 1.88 a 2.93 L/h (Tabla 81) y el valor obtenido mediante la aproximación poblacional fue de 2.29 L/h. Considerando el volumen de agua corporal del mono (3.46 L), el elomotecan presenta una distribución media. El valor de la tasa de extracción puede considerarse bajo ($E=0.2$) ya que el valor fisiológico del flujo sanguíneo en el hígado del mono es de 13.1 L/h^[98] y el coeficiente de reparto plasma-sangre es de uno. En consecuencia, una modificación en la unión a proteínas plasmáticas afectará al aclaramiento del elomotecan

en el mono. Sin embargo, en el ámbito de concentraciones halladas (concentraciones inferiores a 730 ng/mL), no se produce saturación de la unión a proteínas plasmáticas. Ello es consistente con el hecho de hallar un comportamiento farmacocinético lineal. La semivida de eliminación estimada mediante la aproximación no compartimental fue de 1.87 a 3.77 horas mientras que el valor estimado mediante la aproximación poblacional fue de 3.74 horas. El valor de la semivida de eliminación puede considerarse medio.

En el análisis toxicológico tras la administración repetida del elomotecan se observó que ningún animal murió como consecuencia de la administración diaria de elomotecan durante 7 días consecutivos. Los animales que recibieron la dosis de 0.8 y 1.4 mg/kg presentaron episodios de diarrea y una disminución en el número de hematíes. En consecuencia, se estableció la dosis de 0.2 mg/kg/día como el nivel sin efectos adversos observados (NOAEL). A esta dosis, la exposición observada (AUC) tras 7 días de tratamiento fue de 204 y 268 (ng/mL) · h en monos macho y hembra respectivamente. La C_{max} se obtuvo a los 15 minutos de tratamiento y fue de 76.5 y 106 ng/mL en monos macho y hembra, respectivamente.

El escalado alométrico es uno de los métodos empleados para predecir los parámetros farmacocinéticos en humanos y ayudar así en la selección de la dosis inicial a administrar en el hombre. Por este motivo, se ha realizado un análisis alométrico retrospectivo para estudiar la viabilidad de esta aproximación en el elomotecan. Así, con los datos disponibles de concentraciones plasmáticas en las diferentes especies preclínicas empleadas en el desarrollo del fármaco y como última fase del trabajo, se realizó un análisis alométrico empleando la aproximación poblacional. De esta manera, se obtuvo en un sólo paso los coeficientes y exponentes alométricos de los parámetros farmacocinéticos del modelo que mejor explicó los datos concentración vs tiempo en las diferentes especies preclínicas estudiadas. El modelo alométrico se basó en la correlación de los diferentes parámetros farmacocinéticos con el peso corporal como principal característica demográfica entre las distintas especies. El exponente hallado para el aclaramiento en esta ecuación alométrica fue de 0.389, valor que dista del valor de referencia de 0.75. Por ello, en la predicción del aclaramiento, se estudió el efecto de otros factores como la máxima esperanza de vida (MLP), el peso del cerebro (BW) y el flujo de bilis diario normalizado por el peso corporal (CF1) y normalizado por el peso del hígado (CF2) tras aplicar la regla de los exponentes. También se estudió el caso ideal en el que los exponentes alométricos fueron de 0.75 para el aclaramiento y de 1.0 para volúmenes de distribución. La introducción del flujo de bilis diario normalizado por el peso corporal (CF1) en la ecuación alométrica simple, mejoró significativamente el modelo alométrico. Estos resultados están en concordancia con el hecho de que la excreción biliar es una vía importante de eliminación del elomotecan y en fármacos eliminados por esta vía, la inclusión de dicho factor mejora el ajustado ^[83] del modelo. Así, el valor del exponente hallado para el aclaramiento fue de 0.781, valor que se desvía un 4.1% respecto al valor típico de 0.75. El valor del exponente del volumen de distribución del compartimento central fue de 0.721, desviándose un 27.9% respecto al valor comúnmente aceptado de 1.0. Los resultados obtenidos hacían prever que el

modelo alométrico desarrollado permitiría predecir las concentraciones plasmáticas en el hombre adecuadamente. El valor del aclaramiento predicho en humanos con el modelo alométrico seleccionado fue de 2.21 L/h. Teniendo en cuenta este valor y la exposición sin efectos adversos en rata, perro y mono, la primera dosis a administrar en el hombre hubiese sido de 0.2 a 0.5 mg. Esta dosis fue un mínimo de 67% inferior a la primera dosis administrada en el estudio clínico (1.5 mg) ^[41]. Los resultados del volumen de distribución y del aclaramiento plasmático hallados en el estudio clínico, permitieron comprobar el error con el que estos parámetros se predijeron. Con ello, se evaluó la capacidad predictiva del modelo y se observó que éste sólo predecía adecuadamente el volumen del compartimento central (error 28.6%). El error en la predicción del aclaramiento fue del 90.1%, valor que excede los comúnmente aceptados (error de $\pm 30\%$) al aplicar esta metodología.

Con el fin de visualizar gráficamente la capacidad predictiva de los diferentes modelos alométricos desarrollados, se simularon las concentraciones de elomotecan tras la administración i.v. de una dosis de 60 mg (dosis recomendada en el estudio clínico para futuros estudios con el fármaco) y éstas se compararon con las concentraciones plasmáticas promedio (n=12) observadas en el estudio de Fase I ^[41] (Figura 61). Se observó que el modelo alométrico con los exponentes fijos, predecía aceptablemente las concentraciones plasmáticas de elomotecan en el decurso del tiempo. Sin embargo, este modelo, nunca se hubiera seleccionado a priori ya que el valor de la función objetiva y los gráficos de bondad de ajustado fueron peores que los obtenidos con el resto de modelos alométricos ensayados.

Las posibles diferencias en el metabolismo y eliminación del elomotecan en las especies ensayadas y el hombre, pueden ser las responsables de la limitada capacidad predictiva del modelo alométrico poblacional desarrollado. Se conoce que para fármacos que como el elomotecan presentan una baja tasa de extracción, el factor limitante de la eliminación del fármaco es la actividad enzimática y esto, frecuentemente provoca que el escalado alométrico entre especies sea poco predictivo. Por ello, algunos autores proponen predecir el aclaramiento en humanos mediante un método que emplea datos de aclaramiento *in vitro* obtenidos a partir de hepatocitos ^[84]. Sin embargo, en el presente trabajo, esta aproximación no pudo aplicarse al no disponerse de esta información para el elomotecan.

7 CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas en el presente trabajo son las siguientes:

1. Se puso a punto y validó un método bioanalítico para la determinación del elomotecan y del BN80960 en muestras plasmáticas de ratón, rata, perro y humano mediante una extracción en fase sólida en línea acoplada a la cromatografía líquida de alta eficacia y a la espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray. El método fue selectivo, preciso, exacto y robusto en las cuatro especies en las que se validó. La exactitud y precisión del método determinadas durante el análisis de las muestras plasmáticas de los estudios farmacocinéticos/toxicocinéticos en las secuencias de rutina, confirmaron la validez del método desarrollado para la determinación del elomotecan y BN80960.

2. Los estudios de estabilidad efectuados permitieron fijar las condiciones de manipulación y almacenamiento de las muestras plasmáticas. Las muestras deben acidificarse y mantenerse en baño de agua- hielo durante su procesado. A -70°C , las muestras plasmáticas de ratón, rata, perro y humano pueden conservarse durante 12 meses, mientras que, a -20°C , las muestras de ratón y rata fueron estables un plazo máximo de 3 meses y las de perro y humano un periodo máximo de 6 meses.

3. Al analizar los datos de concentración plasmática de elomotecan frente al tiempo correspondientes a todas las especies animales mediante dos aproximaciones farmacocinéticas distintas (análisis no compartimental y poblacional), se obtienen resultados farmacocinéticos similares, permitiendo afirmar que ambas metodologías son capaces de describir aceptablemente el comportamiento cinético del elomotecan.

4. Los resultados obtenidos en los estudios farmacocinéticos y de estabilidad de las formulaciones ensayadas, desaconsejaron el uso de solventes orgánicos en la formulación final.

5. Mediante la aproximación poblacional, el modelo de tres compartimentos con eliminación de primer orden desde el compartimento central fue el que ajustó más satisfactoriamente los datos de ratón, rata y perro. En el caso del mono, el modelo de dos compartimentos con eliminación de primer orden desde el compartimento central fue el mejor.

6. El elomotecan mostró un comportamiento farmacocinético lineal tras la administración intravenosa en todas las especies y ámbito de dosis ensayados; en ratón de 1.75 a 17.5 mg/kg, en rata de 0.0125 a 16 mg/kg, en perro 0.01 a 1.4 mg/kg y en mono de 0.2 a 1.4 mg/kg.

7. En el análisis poblacional, se identificaron como covariables significativas en el aclaramiento de la rata, el peso y el sexo. En el perro, se identificaron como covariables el peso y el vehículo de la formulación. En las otras especies estudiadas, no se identificaron covariables que permitieran explicar parte de la variabilidad interindividual observada.

CONCLUSIONES

8. Se estimó un valor medio-bajo de variabilidad interindividual en el aclaramiento (coeficiente de variación de 7.8 a 29%) y un error residual moderado (coeficiente de variación de 21 a 39%) en las distintas especies ensayadas.

9. El elomotecan que presenta una elevada unión a proteínas plasmáticas (>97.7%), también presenta una alta distribución hacia los compartimentos periféricos en todas las especies ensayadas. El volumen de distribución se consideró intermedio en todas las especies con valores comprendidos entre 1.9 y 4.9 L/kg.

10. El aclaramiento plasmático del elomotecan fue bajo o intermedio, con valores de 0.1 L/h/kg (perro), 0.9 L/h/kg (mono), 2.0 L/h/kg (ratón) y 1.5 - 2.3 L/h/kg (rata hembra y macho). La tasa de extracción del elomotecan fue baja en perro y mono ($E=0.086$ y 0.2 , respectivamente) y media en ratón y rata ($E=0.5$ y $0.4-0.7$, respectivamente). Los valores de estos parámetros ponen de manifiesto las diferencias entre las especies.

11. Se estableció un modelo farmacocinético de escalado entre especies que incluye el flujo de bilis diario normalizado por el peso corporal. Los valores de los exponentes alométricos fueron 0.781 y 0.721 para el aclaramiento y el volumen de distribución del compartimento central, respectivamente. A partir de este modelo, se hubiera infraestimado en un 67% la primera dosis ensayada en humanos.

12. Los valores del volumen de distribución del compartimento central y del aclaramiento plasmático predichos en el hombre por alometría, presentaron un error de 28.6 % y 90.1%, respectivamente. La falta de predicción del modelo alométrico puede ser atribuida a las diferencias en el metabolismo y eliminación del elomotecan entre especies al tratarse de un fármaco con baja tasa de extracción y que presenta excreción biliar.

8 REFERENCIAS

1. Lozano J. A. *Bioquímica y Biología molecular en ciencias de la Salud*. Madrid: Editorial McGraw-Hill-Interamericana, 2005. ISBN 8448606426.
2. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. *Defining Cancer* [en línea]. Maryland, actualizado 02 agosto 2013 [Consulta: 08 agosto 2013]. Disponible en <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>.
3. American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*. Edge SB, Byrd DR. Chicago: Editorial Springer, 2010. ISBN 978-0-387-88440-0.
4. Ferlay J., Shin H.R., Bray .F, Forman D., Mathers C., Parkin D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010; 127, 12, 2893-917.
5. American Society of Health-System Pharmacists. *AHFS Drug information*. Maryland Editorial ASHSP, 2012. ISBN 1585282677.
6. Wall, M.E.; et al. Plant antitumor agents. The isolation and structure of camptothecin. a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptoliteca acuminata*. *J. Am. Chem. Soc.* 1966, 88, 3888
7. Givindachari T.R., Viswanathan N.N. 9-Methoxycamptothecin. A new alkaloid from *Mappia foelida miers*. *Indian J. Chem.* 1972, 10, 6, 453-454.
8. Moertel, C.G. et al. Phase II study of camptothecin (NSC-100880) in the treatment of advanced gastrointestinal cancer. *Cancer Chemother. Rep.* 1972, 56, 1, 95-101.
9. Gottlieb J.A., Guarino A.M., Call J.B. et al. Preliminary pharmacologic and clinical evaluation of camptothecin sodium (NSC-100880). *Cancer Chemother Rep.* 1970, 54, 461-479.
10. Horwitz S.B., Horwitz M.S. Effects of camptothecin on the breakage and repair of DNA during the cell cycle. *Cancer Res.* 1973, 33, 11, 2834-2836.
11. Hsiang. Y-H. et al. Camptothecin induces protein linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, 1985, 260, 27, 14873-14878.
12. Kawato Y. et al. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res.* 1991, 51, 16, 4187-4191.
13. Negoro S. et al. Phase I study of weekly intravenous infusions of CPT-11. A new derivative of camptothecin, in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 1991, 83, 16, 1164-1168.
14. Kingsbury W.D. et al. Synthesis of water-soluble (aminoalkyl) camptothecin analogues: inhibition of topoisomerase I and antitumor activity *J. Med. Chem.* 1991, 34, 1, 98-107.
15. Lavergne O., Lesueur-Ginot L., Pla Rodas F. et al. BN80245: an E-ring modified camptothecin with potent antiproliferative and topoisomerase I inhibitory activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1997, 7, 2235-2238.
16. Lavergne O., et al. Homocamptothecins: synthesis and antitumor activity of novel E-ring-modified camptothecin analogues. *J. Med. Chem.* 1998. 41, 27, 5410-5419.
17. Lesueur-Ginot L., et al. Homocamptothecin, an E-ring modified camptothecin with enhanced lactone stability, retains topoisomerase I-targeted activity and antitumor properties. *Cancer Res.* 1999, 59, 12, 2939-2943.
18. Bailly C., et al. Homocamptothecin, an E-ring modified camptothecin analog, generates new topoisomerase I-mediated DNA breaks. *Biochemistry*, 1999, 38, 47, 15556-15563.

19. Gelderblom H., Salazar R., Verweij J. Et al. Phase I pharmacological and bioavailability study of oral diflomotecan (BN80915), a novel E-ring-modified camptothecin analogue in adults with solid tumors. *Clinical Cancer Research*. 2003, 9, 11, 4101–4107.
20. Abou-Alfa G., et al. Randomized phase III study of exatecan and gemcitabine compared with gemcitabine alone in untreated advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol*. 2006, 24, 27, 4441–4447.
21. Meco D, Di Francesco A.M., Cusano G. et al. Preclinical evaluation of the novel 7-substituted camptothecin Namitecan (ST1968) in paediatric tumour models. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012, 70, 6, 811-822.
22. Wang J.C. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*. 1985, 54, 665-697
23. Liu L.F. DNA Topoisomerase Poisons as Antitumor Drugs. *Ann Rev Biochem*. 1989, 58, 351-375
24. Wu H.Y., Shyy S.H., wang J.C. et al. Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell*. 1988, 53, 3, 433-440.
25. Champoux J.J. DNA Topoisomerases: Structure, Function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem*. 2001, 70, 369–413.
26. Madden K.R., Stewart L. and Champoux J.J. Preferential binding of human topoisomerase I to superhelical DNA. *EMBO J*. 1995,14, 21, 5399-5409.
27. Wang J.C. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*. 1996, 65, 635-692.
28. Zwellung L.A. DNA topoisomerase II as a target of antineoplastic drug therapy. *Cancer Metastasis rev*. 1985, 4, 4, 263-276.
29. Hans-Georg L. Milestone in camptothecin research. *Drugs of the Future*. 2002, 27, 869-878.
30. Hertzberg R.P., Caranfa M.J., Holden K.G. et al. Modification of the hydroxy lactone ring of camptothecin: Inhibition of mammalian topoisomerase I and biological activity. *J Med Chem*. 1989, 32, 3, 715-720.
31. Burke T.G. The important Role of Albumin in determining the relative human blood stabilities of the Camptothecin anticancer drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1995, 84, 4, 518-519.
32. Mi Z., Burke T. Differential interactions of camptothecin lactone and carboxylate forms with human blood components. *Biochemistry*. 1994, 33, 34, 10325-10336.
33. . Actavis Group PTC ehf. Ficha técnica del irinotecan Accord. [en línea]. Junio 2012. [Consulta: 02 febrero 2013]. Disponible en <http://www.actavis.es/NR/rdonlyres/58919C40-00BC-40CB-9C3A-DA2497C89630/4681/FTIRINOTECANNOV09V04.pdf>
34. Chabot G.G., Abigerges D., Catimel G. Et al. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of irinotecan (CPT-11) and active metabolite SN-38 during phase I trials. *Ann Oncol*. 1995, 6, 2, 141-151.
35. European medicines agency. Hycamtin: EPAR - Product Information [en línea]. Londres, 12 mayo 2009, actualizado 30 noviembre 2010 [Consulta: 02 febrero 2013]. Disponible en http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000123/human_med_000823.jsp&mid=WC0b01ac058001d124

36. Scott L., Soepenbergh O., Verweij J. et al. A multicentre phase I and pharmacokinetic study of BN80915 (diflomotecan) administered daily as a 20-min intravenous infusion for 5 days every 3 weeks to patients with advanced solid tumours. *Ann Oncol.* 2007, 18, 3, 569-575.
37. Lavergne O., Harnett J., Rolland A. et al. BN 80927: a novel homocamptothecin with inhibitory activities on both topoisomerase I and topoisomerase II. *Bioorg Med Chem Lett.* 1999, 9, 17, 2599-2602.
38. Demarquay D., Coulomb H., Huchet M. et al. The homocamptothecin, BN 80927, is a potent topoisomerase I poison and topoisomerase II catalytic inhibitor. *Ann N Y Acad Sci.* 2000, 922, 301-302.
39. Huchet M., Demarquay D., Coulomb H. et al. The dual topoisomerase inhibitor, BN 80927, is highly potent against cell proliferation and tumor growth. *Ann N Y Acad Sci.* 2000, 922, 303-305.
40. Demarquay D., Huchet M., Coulomb H. et al. BN80927: a novel homocamptothecin that inhibits proliferation of human tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2004, 64, 14 4942-4949.
41. Trocóniz I.F., Cendrós J.M., Soto E., Pruñonosa J., Perez-Mayoral A., Peraire C., Principe P., Delavault P., Cvitkovic F., Lesimple T., Obach R. Population pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of drug-induced adverse effects of a novel homocamptothecin analog, elomotecan (BN80927), in a Phase I dose finding study in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012, 70, 2, 239-50.
42. De Hoffmann. Tandem mass spectrometry: a primer. *Journal of mass spectrometry.* 1996, 31, 129-137.
43. FDA (Food and Drugs Administration). Guidance for industry: Bioanalytical method validation. May 2001.
44. Williams P.J. *Pharmacometrics: The Science of Quantitative Pharmacology.* 1ª edición. Wiley-Interscience, 2007. ISBN 0-471-67783-3.
45. Domenech Berrozpe J., Martínez Lanao J., Pla Delfina J.M. editores. *Biofarmacia y farmacocinética Volumen I: Farmacocinética*, Madrid: editorial síntesis, 1997. ISBN 9788477385424.
46. Godfrey K. "Compartmental. Models and their Application". New York, Academic Press, 1983.
47. Gillespie W.R. Noncompartmental versus compartmental modelling in clinical pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* 1991, 20, 4, 253-262.
48. Chiou W.L. Critical evaluation of the potential error in pharmacokinetic studies of using the linear trapezoidal rule method for the calculation of the area under the plasma level-time curve. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 1978, 6, 6, 539-546.
49. Gabrielsson J., Weiner D. *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis: Concepts and Applications.* 4th ed. Sweden: Swedish Pharmaceutical Press, 2007. ISBN: 9197651001.
50. Beal S.L., Sheiner L.B. Estimating population kinetics. *Crit Rev Biomed Eng.* 1982, 8, 3, 195-222.
51. FDA (Food and Drugs Administration) Guideline for population PK: Guidance for Industry. Population Pharmacokinetics. February 1999

52. EMEA (European Medicines Agency): Guideline on reporting the results of population pharmacokinetic analysis. June 2007
53. Malbar M.C., Benítez Estevez A.J. Papel de los modelos farmacocinéticos de población. Revisión de métodos. *Química Clínica*. 2004, 23, 417-422.
54. Sheiner L.B. Analysis of pharmacokinetic data using parametric models. II. Point estimates of an individual's parameters. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1985,13, 5, 515-540.
55. Rosenbaum S.E., Carter A.A., Dudley M.N. Population pharmacokinetics: Fundamentals, Methods and Applications. Drug Development and Industrial Pharmacy. 1995, 21, 1115-1114.
56. Beal S. et al. NONMEM basic level course, Lyon, Francia, octubre 2001
57. Mallet A.A Maximum likelihood estimation method for random coefficient regression models. *Biometrika*. 1996, 73, 645-656.
58. Schumitzky A. Nonparametric EM algorithms for estimating prior distributions. *Appl Math Computation*. 1991, 45, 143-157.
59. Beal S.L., Boeckman A.J., Sheiner LB. NONMEM: user's guides. San Francisco (CA): University of California at San Francisco, 1988-1992.
60. Mandema J.W., Verotta D., Sheiner L.B. Building population pharmacokinetic-pharmacodynamic models. I. Models for covariate effects. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1992, 20, 5, 511-528.
61. Wählby U., Jonsson E.N., Karlsson M.O. Assessment of actual significance levels for covariate effects in NONMEM. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2001, 28, 3, 231-252.
62. Wählby U., Bouw M.R., Jonsson E.N., Karlsson M.O. Assessment of type I error rates for the statistical sub-model in NONMEM. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2002, 29, 3, 251-269.
63. Yamaoka T., Nakagawa T., Uno T. Application of Akaike's Information Criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetics equations. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1978, 6, 2, 165-175.
64. Brendel K., Dartois C., Comets E. et al. Are population pharmacokinetic and/or pharmacodynamic models adequately evaluated? A survey of the literature from 2002 to 2004. *Clin Pharmacokinet*. 2007, 46, 3, 221-234.
65. Karlsson M.O., Savic R.M. Diagnosing model diagnostics. *Clin Pharmacol Ther*. 2007, 82, 1, 17-20.
66. Savic R.M., Karlsson M.O. Importance of shrinkage in empirical bayes estimates for diagnostics: problems and solutions. *AAPS J*. 2009, 11, 3, 558-569.
67. Hooker A.C., Staats C.E., Karlsson M.O. Conditional weighted residuals (CWRES): a model diagnostic for the FOCE method. *Pharm Res*. 2007, 12, 2187-2197.
68. Efron B. Bootstrap methods: another look at the jackknife. *Ann Stat*. 1979, 7, 1-26.
69. Holford N. The Visual Predictive Check – Superiority to Standard Diagnostic (Rorschach) Plots. PAGE 14 Abstract 738. Pamplona, Spain 2005, <http://www.page-meeting.org>.

70. Karlsson M.O., Holford N.A tutorial on visual predictive checks. PAGE 17 (2008) Abstract 1434. Marseille, France 2008, <http://www.page-meeting.org>.
71. Bergstrand M, Hooker A.C., Wallin J.E., Karlsson M.O. Prediction-corrected visual predictive checks for diagnosing nonlinear mixed-effects models. *AAPS*. 2011, 13, 2, 143-51.
72. Brendel K., Comets E., Laffont C., Mentré F. Evaluation of different tests based on observations for external model evaluation of population analyses. *J Pharmacokinetic Pharmacodyn*. 2010, 37, 1, 49-65.
73. Rubin D.B. Bayesianly justifiable and relevant frequency calculations for the applied statistician. *Ann Stat*. 1984, 12, 1151-1172.
74. Mentré F., Escolano S. Prediction discrepancies for the evaluation of nonlinear mixed-effects models. *J Pharmacokinetic Pharmacodyn*. 2006, 33, 3, 345-367.
75. Brendel K., Comets E., Laffont C. et al. Metrics for external model evaluation with an application to the population pharmacokinetics of gliclazide. *Pharm Res*. 2006, 23, 9, 2036-2049.
76. Doménech Berrozpe J. Martínez Lanao J. Peraire Guitart C. editores. *Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética, volumen II*. Madrid: Editorial Síntesis, 2013. ISBN 978-84-995895-4-1.
77. Riviere J.E. *Comparative Pharmacokinetic Principles, Techniques and Applications*. Iowa State: University Press, 1999. ISBN 0-8138-2931-3.
78. West G.B., Brown J.H., Enquist B.J. The Fourth Dimension of Life: Fractal Geometry and Allometric Scaling of Organisms. *Science*. 1999, 284, 5420, 1677-1679.
79. Wolstenholme G.E.W., O'Connor M. *The lifespan of animals. Volume 5 colloquia on aging*. Londres.CIBA Foundation. 1959. ISBN 9780470714775.
80. Boxenbaum H., Ferting J.B. Scaling of antipyrine intrinsic clearance of unbound drug in 15 mammalian species. *Eur. J. Metab. Pharmacokinetic*. 1984, 9, 2, 177-183.
81. Mahmood I., Balian J.D. Interspecies scaling: predicting pharmacokinetic parameters of antiepileptic drugs in humans from animals with special emphasis on clearance. *J. Pharm. Sci*. 1996, 85, 4, 411-414.
82. Mahmood I., Balian J.D. Interspecies scaling: predicting clearance of drugs in humans: three different approaches. *Xenobiotica*. 1996, 26, 9, 887-895.
83. Mahmood I., Sahajwalla C. Interspecies Scaling of Biliary Excreted Drugs. *J Pharm Sci*. 2002, 91, 8, 1908-1914.
84. Lavé T., Dupin S., Schmitt C. Integration of in vitro data into allometric scaling to predict hepatic metabolism clearance in man: Application to extensively metabolized drugs. *J. Pharm. Sci*. 1997, 86, 5, 584-590.
85. Mahmood I., Balian J.D. The Pharmacokinetic Principles Behind Scaling from Preclinical Results to Phase I Protocols. *Clin Pharmacokinetic*. 1999, 36, 1, 1-11.
86. Tang H., Mayersohn M. Accuracy of allometrically predicted pharmacokinetic parameters in humans: role of species selection. *Drug Metab Dispos*. 2005, 33, 9, 1288-1293.

87. Dadgar D., Burnett P.E., Choc M.G., Gallicano K., Hooper J.W. Application issues in bioanalytical method validation, sample analysis and data reporting. *J Pharm Biomed Anal.* 1995; 13, 2, 89-97.
88. Directiva Europea 86/609/CEE 24 Nov 1986. Armonización de las leyes y procedimientos administrativos relacionados con la protección de los animales destinados a la experimentación u otros fines científicos.
89. Festing S., Wilkinson R. The ethics of animal research. *EMBO reports.* 2007, 8, 6, 526-530.
90. Martinez J. Conceptos en farmacocinética clínica. En: Herrera J, editor. Manual de farmacia clínica y farmacocinética. Madrid:Elsevier España:2003 p 169-171
91. ABSciex. Analyst Software Tutorial. Concord, Ontario, Canada, 2010.
92. Spark Holland, Spark Link User's guide, Emmen, The Netherlands. 2010.
93. WinNonlin version 5.3 Software for the Statistical Analysis on Nonlinear Models on Micros. SCI Software.
94. The R project for statistical computing, <http://cran.es.r-project.org>.
95. Johnsson E.N., Karlsson M.O. Xpose-an S-PLUS based population pharmacokinetic/pharmacodynamic model building aid for NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed.* 1999, 58, 1, 51-64.
96. Lindbom L., Pihlgren P., Jonsson N. PsN-Toolkit: a collection of computer intensive statistical methods for non-linear mixed effect modelling using NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed.* 2005, 79, 3, 241-57.
97. Rorabacher D.B. Statistical Treatment for Rejection of Deviant Values: Critical Values of Dixon Q Parameter and Related Subrange Ratios at the 95 percent Confidence Level. *Anal. Chem.* 1991, 63, 2, 139-146.
98. Davies B., Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res.* 1993; 10, 7, 1093-1095.
99. Ribeiro V., Lechner M.C. Cloning and characterization of a novel CYP3A1 allelic variant: analysis of CYP3A1 and CYP3A2 sex-hormone-dependent expression reveals that the CYP3A2 gene is regulated by testosterone. *Arch Biochem Biophys.* 1992, 14, 293, 1, 147-52.

9 ANEXO I

Population pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of drug-induced adverse effects of a novel homocamptothecin analog, elomotecan (BN80927), in a Phase I dose finding study in patients with advanced solid tumors

Iñaki F. Trocóniz · Josep-María Cendrós · Elena Soto · Joan Pruñonosa · Ana Perez-Mayoral · Concepción Peraire · Paola Principe · Patrick Delavault · Frédérique Cvitkovic · Thierry Lesimple · Rosendo Obach

Received: 15 March 2012 / Accepted: 30 May 2012 / Published online: 15 June 2012
 © Springer-Verlag 2012

Abstract

Purpose To characterize the pharmacokinetic profile of elomotecan, a novel homocamptothecin analog, evaluate the dose-limiting toxicities, and establish the relationship between exposure and toxicity in the first Phase I study in patients with advanced malignant solid tumors. Preliminary antitumor efficacy results are also provided.

Design Elomotecan was administered as a 30-min intravenous infusion at doses ranging from 1.5 to 75 mg once every 3 weeks to 56 patients with advanced solid tumors. Plasma concentration data and adverse effects were modeled using the population approach.

Results Elomotecan showed linear pharmacokinetics, and clearance was decreased with age. The model predicts a 47 and 61 % reduction in CL for patients aged 60 and 80 years, respectively, when compared with younger

patients (30 years). Neutropenia represented the dose-limiting toxicity. The maximum tolerated dose and the recommended dose (RD) were 75 and 60 mg, respectively. Elomotecan elicited a 20, 5, 2, and 2 % severe (grade 4) neutropenia, asthenia, nausea, and vomiting at the RD, respectively. Of the subjects in the RD cohort, 41.7 % had a stable disease mean duration of 123.6 ± 43.4 days.

Conclusions The pharmacokinetic parameters and the toxicity pattern of elomotecan suggest that this novel homocamptothecin analog should be further explored in the clinical setting using a dose of 60 mg administered as a 30-min intravenous infusion, once every 3 weeks.

Keywords Elomotecan · Dose finding · Pharmacokinetics · Adverse effects · Population modeling

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00280-012-1906-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

I. F. Trocóniz (✉) · E. Soto
 Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology,
 School of Pharmacy, University of Navarra,
 31080 Pamplona, Spain
 e-mail: itroconiz@unav.es

J.-M. Cendrós · J. Pruñonosa · A. Perez-Mayoral · C. Peraire ·
 P. Principe · P. Delavault · R. Obach
 Drug Metabolism and Pharmacokinetic Service, Ipsen Pharma
 S.A., Sant Feliu de Llobregat, 08980 Barcelona, Spain

F. Cvitkovic
 Centre Rene Huguenin, 35 Rue Dailly,
 92210 Saint-Cloud, France

T. Lesimple
 Centre Eugene Marquis, Rue de la Bataille Flandres-Dunkerque,
 CS 44229, 35042 Rennes Cedex, France

Introduction

Elomotecan (BN80927) is a camptothecin analog belonging to the homocamptothecin family (hCPT) that can inhibit both topoisomerases I and II. Such pharmacodynamic characteristics might represent an advantage over the other members of the hCPT family which were reported to specifically inhibit topoisomerase type I. Tumor resistance due to alterations in either one or both enzymes can be therefore hampered, and the possibility exists for elomotecan to act at different places in the cell cycle [1].

Current information about elomotecan is limited. It is known that it reduces the proliferation of different tumor cells with higher potency than other anticancer drugs of reference targeting topoisomerases I or II. In vivo antitumor model studies have shown a higher elomotecan activity in xenografted prostatic tumors when compared to both topotecan and irinotecan. Contrary to other

camptothecins, elomotecan is not a substrate for P-glycoproteins [2–5].

The main focus of the current paper is to (1) characterize the pharmacokinetic properties of elomotecan in patients with advanced malignant solid tumors using the intravenous route (i.v.) and a 30-min fixed infusion rate, once every 3 weeks, and establish the relationship between drug exposure and toxicity in the targeted patient population, (2) identify the maximum tolerated dose (MTD) and recommended dose (RD), and (3) provide preliminary antitumor efficacy results.

The influence of patient characteristics (such as demographic, biochemical, patient status, genotype of genes involved in the transport and metabolism of drugs) on the inter-subject variability linked to pharmacokinetics and adverse effects was evaluated.

Materials and methods

Study design

This is an open-label, multicenter, single-arm, dose-escalating Phase I study. Male and female patients aged from 18 years onwards were included in this study. All eligible patients had an advanced malignant solid tumor with no standard therapeutic option available after failure of standard therapy. All patients who gave informed consent and met the protocol inclusion and exclusion criteria were offered the treatment.

Patient characteristics

Supplementary material Table 1 lists the baseline patient demographic, status, tumor, biochemical and pharmacogenetic characteristics of the studied population. Briefly, the population was constituted by 27 males and 29 females. Approximately half of the patients presented liver metastases and had prior radiotherapy and prior platinum-based chemotherapy. Regarding pharmacogenetics, only phenotypes that presented polymorphism were included in the pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis.

Drug administration

Elomotecan was administered as a 50-mL solution over a 30-min intravenous infusion at doses ranging from 1.5 to 75 mg. Patients were divided into 12 cohorts. The dose level (number of patients) administered in the 12 cohorts were 1.5 (3), 2.5 (4), 4 (3), 6 (3), 10 (3), 16 (3), 25 (3), 40 (3), 60 (12), 61 (6), 65 (6), and 75 (7) mg. A maximum of

10 cycles of therapy were administered: independently of the dose, 56 patients received the first cycle, 50 patients received the second cycle, and 20 patients received up to four cycles. The number of patients with 5, 6, 7, 8, 9, and 10 cycles of chemotherapy was 10, 8, 7, 4, 3, 2, and 1, respectively.

MTD and RD determination

The starting dose considered to be safe was 1.5 mg and was calculated as one-sixth of the highest administered non-lethal dose in the most sensitive animal species (dog). Administration of each new dose level was preceded by a minimum of three patients having been observed for at least 3 weeks. Further escalating doses were dependent on the presence of any relevant clinical or biological safety observations as follows: (1) in the absence of any drug-related toxicity above grade 1, the dose escalation for each successive cohort was 100 %. The first patient to be administered the new dose was observed for 3 weeks before other patients could receive the same dose; (2) if grade 2 or worse toxicity was observed at cycle 1, the dose escalation for the next cohort was 50 %. Patients administered the new dose could do so at the same time; (3) if a dose-limiting toxicity (DLT) was observed in one out of three patients at cycle 1, three additional patients received the same dose before any dose escalation was made. If no additional patient experienced a DLT (this would equate to MTD determination), the next dose escalation could proceed at a level of 25 %; (4) if one out of six patients experienced a DLT at cycle 1, and at least one additional grade 3 toxicity at any cycle was observed, up to three additional patients could receive the same dose before any dose escalation was made. MTD determination within a cohort of nine patients was made upon the judgment of the safety assessment committee.

Once the MTD was determined, 12 additional patients were administered the RD, defined as the highest dose below the MTD.

Tumor response

Tumor assessment was made within 4 weeks prior to the first administration, and once every two cycles. Cancer lesions were identified as target or non-target lesions and classified using RECIST criteria as complete response (CR), partial response (PR), stable disease (SD), and progressive disease (PD). Target and non-target lesions were then combined to determine a patient's overall response at each assessment, and subsequently their best overall response.

Sampling collection

Pharmacokinetics

After the first and second cycles of administration, the pharmacokinetics of elomotecan was characterized during 3 days. Some patients received additional and consecutive cycles of administration but no sample for pharmacokinetic analyses was taken.

Samples were obtained at the following times: 0, 15, 30 (end of infusion), 35, 45, 60, 90 min, 2.5 h, 4.5, 6.5, 9.5, 12.5, 24.5, 48.5, and 72.5 h after the start of the infusion. At each pharmacokinetic sampling time, 8 mL of blood was collected into two tubes containing lithium heparinate as anticoagulant. Blood samples were placed on ice immediately and were centrifuged at 2,000g for 15 min at 4 °C after collection. For each blood sample, two 1.8-mL aliquots of plasma were placed in two appropriately labeled polypropylene tubes and frozen immediately at –80 °C.

The validated analytical method used to determine BN80927 in human plasma is based on a HPLC–MS–MS procedure after its extraction from the matrix with a solid-phase extraction technique. The limit of quantification was 0.05 ng/mL. Within-study bias and precision of the assay was below 15 %.

Genotyping

Participation in the pharmacogenetic testing was optional. Patients were asked to participate and to state in the informed consent form whether they wished to do so and sign the informed consent accordingly. If they agreed, 5 mL of blood was collected into a Monovette tube before the first administration. Blood samples were frozen immediately after withdrawal at –20 °C. Samples for pharmacogenetic analysis were taken only at the first cycle of administration. The genotype of the polymorphic sites determining the allelic variants *2, *3, *4, and *8 of the gene CYP2C19, *3, *4, *5, *6, *7, *8, and *M × N of the gene CYP2D6, *1B, *8, *11, *12, *13, and *17 of CYP3A4, *2, *3 of gene CYP3A5, and *7, *28, *36, and *37 of the gene UGT1A1 were analyzed. In addition, the genotype of the polymorphic sites determining selected variants of the following genes were analyzed for all subjects: ABCB1 (MDR1), ABCC2 (MRP2), ABCC3 (MRP3), ABCG2 (BCRP), SLC22A1 (OCT1), and SLCO1B1 (OATP-C). For these genes, reporting of genotyping results was limited to genotypes.

Absolute neutrophil counts

Blood samples for neutrophil determination were collected twice a week or daily in the presence of a grade 4

hematological toxicity or febrile neutropenia during all treatment cycles. Different levels of neutropenia were computed, transforming the neutrophil count at nadir into a five-category scale as follows: grade 0 ($\geq 2.0 \times 10^9/L$), grade 1 (≥ 1.5 to $< 2.0 \times 10^9/L$), grade 2 (≥ 1.0 to $< 1.5 \times 10^9/L$), grade 3 (≥ 0.5 to $< 1.0 \times 10^9/L$), and grade 4 ($< 0.5 \times 10^9/L$).

Treatment-emergent adverse effects (TEAEs)

TEAEs were monitored weekly at all treatment cycles, and they were classified according to the following criteria based on the investigator's judgment: absence, mild, moderate, severe and life-threatening adverse event corresponding to severity grade from 0 to 4. Within each cycle and for each TEAE, the greatest score was used for the analysis.

Data analysis

Pharmacokinetic (PK) and toxicity data were analyzed using the population analysis approach with the NONMEM version VI software [6]. The analysis was performed sequentially, first the population PK model was developed, and the individual model predicted concentration vs time profiles were used to describe the neutrophil data. For the case of the non-continuous response variables analyzed (i.e., TEAEs), individual C_{MAX} , the maximum concentrations in plasma, and AUC, the area under the concentration vs time curve, were calculated from the individual PK parameters and incorporated together with the dose level into the dataset. The first-order conditional estimation method with the INTERACTION was used during the PK and neutrophil data analyses. The LAPLACIAN LIKELIHOOD estimation method was used for the analysis of the non-continuous data.

In the case of the continuous data, inter-patient and inter-occasion [7] variabilities (IPV and IOV, respectively) were modeled exponentially. Residual variability was in principle described by a combined error model; if one of the components of the residual error model was negligible, it was deleted from the model. For the non-continuous data, IPV was included in the logit (see below) in an additive form.

The minimum value of the objective function provided by NONMEM and approximately equal to $-2 \times \log(\text{likelihood})$ [–2LL] was used as a guide for model selection. A decrease of –2LL in 6.63 and 10.83 points for an additional model parameter between two nested models is considered significant at the 1 and 0.1 % levels, respectively. In addition, precision of the model parameters and goodness-of-fit (GOF) plots were also criteria for model selection. The model with the lowest –2LL value, precise parameter estimates, and proper performance assessed by the GOF plots was selected.

Pharmacokinetic modeling

Disposition of BN80927 in plasma was described by compartmental models. Nonlinear pharmacokinetics was explored in the distribution and elimination processes. Time dependencies in the pharmacokinetic characteristics of elomotecan were evaluated exploring the time after the start of the treatment as a covariate.

Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of toxicity

Absolute neutrophil counts (ANC) A previous published model [8] was applied to describe the ANC versus time data (the model appears schematically and mathematically described in supplementary material figure 1). The three system-related parameters estimated were ANC_0 , the ANC value at the start of the treatment, MTT, the mean transit time, and γ , the rebound parameter. Drug effects (E_{DRUG}) were incorporated in the model as $k_{pred} \times (1 - E_{DRUG})$, where k_{pred} represents the proliferation process in the stem cell described assuming a first-order process. For the case of a linear effect model, E_{DRUG} had the form of $SLP \times C$, where C is the predicted BN80927 concentration in plasma.

TEAEs It was decided to select for modeling purposes only those TEAEs with an incidence greater than 15 % for at least 3 out of the first four cycles of administration (cycles in which a number of patients ≥ 20 still remained in the study). Therefore, the selected TEAEs in order of prevalence were asthenia, nausea, vomiting, diarrhea, and fatigue (see supplementary material figure 2).

TEAEs were recorded as score taking integer values of 0–4 for absence, mild, moderate, severe and life-threatening adverse events, respectively, and treated during the analysis as ordered categorical variables. The relationship between adverse events and drug exposure (DE), AUC, dose, or C_{MAX} was established using the following general logistic regression model:

$$PY_{ij} = \frac{e^L}{1 + e^L}$$

where PY_{ij} is the probability of observing an adverse effect score $\geq m$ in the i th individual at the j th cycle of chemotherapy, and L is the logit. The response within a patient was modeled as a conditional probability $P(Y_{ij} = m/\eta_i)$, where η_i is the individual random effect. The set of individual η values is assumed to be symmetrically distributed around 0 with variance ω^2 . The probability of having an adverse effect score equal to m [$P(Y_{ij} = m/\eta_i)$] is as follows: $P(Y_{ij} \geq m/\eta_i) - P(Y_{ij} \geq (m + 1)/\eta_i)$.

The logit (L) combines the contribution of baseline, drug effects, and covariate contribution on P as $L = f_{baseline}$

$(m) + g(DE) + h(\text{covariates}) + \eta_i$, where $f_{baseline}(m)$ describes the distribution of baseline scores and has the form $\sum_{k=1}^m \beta_k$, where β_k ($k = 1, \dots, m$) are the parameters defining the baseline probabilities of having a score $\geq m$. Different pharmacodynamic models, linear, E_{MAX} , sigmoidal E_{MAX} , and exponential models were explored to select the best drug effect model [$g(DE)$]. Covariate contribution is represented by $h(\text{covariates})$.

Regarding drug exposure for cycles in which PK data were not available (cycles 3 and 4), mean value between exposure parameters (C_{MAX} or AUC) obtained in cycles 1 and 2 was used.

Model development

Base population models without including covariates were developed first. Then, the generalized additive modeling (GAM [9]), approach implemented in Xpose 4.0 [10], was used for initial covariate selection. The covariates found significant were then tested in NONMEM using the forward inclusion and backward deletions procedures. Genotype information, body weight, body surface area, creatinine clearance, and gender were always tested in NONMEM regardless of their significance during the GAM analysis. Continuous covariates were normalized by the corresponding mean value in the studied population. The inclusion of categorical covariates was formulated to obtain its own parameter estimate for each category. The impact of the clinical significance of the covariates was evaluated by computer simulation.

Model evaluation

For each variable analyzed, plasma drug concentration, ANC, and TEAEs, 200 bootstrap datasets were generated based on the selected population models using Perl-speaks-NONMEM [11], and the precision of parameter estimates was explored computing the 2.5th and 97.5th percentiles of the parameter distribution.

Model performance was evaluated by predictive checks. For the case of the PK model and the model for ANC, population-prediction-corrected visual predictive checks (PC-VPC [12]) represented over time were performed. A total of five hundred studies of the same design characteristics as the original one were simulated. The areas covering the 95 % confidence intervals of the median and the 2.5th and 97.5th percentiles of the prediction-corrected predicted plasma concentrations or ANC were plotted together with the 2.5th, 50th, and 97.5th of the raw data.

Visual predictive checks were performed to evaluate the selected models for TEAEs. Five hundred datasets were simulated; for each simulated dataset, the probability for

each score was computed for the following five AUC intervals containing approximately the same number of observations, $n = 29$ –30: ≤ 9.54 ; >9.54 to ≤ 56.8 ; >56.8 to ≤ 96 ; >96 to ≤ 142.4 ; and >142.4 ng \times day/mL. Then for each score and AUC interval, the area covering the 2.5th and 97.5th percentiles was plotted together with the observed probabilities calculated at the same intervals.

Additional model simulations

In order to compare between the toxicity effects of elomotecan, the percentage of grade 4 neutropenia and score = 3 (severe effects) of each TEAE analyzed were computed for 20, 40, 60, and 80 mg doses administered as 30-min intravenous infusion. Each dose level comprised a dataset of the same design characteristics (except dose) as the original dataset. Five hundred simulations were performed per dose level, and the 2.5th and 97.5th percentiles were calculated and plotted.

The significance of the selected covariates was studied, superimposing to the previous plot the results obtained from a subset of patients with covariate value outside the 75th percentile of the studied population.

Results

MTD and RD determination

Table 1 lists the dose-limiting toxicities (DLTs) reported during cycle 1. No DLT was experienced by any patient administered at doses below or equal to 40 mg of elomotecan.

Table 1 Number of dose-limiting toxicities during cycle 1 of treatment

DLT	≤ 10 mg ($n = 16$)	16 mg ($n = 3$)	25 mg ($n = 3$)	40 mg ($n = 3$)	61 mg ($n = 6$)	75 mg ($n = 7$)	65 mg ¹ ($n = 6$)	60 mg ² ($n = 12$)	All ($n = 56$)
A	0	0	0	0	0	0	1	0	1
B	0	0	0	0	1	0	1	0	2
C	0	0	0	0	0	1	1	0	2
D	0	0	0	0	0	2	0	0	2
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MTD reached	No	No	No	No	No	Yes (and exceeded)	Yes	No	–

¹ Maximum tolerated dose; ² Recommended dose

A Grade 4 neutropenia lasting more than 7 days

B Febrile neutropenia with grade 3 or 4 neutropenia and no documented infection

C Grade 4 thrombocytopenia or grade 3 thrombocytopenia with hemorrhage

D Infection (clinically documented with grade 3 or 4 neutropenia)

E Any non-hematological event $>$ grade 2 toxicity, except alopecia or nausea and vomiting without appropriate treatment

F Cycle delay $>$ 3 weeks due to toxicity in cycle 1

In the initial cohort of three patients administered with 61 mg, one patient experienced the DLT of febrile neutropenia. Accordingly, three additional patients were included to further investigate the toxicity at this dose. None of those additional patients experienced a DLT, and a dose escalation to 75 mg was approved.

In the initial cohort of three patients administered with 75 mg, one patient experienced the DLT of infection with grade 3 neutropenia during cycle 1. Three additional patients were included to further investigate the toxicity at this dose, and none of them reported DLT in cycle 1 but one patient experienced serious toxicities during cycle 2. The cohort size was increased to nine patients. A new subject experienced two separate DLTs.

Before setting the RD, an intermediate dose between 61 and 75 mg was investigated. Two out of six patients who received 65 mg experienced DLTs of grade 4 neutropenia, and the MTD and RD were set at 65 and 60 mg, respectively. The RD was not the next lower dose administered during the study, which was 61 mg, but it was decided that 60 mg would be more practical dose in any future studies.

Tumor response

No patient in any dose cohort had a best overall response of CR and PR at any time during the study. Overall, 33.9 % of the patients ($n = 19$) displayed stable disease during the trial. The mean duration of stable disease for all patients was 92.9 ± 40.9 days. The highest mean stable disease duration and the highest stable disease duration in an individual patient were both found within the RD cohort, where 41.7 % of the subjects had mean stable disease duration of 123.6 ± 43.4 days, ranging from 86 to

192 days. Due to the facts that (1) in the current study a number of patients received a dose lower than RD, (2) all of them were in an advance status of the disease, and (3) the patient population was heterogeneous with respect to the type of tumor, no efforts were undertaken to establish a relationship between tumor shrinkage and drug exposure.

Genotype analysis

Genotype analysis was performed with respect to ethnicity of the patients but no statistical evaluation was performed for the genotyping of the two black patients due to low sample number. Phenotypes could be predicted for CYP2C19, CYP2D6, CYP3A5, and UGT1A1. According to their genotype, patients were classified as either poor, intermediate, extensive, or ultrarapid metabolizers. For the rest of the following genes, CYP3A4, ABCB1 (MDR1), ABCC2 (MRP2), ABCC3 (MRP3), ABCG2 (BRCP), SLCO1B1 (OATPC), and SLC22A1 (OCT1), phenotype was not reported since the expected genetic polymorphisms were not found in the current studied population. Summary of the genotype analysis is presented in supplementary material (Table 1).

Pharmacokinetic modeling

A total of 1,439 plasma concentration values of elomotecan were used to develop the PK model.

The three-compartmental model with first-order elimination was significantly better than the two- and one-compartmental models ($p < 0.001$). Models incorporating concentration- or time-dependent elimination and/or distribution did not improve the fit significantly ($p > 0.05$). Data supported the inclusion of (1) IPV terms on CL, V_c (apparent volume of distribution of the central compartment), CL_{D1} , inter-compartmental clearance between the central and shallow peripheral compartments, V_{P1} , apparent volume of distribution of the shallow peripheral compartment, and V_{P2} , apparent volume of distribution of the deep peripheral compartment ($p < 0.001$), (2) IOV for CL ($p < 0.001$), and (3) covariance between CL_{D1} and V_{P1} , ($p < 0.001$). Incorporating IPV in the residual error did not significantly improve the fit ($p > 0.05$). Time effects on the pharmacokinetic parameters resulted non-significant ($p > 0.05$). Consequently, the presence of IOV on CL in the studied population was not associated with induction/inhibition of the metabolizing enzymes, due to the change of the patient factors (such as performance status) that may affect the drug clearance during the treatment.

Age on CL and body weight (WGT) on V_{P2} were the only two covariates that were found significant during the covariate selection process ($p < 0.05$). Age and WGT accounted for 13 and 29 % of IPV in CL and V_{P2} ,

respectively. Gender, body surface area, liver metastasis and prior treatment, biochemical parameters related to renal and hepatic function, and genetic polymorphism in the explored enzyme systems did not elicit significant effects on any of the PK parameters ($p > 0.05$). Once the population pharmacokinetic model was selected, the covariate effect of body surface area on CL was further evaluated resulting non-significant ($p > 0.05$).

Population pharmacokinetic model parameter estimates are listed in Table 2, and Fig. 1a shows the population-prediction-corrected VPC, where it can be observed that the model provides a good description of the data. For clarity, the plots shows only the first 6 h after dosing, but the model performed equally well at later times (not shown). Table 2 lists also the results from the nonparametric bootstrap analysis. The median of the estimates is very similar to the population estimates.

Table 2 Population pharmacokinetic estimates of elomotecan

Parameter	NONMEM estimate	Bootstrap analysis mean [2.5th–97.5th percentiles]
$CL = \theta_{CL} \times (\text{age}/59)^{\theta_{age}}$		
θ_{CL} (L \times day ⁻¹)	522 (5)	521 [477–569]
θ_{age} (years ⁻¹)	-0.976 (24)	-0.971 [-0.524 to -1.45]
V_c (L)	18.4 (8)	18.61 [15.7–21.0]
CL_{D1} (L \times day ⁻¹)	1,670 (8)	1,682 [1,470–1,900]
V_{P1} (L)	65.8 (10)	67.4 [55.2–86.0]
CL_{D2} (L \times day ⁻¹)	315 (14)	309.6 [214–395]
$V_{P2} = \theta_{VP2} \times (\text{WGT}/69.9)^{\theta_{WGT}}$		
θ_{VP2} (L)	122 (7)	121.2 [101–140]
θ_{WGT} (kg ⁻¹)	1.34 (16)	1.32 [0.92–1.75]
IPV _{CL} (%)	33 (18)	32 [25–39]
IPV _{Vc} (%)	32 (95)	34 [10–53]
IPV _{CLD1} (%)	57 (38)	55 [44–72]
IPV _{VP1} (%)	58 (24)	57 [44–72]
IPV _{VP2} (%)	32 (28)	31 [24–39]
Covariance ($\omega_{CLD1}^2, \omega_{VP1}^2$)	0.27 (30)*	0.26 [0.01–0.43]
IOV _{CL} (%)	16 (34)	16 [14–21]
Residual error [log(ng/mL)]	0.0984 (32)	0.0897 [0.022–0.152]
Residual error (%)	24.9 (4)	24.9 [23.4–26.6]

NONMEM estimates are shown with the coefficient of variation in parentheses. IPV, IOV, inter-patient and inter-occasion variabilities, respectively, expressed as coefficient of variation. CL, total plasma clearance; V_c , V_{P1} , V_{P2} , apparent volume of distribution of the central, shallow peripheral, and deep peripheral compartments, respectively; CL_{D1} , and CL_{D2} , inter-compartmental clearance between central and shallow, and between central and deep peripheral compartments, respectively; ω_{CLD1}^2 , ω_{VP1}^2 , variance terms corresponding to CL_{D1} and V_{P1} , respectively; * value corresponding to a correlation coefficient of 0.83

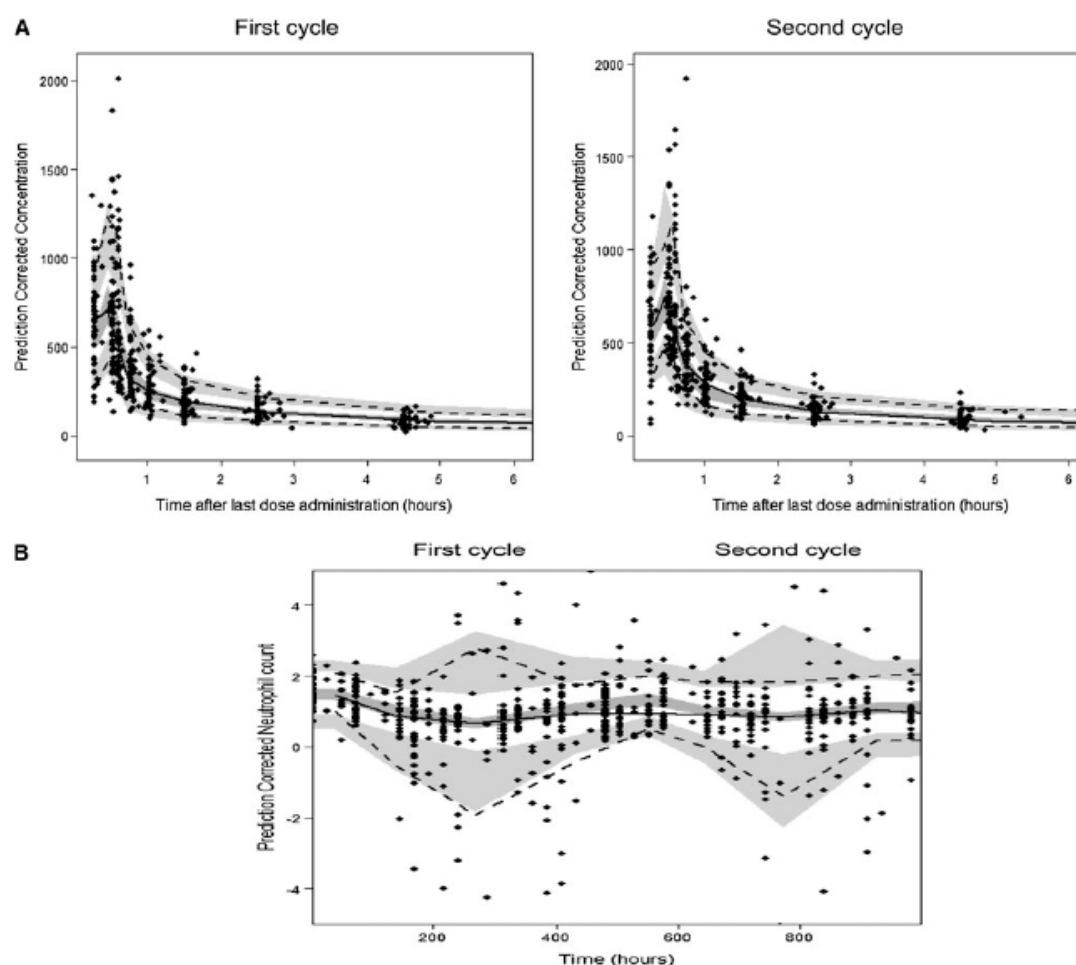


Fig. 1 Results from the prediction-corrected visual predictive check corresponding to the population pharmacokinetic model (a) and to the population model developed for the absolute neutrophil counts (b). The observations (dots), median (solid lines) and 2.5th and 97.5th

percentiles (dashed lines) of the observations, and the 95 % CI of the median (dark gray areas) and of the 2.5th and 97.5th percentiles (light gray areas) of the simulations are shown

The typical value of CL corresponding to the minimum, mean, and maximum values of age in the studied population (31, 59.1, and 81 years) was 40.8, 21.8, and 16.0 L/h, respectively. The model predicts a 47 and 61 % reduction in CL for patients aged 60 and 80 years, respectively, when compared with younger patients (31 years). The volume of distribution at steady state corresponding to the minimum, mean, and maximum values of WGT (38, 69.9, and 110 kg) was 151.7, 237.0, and 364.7 L, respectively.

Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling of ANC

Half of the total observed ($n = 1,021$) ANC were recorded during the first two cycles of treatment.

IPV was found significant for ANC_0 , MTT, and SLP ($p < 0.001$), but not on γ , the rebound parameter ($p > 0.05$). No significant covariance was found between the off-diagonal elements of the Ω variance-covariance matrix ($p > 0.05$). The E_{MAX} , sigmoidal E_{MAX} , and

exponential models did not improve the fit with respect to the linear drug effect model ($p > 0.05$). Same result was obtained when an effect compartment [13] was incorporated to the structure of the Friberg's model [14]. An additive residual error model was sufficient to describe the observations. None of the tested covariates showed significant effects on any of the parameters of the model ($p < 0.001$).

Table 3 lists the population parameter estimates together with the results from the nonparametric bootstrap. The median of the estimates is very similar to the population estimates. Figure 1b shows the population-prediction-corrected VPC, where it can be observed that the model provides a good description of the data.

The neutrophil time courses induced by BN80927 in a typical individual following an intravenous infusion of 1.5, 10, 40, 60 and 75 mg during 30 min are shown in supplementary material figure 3.

Modeling the treatment-emergent adverse effects (TEAEs)

A total of 146 scores of asthenia, nausea, vomiting, diarrhea, and fatigue were recorded. Severe adverse effects (score = 3) were reported by five patients for the case of asthenia. For the case of nausea, vomiting, diarrhea, and fatigue, two patients presented a severe effects and only one patient reported a fatigue grade 4 event.

Diarrhea and fatigue events did not show significant relationship with AUC, C_{MAX} , or dose ($p > 0.05$).

The linear model between asthenia and AUC resulted in a significant decrease in $-2LL$ compared with asthenia model without drug effect added in ($p < 0.001$). No significant improvements were observed when the linear model between asthenia score and AUC was replaced by the E_{max} , sigmoidal E_{max} , or power model ($p > 0.05$). The $-2LL$ was increased when AUC was substituted by C_{MAX} or dose.

For the case of nausea, the power model between nausea and AUC resulted significantly better than the linear, E_{max} , and sigmoid E_{max} models ($p < 0.001$). The $-2LL$ was increased when AUC was substituted by C_{MAX} or dose.

The use of AUC and C_{MAX} did not improve the description of vomiting with respect to dose level. A linear model between vomiting and dose was selected.

Any of the tested covariates including cycle number show statistically significant effects for asthenia, nausea, and vomiting ($p > 0.05$).

Table 3 lists the parameter estimates corresponding to the models selected to describe the adverse effect of elomotecan. Coefficients of variations corresponding to the random effects are greater than 50 %; however, the results from the nonparametric bootstrap analysis did not include

Table 3 Population estimates corresponding to the neutropenic and treatment-emergent adverse effects of elomotecan

Parameter	NONMEM estimate	Bootstrap analysis mean [2.5th–97.5th percentiles]
<i>Neutropenia</i>		
ANC ₀ (cells × 10 ⁹ /L)	4.3 (7)	4.34 [3.84–4.97]
MTT (h)	145 (6)	145 [129–171]
γ	0.176 (9)	0.176 [0.153–0.226]
SLP (mL/ng)	1.92×10^{-2} (11)	1.96×10^{-2} [1.6×10^{-2} – 2.5×10^{-2}]
IPV _{IB} (%)	41 (23)	40.6 [30.1–49.3]
IPV _{MTT} (%)	24 (28)	24.1 [16.4–30.2]
IPV _{SLP} (%)	39 (34)	39.5 [23.9–53.7]
Residual error [log(ANC)]	0.5 (14)	0.49 [0.37–0.65]
<i>Asthenia</i>		
θ_1^*	−0.98 (43)	−1.048 [−0.363 to −2.04]
θ_2^*	−1.35 (19)	−1.415 [−1.34 to −1.92]
θ_3^*	−2.15 (24)	−2.37 [−2.0 to −3.5]
SLP [mL/(ng × day)]	8.21×10^{-3} (42)	8.89×10^{-3} [2.7×10^{-3} – 1.6×10^{-2}]
ω^2	0.92 (87)	1.03 [0.067–3.22]
<i>Nausea</i>		
θ_1^*	−2.99 (25)	−2.04 [−0.77 to −4.26]
θ_2^*	−2.98 (19)	−3.11 [−2.11 to −4.48]
θ_3^*	−2.35 (39)	−2.48 [−1.5 to −5.1]
γ	2.24×10^{-1} (28)	8.1×10^{-2} [9.9×10^{-3} –0.3]
ω^2	1.67 (62)	3.79 [0.8–10.1]
<i>Vomiting</i>		
θ_1^*	−3.1 (30)	−3.25 [−1.65 to −5.6]
θ_2^*	−2.04 (24)	−2.11 [−1.26 to −3.41]
θ_3^*	−2.72 (35)	−5.78 [−2 to −22]
SLP (mg ^{−1})	3.43×10^{-2} (43)	3.52×10^{-2} [8.1×10^{-3} – 6.8×10^{-2}]
ω^2	1.92 (61)	4.45 [0.5–14]

NONMEM estimates are shown with the coefficient of variation in parentheses. IPV, inter-patient variability expressed as coefficient of variation. ANC₀, absolute neutrophil count value at the start of the treatment; MTT, mean transit time; γ , rebound parameter (neutropenia) or parameter accounting of the exponential effects of AUC on the logit (nausea); SLP, parameter representing the linear effect of (1) drug concentration on the first-order rate constant of proliferation (neutropenia), (2) AUC (asthenia), or (3) dose (vomiting) on the logit.

* Parameters defining the baseline probabilities of having a score $\geq m$, $\beta_{1,3}$ are computed as θ_1 , $\theta_1 + \theta_2$, and $\theta_1 + \theta_2 + \theta_3$, respectively; ω^2 , variance reflecting inter-patient variability in the logit. The typical expressions for the selected drug effect models [g(DE)] are SLP × AUC (asthenia), AUC ^{γ} (nausea), and Slope × Dose (vomiting)

the value zero in the 95th confidence intervals for any of the parameters. Figure 2 represents the visual predictive checks for each score and adverse effects. The observed

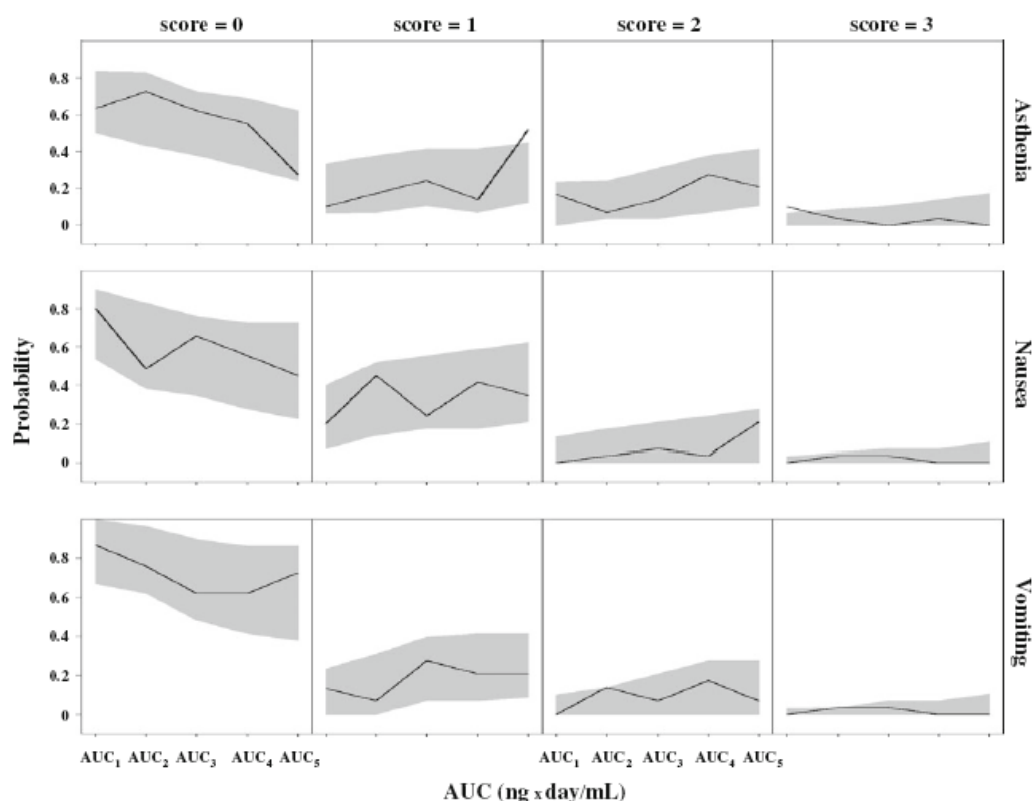


Fig. 2 Visual predictive checks for the population models developed for the treatment-emergent adverse effects. *Solid lines* observed probabilities; *gray areas* 95 % confidence intervals of the

simulations; AUC_{1-5} , ≤ 9.54 , >9.54 to ≤ 56.8 , >56.8 to ≤ 96 , >96 to ≤ 142.4 , and >142.4 $ng \times day/mL$, respectively

probability profiles as a function of AUC are very well described by the selected models-based simulations.

The models developed in the current analysis predict at the recommended dose of 60 mg ($AUC \sim 147$ $ng \times day/mL$) probabilities for scores from 0 to 4 of (1) 0.46, 0.27, 0.22, 0.05, and 0 (asthenia), (2) 0.50, 0.40, 0.09, 0.02, and 0 (nausea), and (3) 0.66, 0.23, 0.10, 0.02, and 0 (vomiting), respectively.

Discussion

The current work represents the first report of the first-in-man results of elomotecan. Elomotecan disposition was best described with a three-open-compartment model. Data did not show evidence of concentration- and time-dependent pharmacokinetics at the dose range studied. Pharmacokinetic properties of elomotecan appeared similar to the

ones of other camptothecin analogs. The typical estimate of CL of 21.75 $L \times h^{-1}$ was similar to the values reported for diflomotecan (21.6 $L \times h^{-1}$ [15]), topotecan (18.57 $L \times h^{-1}$ [16]), and irinotecan (30.08 $L \times h^{-1}$ [17]). For lurtotecan, the estimated value was four times higher (87 $L \times h^{-1}$, [18]). With respect to the apparent volume of distribution at steady state (V_{SS}), the estimated value for elomotecan is equal to 206.2 L and this is greater than the values corresponding to those of other members of the same chemical class: irinotecan 140.5 L, lurtotecan 111 L, diflomotecan 83.8 L (females) and 103.1 L (males), and topotecan 65 L. The fact that elomotecan binds to plasma proteins to a less extent than other analogs (90 vs. 99 % for the case of diflomotecan) may explain the higher value obtained for its V_{SS} . The most recent camptothecin analog in clinical development is delimotecan [19, 20], a pro-drug with median values of CL and apparent volume of distribution of 21 mL/h and 3.3 L, respectively [19].

Pharmacokinetic variability represents an important element to characterize in the early stages of drug development. The magnitude of inter-patient variability in CL (32 %) was also similar to those of other camptothecins with the exception of diflomotecan (52 %, [15]). The rest of pharmacokinetic parameters were associated with variability ranging from 32 to 58 %, as in the case of the other compounds of the family. Inter-occasion variability estimated on CL for topotecan was 22 % [16]. In the current analysis, IOV on CL for elomotecan was even lower (16 %).

Body weight and patient age were the two demographic characteristics that showed statistical covariate effects in V_{p2} and CL, respectively. Body weight was also identified as covariate in all the pharmacokinetic parameters of topotecan [16]. In the same analysis, the authors identified ECOG status, creatinine clearance, and body weight as additional covariates for CL. In the case of diflomotecan, gender was identified as a covariate for apparent volume of distribution in the central compartment [15], and the ABCG2 421C > A genotype was found as an important factor for AUC and bioavailability [21]. In the current analysis, the covariate effects of ECOG, CRCL, gender, as well as CYP2C19, CYP2D6, CYP3A5, and UGT1A1 phenotypes, were also studied without any significant improvement in the description of the data.

The population estimates of the parameters describing the physiological processes related to the neutrophils' fate were consistent with those published previously in the literature [8]. The estimate of the drug effect parameter corrected by the unbound fraction and the molecular weight, $11.13 \mu\text{M}^{-1}$, was lower than the one reported for diflomotecan, $637.4 \mu\text{M}^{-1}$ [15], and greater than the one reported for irinotecan, $3.48 \mu\text{M}^{-1}$ [8]. Variability in the slope parameter was similar between elomotecan and irinotecan (43 %) and smaller than diflomotecan (61 %).

In the current approach, the neutropenic response resulted (very) delayed with respect to the time course of plasma concentrations of elomotecan. In fact, it is not possible to relate directly drug levels in plasma with, for example, nadir, since at the time of nadir (approximately 11 days after drug administration), the levels of elomotecan in plasma are virtually zero. In this sense, one might think that AUC represents a better predictor of neutropenia than the drug levels in plasma. However, using the AUC (instead of the pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) model represented in figure 1 of supplementary material), it does not allow to describe the entire time course of the neutropenic effects. It does not allow to simulate the outcome from different dosing scenarios, or to calculate the time at which, for example, 90 % of the treated patients recover the 80 % of their baseline neutrophil counts to start the next cycle. The relationships

between nadir and AUC or dose level were also explored in the current evaluation. Using the dose level administered as predictor variable resulted in a worse fit in comparison with AUC, reflected as an increase in $-2LL$ of 40 points. That was an expected result since AUC, and not the dose, includes variability in pharmacokinetics resulting in a better description of the data. Results also showed that nadirs corresponding to grades 1, 2, 3, and 4 neutropenia were typically achieved at AUC values of 33, 45, 75, and $162 \text{ ng} \times \text{day/mL}$, respectively.

Of the five adverse events analyzed, three (asthenia, nausea, and vomiting) were correlated with drug exposure and the remaining two (diarrhea and fatigue) were found unrelated to drug exposure. AUC was found to be the best predictor of asthenia and nausea effects, and dose for the case of vomiting. Our results indicate a different result than the one previously reported for irinotecan [17] where the authors showed a correlation between diarrhea scores and the AUC of the parent compound and the SN-38G metabolite.

A simulation exercise was undertaken to explore which of the adverse effects were underlying the dose-limiting toxicity. Those simulations were performed using the selected models together with the corresponding model parameters estimates. The main benefit of the simulations is that variability in pharmacokinetics and in pharmacodynamics is taken into account and gives the possibility to explore a range in the percentage of the adverse effects. In addition, in Phase I studies in oncology, the number of patients in each dose group is in general small, and that number is not the same across dose groups. PK/PD simulations allow us to get a better picture of the expected adverse effects at any given dose level including the recommended dose. Results included in Fig. 3 clearly showed that neutropenic effects are the dose-limiting adverse effects for elomotecan. At the recommended dose of 60 mg, percentages of grade 4 (severe) neutropenia, asthenia, nausea, and vomiting were 20, 5, 2, and 2 %, respectively.

At this stage of development, it is difficult to establish a tumor response vs exposure relationship for any kind of oncology drug due to the heterogeneity of tumor types, small number of patients receiving active dose levels, and usually low objective response rates in the initial Phase I clinical trials with cytotoxic agents in heavily pretreated patients. Nevertheless, the results obtained in the current Phase I trial are promising, since already 41.7 % of the subjects had mean stable disease duration of 123.6 ± 43.4 days at the recommended dose with manageable toxicity.

Despite the fact that patients who received a prior therapy with platinum-based compounds had greater probability of experiencing severe neutropenia during

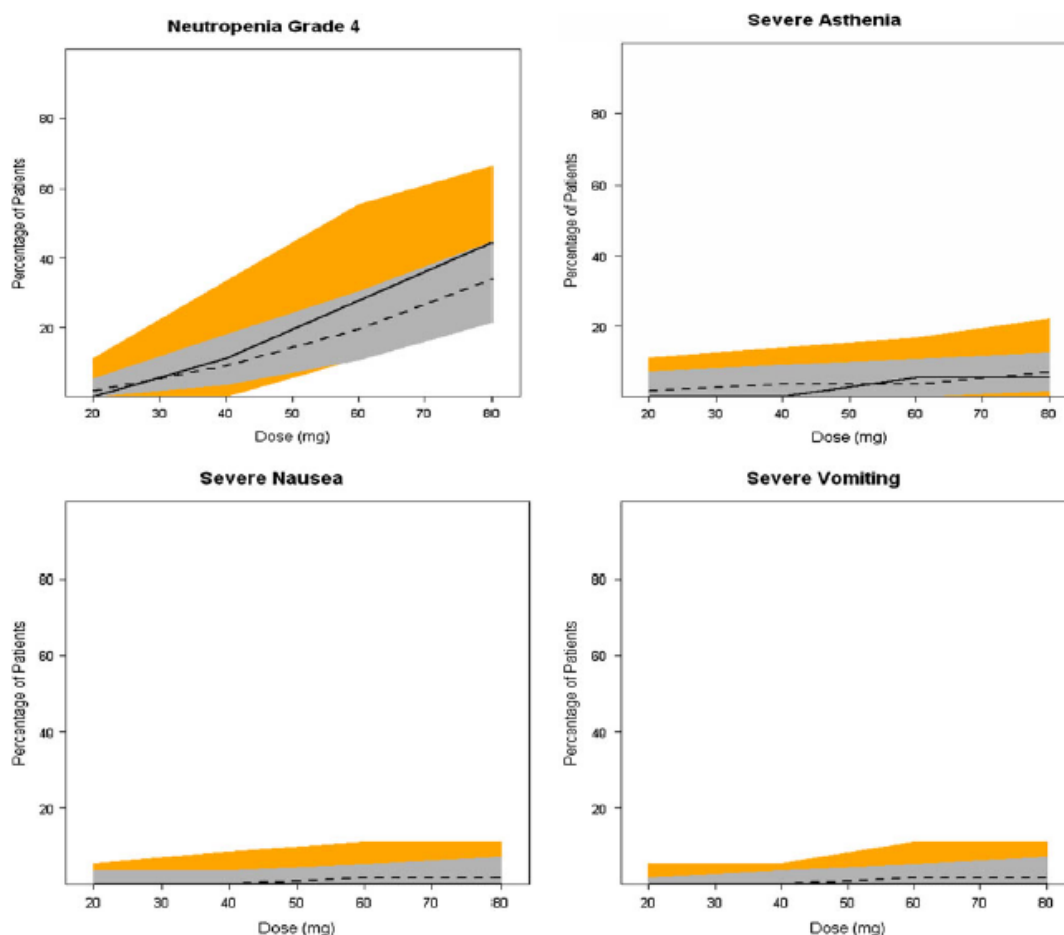


Fig. 3 Simulated percentage of severe neutropenia, asthenia, nausea, and vomiting obtained after 500 simulated datasets. *Lines* median profiles, *Solid* studied population, *dashed* patients over 65 years of

age. *Areas* cover the 95 % confidence intervals: *gray* studied population and *orange* patients over 65 years of age

chemotherapy with topotecan [16], none of the tested covariates (including platinum-based treatment) yielded significant effects during the analysis of the response data.

Figure 3 shows also the difference in response of the subset of patients over 65 years of age. In the case of neutropenia, in patients over 65 years of age, the 20 % neutropenia grade 4 is achieved at the dose of 50 mg, instead at 60 mg when the whole population of the study is included. In supplementary material Figure 4, the impact of weight and age on the overall time course of neutropenia following elomotecan administration at the recommended dose was evaluated. It can be observed that while effect of body weight was negligible (an expected result since body weight did not elicit any covariate effect on CL and

therefore the area under the curve was not affected), the age effect is associated with an increase in toxicity due to the decrease in drug clearance. In this case, drug clearance was twofold higher in a 38-year-old patient ($CL = 33.5 \text{ L} \times \text{h}^{-1}$) than in a 76-year-old one ($CL = 17 \text{ L} \times \text{h}^{-1}$).

To summarize the results from the study reported in this work, elomotecan showed linear pharmacokinetic properties in the dose range from 1.5 to 75 mg when administered as 30-min intravenous infusion in two cycles 3 weeks apart. Gender, patient status, and CYP2C19, CYP2D6, CYP3A5, and UGT1A1 genetic polymorphisms did not alter the pharmacokinetic of elomotecan. Total clearance was decreased with age, and apparent volume of

distribution was increased with body weight. The effect of body surface area on the total plasma clearance of elomotecan resulted negligible. Inter-patient variability was similar to that of other camptothecin analogs and lower than that of diflomotecan. Neutropenia represented the dose-limiting toxicity. Elomotecan elicited low probability of severe neutropenia at the recommended dose of 60 mg. Aging is associated with an increase in toxicity due to the decrease in drug clearance, a covariate effect that requires prospective evaluation.

Given the pharmacokinetic and toxicity patterns described quantitatively in the current investigation and its pharmacodynamic profile, elomotecan seems to be a promising anticancer drug to investigate in further clinical trials.

Acknowledgments The authors would like to thank Veronique Fohanno and Josep Solà from Ipsen Group for managing the clinical study and the pharmacogenetic analysis respectively and to Epidaurus Biotechnologie AG for the genotyping execution.

Conflict of interest Elena Soto and Iñaki F. Trocóniz have received financial research support from Ipsen Pharma S. A. Josep-Maria Cendrós, Ana Perez-Mayoral, Joan Pruñonosa, Concepción Peraire, Rosendo Obach, Paola Principe, and Patrick Delavault are employees of Ipsen Pharma S. A. Frédérique Cvitkovic and Thierry Lesimple were principal investigators for the clinical study.

References

- Bailly C (2003) Homocamptothecins: potent topoisomerase I inhibitors and promising anticancer drugs. *Crit Rev Oncol Hematol* 45:91–108
- Demarquay D, Coulomb H, Huchet M et al (2000) The homocamptothecin, BN 80927, is a potent topoisomerase I poison and topoisomerase II catalytic inhibitor. *Ann N Y Acad Sci* 922:301–302
- Huchet M, Demarquay D, Coulomb H et al (2000) The dual topoisomerase inhibitor, BN 80927, is highly potent against cell proliferation and tumor growth. *Ann N Y Acad Sci* 922:303–305
- Demarquay D, Huchet M, Coulomb H et al (2004) BN80927: a novel homocamptothecin that inhibits proliferation of human tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 64:4942–4949
- Lesimple T (2010) Phase I dose-finding study of BN80927 as an intravenous infusion every 21 days in patients with advanced malignant solid tumors. *J Clinical Oncology* 28(suppl):3072
- Beal SL, Sheiner LB, Boeckmann A (eds) (2006) (1989–2006) NONMEM User's Guides. Icon Development Solutions, Ellicott City
- Karlsson MO, Sheiner LB (1993) The importance of modeling interoccasion variability in population pharmacokinetic analyses. *J Pharmacokinetic Biopharm* 21:735–750
- Friberg LE, Henningson A, Maas H et al (2002) Model of chemotherapy-induced myelosuppression with parameter consistency across drugs. *J Clin Oncol* 20:4713–4721
- Mandema JW, Verotta D, Sheiner LB (1992) Building population pharmacokinetic-pharmacodynamic models. I. Models for covariate effects. *J Pharmacokinetic Biopharm* 20:511–528
- Jonsson EN, Karlsson MO (1999) Xpose-an S-PLUS based population pharmacokinetic/pharmacodynamic model building aid for NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed* 58:51–64
- Lindbom L, Ribbing J, Jonsson EN (2004) Perl-speaks-NONMEM (PsN)—a Perl module for NONMEM related programming. *Comput Methods Programs Biomed* 75:85–94
- Bergstrand M, Hooker AC, Wallin J, Karlsson MO (2011) Prediction-corrected visual predictive checks for diagnosing nonlinear mixed-effects models. *AAPS J* 13:143–151
- Sheiner LB, Stanski DR, Vozeh S et al (1979) Simultaneous modeling of pharmacokinetics and pharmacodynamics: application to d-tubocurarine. *Clin Pharmacol Ther* 25:358–371
- Hing J, Perez-Ruixo JJ, Stuyckens K et al (2007) Mechanism-based pharmacokinetic/pharmacodynamic meta-analysis of trabectedin (ET-743, Yondelis®) induced neutropenia. *Clin Pharmacol Ther* 83:130–143
- Trocóniz IF, Garrido MJ, Segura C et al (2006) Phase I dose-finding study and a pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of the neutropenic response of intravenous diflomotecan in patients with advanced malignant tumours. *Cancer Chemother Pharmacol* 57:727–735
- Mould DR, Holford NH, Schellens JH et al (2002) Population pharmacokinetic and adverse event analysis of topotecan in patients with solid tumors. *Clin Pharmacol Ther* 71:334–348
- Xie R, Mathijssen RH, Sparreboom A et al (2002) Clinical pharmacokinetics of irinotecan and its metabolites in relation with diarrhea. *Clin Pharmacol Ther* 72:265–275
- Schellens JH, Heinrich B, Lehnert M et al (2002) Population pharmacokinetic and dynamic analysis of the topoisomerase I inhibitor lurtotecan in phase II studies. *Invest New Drugs* 20:83–93
- Veltkamp SA, Witteveen EO, Capriati A et al (2008) Clinical and pharmacologic study of the novel prodrug delimotecan (MEN 4901/T-0128) in patients with solid tumors. *Clin Cancer Res* 14:7535–7544
- Bigioni M, Parlani M, Bressan A et al (2009) Antitumor activity of delimotecan against metastatic melanoma: pharmacokinetics and molecular determinants. *Int J Cancer* 125:2456–2464
- Sparreboom A, Gelderblom H, Marsh S et al (2004) Diflomotecan pharmacokinetics in relation to ABCG2 421C > A genotype. *Clin Pharmacol Ther* 76:38–44