



Estudio farmacocinético preclínico de un inhibidor de la sulfatasa esteroïdal

Sílvia Elisabet Blanch López

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica

**ESTUDIO FARMACOCINÉTICO
PRECLÍNICO DE UN INHIBIDOR DE LA
SULFATASA ESTEROIDAL**

Sílvia Elisabet Blanch López, 2012

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica

Unitat de Biofarmàcia i Farmacocinètica

Programa de doctorado Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Bienio 2004/2006

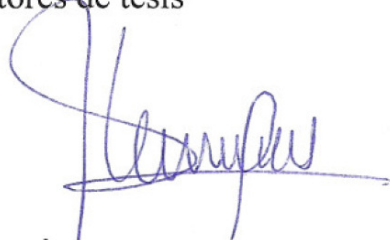
**ESTUDIO FARMACOCINÉTICO PRECLÍNICO DE
UN INHIBIDOR DE LA SULFATASA ESTEROIDAL**

Memoria presentada por **Sílvia Elisabet Blanch López** para optar al título
de doctor por la Universitat de Barcelona

Los directores de tesis



Concepció Peraire Guitart



Àngel Menargues Baños

La doctoranda



Sílvia E. Blanch López

Sílvia Elisabet Blanch López, 2012

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a los directores de la tesis, los doctores Concepció Peraire y Àngel Menargues, por saber transmitirme su experiencia científica, por su eficiente dirección y por su valiosa dedicación durante estos años.

A Concepció, porque sus conocimientos y experiencia han sido a la vez estímulo y guía para profundizar en la farmacocinética de irosustat. Sus aportaciones han sido fundamentales para conducir a buen puerto el presente trabajo.

A Àngel, por contagiarme su curiosidad científica y meticulosidad. Porque su ilusión por investigar y su talento han sido decisivos para ayudarme en el diseño de los experimentos *in vivo* y la posterior interpretación de los resultados. Su dedicación a este trabajo ha sido extraordinaria.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Josep Maria Cendrós, por su inestimable colaboración y guía en la realización de los cálculos de farmacocinética poblacional. Él fue mi mentor en las trincheras del análisis poblacional y me transmitió la confianza necesaria para seguir adelante con este trabajo.

Al Dr. Rossend Obach, por la confianza depositada en este trabajo y por sus sabios consejos cinéticos. Él me brindó la oportunidad de realizar esta tesis y me transmitió un gran entusiasmo por la investigación.

Ha sido muy enriquecedor poder contar con la ayuda experta del Dr. Iñaki Troconiz para la construcción del modelo poblacional. Gracias por ayudarme a encontrar el camino correcto cuando más lo necesitaba.

A los compañeros del estabulario por su estimada colaboración en la fase experimental *in vivo*. Mi especial consideración a Marta Casadas por su espíritu colaborador y por ayudarme a encontrar soluciones inteligentes y sencillas para los problemas experimentales, a Vicens Rioja por su carácter alegre y dinamismo en el laboratorio, y a Xavi Ferrer por su orientación experta en temas de bienestar animal. Un fuerte abrazo a Yolanda, Agustín, Fernando y Àngel, por su desinteresada ayuda en todo momento. Ha sido un verdadero lujo aprender a vuestro lado.

A Anna Pérez, por su colaboración y participación decisiva en el análisis de las muestras de plasma y sangre. En este sentido, también me gustaría agradecer el esfuerzo de Sonia, Marta, Ismael y Carles.

A Ester, Neus y Cristina por su soporte en tareas administrativas. Desearía remarcar que vuestra labor facilitó mucho mi trabajo, y me alegro de haber compartido una época de mi vida con todas vosotras.

Al Dr. Josep Solà, a Mari Carmen y a Verònica, porque sus aportaciones entorno al metabolismo de irosustat han sido de gran ayuda para interpretar la farmacocinética de este compuesto.

Al Dr. Ignacio Diez y a Montse Gallego, por poder contar con ellos para resolver dudas de índole galénico.

Mi agradecimiento a Ipsen Pharma, que sin sus medios materiales y humanos no hubiera sido posible culminar esta laboriosa investigación. A Xavi, Irene y Salomé por las experiencias que hemos compartido juntos y al resto de compañeros de Ipsen Pharma, porque siempre supieron ayudarme y aconsejarme de la mejor manera.

A mis amigos, por su soporte emocional. No me han faltado las palabras de ánimo de todos ellos, pero desearía destacar el apoyo de Judit, Laura y Natalia, que siempre han estado a mi lado cuando las he necesitado.

Y he dejado para el final el agradecimiento a quiénes más quiero, a mi familia.

A mis padres, Laureà y Dolors, per demostrarme su amor incondicional, por ser un ejemplo de trabajadores incansables y por transmitirme su ilusión por ver culminado este trabajo. Gracias a mi hermano, David, y a mis abuelas, por su cariño. Y el agradecimiento a mi madrina, Conxita, porque siempre ha apoyado mi labor investigadora.

A mis suegros, Xavier y Rosa, por toda su ayuda y soporte logístico. Siempre he podido contar con ellos cuando he necesitado su colaboración.

A mi marido, Xavi, por su amor, comprensión y apoyo constantes. Él ha sido primordial en darme el empuje necesario en los momentos más bajos y no dejarme rendir ante la dificultad. Mil gracias por darme tan buenos consejos, y por brindarme la fuerza e ilusión necesarias para llegar al final de este viaje.

A mi hijo, Xavier, por su alegría y cariño. Porque su sonrisa, es el mayor estímulo para mí. Con este trabajo deseo transmitirle la importancia que tienen el esfuerzo y la perseverancia cuando se persigue un sueño, que espero le sea de utilidad en sus retos futuros.

A todos y todas, gracias de corazón.

A mi marido, Xavi
A mi hijo, Xavier
A mis padres, Laureà y Dolors

ABREVIATURAS

ADME	Absorción, distribución, metabolismo y excreción
ANOVA	Análisis de la varianza
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_{IDP 17619/irosustat}	Cociente indicativo de la exposición de IDP 17619 con respecto a la exposición de irosustat
AUC_{Plasma/Sangre}	Cociente indicativo de la exposición de irosustat en plasma con respecto a la exposición en sangre
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
B_{max}	Capacidad máxima de unión
BDDCS	Sistema de clasificación biofarmacéutica de disposición de fármacos
BCS	Sistema de clasificación biofarmacéutica
BKG	Ruido de fondo (<i>background</i>)
BQL	Concentración por debajo del límite de cuantificación
C₀	Concentración estimada a tiempo cero
C₀/D	Concentración estimada a tiempo cero normalizada por la dosis
CA	Anhidrasa carbónica
C_{avg}	Concentración media en estado de equilibrio estacionario
C_E	Concentración en eritrocitos
CL	Aclaramiento
CL_d (Q, Q3 y Q4)	Aclaramiento de distribución
C_{max}	Concentración máxima
C_{max}/D	Concentración máxima normalizada por la dosis
C_{max}/AUC	Cociente indicativo de la velocidad de absorción
C_p	Concentración en plasma
C_s	Concentración en sangre
CV%	Coefficiente de variación

D	Dosis
DE	Desviación estándar
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHEAS	Dehidroepiandrosterona sulfato
DMA	Dimetilacetamida
E1	Estrona
E1S	Estrona sulfato
E2	Estradiol
ER	Receptor de estrógeno
F	Biodisponibilidad
F_{relativa}	Biodisponibilidad relativa
FOCE	Estimación condicional de primer orden
GAM	Modelo aditivo generalizado (generalized additive model)
H	Hembra
HPLC-MS/MS	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas
HTC	Hematocrito
IC95%	Intervalo de confianza del 95%
IC₅₀	Concentración inhibitoria 50
IDP 17619	Código del producto de metabolismo y/o degradación de irosustat
IPRED	Predicciones individuales
IRES	Residuales individuales
irosustat	Nombre del producto en investigación. También conocido como 667-coumate y BN83495
i.v.	Intravenosa
IWRES	Residuales individuales ponderados
K_a	Constante de absorción
K_D	Constante de disociación
KM	Constante de Michaelis-Menten
LOQ	Límite de cuantificación
LSS	Lauril sulfato sódico
λ_z	Constante de velocidad de eliminación (administración intravenosa)
λ_{zapp}	Constante aparente de velocidad de eliminación (administración oral)
M	Macho
MC	Metilcelulosa

MRT	Tiempo medio de residencia desde tiempo cero hasta el infinito
MRT_t	Tiempo medio de residencia desde tiempo cero hasta el último tiempo con concentraciones cuantificables
n	Numero de valores
NONMEM	Nonlinear mixed effects model
NS	Unión no específica
PEG	Polietilenglicol
po	Administración oral
PRED	Predicciones poblacionales
QWBA	Autoradiografía cuantitativa de cuerpo entero
R_{ac(AUC)}	Cociente de acumulación
RES	Residuales
SPE	Extracción en fase sólida
STS	Sulfatasa esteroideal
t_{1/2λz}	Semivida de eliminación (administración intravenosa)
t_{1/2λz app}	Semivida aparente de eliminación (administración oral)
t_{lag}	Tiempo de latencia
t_{max}	Tiempo en el que se alcanza la concentración máxima
V_c (V2)	Volumen de distribución en el compartimento central
VII	Variabilidad interindividual
V_{max} (VM)	Velocidad máxima
VPC	Evaluación predictiva visual (“visual predictive check”)
V_{perif} (V3 y V4)	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
WRES	Residuales ponderados

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
1 INTRODUCCIÓN	11
2 OBJETIVOS.....	39
3 PLAN DE TRABAJO	41
4 MATERIAL Y MÉTODOS	47
4.1 Propiedades Físico-Químicas y Biofarmacéuticas de Irosustat.....	47
4.2 Formulaciones	49
4.2.1 <i>Reactivos.....</i>	49
4.2.2 <i>Solución de Irosustat en Soluphor P:PEG 400:agua (36:24:40).....</i>	49
4.2.3 <i>Suspensión de Irosustat en un 1% (m/v) de metilcelulosa y un 2% (m/v) de lauril sulfato sódico</i>	50
4.2.4 <i>Suspensión de Irosustat en un 1% (m/v) de metilcelulosa</i>	50
4.2.5 <i>Cápsulas.....</i>	50
4.2.6 <i>Comprimidos.....</i>	52
4.3 Animales.....	53
4.3.1 <i>Características Generales</i>	53
4.3.2 <i>Identificación.....</i>	53
4.3.3 <i>Condiciones de Estabulación.....</i>	55
4.3.4 <i>Dieta.....</i>	55
4.3.5 <i>Supervisión Clínica</i>	55
4.3.6 <i>Análisis Hematológicos y Bioquímicos</i>	56
4.3.7 <i>Normativa</i>	56
4.4 Diseño Experimental de los Estudios Farmacocinéticos en Animales.....	56
4.4.1 <i>Administración de Dosis Únicas de Irosustat</i>	56
4.4.1.1 <i>Rata</i>	56
<i>Dosis Únicas de ¹⁴C-Irosustat (ADME): Estudio R1.....</i>	56
<i>Dosis Únicas de ¹⁴C-Irosustat (Autoradiografía): Estudio R2.....</i>	58
<i>Evaluación de la proporcionalidad de dosis: Estudio R3.....</i>	60
4.4.1.2 <i>Perro</i>	61
<i>Selección del tamaño de partícula: Estudios P1, P2 y P3.....</i>	61
<i>Dosis Únicas de ¹⁴C-Irosustat (ADME): Estudio P4.....</i>	62
<i>Comparación de suspensiones: Estudio P5.....</i>	64
<i>Evaluación de la proporcionalidad de dosis: Estudio P6.....</i>	65
<i>Selección de la formulación para Fase 1: Estudio P7.....</i>	66
<i>Interacción con la comida: Estudio P8.....</i>	67
4.4.1.3 <i>Mono</i>	68
<i>Dosis Únicas de ¹⁴C-Irosustat (ADME): Estudio M1.....</i>	68
4.4.2 <i>Administración de Dosis Repetidas de Irosustat.....</i>	70
4.4.2.1 <i>Rata</i>	70
<i>Dosis repetidas durante 1 mes: Estudio R4.....</i>	70
<i>Dosis repetidas durante 6 meses: Estudio R5.....</i>	71

4.4.2.2	<i>Perro</i>	72
	<i>Dosis repetidas durante 1 mes: Estudio P9</i>	72
	<i>Dosis repetidas durante 6 meses: Estudio P10</i>	73
4.4.2.3	<i>Mono</i>	74
	<i>Dosis repetidas durante 7 días: Estudio M2</i>	74
4.5	Obtención y Manipulación de Muestras	74
4.6	Métodos de Espectrometría de Masas Acoplada a Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) para la Cuantificación de Irosustat y de IDP 17619 en Plasma y Sangre	75
4.6.1	<i>Reactivos</i>	76
4.6.2	<i>Equipos</i>	76
4.6.3	<i>Preparación de Soluciones Stock y de Trabajo</i>	76
4.6.4	<i>Preparación de los Estándares de Calibrado y Controles de Calidad</i>	77
4.6.4.1	<i>Estándares de calibrado y controles de calidad en plasma</i>	77
4.6.4.2	<i>Estándares de calibrado y controles de calidad en sangre</i>	78
4.6.5	<i>Procesado de las Muestras</i>	79
4.6.5.1	<i>Procesado de muestras de plasma</i>	79
4.6.5.2	<i>Procesado de muestras de sangre</i>	79
4.6.6	<i>Condiciones Instrumentales</i>	79
4.6.7	<i>Criterios de Aceptación</i>	80
4.6.8	<i>Resumen de la Validación</i>	80
4.7	Procedimiento Experimental para la Cuantificación de Radioactividad Total Tras la Administración de ¹⁴C-Irosustat	83
4.7.1	<i>Cuantificación de la Radioactividad en Muestras de Rata</i>	83
4.7.1.1	<i>Muestras del estudio de ADME</i>	83
4.7.1.2	<i>Muestras del Estudio de Autoradiografía (QWBA, Quantitative Whole Body Autoradiography)</i>	84
4.7.2	<i>Cuantificación de la Radioactividad en Muestras de Perro y Mono</i>	85
4.8	Análisis Farmacocinético No Compartimental	86
4.9	Análisis Farmacocinético Poblacional	88
4.9.1	<i>Análisis de los Datos</i>	91
4.9.2	<i>Desarrollo del Modelo</i>	92
4.9.2.1	<i>Modelo Farmacocinético en Perro</i>	92
4.9.2.2	<i>Modelo Farmacocinético en Rata</i>	92
4.9.3	<i>Selección del Modelo</i>	93
4.9.4	<i>Análisis de las Covariables</i>	93
4.9.5	<i>Evaluación del Modelo</i>	94
4.10	Análisis Estadístico	94
4.10.1	<i>Estadística Descriptiva</i>	94
4.10.2	<i>Modelo de Potencia para la Evaluación de la Proporcionalidad de Dosis</i>	94

4.10.3	<i>Análisis Estadístico para Evaluar el Efecto de la Comida en la Absorción de Irosustat</i>	95
4.10.4	<i>ANOVA para la Comparación de Formulaciones</i>	95
5	RESULTADOS	99
5.1	Administración de Dosis Únicas de Irosustat	99
5.1.1	Rata	99
5.1.1.1	<i>Dosis única de ¹⁴C-irosustat (ADME): Estudio R1</i>	99
5.1.1.2	<i>Dosis única de ¹⁴C-irosustat (Autoradiografía): Estudio R2</i>	105
5.1.1.3	<i>Evaluación de la proporcionalidad de dosis: Estudio R3</i>	111
5.1.2	Perro	132
5.1.2.1	<i>Selección del tamaño de partícula de irosustat: Estudios P1, P2 y P3</i>	132
5.1.2.2	<i>Dosis única de ¹⁴C-irosustat: Estudio P4</i>	139
5.1.2.3	<i>Comparación de suspensiones: Estudio P5</i>	143
5.1.2.4	<i>Evaluación de la proporcionalidad de dosis: Estudio P6</i>	147
5.1.2.5	<i>Selección de la formulación para Fase 1: Estudio P7</i>	177
5.1.2.6	<i>Interacción con la comida: Estudio P8</i>	185
5.1.3	Mono	190
5.1.3.1	<i>Dosis única de ¹⁴C-irosustat: Estudio M1</i>	190
5.2	Administración de Dosis Repetidas de Irosustat	194
5.2.1	Rata	194
5.2.1.1	<i>Dosis repetidas durante 1 mes: Estudio R4</i>	194
5.2.1.2	<i>Dosis repetidas durante 6 meses: Estudio R5</i>	200
5.2.2	Perro	211
5.2.2.1	<i>Dosis repetidas durante 1 mes: Estudio P9</i>	211
5.2.2.2	<i>Dosis repetidas durante 6 meses: Estudio P10</i>	219
5.2.3	Mono	238
5.2.3.1	<i>Dosis repetidas durante 7 días: Estudio M2</i>	238
6	DISCUSIÓN	245
7	CONCLUSIONES	271
8	REFERENCIAS	277
9	ANEXO I	289
9.1	Modelo Final de NONMEM (Rata - Estudio R3)	289
9.2	Modelo Final de NONMEM (Perro - Estudio P6)	293
9.3	Tabla Resumen de Desarrollo del Modelo PK Poblacional en Rata	297
9.4	Tabla Resumen de Desarrollo del Modelo PK Poblacional en Perro	301
10	ANEXO II	305
10.1	Póster Presentado en el 29º Congreso de la Sociedad Española de Farmacología	305

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama

Definición

El cáncer de mama se origina cuando las células normales de la mama empiezan a cambiar y proliferan sin control, y forman una masa denominada tumor. El tumor puede ser benigno (no canceroso) o maligno (canceroso), lo que implica que puede diseminarse a otras partes del organismo.

El cáncer de mama se disemina cuando las células cancerosas se desplazan a otros sitios del organismo a través de los vasos sanguíneos o linfáticos, dando lugar a lo que se denomina metástasis.

Lo más frecuente es que el cáncer de mama se extienda hacia los nódulos linfáticos axilares, cervicales o supraclaviculares. Cuando el cáncer de mama se extiende a otras regiones, con frecuencia se ven afectados los huesos, los pulmones y el hígado. Más raramente, el cáncer de mama puede diseminarse al cerebro.

Epidemiología

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente entre las mujeres de todo el mundo, con aproximadamente 1.38 millones de nuevos casos el año 2008^[1], representando el 23% del total de cánceres femeninos. Considerando los dos sexos, es el segundo cancer más frecuente en el mundo después del cáncer de pulmón.

Su incidencia aumenta con el nivel económico, registrándose una incidencia más alta en las regions desarrolladas del mundo (excepto Japón) y una incidencia baja en la mayoría de regiones en vías de desarrollo, como Tailandia, Nigeria e India. Las tasas de incidencia varían entre 19.3 por cada 100,000 mujeres en el este de África y 89.9 por cada 100,000 mujeres en Europa Occidental^[2]. En la Unión Europea la probabilidad de desarrollar un cáncer de mama antes de los 75 años es del 8%^[3].

En España se diagnostican unos 16,000 casos al año^[4], lo que representa casi el 30% de todos los cánceres del sexo femenino en nuestro país. La mayoría de los casos se diagnostican entre los 35 y los 80 años, siendo máxima su incidencia entre los 45 y los 65 años.

Tanto la incidencia como la prevalencia aumentan lentamente en España y en el mundo, probablemente debido al envejecimiento de la población. El aumento de la incidencia en España se estima en un 1-2% anual^[4].

Mientras que el número de casos y las tasas de incidencia aumentan lentamente, las tasas de mortalidad descienden en nuestro país, debido sobretodo a las campañas y

programas de cribado de cáncer de mama, que permiten un diagnóstico más precoz de la enfermedad y una mayor eficacia de los tratamientos.

Factores de Riesgo

Si bien los factores de riesgo pueden influir en el desarrollo del cáncer, la mayoría no es una causa directa de esta enfermedad. Algunas personas que tienen varios factores de riesgo nunca desarrollaran cáncer, mientras que sí lo hacen otras personas sin factores de riesgo conocidos. Sin embargo, el conocer los factores de riesgo es clave para la prevención de esta enfermedad ya que permite tomar decisiones más acertadas sobre el estilo de vida y los cuidados de salud.

Cabe destacar que el sexo es un factor determinante en la aparición de esta enfermedad, siendo las mujeres las principales afectadas por la misma. El cáncer de mama también afecta a los hombres pero en un porcentaje mucho menor (1%) comparado con la población femenina que lo padece.

Los siguientes factores pueden elevar el riesgo de una mujer de desarrollar cáncer de mama:

- Edad

El riesgo de desarrollar cáncer de mama aumenta a medida que la mujer envejece y, en la mayoría de los casos, la enfermedad se desarrolla en mujeres de más de 50 años.

- Antecedentes personales de cáncer de mama

Una mujer que ha desarrollado el cáncer en una mama tiene una probabilidad más elevada de desarrollar un segundo cáncer en la otra mama.

- Antecedentes familiares de cáncer de mama

Se ha demostrado que cuando una mujer no tiene antecedentes familiares de cáncer de mama, tiene un riesgo de padecer cáncer de mama, conocido como riesgo poblacional, que se sitúa alrededor del 8%^[3].

Cuando una mujer tiene un familiar de primer grado afectada de cáncer de mama (hermana, madre o hija) tiene un riesgo mayor de padecer cáncer de mama, situándose aproximadamente en un 13% a lo largo de la vida. Este riesgo es mayor si hay dos familiares directas afectas de cáncer de mama, situándose entonces en aproximadamente el 21% a lo largo de la vida. Si hay 3 ó más familiares de primer grado afectadas de cáncer de mama, el riesgo se considera muy elevado, superior al 30% y hablamos entonces de predisposición hereditaria al cáncer de mama.

- Predisposición genética

Las mutaciones de los genes de predisposición hereditaria al cáncer de mama (BRCA1 o BRCA2) se asocian con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama u ovario^[5].

Un gen BRCA1 o BRCA2 mutado normalmente produce una proteína que no funciona correctamente porque es anormalmente corta. Se cree que estas proteínas defectuosas no están en condiciones de ayudar a corregir las mutaciones que se producen en otros genes. Estos defectos se acumulan y pueden permitir a las células crecer y dividirse de forma descontrolada, formando un tumor.

- Exposición a estrógeno y progesterona

El estrógeno y la progesterona son hormonas femeninas que controlan el desarrollo de las mamas. La exposición prolongada a estas hormonas aumenta el riesgo de padecer cáncer de mama.

En consecuencia, las mujeres que comienzan a menstruar antes de los 10 años o llegan a la menopausia después de los 55 años tienen más riesgo de padecer cáncer de mama porque las células mamarias están expuestas al estrógeno y a la progesterona durante un tiempo más prolongado.

Las mujeres que no han tenido ningún hijo (nulíparas) o que han tenido su primer hijo después de los 35 años también tienen más riesgo de padecer cáncer de mama. El embarazo puede actuar como protección contra el cáncer de mama porque empuja a las células mamarias hacia la última fase de la maduración. La lactancia también se ha descrito como un factor de protección contra el cáncer de mama.

- Raza

Si bien las mujeres blancas tienen más posibilidades de desarrollar cáncer de mama, las mujeres negras son más propensas a morir a causa de la enfermedad. Aún no están claros los motivos de las diferencias en la supervivencia y probablemente se vinculen con factores socioeconómicos y biológicos.

- Factores del estilo de vida

Al igual que con otros tipos de cáncer, los estudios han demostrado que hay diversos factores del estilo de vida que pueden contribuir al desarrollo del cáncer de mama.

La obesidad en mujeres posmenopáusicas aumenta el riesgo de padecer cáncer de mama, probablemente porque en el tejido graso se sintetizan una mayor

cantidad de estrógenos a partir de corticoides y hormonas masculinas, que en mujeres delgadas.

Asimismo, las mujeres que son físicamente inactivas en su vida diaria parecen tener un mayor riesgo de cáncer de mama.

- **Exposición a radiación**

Las dosis altas de radiación (por ejemplo, provenientes de radiografías o cabinas de bronceado) pueden aumentar el riesgo de la mujer de padecer cáncer de mama.

Pruebas diagnósticas

Para el diagnóstico del cáncer de mama existen tres grandes grupos de pruebas: pruebas por imagen, pruebas con procedimientos quirúrgicos y pruebas genéticas.

A. Pruebas por imagen

A.1. Mamografía: La mamografía, llamada también mamograma, utiliza dosis baja de rayos X para examinar las mamas y detectar pequeños tumores que no han podido ser encontrados por el médico. La combinación ideal en la detección precoz del cáncer de mama es la mamografía junto con la exploración periódica del ginecólogo, además de la habitual autoexploración de la mujer.

A.2. Ecografía mamaria: procedimiento en el que se utilizan ondas de sonido de alta frecuencia (ultrasonidos) para producir imágenes del tejido mamario. Esta prueba permite distinguir una masa sólida, que puede ser un cáncer, y un quiste lleno de líquido, que habitualmente no es canceroso.

A.3. Imágenes de resonancia magnética (MRI): Utilizan campos magnéticos, en lugar de rayos X, para producir imágenes detalladas de la mama.

B. Pruebas con procedimientos quirúrgicos

Biopsia: este estudio consiste en la extracción de una pequeña cantidad de tejido para su examen con microscopio. Otras pruebas pueden sugerir la presencia de cáncer, pero solo la biopsia permite dar un diagnóstico definitivo. Existen diferentes tipos de biopsias, que se clasifican según la técnica o el tamaño de la aguja utilizada para obtener la muestra de tejido:

- Biopsia por escisión: extracción completa de una masa de tejido
- Biopsia por incisión: extracción de una parte de una masa o de una muestra de tejido
- Biopsia central: extracción de tejido con una aguja ancha

- Biopsia por aspiración con aguja fina (AAF): extracción de tejido o líquido mediante una aguja fina

Posteriormente un patólogo analiza el tejido obtenido para determinar los siguientes factores y ofrecer una guía en las decisiones de tratamiento:

Características del tumor: El examen microscópico del tumor determina su tipo (invasivo o *in situ*, ductal o lobular), su grado (la diferencia que presentan las células cancerosas de las células sanas) y si el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos.

Pruebas para receptor de estrógeno (ER) y receptor de progesterona (PR): Las células del cáncer de mama que tienen estos receptores dependen de las hormonas estrógeno o progesterona para su proliferación. La presencia de estos receptores ayuda a determinar tanto el pronóstico del paciente como la posibilidad de que funcione un tratamiento hormonal. En general, el tratamiento hormonal funciona bien para los tumores positivos para ER o PR. Aproximadamente entre el 75% y el 80% de los casos de cáncer de mama son positivos para la presencia de receptores de estrógeno o progesterona (ER+ y PR+, respectivamente).

Pruebas del receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2): Alrededor del 20% al 25% de los casos de cáncer de mama invasivo, presentan demasiada cantidad de una proteína llamada receptor del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). En estos casos, el cáncer se denomina cáncer positivo para HER2 (HER2+). Saber el estado HER2 de un cáncer ayuda a determinar si un cierto tipo de medicamento, tal como el trastuzumab o el lapatinib pueden ayudar a tratar el cáncer.

Si el tumor de una persona no contiene receptores ER, PR ni HER2, se dice que el tumor es triple negativo. Los cánceres de mama triple negativo constituyen aproximadamente el 15% de todos los tipos de cáncer y son más frecuentes en las mujeres con mutaciones en el BRCA1 o BRCA2. Este subtipo de cáncer de mama en general crece y se disemina más rápido. El cáncer de mama triple negativo parece ser más común entre las mujeres negras y las mujeres jóvenes.

C. Pruebas genéticas

La principal aplicación de las micromatrices de ADN en cáncer ha sido el estudio de la expresión genética diferencial entre muestras pareadas (tumoraes y normales) del mismo individuo enfermo. Se trata de comparar los genes que se encuentran alterados en el tejido tumoral respecto al normal, tanto activados (mayor expresión) como reprimidos (menor expresión). La colección de genes alterados constituye una firma molecular del tumor objeto de estudio. Mediante el uso de estas firmas moleculares es posible, por tanto, clasificar

molecularmente los tumores y estratificar los pacientes en diferentes grupos atendiendo a diferentes criterios: mejor o peor pronóstico según el riesgo de desarrollar metástasis, mayor o menor beneficio de la quimioterapia en cada paciente^[6, 7].

Dos de los tests genéticos más utilizados son el Oncotype Dx® y el MammaPrint®.

Tipos de cáncer de mama

Generalmente los tipos de cáncer de mama se clasifican de acuerdo a tres factores: el sitio en el que se originó el carcinoma o tumor, el grado de invasión y la apariencia de las células vistas bajo un microscopio.

El cáncer de mama se clasifica en los siguientes tipos:

- *Carcinoma in situ*

In situ significa “en su sitio”. Es un tipo de cáncer que no invade en profundidad y se considera susceptible de ser curado mediante una simple extirpación tumoral. Está ubicado en los conductos de los lobulillos, no se ha extendido al tejido adiposo cercano al seno, ni a otros órganos del organismo. No produce metástasis, no invade vasos sanguíneos ni linfáticos.

Existen dos tipos de carcinoma *in situ*:

Carcinoma lobular *in situ* (CLIS): También llamado neoplasia (tumor) lobular. Se origina en los lóbulos o lobulillos de la mama. No atraviesa las paredes de éstos por lo que generalmente no se convierte en cáncer invasivo. No obstante, existen casos en los que sí puede desarrollarse y convertirse en un carcinoma lobular invasor.

Carcinoma ductal *in situ* (CDIS): También se le llama carcinoma intraductal. Es el tipo más común de cáncer no invasivo de mama que existe, en el cual hay presencia de células anormales en el revestimiento de un conducto de la mama. En este caso las células cancerosas no se propagan a través de las paredes hacia el tejido adiposo del seno. El tratamiento incluye cirugía o radiación, que generalmente son favorables a la cura de la enfermedad. No obstante, si no se tratan a tiempo pueden convertirse en invasivos.

- *Carcinoma ductal infiltrante (o invasivo)*

Se origina en las glándulas productoras de leche. Puede extenderse hacia los canales linfáticos o a los vasos sanguíneos del seno y distribuirse a otras partes del organismo. Este es el tipo de tumor más común en el cáncer de mama.

- Carcinoma lobular infiltrante (o invasivo)

Se origina también en las glándulas productoras de leche y puede extenderse a otras partes del organismo. Se estima que entre 10 y 15% de los cánceres invasivos pertenecen a esta clasificación.

- Carcinoma medular

Se estima que es responsable del 5% de todos los casos de cáncer de seno. En él, las células cancerosas se encuentran agrupadas y en los bordes del tumor existen células del sistema inmunitario que sirven para atacar y destruir las células anormales, así como a otros agentes extraños como bacterias o virus.

- Carcinoma mucinoso

Está formado por células que producen mucosidad. Pertenecce al tipo de cáncer ductal invasivo y tiene un pronóstico favorable al tener menos probabilidades de propagación que el cáncer ductal invasivo o el lobular invasivo.

- Carcinoma tubular

El carcinoma tubular es un tipo especial de carcinoma ductal infiltrante. Existen menos probabilidades de que se propague fuera del seno, comparado con el cáncer ductal invasivo o el lobular invasivo. Es el responsable del 2% de todos los casos de cáncer de mama.

- Cáncer inflamatorio de mama.

No es muy común, representa apenas el 1% de los casos de cáncer de mama. Los síntomas son: piel enrojecida y caliente, con la apariencia de una cáscara de naranja. Las células cancerosas bloquean los vasos linfáticos de la piel, es decir que no se trata de una simple inflamación. Este tipo de cáncer tiene mayores probabilidades de propagación y su pronóstico es menos alentador que otros tipos.

Determinación del estadio (Clasificación TNM)

La estadificación describe la gravedad del cáncer que afecta a una persona basándose en la extensión del tumor original (primario) y si el cáncer se ha diseminado en el organismo o no. La estadificación es importante por las siguientes razones:

- Ayuda al médico a planear un tratamiento apropiado
- La etapa o estadio puede usarse para estimar el pronóstico de la persona
- Facilita un lenguaje común para evaluar los resultados de los estudios clínicos y comparar resultados de estudios diferentes.

La estadificación se basa en los conocimientos sobre el proceso de evolución del cáncer. Cuando las células cancerosas se separan del tumor primario (original) y circulan a través de la linfa o la sangre hasta otros lugares del organismo, se puede formar otro tumor (secundario). Este proceso de diseminación se llama metástasis. El tumor secundario (metastásico) es el mismo tipo de cáncer que el tumor primario. Por ejemplo, si el cáncer de mama se disemina hasta los huesos, las células cancerosas de los huesos son en realidad células de cáncer de mama. La enfermedad es cáncer metastásico de mama, no cáncer del hueso.

El sistema TNM es uno de los sistemas de estadificación de mayor uso^[8,9]. Este sistema ha sido aceptado por la *International Union Against Cancer, UICC*, y por el *American Joint Committee on Cancer, AJCC*.

El sistema TNM está basado en la extensión del tumor (**T**), el grado de diseminación a los ganglios linfáticos (**N**), y la presencia de metástasis (**M**) distante. Un número se añade a cada letra para indicar el tamaño o extensión del tumor y el grado de diseminación del cáncer.

Tumor primario (T)

TX: El tumor primario no puede ser evaluado

T0: No hay evidencia de tumor primario

Tis: Carcinoma *in situ* (CIS). Aunque no es cáncer, el CIS puede progresar a cáncer y algunas veces se llama cáncer preinvasor

T1, T2, T3, T4: Tamaño creciente del tumor primario

Ganglios linfáticos regionales (N)

NX: No es posible evaluar los ganglios linfáticos regionales

N0: No existe complicación de ganglios linfáticos

N1, N2 y N3: Complicación de ganglios linfáticos regionales (número de ganglios linfáticos y grado de diseminación)

Metástasis distante (M)

MX: No es posible evaluar una metástasis distante

M0: No existe metástasis distante

M1: Presencia de metástasis distante

Por ejemplo, el cáncer de mama clasificado como T3 N2 M0 se refiere a un tumor grande que se ha diseminado fuera del seno a los ganglios linfáticos vecinos, pero no a otras partes del organismo. Cáncer de mama T2 N0 M0 significa que el tumor está localizado sólo en la mama y no se ha diseminado a los ganglios linfáticos o a otras partes del organismo.

Para el cáncer de mama, las combinaciones TNM corresponden a una etapa o estadio de nueve posibles, tal y como se resume en la Tabla 1.

Tabla 1 Estadificación del cáncer de mama.

Estadio	T	N	M	Clasificación	% supervivencia a los 5 años ^[10]
0	Tis	N0	M0	In situ	100
IA	T1	N0	M0	Invasivo precoz	98.0 (localizado) 83.6 (regional)
IB	T0	N1	M0		
	T1	N1	M0		
IIA	T0	N1	M0		
	T1	N1	M0		
IIB	T2	N0	M0		
	T3	N0	M0		
IIIA	T0	N2	M0	Localmente avanzado	57
	T1	N2	M0		
	T2	N2	M0		
	T3	N1	M0		
IIIB	T3	N2	M0		
	T4	N0	M0		
	T4	N	M0		
IIIC	Cualquier T	N3	M0		
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1	Metastásico	23.4

Tratamiento

En la Tabla 2 se resumen las opciones terapéuticas más frecuentes para hacer frente al cáncer de mama.

Tabla 2 Opciones de Tratamiento del Cáncer de Mama Según el Estadio^[10].

Estadio del cáncer y tipo	Tratamiento primario	Evaluación de los nódulos	Terapia adyuvante		
			ER o PR -	ER o PR +	Sobreexpresión HER2
Estadio 0					
Carcinoma lobular in situ	No tratamiento o considerar profilaxis con tamoxifeno	-	-	-	-
Carcinoma ductal in situ	Tumorectomía y radioterapia	-	-	-	-
Estadio I y II: invasivo precoz	Tumorectomía y radioterapia	Biopsia del GLC o disección de GLA	Quimioterapia	Quimioterapia y terapia hormonal	Quimioterapia y trastuzumab
Estadio III: localmente avanzado					
No inflamatorio	Quimioterapia de inducción, seguida de tumorectomía y radioterapia	Biopsia del GLC o disección de GLA	Quimioterapia de inducción	Quimioterapia de inducción y en el post-operatorio terapia hormonal	Quimioterapia de inducción y en el post-operatorio trastuzumab
Inflamatorio	Quimioterapia de inducción, seguida de mastectomía y radioterapia	Disección de GLA	Quimioterapia de inducción	Quimioterapia de inducción y en el post-operatorio terapia hormonal	Quimioterapia de inducción y en el post-operatorio trastuzumab
Estadio IV: metástasis	Radioterapia o bifosfonatos para el dolor óseo	-	Quimioterapia	Terapia hormonal con o sin quimioterapia	Trastuzumab con o sin quimioterapia

ER: Receptor de estrógeno; PR: Receptor de progesterona; GLC: ganglio linfático centinela; GLA: ganglios linfáticos axilares

A continuación se describen las opciones de tratamiento para el cáncer de mama:

- Cirugía

Los dos tipos de cirugía que se llevan a cabo son los siguientes:

- Tumorectomía: Consiste en la extirpación del tumor y un pequeño margen de tejido sano alrededor del tumor. Queda la mayor parte de la mama. Para el carcinoma ductal *in situ* y el cáncer invasivo precoz, en general se recomienda radioterapia de seguimiento en el tejido mamario remanente. La tumorectomía también puede llamarse cirugía con conservación de la mama, mastectomía parcial o mastectomía segmental.
- Mastectomía: Extirpación quirúrgica de toda la mama.

La cirugía también se utiliza para el análisis y extracción de los ganglios linfáticos cercanos a las mamas, puesto que estos pueden capturar células cancerosas que se desprendieron del tumor original antes de que fuera extirpado. Existen dos aproximaciones:

- Biopsia del ganglio linfático centinela: Permite la extirpación del primer ganglio receptor o primera estación ganglionar que se vería hipotéticamente afectada por la progresión del tumor mamario. Esto permite reservar un procedimiento más grande de vaciamiento de los ganglios linfáticos axilares para pacientes cuyos ganglios linfáticos centinela presenten cáncer.
- Vaciamiento de ganglios linfáticos axilares: Consiste en un vaciamiento completo de los ganglios linfáticos que se encuentran bajo el brazo.

- Radioterapia

La radioterapia se basa en el empleo de radiaciones ionizantes (rayos X o radioactividad) para eliminar las células cancerosas. El tipo más común de tratamiento de radiación se denomina radioterapia de haz externo, que se aplica desde una máquina externa al organismo. Cuando el tratamiento de radiación se aplica mediante pequeñas semillas o cápsulas radioactivas, se denomina radioterapia interna o braquiterapia.

Después de una tumorectomía o mastectomía se aplica radioterapia adyuvante a fin de eliminar las células cancerosas que permanecen cerca del sitio del tumor o en cualquier otra parte de la mama, y disminuir así el riesgo de recurrencia de cáncer.

- Quimioterapia

La quimioterapia es el uso de medicamentos para destruir las células cancerosas, generalmente al inhibir su capacidad para proliferar y dividirse.

La quimioterapia adyuvante se administra generalmente después de un tratamiento principal como es la cirugía, para disminuir la incidencia de diseminación a distancia del cáncer.

La quimioterapia neoadyuvante o de inducción se inicia antes de cualquier tratamiento quirúrgico o de radioterapia. Su objetivo es disminuir el estadio tumoral para mejorar los resultados de la cirugía y de la radioterapia.

Los siguiente medicamentos, entre otros, puede utilizarse solos o en combinación para el tratamiento del cáncer de mama^[11]:

Antraciclinas: doxorubicina, epirubicina

Taxanos: docetaxel, paclitaxel

Agentes alquilantes: ciclofosfamida

Antimetabolitos: 5-fluorouracilo, metotrexato

- Terapia dirigida

La terapia dirigida es un tratamiento que apunta a los genes o las proteínas específicos de un tumor, o a las condiciones del tejido que contribuyen al crecimiento y la supervivencia del cáncer. Este tipo de tratamiento inhibe la proliferación y diseminación de las células cancerosas, y, a la vez, limita el daño a las células sanas, lo que habitualmente produce menos efectos secundarios en comparación con otros medicamentos para el cáncer.

En la actualidad, las dos clases principales de terapia dirigida aprobadas para el tratamiento del cáncer de mama están dirigidas a las moléculas HER2 y a los vasos sanguíneos del área del tumor. Asimismo, la terapia dirigida también se utiliza para el tratamiento de metástasis óseas.

- Terapia dirigida a HER2: El trastuzumab y el lapatinib son terapias dirigidas a HER2 que pueden administrarse solos o junto con la quimioterapia.

El trastuzumab está aprobado para el tratamiento del cáncer de mama avanzado y como terapia adyuvante para el cáncer de mama temprano en tumores positivos para HER2.

El lapatinib habitualmente se utiliza en mujeres con cáncer de mama positivo para HER2 en las que el trastuzumab ya no funciona.

- Terapia antiangiogénica: Tiene como objetivo detener la angiogénesis, que es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos. Dado que un tumor necesita los nutrientes de los vasos sanguíneos para crecer y diseminarse, el objetivo de la terapias antiangiogénicas es hacer “pasar hambre” al tumor.

En este sentido, el bevacizumab se ha utilizado para tratar el cáncer de mama recurrente o metastásico.

- Terapia antiosteoclástica: En pacientes con cáncer de mama que se ha diseminado a los huesos, se ha demostrado que los bifosfonatos reducen las complicaciones de las metástasis óseas, tales como el dolor y las fracturas.

- Terapia hormonal

La terapia hormonal ayuda a controlar un tumor con resultados positivos en el análisis de receptores de estrógeno (RE) o progesterona (RP), tanto en cáncer de estadio temprano como en el metastásico. Las opciones de terapia hormonal se describen a continuación.

- Moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERMs). Los SERMs son una clase de compuestos que actúan sobre el receptor de estrógeno (RE). Una característica que distingue estas sustancias de los antagonistas puros es que su acción es diferente en los distintos tejidos, otorgando la posibilidad de forma selectiva de estimular o inhibir el RE según el tejido. El fármaco más empleado de esta categoría es el tamoxifeno, que tiene un efecto antagonista del RE en las mamas pero un efecto agonista en el hueso (impide la descalcificación de los huesos).

- Reguladores negativos selectivos del receptor de estrógeno (SERDs). El fármaco más representativo de esta clase es el fulvestrant. Es un antagonista del receptor de estrógeno sin efectos agonistas, que funciona mediante regulación negativa y por degradación del receptor de estrógeno. A diferencia de otras terapias hormonales orales, el fulvestrant se administra una vez al mes por inyección intramuscular.

- Análogos de la hormona liberadora de gonadotropina. Suprimir la función de los ovarios, o ablación ovárica, puede ser otra posibilidad para las mujeres con cáncer de mama positivo para RE que todavía no han pasado la menopausia. Esto se puede realizar de forma temporal con medicamentos análogos a la hormona liberadora de gonadotropina, como la goserelina y el leuprolide.

- Inhibidores de la aromatasa (AI). Los AI disminuyen la cantidad de estrógenos en mujeres posmenopáusicas, ya que bloquean la enzima aromatasa, necesaria para la síntesis de estradiol. Entre estos medicamentos se incluyen el anastrozol, el exemestano y el letrozol, que se administran diariamente por vía oral. Las mujeres posmenopáusicas que reciben terapia hormonal para tratar el cáncer de mama tienen varias opciones^[12]: tomar tamoxifeno o un AI durante cinco años, comenzar el tratamiento con tamoxifeno durante dos a tres años y luego cambiar a un AI para el resto del período de cinco años, o tomar tamoxifeno durante cinco años y luego cambiar a un AI para cubrir lo que se denomina terapia extendida.

A modo de resumen, en la Tabla 3 se muestran algunos de los fármacos más utilizados para el tratamiento del cáncer de mama.

Tabla 3 Fármacos Utilizados Para el Tratamiento del Cáncer de Mama^[10].

Tipo de Terapia	Fármaco	Tratamiento típico
Quimioterapia	Antraciclinas	
	doxorubicina	IV cada 14 a 21 días durante cuatro a seis ciclos; utilizada en combinación con un taxano, ciclofosfamida y/o fluorouracilo
	epirrubicina	IV día 1 o días 1 y 8, cada 21 a 28 días durante tres a ocho ciclos; utilizada en combinación con ciclofosfamida o fluorouracilo
	Taxanos	
	docetaxel	IV cada 21 días durante tres a ocho ciclos; utilizada en combinación con doxorubicina, ciclofosfamida y/o fluorouracilo
	paclitaxel	IV cada siete a 21 días durante cuatro a doce ciclos; utilizada en combinación con doxorubicina y ciclofosfamida
Terapia endocrina	Inhibidores de la aromatasa	
	anastrozol	Comprimido diario oral durante cinco años; utilizado solo o en secuencia con tamoxifen
	exemestano	Comprimido diario oral durante dos a cinco años; utilizado solo o en secuencia con tamoxifen
	letrozol	Comprimido diario oral durante dos a cinco años; utilizado solo o en secuencia con tamoxifen
	Agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina	
	goserelina	Subcutáneo cada uno a tres meses durante dos años
	Moduladores selectivos del receptor de estrógenos	
tamoxifeno	Comprimido diario oral durante dos a cinco años; utilizado solo o con un inhibidor de la aromatasa	
Terapia dirigida	Anticuerpos monoclonales	
	trastuzumab	IV con la primera dosis del régimen de quimioterapia y después cada una a tres semanas durante un año

Muchos tumores de mama no responden a este tipo de terapia o bien el cáncer progresa después de un periodo de tiempo relativamente corto^[13], poniendo de manifiesto que es necesario continuar con la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos que sean eficaces. Los inhibidores de la sulfatasa esterooidal representan una opción de futuro muy prometedora, tal y como se argumenta en el siguiente apartado.

Papel de la sulfatasa esterooidal en el cáncer de mama

Los estrógenos, especialmente el estradiol (E2), son los principales mitógenos implicados en la estimulación del crecimiento de tumores de mama endocrino-dependientes^[14, 15].

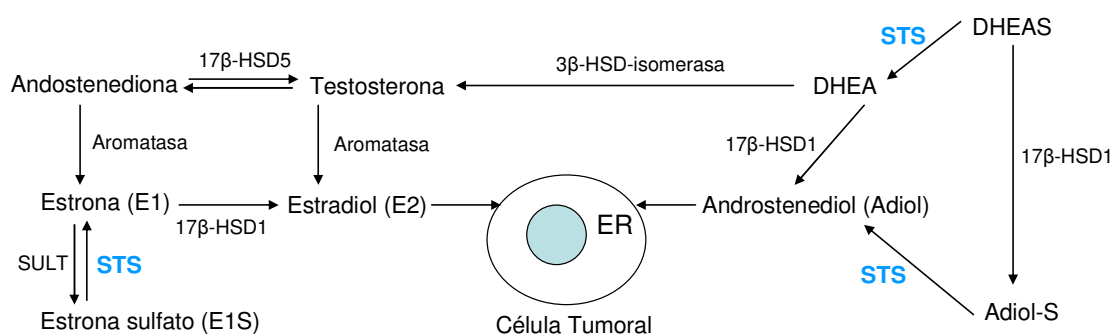
En las mujeres, los estrógenos proceden de fuentes diferentes antes y después de la menopausia. En las mujeres premenopáusicas, los ovarios son la principal fuente de estrógenos circulantes, mientras que después de la menopausia, la biosíntesis de estrógenos ocurre en los tejidos periféricos, principalmente a partir de la conversión de andrógenos tanto de origen adrenal como ovárico^[16].

Varios estudios sugieren que, en mujeres posmenopáusicas, para el crecimiento de los tumores de mama estrógeno-dependientes tiene más importancia la formación local de estrógenos dentro del tumor que los niveles circulantes en plasma de estrógenos^[17-19]. La importancia de la formación local de estrógenos se basa en el hecho de que el tejido de cáncer de mama en pacientes posmenopáusicas contiene una alta concentración de estrógenos, en especial de estrona sulfato (E1S), a pesar de que en este período los niveles de estrógenos circulantes son muy bajos^[20].

Hay dos vías principales por las que los estrógenos pueden ser sintetizados a nivel local en los tumores de mama, que son a través de la aromatasa y de la sulfatasa. De acuerdo con la Figura 1, la aromatasa convierte androstenediona a estrona (E1) que rápidamente es sulfatada a E1S por una serie de sulfotransferasas que se encuentran ampliamente distribuidas en el organismo^[21, 22]. La E1S actúa como reservorio para la formación de estrógenos activos a través de la acción de la sulfatasa esteroidal (STS), enzima que hidroliza los esteroides sulfatados a sus formas no conjugadas, que son las biológicamente activas^[23, 24].

La STS implica la formación de E1 y dehidroepiandrosterona (DHEA) a partir de E1S y DHEAS, respectivamente. Las formas no conjugadas E1 y DHEA pueden ser reducidas por el enzima 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (17β-HSD1) a estradiol (E2) y androstenediol (adiol), respectivamente, ambos esteroides con potentes propiedades estrogénicas^[25].

Figura 1 Origen de los esteroides estrogénicos en mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama hormonodependientes.



STS: sulfatasa esteroidal; SULT: sulfotransferasa; 17β-HSD1 y 17β-HSD5: 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 y 5, respectivamente; 3β-HSD-isomerasa: 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa delta 5-delta 4 isomerasa

En estudios previos, se observó que la habilidad de DHEAS, DHEA y adiol para estimular la proliferación de células MCF-7 de cáncer de mama podía ser bloqueada por antiestrógenos e inhibidores de la STS, pero no por inhibidores de la aromatasa. Los autores concluyeron que la estimulación de la proliferación de células MCF-7 ejercida por DHEA se produjo por una vía independiente a la aromatasa^[26, 27].

En este sentido, se ha verificado que en los cánceres de mama, la actividad de STS es considerablemente más alta que la actividad de la sulfatasa, ya que se sintetizan 10 veces más de estrona (E1) por la vía de la sulfatasa que por la vía de la aromatasa^[28]. Asimismo, técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa han demostrado que la expresión del mRNA de la STS en el tejido de mama maligno es mucho mayor que en el tejido mamario normal, siendo además considerablemente superior a la expresión del mRNA de la aromatasa^[29]. De la misma forma, también se ha comprobado que los niveles altos de mRNA de la STS en tumores de mama se asocian con un mal pronóstico, mientras que los niveles de mRNA de la aromatasa no ofrecen valor pronóstico^[30].

Teniendo en cuenta estos hallazgos, los inhibidores de la STS son candidatos adecuados para el tratamiento del cáncer de mama estrógeno-dependientes en mujeres posmenopáusicas.

A continuación se resumen algunas de las principales características de la STS.

Biología molecular de la STS

La STS es miembro de una superfamilia de 12 sulfatasas distintas. Dependiendo del grado de glicosilación, la STS purificada tiene un peso molecular de aproximadamente 65 kDa. El gen de la STS humana se localiza en la parte distal del brazo corto del cromosoma X. Este gen consta de 10 exones y abarca 146 kb, con un tamaño de intrones que va de 102 bp a 35 kb^[25].

La inactivación del gen de la STS da como resultado la ictiosis ligada al cromosoma X (X-LI). Esta patología afecta a niños varones, lo que indica una herencia recesiva ligada al cromosoma X. La X-LI se caracteriza por la acumulación de escamas visibles en la piel, sobretodo en el cuello, el tronco y las extremidades. La aplicación tópica de una crema con un 10% de colesterol, ha demostrado ser de utilidad para el tratamiento de esta enfermedad^[31].

Localización de la STS

Se ha encontrado STS en testículos, ovario, glándulas adrenales, placenta, próstata, piel, cerebro, pulmones, endometrio, linfocitos sanguíneos periféricos, aorta, hígado, riñones y hueso. Se cree que es una enzima virtualmente ubicuota en el organismo pero en pequeñas cantidades^[25]. La fuente más rica de STS es la placenta.

En cultivos de fibroblastos humanos, la STS fue localizada en el retículo endoplasmático rugoso y en el aparato de Golgi. En menor medida, también fue localizada en membranas celulares y en componentes de la vía endocítica como los endosomas^[32].

Regulación de la actividad STS

Puesto que la STS es la principal enzima involucrada en la síntesis *in situ* de estrógenos en los tumores hormonodependientes^[28], Purohit et al. investigaron la influencia de los factores de crecimiento secretados por los tumores de mama sobre la actividad de la E1-STS, enzima que cataliza la conversión de E1S a E1^[33].

Para ello, evaluaron el efecto del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) y el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) en la actividad E1-STS en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231. En ambos tipos de células, IGF-1 (25 a 200 ng/ml) y bFGF (100 a 200 ng/ml) estimularon significativamente (de 8 a 60%) la actividad E1-STS de forma dosis dependiente a las 48 horas. Los autores concluyeron que estos factores de crecimiento, que se cree son secretados por las células mamarias tumorales, provocan un aumento en la producción local de estrógenos a través de la estimulación en la actividad E1-STS.

Roles biológicos de la STS

A. En el cáncer de mama hormonodependiente

En este tipo de cáncer la STS actúa sobre dos tipos de sustratos: la E1S y la DHEAS (ver Figura 1).

- Hidrólisis de E1

Los sulfatos de estrógeno no tienen capacidad para unirse al receptor de estrógenos y por tanto son biológicamente inactivos. La larga semivida de E1S en la sangre (10-12 h) en comparación con los estrógenos no conjugados E1 y E2 (20 min), junto con el hecho de que las concentraciones circulantes de E1S son muy superiores a las de E1, pusieron de manifiesto que la E1S actúa como reservorio para la formación de estrógenos biológicamente activos a través de la acción de la STS^[34].

- Hidrólisis de DHEAS

DHEAS actúa como precursor para la formación de esteroides con propiedades estrogénicas, como el 5-androstenediol (adiol). El adiol, a pesar de ser un andrógeno, se puede unir al receptor de estrógenos con una afinidad ligeramente menor que la de estradiol. Además, puesto que las concentraciones en plasma de adiol en mujeres posmenopáusicas son al menos 100 veces superiores a las de estradiol, se considera que el adiol es equipotente al estradiol en este grupo de mujeres^[35].

A la vez, estudios realizados en cultivos celulares y en modelos animales revelaron que DHEAS, DHEA y adiol pueden estimular la proliferación de células mamarias tumorales^[26, 27].

B. En la piel

La STS también se encuentra en la epidermis, y cada vez hay más evidencias de que su acción dentro de la piel puede representar una contribución importante para la producción de andrógenos en este tejido.

Por un lado, el déficit de STS provoca ictiosis ligada al cromosoma X (X-LI), caracterizada por la aparición de escamas en la piel de color marrón oscuro y el aumento en el espesor del estrato córneo. La X-LI se trata por vía tópica con agentes queratolíticos, como las cremas de colesterol.

Por otro lado, en pacientes con acné vulgar se ha detectado un aumento en la inmunoreactividad de la STS en las zonas de la piel afectada^[36]. De este modo, los inhibidores de la STS pueden ser de utilidad para el tratamiento de patologías de la piel y del cabello, en las cuales la STS provoca un aumento en la producción local de andrógenos biológicamente activos.

C. En el sistema inmune

Los estudios realizados por Daynes et al.^[37] y Rook et al.^[38] sugirieron que la relación DHEAS/DHEA puede tener un rol importante en la regulación de la maduración de los linfocitos “T helper” hacia los fenotipos Th1 o Th2.

Por tanto, la STS que convierte DHEAS a DHEA y que está presente en los macrófagos de los tejidos linfoides donde tiene lugar la maduración y diferenciación de los linfocitos Th, tiene un papel crucial en regular parte de la respuesta inmune. De estas investigaciones, se concluyó que el balance entre DHEA y glucocorticoides determina que un linfocito Th madure hacia un fenotipo Th1 o Th2, de forma que el DHEA favorece el desarrollo de células Th1 y el cortisol promueve una respuesta Th2.

D. En la función neuronal y la memoria

Esteroides como DHEA y DHEAS, además de sintetizarse en el córtex adrenal, también se forman en distintas partes del sistema nervioso central y por ello son clasificados como neuroesteroides.

Debido a que los niveles sanguíneos de DHEAS y DHEA disminuyen con la edad, se realizaron varias investigaciones para investigar la posibilidad que la administración a roedores de estos neuroesteroides pudiera aumentar la memoria. La administración de EMATE, un inhibidor potente de la STS, a ratas con amnesia inducida por escopolamina sugirió que el aumento en los niveles en sangre de DHEAS provoca en roedores una mejora de la memoria^[39].

A pesar de que no hay información sobre los posibles efectos de DHEAS o DHEA sobre la memoria humana, en los pacientes con deficiencia de STS no se ha encontrado ninguna evidencia que sugiera anomalías en la función cognitiva.

E. En los tejidos del tracto reproductivo

En las mujeres, se ha detectado una actividad STS relativamente alta en la mayoría de tejidos del tracto reproductivo, sobretodo en ovarios y endometrio. En estos tejidos, la STS es capaz de utilizar DHEAS para la producción de DHEA, androstenediona y testosterona. Por ello, el desarrollo de inhibidores potentes de la STS ofrece un potencial terapéutico para el tratamiento de tumores malignos del tracto reproductivo femenino.

En los hombres, la próstata es probable que sea el tejido donde la actividad STS tiene una contribución más importante en la síntesis de andrógenos biológicamente activos. En cultivos de células tumorales de próstata LNCaP se detectó actividad STS, aunque a niveles más bajos que los encontrados en células tumorales de mama^[40]. Por tanto, los inhibidores de la STS también podrían ser considerados para el tratamiento del cáncer de próstata.

F. En los osteoblastos

La reducción de la producción ovárica de estrógenos que ocurre durante la menopausia ha sido considerada como un factor importante en el desarrollo de osteoporosis. Dado que diversas investigaciones no han logrado detectar una reducción relevante en las concentraciones de estrógenos plasmáticos en mujeres con osteoporosis en comparación con mujeres de edad similar sin esta enfermedad, se ha considerado la posibilidad de que en las células óseas se produzca una síntesis de estrógenos *in situ*.

Gooyer et al.^[41] comprobaron que la administración de tibolona, inhibe la actividad STS en las células tumorales mamarias pero no en los osteoblastos. Esta investigación puso de manifiesto que los distintos tejidos pueden expresar diferentes isoformas de la STS o bien, que la STS esté sujeta a distintos modos de regulación según el tejido.

G. En los leucocitos

La presencia de actividad STS en tejidos fácilmente accesibles como los linfocitos periféricos (PBLs) facilita que estas células hayan sido utilizadas para proporcionar un método relativamente simple para monitorizar la duración y magnitud de inhibición de la STS en los estudios clínicos realizados con inhibidores de la STS.

Inhibidores de la STS

Existen distintos tipos de inhibidores de la STS: sustratos alternativos, inhibidores reversibles e inhibidores irreversibles (esteroidales y no esteroidales).

El irosustat, también conocido como 667-coumate, es un inhibidor irreversible no esteroideal de la STS. En la Figura 2 se muestran algunos ejemplos de la estructura de los diferentes tipos de inhibidores de la STS.

A. Sustratos alternativos

Este tipo de compuestos, que contienen al menos un grupo sulfato en su estructura, se diseñaron para competir con la E1S por la unión al sitio activo de la STS y, como consecuencia impedir la hidrólisis de su sustrato natural que genera E1.

Estos compuestos se unen a la STS, la cual hidroliza el grupo/s sulfato del sustrato alternativo. El primer ejemplo de esta serie de inhibidores de la STS fueron los 2-hidroxifenil indol sulfatos, uno de los cuales (compuesto 1, Figura 2) mostró una IC_{50} de $80 \mu M$ ^[42].

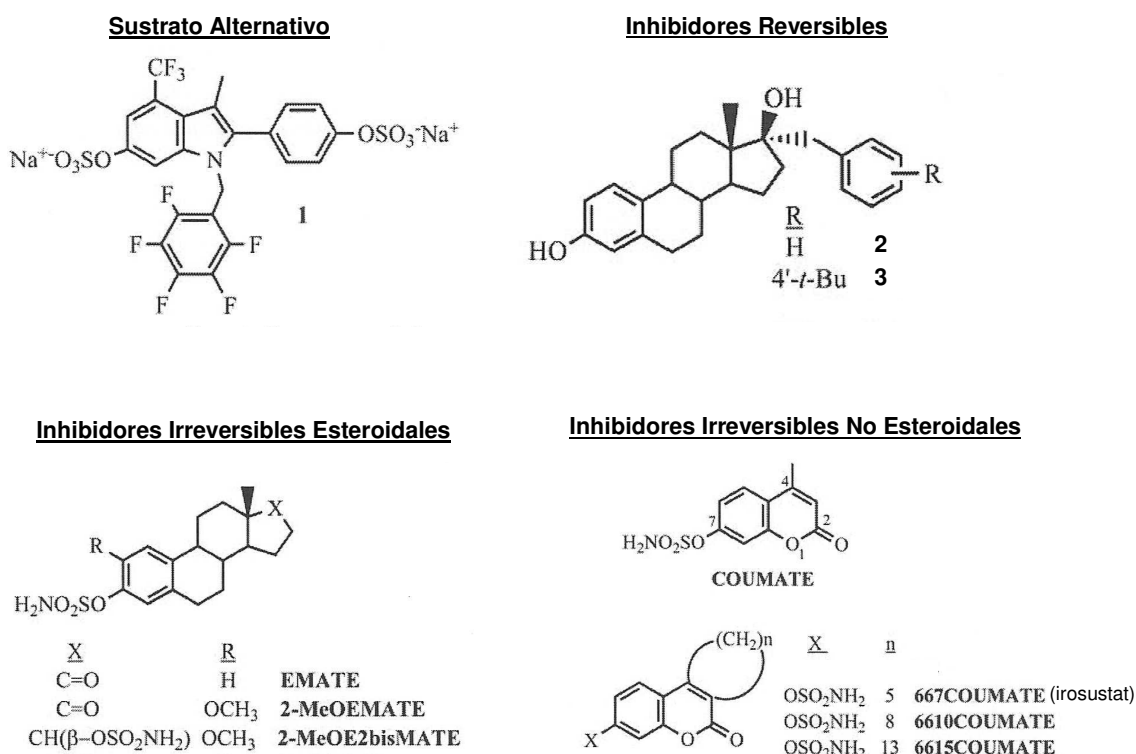
Algunos de estos inhibidores pueden ser potencialmente problemáticos por la posibilidad de generar metabolitos que se sabe son estrógenos, lo cual les confiere muy poco valor clínico para el tratamiento del cáncer de mama hormonodependiente.

B. Inhibidores Reversibles

La estrategia inicial para generar inhibidores reversibles de la STS consistió en reemplazar el grupo sulfato de la E1S por otros grupos similares como fosfatos, fosfonatos, sulfonatos, sulfonamidas, etc. Muchos de estos compuestos fueron diseñados para competir con la E1S por el sitio activo de la STS pero permaneciendo metabolitamente estables, es decir sin actuar como sustratos.

En la actualidad se han realizado varias modificaciones en la estructura de los inhibidores reversibles y se ha comprobado que los derivados del 17α -benzilestradiol (compuestos 2 y 3, Figura 2) son los compuestos que presentan una mayor actividad inhibidora, con valores de IC_{50} en células JEG-3 de entre 22 y $28 nM$ ^[43].

Figura 2 Ejemplos de los Cuatro Tipos de Inhibidores de la STS.



C. Inhibidores Irreversibles

La mayor parte de inhibidores de la STS reportados hasta la fecha pertenecen a esta categoría de inhibidores. Se distinguen dos tipos de inhibidores irreversibles, los esteroidales y los no esteroidales, los cuales se describen a continuación.

- Inhibidores irreversibles esteroidales

El EMATE (ver Figura 2) fue el primer inhibidor de la STS con este mecanismo de acción. Aunque el EMATE es activo vía oral y además muy potente, no es adecuado como agente terapéutico para el tratamiento del cáncer de mama hormonodependiente, porque posteriormente se ha demostrado que es cinco veces más estrógeno que el etinilestradiol cuando se administra por vía oral en rata^[44].

Tras el descubrimiento de EMATE, todos los inhibidores irreversibles esteroidales se diseñaron para ser menos estrogénicos que el EMATE pero con una actividad inhibidora de la STS igual o superior a este compuesto.

Las modificaciones más exitosas en el anillo A del EMATE fueron el 2-metoxiestrona 3-O-sulfamato (2-MeOEMATE) y el 2-metoxiestradiol-3,17β-bis-O,O-sulfamato (2-MeOE2bisMATE), los cuales mostraron una IC₅₀ en

microsomos de placenta de 30 nM^[45] y 39 nM^[46], respectivamente, indicando ser equipotentes a EMATE inhibiendo la STS *in vitro*.

Todas las investigaciones realizadas con estos compuestos han puesto de manifiesto que el grupo sulfamato es crucial para una inactivación potente de la STS.

- Inhibidores irreversibles no esteroideos

Es reconocido que los agentes no esteroideos son menos propensos a presentar efectos endocrinos no deseados que sus homólogos esteroideos.

Se sintetizaron series de sulfamatos de la cumarina bicíclicos que imitaban los anillos A y B del EMATE, entre los cuales el 4-metilcoumarin 7-O-sulfamato (COUMATE, Figura 2) mostró una IC₅₀ de 380 nM^[47] en células MCF-7, que todavía se encontraba lejos de la IC₅₀ de 65 pM del EMATE en este mismo ensayo.

Desde entonces, se desarrollaron sulfamatos de la cumarina tricíclicos, de los cuales el irosustat (también conocido como 667COUMATE) mostró una IC₅₀ de 8 nM^[47] en microsomos de placenta, siendo *in vitro* tres veces más potente que el EMATE (IC₅₀ de 25 nM en microsomos de placenta).

La extensión de esta serie de compuestos dio lugar al 6610COUMATE, que mostró una mayor actividad inhibitoria de la STS *in vitro* (IC₅₀=1 nM en microsomos de placenta) pero que *in vivo* resultó ser equipotente al 667COUMATE, inhibiendo la actividad STS hepática de rata (89% vs. 86%, a 1 mg/kg oral)^[48].

Sorprendentemente, el análogo 6615COUMATE, cuya IC₅₀ *in vitro* fue 370 veces superior a la obtenida para el 6610COUMATE, resultó ser el compuesto más potente de la serie *in vivo* (94% de inhibición de la STS hepática de rata a 1 mg/kg oral)^[48].

Actividad farmacológica *in vivo* de irosustat

Según lo comentado anteriormente, el irosustat es un inhibidor irreversible no esteroideo de la STS, cuya actividad *in vivo* ha sido investigada en estudios preclínicos y clínicos.

Las investigaciones realizadas en rata, han estado encaminadas a evaluar los siguientes aspectos:

- Ausencia de efectos estrogénicos

La potencial actividad estrogénica de irosustat se investigó mediante un estudio útero-trópico realizado en ratas ovariectomizadas.

En ratas ovariectomizadas que recibieron E1S (50 µg/día, s.c.) durante 5 días, el crecimiento del útero se incrementó un 170% en comparación con los animales que recibieron vehículo. Contrariamente, en animales tratados con una combinación de E1S (50 µg/día, s.c.) e irosustat (2 mg/kg/día, oral) durante 5 días, la habilidad de la E1S para estimular el crecimiento uterino fue bloqueada por la co-administración con irosustat^[49]. Asimismo, en los animales que recibieron irosustat (2 mg/kg/día, oral) durante 5 días, el peso del útero no difirió significativamente del de los animales control. Estos resultados permitieron verificar que irosustat, a diferencia del EMATE, carece de actividad estrogénica.

- Porcentaje de inhibición de la actividad E1-STS

En ratas hembra Wistar, la administración de una dosis única oral de 10 mg/kg de irosustat produjo una inhibición casi completa (> 90%) de la actividad E1-STS en hígado. Una dosis diaria repetida oral de 0.1 mg/kg de irosustat durante 5 días dio lugar a una inhibición del 84% de la actividad E1-STS en hígado^[50].

- Tiempo de duración de la inhibición de actividad E1-STS

Para examinar la duración de la inhibición de la actividad E1-STS, se obtuvieron muestras de hígado de ratas hembra Wistar 1, 3 y 7 días tras la administración de una dosis única oral de 10 mg/kg de irosustat. El tiempo que tardó la actividad E1-STS en estar un 50% recuperada tras la administración de irosustat fue de 3.5 días, tiempo similar al periodo de recambio de la E1-STS^[51]. Asimismo, se verificó que el día 7 la actividad de la E1-STS estaba totalmente restablecida^[50].

- Inhibición del crecimiento de tumores mamarios

La capacidad de irosustat para inhibir el crecimiento de tumores de mama se realizó en ratas Ludwig con tumores de mama inducidos por nitrosometilurea. En este modelo se comprobó que la ovariectomía daba lugar a una disminución significativa ($p < 0.02$) del volumen del tumor, mientras que la administración de E1S (50 µg/día, s.c.) originaba un aumento significativo ($p < 0.02$) del volumen del tumor, demostrando el estatus de dependencia hormonal de este tipo de tumor. Los animales que recibieron una combinación de E1S más irosustat (10 mg/kg/día o 2 mg/kg/día durante 45 días, oral) experimentaron una regresión significativa del crecimiento del tumor inducido por E1S. El porcentaje de disminución del volumen del tumor fue del $81 \pm 5\%$ a la dosis de 10 mg/kg/día y del $56 \pm 13\%$ a la dosis de 2 mg/kg/día^[49].

- Resultados del estudio clínico de Fase I^[52]

El primer estudio de Fase I de irosustat se realizó en mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama localmente avanzado o metastásico. El irosustat se administró vía oral a las dosis de 5 y 20 mg. Los pacientes recibieron una dosis inicial (ciclo 0)

seguida de 1 a 3 ciclos semanales, consistiendo cada ciclo en una dosis diaria durante 5 días seguida de nueve días sin tratamiento. Los resultados obtenidos se resumen a continuación.

- A) Inhibición de la STS: En ambas dosis, la actividad STS en los linfocitos periféricos (PBLs) se redujo un 98% (95-99%) el día 5 en la muestra obtenida a las 8 horas post administración. Por tanto, se alcanzó una inhibición casi completa de la actividad STS en PBLs a las dosis de 5 y 20 mg de irosustat.

En las muestras tumorales, la inhibición media de la actividad STS a las dosis de 5 y 20 mg fue del 99% y sólo en un paciente tratado a la dosis de 5 mg se registró una inhibición del 78%.

- B) Concentración de esteroides: A las dosis de irosustat de 5 y 20 mg, las concentraciones medias de estrona se redujeron un 55% y 42%, respectivamente, y las concentraciones de estradiol disminuyeron un 47% y 41%, respectivamente, en el ciclo 1, a las 8 horas post administración del día 5.

La anhidrasa carbónica y la fijación de fármacos a eritrocitos

La anhidrasa carbónica (CA) es una enzima dependiente de Zn (II), que cataliza la hidratación reversible del dióxido de carbono en hidrógeno carbonato y un protón. Desempeña un papel importante en el proceso fisiológico de intercambio de aniones y en el balance hídrico.

Esta enzima, que tiene un peso molecular de 29 kDa, ha sido durante mucho tiempo diana terapéutica para el tratamiento del glaucoma, adquiriendo ultimamente relevancia como diana potencial para el tratamiento de la obesidad y del cáncer.

En vertebrados, se han identificado al menos 14 isoformas de la CA con diferentes funciones fisiológicas y patológicas. Estas isoformas se han localizado en el citosol (CA I-III y VII) o en la mitocondria (CA V), mientras que otras son secretadas (CA VI) o están ligadas a la membrana con un dominio extracelular activo (CA IV, IX, XII y XIV).

Hay evidencias convincentes^[53] de la sobreexpresión de las isoformas CA IX y XII en el cáncer, que pueden promover el crecimiento del tumor por acidificación del medio extracelular. Además, su expresión está regulada positivamente en condiciones de hipoxia, que es común en los tumores sólidos. Se ha confirmado que el EMATE y su derivado bis-sulfamato son potentes inhibidores de la CA IX^[54]. El hallazgo de que los sulfamatos esteroideos y no esteroideos, originalmente desarrollados como inhibidores de la STS, puedan también actuar como inhibidores de la CA IX plantea la posibilidad de que la inhibición de la CA contribuya a la eficacia anticancerígena de esta clase de compuestos.

Se ha reportado que las sulfonamidas por lo general actúan como potentes inhibidores de la CA II^[55]. La similitud estructural entre el grupo sulfamato y el grupo sulfamida y la habilidad de sus formas mono aniónicas de coordinarse con el Zn II son los principales factores contribuyentes de la unión de irosustat a la CA II. De hecho, la cristalización de la CA II en presencia de irosustat^[56] demostró la unión reversible del grupo sulfamato de irosustat al átomo de zinc del sitio activo de la CA II.

Los estudios realizados con CA II proveniente de eritrocitos, revelaron que el irosustat es un potente inhibidor de la CA II con una IC₅₀ de 25 nM^[57], demostrando ser equipotente a la acetazolamida, inhibidor de referencia de la CA II.

Esta unión reversible de irosustat a la CA II del interior de los eritrocitos afecta a su comportamiento farmacocinético^[58]. La farmacocinética de los compuestos que se unen fuertemente a la CA II de los eritrocitos, depende de la magnitud de dicha unión: el aumento de la unión a CA II se espera que prolongue la semivida en sangre de estos compuestos, mientras que un desplazamiento de dicha unión se prevé que provoque una aceleración en la eliminación. Asimismo, el hecho de que los sulfamatos sean capaces de transitar por el hígado en el interior de los eritrocitos, los protege de la degradación y facilita que estos compuestos tengan una buena biodisponibilidad cuando se administran por vía oral.

Farmacocinética Poblacional

La farmacocinética poblacional puede ser definida como el estudio de la variabilidad inter e intraindividual en las concentraciones plasmáticas de los fármacos, así como de los parámetros farmacocinéticos que las condicionan, cuando se administran mediante regímenes estándar de dosificación a un grupo amplio de individuos o animales con características fisiopatológicas y clínicas definidas^[59].

Existen tres tipos básicos de parámetros farmacocinéticos poblacionales:

1. *Parámetros de efectos fijos*. Cuantifican el comportamiento farmacocinético medio de un fármaco en una población (por ejemplo, el aclaramiento medio poblacional o el volumen de distribución medio) y la relación entre los parámetros farmacocinéticos y factores fisiopatológicos (por ejemplo, los valores del coeficiente de regresión de la relación entre aclaramiento del fármaco y aclaramiento de creatinina).
2. *Parámetros de efectos aleatorios interindividuales*. Cuantifican la magnitud típica de la variabilidad interindividual de los parámetros farmacocinéticos, es decir, describen la distribución de las desviaciones de los valores de estos parámetros en los individuos con respecto a los valores medios de la población. Estos parámetros son las desviaciones estándar de dichas distribuciones.

3. *Parámetros de efectos aleatorios intraindividuales*. Cuantifican la magnitud típica de la variabilidad intraindividual (error residual) que incluye, fundamentalmente, la variabilidad cinética intraindividual, el error analítico y el error de especificación del modelo.

Existen numerosos métodos para estimar los parámetros farmacocinéticos poblacionales^[60]:

Método Simple o “Naive”

Consiste en tomar los datos de todos los individuos y fusionarlos como si de un único individuo se tratase. Sobre este “paciente poblacional” se estiman los parámetros farmacocinéticos mediante el método de mínimos cuadrados.

Este método no permite calcular los parámetros aleatorios inter e intraindividuales necesarios para caracterizar el comportamiento poblacional.

Se conocen dos variantes de este método: combinación simple de datos NPD (*Naive Pooled Data*) y el promedio simple de datos NAD (*Naive Averaging Data*).

Método en dos etapas (*Standard two-stage method*)

Se llama así porque el análisis de los datos se realiza en dos etapas: en la primera, se analizan de forma separada los datos de cada individuo, habitualmente ajustándolos a un modelo farmacocinético mediante regresión no lineal por mínimos cuadrados, con objeto de estimar los parámetros farmacocinéticos individuales.

En la segunda etapa, se efectúa un análisis estadístico de los parámetros farmacocinéticos individuales. Generalmente, las medias y las varianzas de los parámetros individuales se toman como estimaciones de los parámetros de efectos fijos y de los parámetros de efectos aleatorios interindividuales, respectivamente. Los parámetros de efectos fijos que relacionan las características de los pacientes con los parámetros cinéticos se suelen establecer mediante técnicas de regresión lineal.

Método de efectos mixtos

Están basados en el uso de modelos farmacostatísticos complejos cuya resolución se lleva a cabo en una única etapa. Su objetivo es buscar el conjunto de parámetros de efectos fijos y aleatorios que tengan mayor probabilidad de ocurrir (métodos de máxima probabilidad). Existen dos tipos de aproximaciones:

- *No paramétrica*: Pueden aplicarse a cualquier tipo de distribución. En este caso se habla de la probabilidad (función de densidad) de que una serie de valores de los parámetros estudiados expliquen el proceso que se pretende conocer. Se

distinguen dos métodos: método no paramétrico de máxima verosimilitud “NPML” y método no paramétrico de máxima expectación “NPEM”.

- *Paramétrica*: Asume que el conjunto de parámetros farmacocinéticos de la población en estudio se ajusta a una distribución conocida (normal o logaritmo normal) caracterizada por una media y sus correspondientes medidas de dispersión. El programa de ordenador más utilizado para el tratamiento de los datos es NONMEM.

NONMEM es un programa de ordenador escrito en lenguaje FORTRAN y diseñado para ajustar modelos estadísticos de regresión no lineal a los datos, con objeto de estimar la media y variancia poblacional de los parámetros farmacocinéticos y buscar aquellos factores que tienen influencia sobre los mismos. NONMEM es un acrónimo de “NONlinear Mixed Effects Model” (modelo no lineal de efectos mixtos).

Está basado en la estimación de la función de máxima verosimilitud (*maximum likelihood estimation*) y diseñado para ser acoplado a modelos estadísticos que incluyen efectos fijos y efectos debidos a la variabilidad inter e intraindividual (efectos aleatorios). Para la estimación de los parámetros poblacionales se requiere previamente el diseño de un modelo farmacostatístico. Este modelo incluye, a su vez, un modelo farmacocinético para predecir las concentraciones del fármaco en función de los parámetros farmacocinéticos individuales, un modelo de regresión para investigar la influencia de los efectos fijos sobre los parámetros fijos y por último, un modelo estadístico para calcular la variabilidad interindividual y residual.

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2 OBJETIVOS

El presente trabajo tiene por objetivo evaluar las características farmacocinéticas preclínicas de irosustat, un novedoso inhibidor de la STS con estructura no esteroideal. Para alcanzar este objetivo general, se investigan los diferentes procesos que intervienen en el paso del compuesto por el organismo mediante la realización de los estudios que se indican a continuación.

En primer lugar, se cuantifican de forma simultánea las concentraciones de irosustat en plasma y en sangre y se estudia el perfil farmacocinético de irosustat administrado a dosis únicas, por vía intravenosa y oral, en la rata y en el perro. Asimismo, se valora en estas dos especies y en ambas matrices biológicas, la linealidad farmacocinética tras la administración intravenosa y oral de dosis crecientes de irosustat. A continuación, para completar la caracterización del perfil farmacocinético de irosustat, se estudian las curvas concentración-tiempo obtenidas en la rata, el perro y el mono tras la administración oral de dosis repetidas de irosustat y se cuantifica la posible acumulación del compuesto.

En cuanto a las características farmacocinéticas se refiere, se evalúan la absorción, la distribución y la excreción de irosustat. La absorción, se valora mediante el cálculo de la biodisponibilidad de una suspensión de irosustat, preparada a tres niveles de concentración y administrada a la rata y al perro. Igualmente, se calcula en el perro la biodisponibilidad relativa de irosustat a partir de distintas formulaciones sólidas administradas por vía oral con el objeto de seleccionar la formulación más adecuada para iniciar los estudios clínicos en humanos. Además, se investiga en el perro el posible efecto de la presencia de comida en la velocidad y la magnitud de absorción de irosustat.

El proceso de distribución, se aborda en sus diferentes vertientes. Por un lado se valora la distribución de radioactividad en los distintos tejidos y órganos de rata mediante autoradiografía. Por otro lado, se estudia en rata, perro y mono la fijación saturable de irosustat al interior de los eritrocitos ya que este compuesto es un sulfamato no substituido y éstos se unen a la anhidrasa carbónica II del interior de los eritrocitos. Asimismo, se demuestra que el IDP 17619, uno de los productos del metabolismo y/o degradación de irosustat, no posee la capacidad de unirse a los eritrocitos debido a la pérdida del grupo sulfamato.

Respecto al proceso de eliminación, el estudio se centra en definir el perfil de excreción de irosustat y conocer su principal vía de excreción. Para ello, se administra irosustat marcado con carbono 14 por vía intravenosa y oral a la rata, al perro y al mono.

Finalmente, para tratar de integrar la información sobre los parámetros farmacocinéticos que rigen los procesos de absorción, distribución, metabolismo y

excreción de irosustat en una población, y la información acerca de su variabilidad inter e intraindividual, se utilizan las herramientas de la farmacocinética poblacional para construir un modelo no lineal de efectos mixtos en rata y en perro. Los objetivos específicos del modelo obtenido para cada especie se pueden resumir en los siguientes tres puntos: i) determinar los parámetros farmacocinéticos medios (típicos) de la población; ii) identificar y determinar la variabilidad interindividual e intraindividual en el comportamiento cinético de irosustat; iii) cuantificar la magnitud de la variabilidad residual no explicada.

3 PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo para alcanzar los objetivos de esta tesis doctoral se describe a continuación:

1. Revisión bibliográfica

En primer lugar, se realiza una búsqueda bibliográfica para determinar la necesidad y/o relevancia del desarrollo preclínico de irosustat para su futura aplicación para el tratamiento del cáncer de mama y otros cánceres hormonodependientes (próstata, ovario y endometrio). Para esto se valora la epidemiología de estos tipos de cáncer, los mecanismos implicados en su desarrollo, los tratamientos farmacológicos disponibles y las necesidades no cubiertas por las terapias actuales.

En segundo lugar, dado que el irosustat es un inhibidor irreversible de la sulfatasa esteroideal, se recoge información sobre este enzima: su estructura, su distribución en el organismo, su relación con los cánceres hormonodependientes, mecanismos de inhibición y ejemplos de otras sustancias inhibitoras del mismo.

En tercer lugar, se compila información sobre la influencia que tiene la unión a eritrocitos en el comportamiento farmacocinético de un producto y cuales podían ser los lugares de unión en los eritrocitos.

Finalmente, antes de iniciar la fase experimental *in vivo* se recoge información sobre cuales son las especies animales mas adecuadas para iniciar el desarrollo preclínico del producto y sobre los aspectos éticos relacionados con la utilización de animales para experimentación.

2. Investigaciones previas/paralelas

Se recopila información sobre las investigaciones realizadas previamente al desarrollo de esta tesis doctoral y que son aspectos clave para el correcto planteamiento, concepción y ejecución de la misma.

- Evaluación de las principales propiedades fisicoquímicas de irosustat
- Revisión de la metodología analítica existente y validación del método de cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) para la cuantificación de irosustat y uno de sus metabolitos y/o productos de degradación (IDP 17619) en muestras de plasma y sangre, tanto de rata como de perro
- Unión de irosustat a proteínas plasmáticas
- Estudios de metabolismo *in vitro/in vivo*

3. Fase experimental: Administración del producto a distintas especies animales y obtención de muestras biológicas

Para alcanzar los objetivos descritos en la sección 2, los estudios *in vivo* a realizar durante el desarrollo de la presente tesis doctoral se agrupan en cuatro bloques: perfil farmacocinético, características de absorción, propiedades de distribución y vías de excreción de irosustat.

- Perfil farmacocinético en plasma y sangre

Valoración de las curvas concentración-tiempo obtenidas tras la administración intravenosa y oral de dosis crecientes de irosustat, cálculo de los parámetros farmacocinéticos derivados e investigación de la proporcionalidad de dosis.

Estudio de las curvas concentración-tiempo obtenidas tras la administración oral de dosis repetidas de irosustat a la rata, al perro y al mono.

Determinación de la exposición de uno de los productos de metabolismo y/o degradación (IDP 17619) con respecto a irosustat.

- Absorción

Evaluación de las características de absorción de irosustat tras su administración por vía oral, tanto en rata como en perro.

Valoración de la biodisponibilidad de irosustat a partir de distintas formulaciones administradas por vía oral.

Estudio del efecto de la comida en la velocidad y la magnitud de absorción de irosustat en el perro.

- Distribución

Cuantificación de la distribución de radioactividad en los distintos tejidos y órganos de rata mediante autoradiografía.

Investigación de la distribución de irosustat a través de su unión reversible a eritrocitos.

- Excreción

Caracterización del perfil de excreción de irosustat, y cálculo de los principales parámetros farmacocinéticos de eliminación, tras su administración intravenosa a distintas dosis.

Administración de irosustat marcado con carbono 14 para definir las principales vías de excreción del producto en rata, perro y mono.

4. Tratamiento de datos

El tratamiento farmacocinético de los datos consiste en:

- Análisis farmacocinético no compartimental para obtener los principales parámetros farmacocinéticos de irosustat.
- Análisis farmacocinético poblacional: desarrollo de un modelo no lineal de efectos mixtos que explique adecuadamente los niveles de irosustat en plasma y sangre y su variabilidad tras la administración intravenosa y oral del producto a diferentes dosis en el perro y la rata.

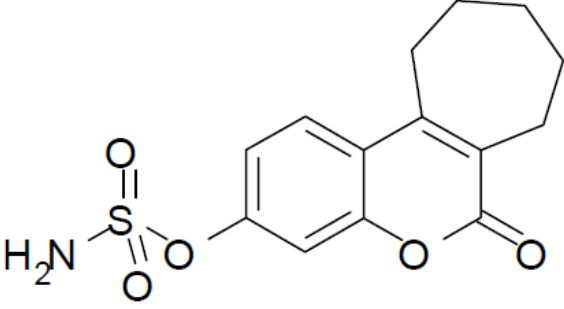
5. Discusión y Conclusiones

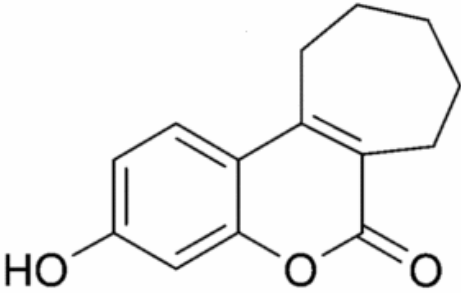
MATERIAL Y MÉTODOS

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Propiedades Físico-Químicas y Biofarmacéuticas de Irosustat

Las propiedades fisico-químicas y biofarmacéuticas de irosustat son las siguientes:

USAN	irosustat			
Número de Registro CAS	288628-05-7			
Nombre Químico	6-oxo-8,9,10,11-tetrahydro-7H-ciclohepta-[c][1]benzopian-3-o-sulfamato			
Fórmula Molecular	C ₁₄ H ₁₅ NO ₅ S			
Fórmula Estructural				
Otros Nombres	BN83495, STX-64, 667-coumate			
Proveedor	Panchim			
Aspecto	Polvo blanco cristalino			
Peso Molecular	309.34 g/mol			
pK_a	pK _a in MeOH/H ₂ O (1:1): 9.1			
Espectro de Absorción UV	Irosustat	Lote 1	Lote 2	Lote 3
		280	280	280
	λ max (nm)	290	290	290
		310	310	310
	Coeficiente de absorción molar a 290 nmε (mol ⁻¹ ·dm ³ ·cm ⁻¹)	10900	10800	10769
Punto de Fusión	169-171°C			

Forma Cristalina	Se conocen cinco formas cristalinas de irosustat, de las cuales tres son polimorfos (formas I, II y III) y las otras dos son solvatos. El irosustat se fabrica como forma cristalina I que es la termodinámicamente más estable. Su polimorfismo se controla mediante la Difracción de Rayos X de Polvo (DRXP).	
Estabilidad	Materia Prima	Un almacenaje prolongado (> 6 meses) a -20°C no produjo cantidades significativas de IDP 17619
	En solución tras 5 días (análisis UV)	En PEG300: el contenido de IDP 17619 fue de 4.5% En N-metil pirrolidona: el contenido de IDP 17619 fue de 19.2% En DMSO: el contenido de IDP 17619 fue de 37.2%
Almacenaje	Congelar a -20°C o a -80°C.	
Manipulación	Manipular como categoría 4 del sistema de clasificación SafeBridge® [61, 62].	
Principal producto de degradación por hidrólisis	IDP 17619 , también conocido como 667-coumarin	
		
	Peso Molecular: 230.3 g/mol pK _a in MeOH/H ₂ O (1:1): 8.9	
Solubilidad	Solvente	mg/mL
	Agua	Insoluble
	Aceite de coco fraccionado	<10
	Acetona	30
	Acetonitrilo	23
	Cloroformo	<<3
	Dimetil sulfóxido (DMSO)	100
	Etil acetato	10.8
	Hexano	<<3
	Isopropanol	61
	N-metil pirrolidona	61
	Polietilenglicol 300	10
	Polietilenglicol 400	38
	Soluphor P	234
	Tetrahidrofurano (THF)	10
	Triacetina	<11

Permeabilidad	
Molécula	Constante de Permeabilidad en Células Caco-2 ($10^{-6} \cdot \text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)
irosustat	11.45
Referencias: alta permeabilidad (testosterona: 13.31), baja permeabilidad (manitol: 1.26)	
BCS	Clase II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) ^[63, 64] : baja solubilidad en un solvente acuoso a valores de pH entre 1.2 y 7.5 y alta permeabilidad .

4.2 Formulaciones

Las formulaciones utilizadas para llevar a cabo los diferentes estudios para caracterizar la farmacocinética preclínica de irosustat son:

- solución de irosustat en Soluphor P:PEG 400:agua (36:24:40)
- suspensión de irosustat en 1% de metilcelulosa y un 2% de lauril sulfato sódico
- suspensión de irosustat en 1% de metilcelulosa
- seis lotes de cápsulas (P15049, P15050, P60087, P15345, P15346 y RBNX)
- cuatro lotes de comprimidos (P15492, P15573, P15574 y P15579)

4.2.1 Reactivos

- Soluphor® P (BASF, ref. 30035117)
- PEG 400 (Merck, ref. 8170031000)
- Agua estéril para preparaciones inyectables (B. Braun)
- Metilcelulosa (Sigma-Aldrich, ref. M0512)
- Lauril sulfato sódico (Merck, ref. 8170341000)

4.2.2 Solución de Irosustat en Soluphor P:PEG 400:agua (36:24:40)

La solución de irosustat se prepara el mismo día de administración. Para ello, se pesa el irosustat micronizado a 5 μm (la cantidad adecuada según la concentración que se quiera alcanzar) y se disuelve de forma secuencial en Soluphor P, PEG 400 y agua hasta alcanzar una relación final de 36:24:40. Es muy importante asegurar que el irosustat está bien disuelto en cada solvente antes de añadir el siguiente.

La solubilidad del irosustat en Soluphor P:PEG 400:agua (36:24:40) es de 35 mg/ml.

Esta solución es estable durante 4 horas a temperatura ambiente.

4.2.3 *Suspensión de Irosustat en un 1% (m/v) de metilcelulosa y un 2% (m/v) de lauril sulfato sódico*

- A) Preparación del vehículo (el día anterior a la administración)
- Se suspende un 1% de metilcelulosa con el 80% de volumen de agua, bajo agitación magnética
 - Se decanta en un vaso con un 2% de lauril sulfato sódico. Se añade el resto de agua
 - Se mantiene en el agitador magnético hasta el día siguiente
- B) Preparación de la suspensión
- Se pesa el irosustat micronizado a 5 μm
 - Se añade el volumen adecuado de vehículo
 - Se mantiene la suspensión en agitación magnética hasta el momento de cargar las jeringas que se utilizan para administrar el compuesto a los animales. Antes de realizar esta operación, es importante verificar que la suspensión es totalmente homogénea.

Esta suspensión es estable durante 4 horas a temperatura ambiente.

4.2.4 *Suspensión de Irosustat en un 1% (m/v) de metilcelulosa*

La preparación de esta suspensión se realiza tal y como se indica en la sección 4.2.3 pero sin añadir el lauril sulfato sódico.

Esta suspensión es estable durante 4 horas a temperatura ambiente.

4.2.5 *Cápsulas*

Se ensayaron seis lotes de cápsulas con principio activo de diferente tamaño de partícula y/o diferentes formulaciones, preparados en Beaufour Ipsen Industrie (Dreux, Francia). La composición cuantitativa de estas cápsulas se detalla a continuación:

- Cápsulas P15049 y P15050: estas cápsulas contenían únicamente principio activo, 45 mg de irosustat micronizado, con dos distribuciones de tamaño de partícula diferente centradas en 5 y 15 μm , respectivamente.
- Cápsulas P60087, P15345, P15346 y RBNX: La composición cuantitativa de estos lotes se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4 Composición Cuantitativa los Lotes de Cápsulas con Irosustat.

Composición cuantitativa unitaria (mg)					
Componente	Función	Lote de cápsulas			
		P60087	P15345	P15346	RBNX
Irosustat micronizado (tamaño de partícula)	Principio activo	10.0 (5µm)	40.0 (3µm)	40.0 (9µm)	40.0 (5µm)
Manitol (atomizado)	Diluyente	44.0	176.0	176.0	176.0
Lactosa monohidrato (atomizada)	Diluyente	82.0	328.0	328.0	328.0
Sílice coloidal anhidra	Deslizante	2.0	8.0	8.0	8.0
Estearato de magnesio	Lubricante	4.0	16.0	16.0	16.0
Total		142.0	568.0	568.0	568.0

El procedimiento de elaboración de las cápsulas fue el siguiente:

1. Tamización de todos los componentes, excepto el lubricante, a través de un tamiz de 1 mm de luz de malla.
2. Premezcla del principio activo, irosustat, con sílice coloidal anhidra (Aerosil® 130). Se estima necesaria la inclusión de un proceso de premezcla, en la fabricación de las cápsulas, a fin de paliar los inconvenientes tecnológicos que representa la baja dosificación del principio activo y su reducido tamaño de partícula (micronizado). Con la premezcla de principio activo y agente deslizante se persigue mejorar el comportamiento reológico del polvo micronizado e inhibir la agregación de partículas de pequeño tamaño, mediada por la generación de cargas electrostáticas, logrando así una dosificación homogénea del irosustat en cápsulas.
3. Adición de los diluyentes sobre la premezcla del principio activo, y mezcla de los mismos, en un mezclador por difusión, durante 30 minutos.
4. En base a las características físicas el principio activo, los diluyentes seleccionados para ser incluidos en la formulación, manitol atomizado (Pearlitol® 100 SD) y lactosa atomizada (Lactopress® SD), son excipientes solubles que presentan unas características de flujo excelentes, por lo que favorecen el llenado y la dispersión de la cápsula.
5. Lubricación de la mezcla homogénea obtenida en el paso 3. En el mezclador por difusión que contiene la mezcla de principio activo, deslizante y diluyente/s, se incorpora el lubricante (estearato de magnesio) previamente tamizado por un tamiz provisto de malla de 0,5 mm de luz, y el conjunto se mezcla durante 5 minutos.
6. La mezcla homogénea de polvo lubricado se dosifica en cápsulas de gelatina dura (Coni-Snap®, Capsugel):
 - a. En la elaboración del lote P60087 se emplean cápsulas del número 4 que se dosifican a un peso objetivo de 142 mg.
 - b. En la elaboración de los lotes P15345, P15346 y RBNX, se emplearon capsulas del tamaño 00, que se dosificaron a un peso objetivo de 568 mg.

Tras la elaboración, las cápsulas se conservan refrigeradas a una temperatura de $5 \pm 3^\circ \text{C}$ durante un máximo de seis meses.

4.2.6 *Comprimidos*

Se ensayaron cuatro lotes de comprimidos, con diferentes formulaciones, que fueron elaborados por Beaufour Ipsen Industrie (Dreux, Francia). La composición cuantitativa de estos comprimidos se encuentra detallada en la Tabla 5.

Tabla 5 Composición Cantitativas de los Lotes de los Comprimidos con Irosustat.

Composición cuantitativa unitaria (mg)					
Componente	Función	Lote de comprimidos			
		P15492	P15573	P15574	P15579
Fase intragranular					
Irosustat (tamaño de partícula 5 μm)	Principio activo	20.0	20.0	20.0	20.0
Almidón glicolato sódico	Disgregante	-	-	2.0	-
Lactosa monohidrato	Diluyente	40.0	40.0	33.3	46.7
Celulosa microcristalina	Diluyente	65.6	61.4	48.5	-
Almidón pregelatinizado	Aglutinante	-	-	-	46.7
Polivinilpirrolidona	Aglutinante	-	5.3	5.3	-
Copovidona	Aglutinante	5.6	-	-	-
Fase extragranular					
Celulosa microcristalina	Diluyente	-	-	-	16.6
Almidón pregelatinizado	Diluyente	-	-	20.0	-
Almidón glicolato sódico	Disgregante	-	4.0	2.0	-
Sílice coloidal anhidra	Deslizante	1.1	1.3	1.1	1.3
Estearato de magnesio	Lubricante	1.0	1.3	1.1	2.0

La elaboración de los comprimidos se llevó a cabo mediante un proceso de granulación por vía húmeda según se detalla a continuación:

1. Incorporar en el granulador/secador de alta velocidad el principio activo, irosustat, y lactosa monohidrato. Asimismo se incorporan, en caso de estar incluidos en la composición de la fase intragranular, celulosa microcristalina y almidón glicolato sódico (Explotab®).
2. Granular la mezcla de polvos del paso 1 con una dispersión acuosa del agente aglutinante definido en la composición de la fase intragranular de cada lote, almidón de maíz parcialmente gelatinizado (Starch 1500), polivinilpirrolidona o copovidona (Kollidon® VA 64).
3. Secar el granulado obtenido en el paso 2 en el mismo granulador.
4. Calibrar el granulado seco por un tamiz provisto de malla de 0.5 mm de luz.

5. Incorporar en un mezclador por difusión, el granulado calibrado y todos los excipientes extragranulares, excepto el lubricante, previamente tamizados por un tamiz provisto de malla de 0.5 mm de luz. Mezclar durante 30 minutos.
6. Incorporar sobre la mezcla del punto 5 el lubricante (estearato de magnesio) previamente tamizado por un tamiz provisto de malla de 0.5 mm de luz. Mezclar durante 5 minutos.
7. Comprimir el granulado lubricado obtenido en el paso 6, en máquina de comprimir, a un peso objetivo de 133.3 mg.

Tras la elaboración, los comprimidos se conservan refrigerados a una temperatura de $5 \pm 3^\circ \text{C}$ durante un máximo de seis meses.

4.3 Animales

4.3.1 *Características Generales*

Para llevar a cabo los diferentes estudios se utilizaron ratas Sprague-Dawley, ratas Lister Hooded, perros *beagle* y monos *cynomolgus*. Sus características generales, así como el número y tipo de estudio en que fueron utilizados, se resumen en la Tabla 6.

4.3.2 *Identificación*

En todos los casos los animales se identificaron de forma unívoca, como se indica a continuación:

- Ratas: un número escrito en la cola con un rotulador indeleble y no tóxico.
- Perros: un número tatuado en el lado interior de la oreja o un microchip.
- Monos: un número tatuado en el muslo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 6 Características Generales de los Animales Administrados con Irosustat.

Nº de Estudio	Tipo de estudio	Especie Animal	Raza	Nº Animales/ Sexo	Peso	Edad	Estabulario	Proveedor
R1	ADME	Rata	Sprague-Dawley	22M / 22H	220 - 370 g	7-11 semanas	Charles River (Edinburgo, Escocia)	Charles River Limited (Gran Bretaña)
R2	QWBA	Rata	Sprague-Dawley Lister-Hooded	21M 5M	210 - 280 g 170 - 190 g	7-8 semanas 7-8 semanas	Charles River (Edinburgo, Escocia)	Charles River Limited (Gran Bretaña)
R3	PK	Rata	Sprague-Dawley	72 M	180 - 260 g	6-7 semanas	Ipsen Pharma (Barcelona, España)	Charles River Laboratories (España)
R4	TK 1 mes	Rata	Sprague-Dawley	18 M / 18H	170 - 200 g	5-6 semanas	CIT (Evreux, Francia)	Charles River Laboratories (Francia)
R5	TK 6 meses	Rata	Sprague-Dawley	24 M / 24H	150 - 200 g	5-6 semanas	CIT (Evreux, Francia)	Charles River Laboratories (Francia)
P1	PK	Perro	beagle	6 H	10 - 21 kg	2 años	Harlan Laboratories (Barcelona, España)	R.C. Hartelust BV (Holanda)
P2	PK	Perro	beagle	12 H	9 - 15 kg	2-3 años	Harlan Laboratories (Barcelona, España)	R.C. Hartelust BV (Holanda), Harlan Laboratories GmbH (Alemania)
P3	PK	Perro	beagle	6 H	9 - 15 kg	2-3 años	Harlan Laboratories (Barcelona, España)	R.C. Hartelust BV (Holanda), Harlan Laboratories GmbH (Alemania)
P4	ADME	Perro	beagle	1M / 1H	21.7 kg (M), 19.6 kg (H)	3 años	Harlan Laboratories (Barcelona, España)	R.C. Hartelust BV (Holanda)
P5	PK	Perro	beagle	6 H	11 - 15 kg	2-3 años	Harlan Laboratories (Barcelona, España)	R.C. Hartelust BV (Holanda), Harlan Laboratories GmbH (Alemania)
P6	PK	Perro	beagle	9 H	11 - 16 kg	3-5 años	Harlan Laboratories (Barcelona, España)	Hartelust & Co (Holanda), Harlan Laboratories GmbH (Alemania)
P7	PK	Perro	beagle	12 H	9 - 27 kg	3-5 años	Harlan Laboratories (Barcelona, España)	R.C. Hartelust BV (Holanda), Harlan Laboratories GmbH (Alemania)
P8	PK	Perro	beagle	6 M	11 - 18 kg	2-3 años	Ipsen Pharma (Barcelona, España)	Harlan Laboratories GmbH (Alemania), Harlan Interfauna Ibérica (España)
P9	TK 1 mes	Perro	beagle	9 M / 9 H	7 - 9 kg	1 año	CIT (Evreux, Francia)	Marshall Farms (EEUU)
P10	TK 6 meses	Perro	beagle	14 M / 16 H	7 - 10 kg	1 año	CIT (Evreux, Francia)	Marshall Farms (EEUU)
M1	ADME	Mono	cynomolgus	1M / 1H	6.6 kg (M), 2.7 kg (H)	6 años	Harlan Laboratories (Barcelona, España)	R.C. Hartelust BV (Holanda), Centre de Recherches Primatologiques (Francia)
M2	PK	Mono	cynomolgus	1M / 1H	2.9 kg (M), 2.3 kg (H)	2 años	CIT (Evreux, Francia)	Bioprim (Francia)

PK: farmacocinético; TK: toxicocinético; QWBA: autoradiografía cuantitativa de cuerpo entero; ADME: absorción y disposición; M: macho; H: hembra

4.3.3 *Condiciones de Estabulación*

Las ratas se alojaron en jaulas transparentes de policarbonato, generalmente en grupos de tres animales. En los estudios R1 y R2, las ratas se estabularon individualmente en jaulas de metabolismo.

Los perros y los monos se colocaron individualmente en jaulas de acero inoxidable. En el caso de los perros, pasadas las doce primeras horas de la fase experimental, se trasladaron a jaulas más grandes en grupos de dos.

Las condiciones ambientales, tanto en las salas de residencia como de los laboratorios, se resumen a continuación:

- Temperatura: 19-23°C (roedores) y 18-22°C (no roedores)
- Humedad relativa: 45-65%
- Ciclo de luz/oscuridad: 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad cada 24 horas.

Las condiciones ambientales fueron monitorizadas de forma continua y se establecieron sistemas de alarma en caso de producirse variaciones importantes de estos límites.

4.3.4 *Dieta*

Las ratas tuvieron acceso libre a pienso controlado SAFE R04C-25® (Scientific Animal Food and Engineering, Francia), o similar.

Los perros recibieron diariamente 400 g de pienso controlado Tekland® 2021 (Harland Tekland Europe, Gran Bretaña) o similar. Excepcionalmente, para evaluar la interacción de irosustat con la comida (estudio P8), los perros fueron alimentados con 400 g diarios de pienso controlado alto en grasas TD 73427 (Harland Tekland Europe, Gran Bretaña).

A los monos se les ofreció diariamente 400 g de pienso controlado SAFE 107C® (Scientific Animal Food and Engineering, Francia) o similar.

El agua fue analizada periódicamente y ofrecida *ad libitum* tanto a roedores como a no roedores.

En el caso de administración oral de irosustat, los animales tuvieron un periodo de ayuno de aproximadamente 12 horas.

4.3.5 *Supervisión Clínica*

Todos los animales fueron sometidos a una cuarentena o periodo de observación de al menos 5 días para las ratas, 21 días para los perros y 28 días para los monos, y un veterinario les realizó una inspección detallada antes de ser aceptados para experimentación.

Durante la fase experimental, los animales fueron observados diariamente para verificar su bienestar y se controló periódicamente su peso corporal.

4.3.6 *Análisis Hematológicos y Bioquímicos*

En el caso de los perros y los monos, se realizaron análisis hematológicos y bioquímicos, antes de iniciar la fase experimental y a su término.

Los análisis hematológicos incluyeron las siguientes determinaciones: hematocrito, hemoglobina, leucocitos totales, recuento diferencial de leucocitos, plaquetas, eritrocitos, volumen corpuscular medio y hemoglobina corpuscular media.

Los análisis bioquímicos incluyeron: glucosa, urea, creatinina, aspartato transaminasa (SGOT/AST), alanino aminotransferasa (SGPT/ALT), bilirrubina, proteínas totales, colesterol total, sodio, potasio y cloro.

4.3.7 *Normativa*

Todos los estudios efectuados durante esta investigación se realizaron de acuerdo con la directiva europea 86/609/CEE del 24 de noviembre de 1986, para la armonización de las leyes y procedimientos administrativos relacionadas con la protección de los animales destinados a la experimentación u otros fines científicos.

Además, antes de iniciar cada estudio, el protocolo correspondiente fue revisado por un Comité Ético de Experimentación Animal para asegurar que:

- el uso de animales estuviese plenamente justificado
- se tuvieran en cuenta todas las posibilidades de reducción, refinamiento y reemplazo^[65]
- se pusieran todos los medios para asegurar el bienestar animal

Todos los estudios realizados en esta investigación recibieron la aprobación del Comité Ético del centro donde se llevaron a cabo.

4.4 **Diseño Experimental de los Estudios Farmacocinéticos en Animales**

4.4.1 *Administración de Dosis Únicas de Irosustat*

4.4.1.1 *Rata*

1) *Dosis Únicas de ¹⁴C-Irosustat (ADME): Estudio R1*

Formulación de ¹⁴C-irosustat

- *Solución de ¹⁴C-irosustat:*

Solución de DMA y ¹⁴C-irosustat (peso molecular: 313.3 g/mol; actividad específica: 123 mCi/mmol; pureza radioquímica: 98.2%; concentración radioactiva: 1 mCi/ml; lote CFQ14345, Amersham Biosciences, Gran Bretaña).

- *Solución de irosustat:*

Solución de irosustat (lote SGA508M1, Panchim) en Soluphor P, PEG 400 y agua (36:24:40).

- *Solución de Administración:*

La cantidad adecuada de la solución de ^{14}C -irosustat se mezcló con la solución de irosustat (producto frío) para alcanzar la dosis deseada.

Dosis y Vías de Administración

Se administró por vía intravenosa y oral una solución de ^{14}C -irosustat a una dosis de 3 mg/kg (equivalente a 100 $\mu\text{Ci/kg}$). El volumen de administración fue de 0.4 mL/kg.

La administración intravenosa se realizó a través de la vena de la cola mediante un bolus. La administración oral se realizó mediante una sonda gástrica.

Los animales estuvieron en ayuno desde la noche anterior a la administración (15-16 horas) hasta 8 horas después de esta.

El esquema de administración se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7 Administración de ^{14}C -Irosustat a Ratas.

Fase	Evaluación	Vía	Nº Animales y Sexo	Dosis Teórica (mg/kg)	Dosis Real (mg/kg)	Dosis Radioactiva Teórica ($\mu\text{Ci/kg}$)	Dosis Radioactiva Real ($\mu\text{Ci/kg}$)
1	Excreción en Orina y Heces (Ratas Intactas)	I.V.	3 M / 3 H	3	2.7	100	81.9
		Oral	3 M / 3 H	3	3.3	100	102.3
2	Excreción en Orina, Heces y Bilis (Ratas con Canula Biliar)	I.V.	2 M / 2 H	3	3.0	100	109.6
		Oral	2 M / 2 H	3	3.5	100	128.8
3	Radioactividad en Plasma y Sangre	I.V.	6 M / 6 H	3	2.7	100	83.5
		Oral	6 M / 6 H	3	3.0	100	91.3

M: Macho; H: Hembra

Para la determinación de la dosis radioactiva real, las jeringas de administración se pesaron antes y después de la administración, y se determinó por triplicado la radioactividad presente en dos alícuotas de la solución de administración.

Muestras Biológicas

- *Fase 1:*

La orina y las heces se recogieron de forma separada en contenedores refrigerados con hielo seco a los intervalos descritos a continuación.

Orina: 0-6h, 6-24h, 24-48h, 48-72h, 72-96h, 96-120h, 120-144h y 144-168h.

Heces: 0-12h, 12-24h, 24-48h, 48-72h, 72-96h, 96-120h, 120-144h y 144-168h.

Las jaulas se lavaron con agua al finalizar cada período de recolección de heces.

Al final del período de recolección de 168 horas, las ratas se sacrificaron y su tracto gastrointestinal y carcasa se guardaron congelados de forma separada.

- *Fase 2:*

La orina, las heces y la bilis se recogieron de forma separada en contenedores refrigerados con hielo seco a los intervalos descritos a continuación.

Orina y heces: 0-24h y 24-48h

Bilis: 0-0.5h, 0.5-1h, 1-2h, 2-4h, 4-8h, 8-24h y 24-48h.

Las jaulas se lavaron con agua al finalizar cada período de recolección de heces.

Al final del período de recolección de 48 horas, las ratas se sacrificaron y su tracto gastrointestinal y carcasa se guardaron congelados de forma separada.

- *Fase 3:*

La obtención de muestras de sangre, tras la administración intravenosa y oral de ^{14}C -irosustat, se realizó a los siguientes tiempos: 0.25, 1, 3, 6, 10, 24, 48, 72, 120 y 168 horas.

En grupos alternativos de 3 animales (*sparse sampling*), se obtuvieron muestras de 0.4 ml de sangre a través de la vena de la cola y se colocaron en tubos con heparina de litio. Se determinó el hematocrito y se separaron dos alícuotas de 25 μl de sangre para la determinación de radioactividad en sangre. Posteriormente, el resto de sangre mantenido en un baño de agua-hielo, se centrifugó a 1600g a 4°C durante 20 minutos. El plasma sobrenadante se separó en dos alícuotas de 25 μl para la determinación de radioactividad.

En todos los casos, las muestras que no fueron analizadas inmediatamente se guardaron congeladas a $-80\pm 10^\circ\text{C}$. El procedimiento para su análisis se detalla en la sección 4.7.1.1.

2) Dosis Únicas de ^{14}C -Irosustat (Autoradiografía): Estudio R2

Formulación de ^{14}C -irosustat

- *Solución de ^{14}C -irosustat:*

Solución de DMA y ^{14}C -irosustat (peso molecular: 313.3 g/mol; actividad específica: 123 mCi/mmol; pureza radioquímica: 98.2%; concentración radioactiva: 1 mCi/ml; lote CFQ14345, Amersham Biosciences, Gran Bretaña).

- *Solución de irosustat:*

Solución de irosustat (lote SGA508M1, Panchim) en Soluphor P, PEG 400 y agua (36:24:40).

- *Solución de Administración:*

La cantidad adecuada de la solución de ^{14}C -irosustat se mezcla con la solución de irosustat (producto frío) para alcanzar la dosis deseada.

Dosis y Vías de Administración

Se administró por vía oral mediante sonda gástrica una solución de ^{14}C -irosustat a una dosis de 3 mg/kg (equivalente a 100 $\mu\text{Ci/kg}$). El volumen de administración fue de 0.4 mL/kg.

Los animales estuvieron en ayuno desde la noche anterior a la administración (15-16 horas) hasta 8 horas después de esta.

El esquema de administración se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8 Administración de ^{14}C -Irosustat a Ratas.

Grupo	Vía	Nº Animales y Sexo	Dosis Teórica (mg/kg)	Dosis Real (mg/kg)	Dosis Radioactiva Teórica ($\mu\text{Ci/kg}$)	Dosis Radioactiva Real ($\mu\text{Ci/kg}$)
Ratas Albinas	Oral	21 M	3	3.4	100	124.0
Ratas Pigmentadas	Oral	5 M	3	3.5	100	127.0

M: machos

Para la determinación de la dosis radioactiva real, las jeringas de administración se pesaron antes y después de la administración, y se determinó por triplicado la radioactividad presente en dos alícuotas de la solución de administración.

Muestras Biológicas

A cada uno de los siguientes puntos de muestreo: 1, 3, 6, 24, 72, 120 y 168 horas post administración, se sacrificaron tres ratas albinas mediante narcosis con CO_2 .

Del grupo de ratas pigmentadas, se sacrificó una rata mediante narcosis con CO_2 en cada uno de los siguientes puntos de muestreo: 1, 24, 72, 168 y 336 horas post administración.

Inmediatamente tras el sacrificio, la carcasa fue congelada por inmersión durante 30 minutos en una mezcla de hielo seco (CO_2 sólido) y hexano. La carcasa congelada se situó en un bloque de carboximetilcelulosa que fue almacenado a -20°C hasta el momento de análisis.

Para el análisis por autoradiografía, se tomaron las carcacas congeladas a -20°C y se realizaron secciones sagitales de 30 μm de grueso con un criomicrotomo (Leica GmbH). A continuación las secciones fueron liofilizadas y mantenidas a temperatura ambiente para su lectura mediante la técnica de Phosphor Imaging.

El procedimiento para el análisis de las muestras se detalla en la sección 4.7.1.2.

3) Evaluación de la proporcionalidad de dosis: Estudio R3

La evaluación de la proporcionalidad de dosis se realizó en setenta y dos ratas macho Sprague-Dawley (seis grupos de doce ratas cada uno), tal y como se resume en la Tabla 9.

Tabla 9 Diseño del Estudio en Rata para Evaluación de la Proporcionalidad de Dosis.

Nº Animales y Sexo	Dosis (mg/kg)	Vía	Formulación	Conc. (mg/ml)	Volumen (ml/kg)
12M	0.3	IV	Solución [Soluphor P:PEG400:agua (36:24:40)]	0.15	2
12M	3	IV	Solución [Soluphor P:PEG400:agua (36:24:40)]	1.5	2
12M	30	IV	Solución [Soluphor P:PEG400:agua (36:24:40)]	15	2
12M	3	Oral	Suspensión [1% MC]	0.75	4
12M	30	Oral	Suspensión [1% MC]	7.5	4
12M	300	Oral	Suspensión [1% MC]	75	4

M: macho

La administración oral se realizó mediante sonda gástrica y la administración intravenosa mediante un bolus a través de la vena yugular. La preparación de las formulaciones se describe en las secciones 4.2.2 y 4.2.4.

Tras cada administración, la obtención de muestras de sangre se realizó siguiendo la aproximación del muestreo disperso (*sparse sampling*) que en este caso consistió en que los valores de concentración de cada tiempo de muestreo provienen de tres ratas distintas (n=3) y cada rata contribuye en tres puntos de muestreo. En la siguiente tabla se adjunta a modo de ejemplo el esquema de obtención de muestras en el primer grupo de doce ratas.

Tabla 10 Obtención de Muestras de Sangre en el Grupo de Ratas Tratadas con Irosustat a la Dosis Intravenosa de 0.3 mg/kg.

Rata Nº	Tiempos de Muestreo											
	0	1 min	10 min	30 min	1 h	3 h	5 h	8 h	12 h	22 h	30 h	48 h
1 - 3	X				X				X			
4 - 6		X				X				X		
7 - 9			X				X				X	
10 - 12				X				X				X

Los tiempos de obtención de muestra de sangre fueron los siguientes:

Administración intravenosa: pre-dosis (tiempo 0); 1, 10, 30 minutos; 1, 3, 5, 8, 12, 22, 30 y 48 horas.

Administración oral: pre-dosis (tiempo 0); 5, 20, 40 minutos; 1, 3, 5, 8, 12, 22, 30 y 48 horas.

La manipulación de las muestras se realizó como se describe en la sección 4.5.

Se cuantificó el irosustat y el IDP 17619 en plasma y sangre con el método de espectrometría de masas descrito en la sección 4.6.

El análisis farmacocinético de los datos mediante aproximación no compartimental y poblacional se detalla en las secciones 4.8 y 4.9, respectivamente. El análisis estadístico se resume en la sección 4.10.2.

4.4.1.2 Perro

Los estudios realizados en perro a dosis única, así como la información obtenida a partir de cada uno de ellos, se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11 Estudios de Irosustat a Dosis Única Realizados en Perro.

Estudio	Nº Animales y Sexo	Dosis	Vía	Formulación	Analito/s	Matriz	Información
P1	6H	45 mg	Oral	Cápsula P15049			
		45 mg	Oral	Cápsula P15050			
P2	12H	40 mg	Oral	Cápsula P60087	irosustat	Plasma	Comprobar el efecto del tamaño de partícula del irosustat en la magnitud de su absorción.
P3	6H	40 mg	Oral	Cápsula P15345			
		40 mg	Oral	Cápsula P15346			
P4	1M / 1H	3 m/kg*	IV	Solución [Soluphor P:PEG400:agua (36:24:40)]	Radioactividad total	Plasma, Sangre, Orina, Heces	Evaluar la absorción y disposición del irosustat
		3 m/kg*	Oral	Solución [Soluphor P:PEG400:agua (36:24:40)]			
P5	6H	400 mg/kg	Oral	Suspensión [1% MC + 2% LSS]	irosustat	Plasma	Comprobar si la retirada del lauril sulfato sódico de la suspensión afecta a la magnitud de absorción del irosustat.
		400 mg/kg	Oral	Suspensión [1% MC]			
P6	9H	0.1 mg/kg	IV	Solución [Soluphor P:PEG400:agua (36:24:40)]	irosustat, IDP 17619	Plasma, Sangre	Perfil farmacocinético a dosis únicas, proporcionalidad de dosis, biodisponibilidad, parámetros de absorción, distribución y eliminación.
		0.4 mg/kg	IV	Solución [Soluphor P:PEG400:agua (36:24:40)]			
		2 mg/kg	IV	Solución [Soluphor P:PEG400:agua (36:24:40)]			
		0.25 mg/kg	Oral	Suspensión [1% MC]			
		2.5 mg/kg	Oral	Suspensión [1% MC]			
P7	12H	25 mg/kg	Oral	Suspensión [1% MC]	irosustat	Plasma	Selección de una formulación para la Fase 1 en humanos
		40 mg	Oral	Cápsula RBNX			
		40 mg	Oral	Comprimido P15492			
		40 mg	Oral	Comprimido P15573			
		40 mg	Oral	Comprimido P15574			
P8	6M	40 mg	Oral	Cápsula RBNX	irosustat	Plasma	Efecto de la comida en la velocidad y extensión de absorción.
		40 mg	Oral	Comprimido P15579			

M: macho; H: hembra; *: Dosis radioactiva de 29 o 50 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$; MC: metilcelulosa; LSS: lauril sulfato sódico

1) Selección del tamaño de partícula: Estudio P1, P2 y P3

Se realizaron tres estudios en perros *beagle* hembra para seleccionar el tamaño de partícula de irosustat (administrado en forma de cápsula) que permitiera alcanzar una mejor exposición al compuesto.

Al inicio de los estudios no se tenía información sobre qué número de formulaciones y de tamaños de partícula de irosustat se ensayarían. Por tanto en lugar de realizar un único estudio para comparar todas las formulaciones, se utilizó la información de cada estudio para diseñar la siguiente formulación a ensayar.

El objetivo final de los estudios P1, P2 y P3 era evaluar las posibles diferencias entre los valores de C_{max}/D y AUC_t/D de irosustat obtenidos tras la administración de distintas formulaciones de cápsula que contenían irosustat micronizado a distintos tamaños de partícula (3, 5, 9 y 15 μm).

Las características experimentales y diseño de los estudios se resumen en las dos siguientes tablas.

Tabla 12 Características Experimentales de los Estudios P1, P2 y P3 en Perro.

Estudio	Cápsulas	Tamaño de partícula irosustat (μm)	Contenido en irosustat/cápsula (mg)	Dosis Administrada (mg)	Nº de perros y sexo	Diseño del estudio
P1	P15049 P15050	5 15	45	45	6H	Cruzado
P2	P60087	5	10	40	12H	-
P3	P15345 P15346	3 9	40	40	6H	Cruzado

H: hembra

La composición de las cápsulas ensayadas se detalla en la sección 4.2.5.

Tabla 13 Diseño de los Estudios P1 y P3 en Perro Para Selección del Tamaño de Partícula.

Periodo	Estudio P1		Estudio P3	
	Group A1	Group B1	Group A2	Group B2
1	Cápsula P15049	Cápsula P15050	Cápsula P15345	Cápsula P15346
2	Cápsula P15050	Cápsula P15049	Cápsula P15346	Cápsula P15345

Los grupos A1, B1, A2 y B2 están formados por 3 perros cada uno.

La administración oral se realizó situando la correspondiente cápsula en el fondo de la garganta de cada perro y haciendo un masaje para facilitar la deglución de la misma. El periodo de blanqueo entre cada administración fue de al menos una semana.

Tras cada administración, la obtención de muestras de sangre se realizó a los siguientes tiempos: pre-dosis (tiempo 0); 5, 20, 40 minutos; 1, 1.5, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 30 y 48 horas.

La manipulación de las muestras se realizó como se describe en la sección 4.5.

Se cuantificó el irosustat en plasma con el método de espectrometría de masas descrito en la sección 4.6.

El análisis farmacocinético de los datos mediante aproximación no compartimental se detalla en la sección 4.8 y el análisis estadístico se resume en la sección 4.10.4.

2) Dosis Única de ^{14}C -Irosustat (ADME): Estudio P4

Formulación de ^{14}C -irosustat

- Solución de ^{14}C -irosustat:

Solución de DMA y ^{14}C -irosustat (peso molecular: 313.3 g/mol; actividad específica: 123 mCi/mmol; pureza radioquímica: 98.2%; concentración radioactiva: 1 mCi/ml; lotes CFQ14404 y CFQ14345, Amersham Biosciences, Gran Bretaña).

- *Solución de irosustat:*

Solución de irosustat (lote SGA476P, Panchim) en Soluphor P, PEG 400 y agua (36:24:40).

- *Solución de Administración:*

La cantidad adecuada de la solución de ^{14}C -irosustat se mezcló con la solución de irosustat (producto frío) para alcanzar la dosis deseada.

Dosis y Vías de Administración

Se administró por vía intravenosa y oral una solución de irosustat (producto frío y producto marcado con carbono 14) a una dosis de 3 mg/kg (equivalente a 50 o 29 $\mu\text{Ci/kg}$). El volumen de administración fue de 0.5 mL/kg.

Al inicio del estudio la dosis radioactiva fue de 50 $\mu\text{Ci/kg}$ pero durante su desarrollo, atendiendo a las existencias de producto marcado, la dosis se cambió a 29 $\mu\text{Ci/kg}$.

La administración intravenosa se realizó a través de las venas cefálicas mediante un bolus lento (1 minuto). La administración oral se realizó mediante una sonda gástrica.

Los animales estuvieron en ayuno desde la noche anterior a la administración (15-16 horas) hasta 8 horas después de esta.

El esquema de administración se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14 Administración de ^{14}C -Irosustat a Perros.

Especie	Nº Animal y Sexo	Vía	Dosis (mg/kg)	Dosis Radioactiva Teórica ($\mu\text{Ci/kg}$)	Dosis Radioactiva Real ($\mu\text{Ci/kg}$)
Perro	040910 M	I.V.	3	29	29.94
		Oral	3	50	52.28
	035019 H	I.V.	3	50	53.53
		Oral	3	29	29.89

M: Macho; H: Hembra

Para la determinación de la dosis radioactiva real, las jeringas de administración se pesaron antes y después de la administración, y se determinó por triplicado la radioactividad presente en dos alícuotas de la solución de administración.

Muestras Biológicas

- *Plasma y Sangre*

La obtención de muestras de sangre se realizó a los siguientes tiempos:

I.V.: pre-dosis, 1 y 20 minutos; 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 264, 312 y 360 horas.

Oral: pre-dosis, 15 y 30 minutos; 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 264, 312 y 360 horas.

Se obtuvieron muestras de 5 ml de sangre por punción de la vena yugular y se colocaron en tubos de poliestireno con heparina de litio. Se determinó el hematocrito y se separaron dos alícuotas de 0.2 ml de sangre para la determinación de radioactividad en sangre. Posteriormente, el resto de sangre mantenido en un baño de agua-hielo, se centrifugó a 1600 g a 4°C durante 20 minutos. El plasma sobrenadante se separó en dos alícuotas para la determinación de radioactividad.

- *Orina y Heces*

La orina y las heces se recogieron de forma separada en contenedores refrigerados con hielo seco durante las 24 horas antes de la administración y a los siguientes intervalos: 0-24h, 24-48h, 48-72h, 72-96h, 96-120h, 120-144h, 144-168h, 168-192h, 192-264h, 264-312h y 312-360h.

- *Aguas de Lavado*

Al finalizar cada intervalo de recogida de heces, cada jaula de metabolismo se lavó con 1 litro de agua. Los niveles de radioactividad se determinaron en cada muestra.

En todos los casos, las muestras que no fueron analizadas inmediatamente se guardaron congeladas a $-80\pm 10^\circ\text{C}$. El procedimiento para su análisis se detalla en la sección 4.7.2.

3) *Comparación de suspensiones: Estudio P5*

Se realizó un estudio en seis perros *beagle* hembra para comparar la exposición a irosustat tras la administración de dos formulaciones distintas:

- A. suspensión acuosa con un 1% (m/v) de metilcelulosa y un 2% (m/v) de lauril sulfato sódico
- B. suspensión acuosa con un 1% (m/v) de metilcelulosa

En algunos estudios, como en el P9 (dosis repetidas durante 1 mes), se había observado que el lauril sulfato sódico administrado por vía oral a los perros, les provocaba vómitos. Por tanto, el objetivo de este estudio era evaluar el efecto que tenía la retirada del lauril sulfato sódico sobre la biodisponibilidad de la suspensión.

La administración de las dos formulaciones se realizó por vía oral, mediante sonda gástrica, a seis perros *beagle* hembra siguiendo el diseño cruzado que se resume en la siguiente tabla. El período de blanqueo entre los dos períodos fue de al menos una semana.

Tabla 15 Diseño del Estudio en Perro para Comparación de Suspensiones.

Periodo	Grupo A	Grupo B
1	Susp. 1%MC + 2% LSS	Susp. 1%MC
2	Susp. 1%MC	Susp. 1%MC + 2% LSS

Los grupos A y B estan formados por 3 perros cada uno.

MC: metilcelulosa; LSS: lauril sulfato sódico

La administración oral se realizó mediante sonda gástrica a la dosis de 400 mg/kg. La concentración de irosustat en cada suspensión fue de 80 mg/ml y se utilizó un volumen de administración de 5 ml/kg.

Tras cada administración, la obtención de muestra de sangre se realizó a los siguientes tiempos: pre-dosis (tiempo 0); 5, 20, 40 minutos; 1, 2, 4, 6, 9, 24 y 48 horas.

La manipulación de las muestras se realizó según se describe en la sección 4.5.

Se cuantificó el irosustat en plasma con el método de espectrometría de masas descrito en la sección 4.6.

El análisis farmacocinético de los datos mediante aproximación no compartimental se detalla en la sección 4.8.

4) Evaluación de la proporcionalidad de dosis: Estudio P6

Se administraron tres dosis orales y tres dosis intravenosas a nueve perros *beagle* hembra, siguiendo el diseño cruzado que se describe en la Tabla 16. El período de blanqueo entre cada administración fue de al menos una semana.

Tabla 16 Diseño del Estudio en Perro para Evaluación de la Proporcionalidad de Dosis.

Fase del Estudio	Vía	Administración No.	Dosis (mg/kg)		
			Grupo A*	Grupo B*	Grupo C*
Fase I	Oral	1	0.25	2.5	25
		2	25	0.25	2.5
		3	2.5	25	0.25
Fase II	IV	4	0.1	0.4	2
		5	2	0.1	0.4
		6	0.4	2	0.1

*: Grupos A, B y C estan formados por 3 perros cada uno.

La administración oral se realizó mediante sonda gástrica a las dosis de 0.25, 2.5 y 25 mg/kg. La concentración de irosustat en la suspensión acuosa con un 1% (m/v) de metilcelulosa fue de 0.0625, 0.625 y 6.25 mg/ml. Se utilizó un volumen de administración constante de 4 ml/kg.

El bolus intravenoso se realizó a través de las venas cefálicas, a las dosis de 0.1, 0.4 y 2 mg/kg. La concentración de irosustat en la solución con Soluphor P:PEG 400:agua (36:24:40) fue de 0.2, 0.8 y 4 mg/ml. Se utilizó un volumen de administración constante de 0.5 ml/kg.

Tras cada administración, la obtención de muestra de sangre se realizó a los siguientes tiempos:

Administración oral: pre-dosis (tiempo 0); 5, 20, 40 minutos; 1, 1.5, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 30, 48, 72 y 96 horas.

Administración intravenosa: pre-dosis (tiempo 0); 1, 5, 20, 40 minutos; 1, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 30, 48 y 72 horas.

La manipulación de las muestras se realizó según se describe en la sección 4.5.

Se cuantificó el irosustat y el IDP 17619 en plasma y sangre con el método de espectrometría de masas descrito en la sección 4.6.

El análisis farmacocinético de los datos mediante aproximación no compartimental y poblacional se detalla en las secciones 4.8 y 4.9, respectivamente. El análisis estadístico se resume en la sección 4.10.2.

5) Selección de la formulación para Fase I: Estudio P7

Para seleccionar una formulación de cápsula o comprimido adecuada para desarrollar la fase I de desarrollo en humanos, se diseñó un estudio con el objetivo de:

- Evaluar la exposición y el perfil farmacocinético de irosustat en perros hembra tras la administración única oral de la cápsula RBNX y de los comprimidos P15492, P15573, P15574 y P15579 (ver sección 4.2.5 y 4.2.6).
- Calcular la biodisponibilidad relativa de irosustat en las cuatro formulaciones de comprimido teniendo en cuenta la cápsula RBNX como referencia.
- Valorar si existían diferencias entre los parámetros C_{max}/D y AUC_t/D obtenidos tras la administración de la cápsula RBNX y de los cuatro comprimidos mencionados anteriormente.

Se seleccionó como referencia la cápsula RBNX porque tenía la misma composición centesimal y tamaño de partícula que la cápsula P60087 que en los estudios de selección de tamaño de partícula se había visto que permitía alcanzar una mejor exposición a irosustat.

Se utilizaron doce perros *beagle* hembra, de forma que cada perro recibió dos de las cuatro formulaciones en comprimidos y además la formulación de referencia (cápsula RBNX), tal y como se resume en la siguiente tabla. La dosis administrada

de irosustat fue de 40 mg y el período de blanqueo entre cada administración fue de al menos una semana.

Tabla 17 Diseño del Estudio en Perro para Seleccionar la Formulación para Fase I.

Periodo	Perros 1 - 6	Perros 7 - 12
1	Comprimido P15492	Cápsula RBNX
2	Cápsula RBNX	Comprimido P15573
3	Comprimido P15574	Comprimido P15579

La administración oral se realizó situando el correspondiente comprimido o cápsula en el fondo de la garganta de cada perro y haciendo un masaje para facilitar la deglución.

Tras cada administración, la obtención de muestra de sangre se realizó a los siguientes tiempos: pre-dosis (tiempo 0); 5, 20, 40 minutos; 1, 1.5, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 30 y 48 horas.

La manipulación de las muestras se realizó tal y como se describe en la sección 4.5.

Se cuantificó el irosustat en plasma con el método de espectrometría de masas descrito en la sección 4.6.

El análisis farmacocinético de los datos mediante aproximación no compartimental se detalla en la sección 4.8 y el análisis estadístico se resume en la sección 4.10.4.

6) Interacción con la comida: Estudio P8

La evaluación del efecto de la comida en la velocidad y magnitud de absorción del irosustat a partir de la formulación en cápsulas utilizada en un estudio clínico de Fase I (cápsula RBNX, ver sección 4.2.5) se evaluó en seis perros *beagle* macho. La dosis total administrada fue 40 mg y se siguió un diseño cruzado con dos períodos y dos secuencias, como se describe en la Tabla 18. El período de blanqueo entre cada administración fue de al menos una semana.

Tabla 18 Diseño del Estudio en Perro para Evaluación de la Interacción con la Comida.

Periodo	Grupo A	Grupo B
Periodo 1	Administración en AYUNO	Administración después de la COMIDA
Periodo 2	Administración después de la COMIDA	Administración en AYUNO

Los grupos A y B están formados por tres perros cada uno.

Para la administración de irosustat en condiciones de ayuno, los animales ayunaron durante toda la noche previa a la administración (aprox. 20 horas) y durante las 6 horas posteriores a la administración.

Para la administración de irosustat después de la comida, los animales recibieron 400 g de pienso controlado con alto contenido en grasa 45 minutos antes de la administración. Se pesó el pienso consumido por cada animal para verificar que los animales comían al menos el 90% del pienso ofrecido.

La administración oral de las cápsulas se realizó situando la cápsula en el fondo de la garganta de cada perro y haciendo un masaje para facilitar la deglución de la misma.

Tras cada administración, la obtención de muestra de sangre se realizó a los siguientes tiempos: pre-dosis (tiempo 0); 5, 20, 40 minutos; 1, 1.5, 2, 4, 6, 9, 12, 24, 30 y 48 horas.

La manipulación de las muestras se realizó según se describe en la sección 4.5.

Se cuantificó el irosustat en plasma con el método de espectrometría de masas descrito en la sección 4.6.

El análisis farmacocinético de los datos mediante aproximación no compartimental se detalla en la sección 4.8 y el análisis estadístico se resume en la sección 4.10.3.

4.4.1.3 Mono

1) Dosis Única de ¹⁴C-Irosustat (ADME): Estudio M1

Formulación de ¹⁴C-irosustat

- Solución de ¹⁴C-irosustat:

Solución de DMA y ¹⁴C-irosustat (peso molecular: 313.3 g/mol; actividad específica: 123 mCi/mmol; pureza radioquímica: 98.2%; concentración radioactiva: 1 mCi/ml; lotes CFQ14404 y CFQ14345, Amersham Biosciences, Gran Bretaña).

- Solución de irosustat:

Solución de irosustat (lote SGA476P, Panchim) en Soluphor P, PEG 400 y agua (36:24:40).

- *Solución de Administración:*

La cantidad adecuada de la solución de ^{14}C -irosustat se mezcló con la solución de irosustat (producto frío) para alcanzar la dosis deseada.

Dosis y Vías de Administración

Se administró por vía intravenosa y oral una solución de irosustat (producto frío y producto marcado con carbono 14) a una dosis de 3 mg/kg (equivalente a 50 o 29 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$). El volumen de administración fue de 0.5 mL/kg.

Al inicio del estudio la dosis radioactiva fue de 50 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ pero durante su desarrollo, atendiendo a las existencias de producto marcado, la dosis se cambió a 29 $\mu\text{Ci}/\text{kg}$.

La administración intravenosa se realizó a través de la vena femoral mediante un bolus lento (1 minuto). La administración oral se realizó mediante una sonda gástrica.

Los animales estuvieron en ayuno desde la noche anterior a la administración (15-16 horas) hasta 8 horas después de esta.

El esquema de administración se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19 Administración de ^{14}C -Irosustat a Monos.

Especie	Nº Animal y Sexo	Vía	Dosis (mg/kg)	Dosis Radioactiva Teórica ($\mu\text{Ci}/\text{kg}$)	Dosis Radioactiva Real ($\mu\text{Ci}/\text{kg}$)
Mono	6207 M	I.V.	3	29	30.32
		Oral	3	50	50.75
	AE816 H	I.V.	3	50	54.51
		Oral	3	50	53.94

M: Macho; H: Hembra

Para la determinación de la dosis radioactiva real, las jeringas de administración se pesaron antes y después de la administración, y se determinó por triplicado la radioactividad presente en dos alícuotas de la solución de administración.

Muestras Biológicas

- *Plasma y Sangre*

La obtención de muestras de sangre se realizó a los siguientes tiempos:

I.V.: pre-dosis, 1 y 20 minutos; 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 264, 312 y 360 horas.

Oral: pre-dosis, 15 y 30 minutos; 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 264, 312 y 360 horas.

Se obtuvieron muestras de 1.4 ml de sangre por punción de la vena cubital y se colocaron en tubos de poliestireno con heparina de litio. Se determinó el

hematocrito y se separaron dos alícuotas de 0.2 ml de sangre para la determinación de radioactividad en sangre. Posteriormente, el resto de sangre mantenido en un baño de agua-hielo, se centrifugó a 1600 g a 4°C durante 20 minutos. El plasma sobrenadante se separó en dos alícuotas para la determinación de radioactividad.

- *Orina y Heces*

La orina y las heces se recogieron de forma separada en contenedores refrigerados con hielo seco durante las 24 horas antes de la administración y a los siguientes intervalos: 0-24h, 24-48h, 48-72h, 72-96h, 96-120h, 120-144h, 144-168h, 168-192h, 192-264h, 264-312h y 312-360h.

- *Aguas de Lavado*

Al finalizar cada intervalo de recogida de heces, cada jaula de metabolismo se lavó con 1 litro de agua. Los niveles de radioactividad se determinaron en cada muestra.

En todos los casos, las muestras que no fueron analizadas inmediatamente se guardaron congeladas a $-80\pm 10^{\circ}\text{C}$. El procedimiento para su análisis se detalla en la sección 4.7.2.

4.4.2 *Administración de Dosis Repetidas de Irosustat*

Con el fin de minimizar el uso de animales, los estudios farmacocinéticos a dosis repetidas se hicieron de forma paralela a los estudios de toxicidad.

4.4.2.1 *Rata*

Se realizaron dos estudios de dosis repetidas de irosustat, uno tras la administración diaria de irosustat durante 1 mes y el otro durante 6 meses (estudios R4 y R5, respectivamente).

1) Dosis repetidas durante 1 mes: Estudio R4

Se realizó un estudio en ratas Sprague-Dawley tras la administración diaria de irosustat durante cuatro semanas, como se resume en la siguiente tabla.

Tabla 20 Diseño del Estudio en Rata de Dosis Repetidas Durante 1 Mes.

Grupo	Nº Animales y Sexo	Dosis (mg/kg/día)	Vía	Formulación	Conc. (mg/ml)	Volumen (ml/kg/día)
1	2M / 2H	0	Oral	Suspensión [1% MC + 2% LSS]	0	10
2	6M / 6H	100	Oral	Suspensión [1% MC + 2% LSS]	10	10
3	6M / 6H	300	Oral	Suspensión [1% MC + 2% LSS]	30	10
4	6M / 6H	900	Oral	Suspensión [1% MC + 2% LSS]	90	10

M: macho; H: hembra; MC: metilcelulosa; LSS: lauril sulfato sódico

La administración oral se realizó mediante sonda gástrica.

Las muestras de sangre para el análisis toxicocinético/farmacocinético se obtuvieron a los siguientes tiempos de muestreo: 0.5, 2, 6 y 24 horas post administración los días 1 y 29, para determinar las concentraciones plasmáticas y sanguíneas de irosustat con el método de espectrometría de masas descrito en la sección 4.6. Se utilizaron tres ratas de cada sexo y grupo para obtener sangre en cada tiempo de muestreo. En el caso del grupo control, se sacó sangre a las 2 horas post administración, los días 1 y 29.

La manipulación de las muestras se realizó como se describe en la sección 4.5.

El análisis farmacocinético de los datos mediante aproximación no compartimental se detalla en la sección 4.8.

2) Dosis repetidas durante 6 meses: Estudio R5

Se realizó un estudio en ratas Sprague-Dawley tras la administración diaria de irosustat durante veintiséis semanas, como se resume en la siguiente tabla.

Tabla 21 Diseño del Estudio en Rata de Dosis Repetidas Durante 6 Meses.

Grupo	Nº Animales y Sexo	Dosis (mg/kg/día)	Vía	Formulación	Conc. (mg/ml)	Volumen (ml/kg/día)
1	2M / 2H	0	Oral	Suspensión [1% MC]	0	5
2	6M / 6H	25	Oral	Suspensión [1% MC]	5	5
3	6M / 6H	50	Oral	Suspensión [1% MC]	10	5
4	6M / 6H	100	Oral	Suspensión [1% MC]	20	5
5	6M / 6H	200	Oral	Suspensión [1% MC]	40	5

M: macho; H: hembra; MC: metilcelulosa

La administración oral se realizó mediante sonda gástrica.

Las muestras de sangre para el análisis toxicocinético/farmacocinético se obtuvieron a los siguientes tiempos de muestreo: 0.5, 2, 6 y 24 horas post administración los días 1, 29, 87 y 170, para determinar las concentraciones plasmáticas y sanguíneas de irosustat y uno de sus metabolitos y/o productos de degradación, el IDP 17619, con el método de espectrometría de masas descrito en la sección 4.6. Se utilizaron tres ratas de cada sexo y grupo para obtener sangre en cada tiempo de muestreo. En el caso del grupo control, se sacó sangre a las 2 horas post administración, los días 1, 29, 87 y 170.

La manipulación de las muestras se realizó como se describe en la sección 4.5.

El análisis farmacocinético de los datos mediante aproximación no compartimental se detalla en la sección 4.8.

4.4.2.2 *Perro*

Se realizaron dos estudios de dosis repetidas de irosustat en perro, uno tras la administración diaria de irosustat durante 1 mes y el otro durante 6 meses (estudios P2 y P3, respectivamente).

1) Dosis repetidas durante 1 mes: Estudio P9

Se realizó un estudio en perros *beagle* tras la administración diaria de irosustat durante cuatro semanas, según el diseño de la Tabla 22.

La administración oral se realizó mediante sonda gástrica.

En todos los perros de los cuatro grupos, las muestras de sangre para el análisis toxicocinético/farmacocinético se obtuvieron a los siguientes tiempos de muestreo: pre-dosis, 0.5, 1, 2, 4, 6, 9 y 24 horas post administración los días 1 y 35, para determinar las concentraciones plasmáticas y sanguíneas de irosustat con el método de espectrometría de masas descrito en la sección 4.6.

La manipulación de las muestras se realizó como se describe en la sección 4.5.

El análisis farmacocinético de los datos mediante aproximación no compartimental se detalla en la sección 4.8.

Tabla 22 Diseño del Estudio en Perro de Dosis Repetidas Durante 1 Mes.

Grupo	Nº Animales y Sexo	Dosis (mg/kg/día)	Vía	Formulación	Conc. (mg/ml)	Volumen (ml/kg/día)
1	3M / 3H	0	Oral	Suspensión [1% MC + 2% LSS]	0	5
2	3M / 3H	100	Oral	Suspensión [1% MC + 2% LSS]	20	5
3	3M / 3H	200	Oral	Suspensión [1% MC + 2% LSS]	40	5
4	3M / 3H	400	Oral	Suspensión [1% MC + 2% LSS]	80	5

M: macho; H: hembra; MC: metilcelulosa; LSS: lauril sulfato sódico

2) Dosis repetidas durante 6 meses: Estudio P10

Se realizó un estudio en perros *beagle* tras la administración diaria de irosustat durante veintiséis semanas, tal y como se resume en la siguiente tabla.

Tabla 23 Diseño del Estudio en Perro de Dosis Repetidas Durante 6 Meses.

Grupo	Nº Animales y Sexo	Dosis (mg/kg/día)	Vía	Formulación	Conc. (mg/ml)	Volumen (ml/kg/día)
1	6M / 6H	0	Oral	Suspensión [1% MC]	0	5
2	4M / 4H	50	Oral	Suspensión [1% MC]	10	5
3	4M / 4H	250	Oral	Suspensión [1% MC]	50	5
4	6M / 6H	1000	Oral	Suspensión [1% MC]	200	5

M: macho; H: hembra; MC: metilcelulosa

La administración oral se realizó mediante sonda gástrica.

En todos los perros de los cuatro grupos, las muestras de sangre para el análisis toxicocinético/farmacocinético se obtuvieron a los siguientes tiempos de muestreo: pre-dosis, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 24 horas post administración los días 1, 29, 85 y 176, para determinar las concentraciones plasmáticas y sanguíneas de irosustat y uno de sus metabolitos y/o productos de degradación, el IDP 17619, con el método de espectrometría de masas descrito en la sección 4.6.

La manipulación de las muestras se realizó como se describe en la sección 4.5.

El análisis farmacocinético de los datos mediante aproximación no compartimental se detalla en la sección 4.8.

4.4.2.3 Mono

1) Dosis repetidas durante 7 días: Estudio M2

Se realizó un estudio en monos *cynomolgus* (*macaca fascicularis*) tras la administración diaria de irosustat durante 7 días, como se resume en la Tabla 24.

Tabla 24 Diseño del Estudio en Mono de Dosis Repetidas Durante 7 Días.

Grupo	Nº Animales y Sexo	Dosis (mg/kg/día)	Vía	Formulación	Conc. (mg/ml)	Volumen (ml/kg/día)
1	1M / 1H	2000	Oral	Suspensión [1% MC]	200	10

M: macho; H: hembra; MC: metilcelulosa

La administración oral se realizó mediante sonda gástrica.

En todos los monos, las muestras de sangre para el análisis toxicocinético/farmacocinético se obtuvieron a los siguientes tiempos de muestreo: pre-dosis, 0,5, 1, 2, 4, 6 y 24 horas post administración los días 1 y 7 para determinar las concentraciones plasmáticas y sanguíneas de irosustat y uno de sus metabolitos y/o productos de degradación, el IDP 17619. Para la cuantificación de irosustat en las muestras de mono se utilizó el método de espectrometría de masas validado para las muestras de perro (ver sección 4.6) previa comprobación de la idoneidad de la metodología para las muestras de esta especie.

La manipulación de las muestras se realizó según se describe en la sección 4.5.

El análisis farmacocinético de los datos mediante aproximación no compartimental se detalla en la sección 4.8.

4.5 Obtención y Manipulación de Muestras

El procedimiento finalmente adoptado para obtener y manipular las muestras de sangre y plasma se resume en los siguientes puntos.

1. En cada tiempo de muestreo, se obtuvo una muestra de sangre del correspondiente animal. El volumen de muestra y la vena variaron según la especie.

Ratas

Se obtuvieron 0.9 ml de sangre mediante una punción del plexo retro-orbital con una pipeta Pasteur, manteniendo los animales bajo anestesia con isoflurano.

Perros

Se obtuvieron 2.5 mL de sangre a través de la vena cefálica o yugular.

Monos

Se obtuvieron 1.4 mL de sangre a través de la vena femoral.

2. Las muestras de sangre se colocaron en tubos con heparina de litio (0.75 mg/ml sangre). Cada tubo se agitó con suavidad y se colocó en un baño de agua-hielo.
3. Con una pipeta automática se tomaron 0.2 ml de sangre de cada tubo y se colocaron en tubos eppendorf con 0.8 ml de una solución de agua:ácido fórmico (50:50). Esta mezcla se agitó en el vórtex y a continuación se centrifugó a 12000g durante 30 minutos a 4°C. Con una pipeta automática se recogió el sobrenadante de cada tubo y se transfirió a tubos de polipropileno que se mantuvieron congelados con hielo seco hasta ser transferidos a un congelador de $-80\pm 10^{\circ}\text{C}$
4. El resto de sangre de cada tubo, mantenida en el baño de agua-hielo, se centrifugó a 1600g durante 20 minutos a 4°C. Seguidamente, el plasma sobrenadante se transfirió a tubos de polipropileno que se mantuvieron congelados con hielo seco hasta ser transferido a un congelador de $-80\pm 10^{\circ}\text{C}$.

4.6 Métodos de Espectrometría de Masas Acoplada a Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) para la Cuantificación de Irosustat y de IDP 17619 en Plasma y Sangre

La cuantificación de irosustat y uno de sus productos de metabolismo y/o degradación, el IDP 17619, en plasma y en sangre de rata y perro se realizó mediante cuatro métodos bioanalíticos (uno para cada matriz y especie). Todos los métodos fueron desarrollados y validados^[66, 67] en Ipsen Pharma.

Para la cuantificación de irosustat e IDP 17619 en sangre de rata y perro se realizó el tratamiento de 0.2 ml de sangre con 0.8 ml de una solución de agua:ácido fórmico 50:50 para provocar la lisis de los eritrocitos y liberar el irosustat de su interior. Esta mezcla se centrifugó a 12000g durante 30 minutos a 4°C y se recogió el extracto sobrenadante. En el caso del plasma de rata y perro, no se requirió ningún tratamiento previo de la muestra para la cuantificación de irosustat e IDP 17619.

Un volumen de 0.2 ml del extracto de sangre, o bien 0.1 ml de plasma, se analizaron mediante una extracción en línea en fase sólida acoplada a cromatografía de líquidos de alta eficacia y seguida de espectrometría de masas (on-line SPE HPLC-MS/MS), trabajando el espectrómetro de masas en modo MRM (*multireaction monitoring*). Esta metodología resultó adecuada para la cuantificación de irosustat y de IDP 17619 en plasma y sangre de ambas especies, en el intervalo de concentraciones que van desde 0.250 ng/ml hasta 100 ng/ml. El límite de cuantificación en plasma y sangre se estableció en 0.250 ng/ml para ambos productos.

4.6.1 *Reactivos*

- Acetonitrilo para HPLC (Panreac, ref. 263093)
- Metanol para HPLC (Panreac, ref. 361091)
- Ácido acético glacial 100% (Merck, ref. 1018302500)
- Ácido fórmico 98-100% (Merck, ref. 1002641000)
- N,N-dimetilacetamida (DMA) (Merck, ref. 8032351000)
- Agua Milli-Q
- Irosustat e IDP 17619
- Estándares internos: IDP 18090 e IDP 18091 (análogos de irosustat y de IDP 17619, respectivamente, marcados con carbono 13)
- Plasma y sangre blanco de rata
- Plasma y sangre blanco de perro

4.6.2 *Equipos*

- Sistema en línea SPE-HPLC-MS/MS:
 - sistema de extracción en fase sólida (SPE) Prospekt-2 (Spark Holland, Holanda)
 - HPLC 1100 con bomba cuaternaria (Agilent, USA)
 - espectrómetro de masas con triple cuadrupolo API3000 con fuente de iones Turboionspray (MDS Sciex, Canada)
- Centrífugas refrigeradas Beckman J6 MC y Sorvall RC 5C
- Pipetas automáticas Biohit
- Balanza analítica Mettler Toledo AT-201
- Hornos de columnas (BioRad Chromatography, USA)
- Material volumétrico de cristal clase A

4.6.3 *Preparación de Soluciones Stock y de Trabajo*

- **Soluciones stock de irosustat, IDP 17619, IDP 18090 (estándar interno de irosustat) e IDP 18091 (estándar interno de irosustat)**

Se disolvieron 5 mg de cada uno de estos productos en 5 ml de DMA para obtener soluciones stock con una concentración final de 1 mg/ml.

Cada una de estas cuatro soluciones stock se guardó a $-22\pm 4^{\circ}\text{C}$, con una caducidad de 3 meses.

- **Soluciones de trabajo de irosustat e IDP 17619**

Las soluciones stock de irosustat e IDP 17619 se diluyeron 1:1000 con una solución de acetonitrilo:agua 50:50 (con un 0.1% de ácido acético) para obtener soluciones de trabajo con una concentración final de 1000 ng/ml.

Estas soluciones, mantenidas en un baño de agua-hielo durante un máximo de 6 horas, se utilizaron para preparar los estándares de calibrado y los controles de calidad.

- **Soluciones de trabajo de IDP 18090 y IDP 18091 (estándares internos)**

Las soluciones stock de IDP 18090 e IDP 18091 se diluyeron 1:50000 con una solución de acetonitrilo:agua 50:50 (con un 0.1% de ácido acético) para obtener soluciones de trabajo con una concentración final de 20 ng/ml.

Estas soluciones, mantenidas en un baño de agua-hielo durante un máximo de 6 horas, se añadieron a las muestras de plasma y/o sangre, a los estándares de calibrado y a los controles de calidad tal y como se describe en las secciones 4.6.5.1 y 4.6.5.2.

4.6.4 Preparación de los Estándares de Calibrado y Controles de Calidad

4.6.4.1 Estándares de calibrado y controles de calidad en plasma

Las soluciones de trabajo de irosustat y de IDP 17619 (ambas de 1 mg/ml) se diluyeron de forma secuencial con plasma blanco de la especie correspondiente para obtener los estándares de calibrado y los controles de calidad que se resumen en la Tabla 25. Durante todo el proceso se mantuvieron los tubos en un baño de agua-hielo.

Tabla 25 Tabla para la Preparación de los Estándares de Calibrado y los Controles de Calidad en Plasma.

Objetivo	Tubo	Concentración Final de Irosustat y de IDP 17619 en Plasma (ng/ml)
Estándares de Calibrado	E-100	100
	E-50	50
	E-25	25
	E-10	10
	E-5	5
	E-1	1
	E-0.5	0.5
	E-0.25	0.25
	BIS	0
	B	0
Controles de Calidad	QC-80	80
	QC-25	25
	QC-0.75	0.75

BIS: Blanco más estándar interno; B: Blanco

Se hicieron alícuotas de 100 µl de cada tubo y se mantuvieron en un baño de agua-hielo durante un máximo de 6 horas. En caso de no usarse inmediatamente, se guardaron a una temperatura de $-80\pm 10^{\circ}\text{C}$ con una caducidad de 12 meses.

4.6.4.2 *Estándares de calibrado y controles de calidad en sangre*

La preparación de los estándares de calibrado y los controles de calidad en sangre se realizó en dos pasos:

Paso 1: Las soluciones de trabajo de irosustat y de IDP 17619 (ambas de 1 mg/ml) se diluyeron de forma secuencial con una solución de acetonitrilo:agua 50:50 (con un 0.1% de ácido acético) para obtener una batería de estándares intermedios a concentraciones desde 800 hasta 2 ng/ml.

Paso 2: Se hicieron alícuotas de 25 µl de cada estándar intermedio en tubos de polipropileno que contenían 200 µl de sangre. A continuación, a todos los tubos se les añadió 800 µl de agua:ácido fórmico 50:50 para provocar la lisis de los eritrocitos y liberar el irosustat de su interior.

El proceso de preparación de los estándares de calibrado y controles de calidad en sangre se resumen en la Tabla 26.

Tabla 26 Tabla para la Preparación de los Estándares de Calibrado y los Controles de Calidad en Sangre.

Objetivo	Tubo	Sangre (µl)	Volumen y Concentración del Estándar Intermedio	Agua con ác. fórmico al 50% (µl)	Concentración Final de Irosustat y de IDP 17619 en Sangre (ng/ml)
Estándares de Calibrado	E-100	200	25 µl (800 ng/ml)	800	100
	E-50	200	25 µl (400 ng/ml)	800	50
	E-25	200	25 µl (200 ng/ml)	800	25
	E-10	200	25 µl (80 ng/ml)	800	10
	E-5	200	25 µl (40 ng/ml)	800	5
	E-1	200	25 µl (8 ng/ml)	800	1
	E-0.5	200	25 µl (4 ng/ml)	800	0.5
	E-0.25	200	25 µl (2 ng/ml)	800	0.25
	BIS	200	0	800	0
B	200	0	800	0	
Controles de Calidad	QC-80	200	25 µl (640 ng/ml)	800	80
	QC-25	200	25 µl (200 ng/ml)	800	25
	QC-0.75	200	25 µl (6 ng/ml)	800	0.75

BIS: Blanco más estándar interno; B: Blanco

Tras la centrifugación de cada tubo a 12000g a 4°C durante 30 minutos, se hicieron alícuotas de 200 µl del extracto sobrenadante. Todos los tubos se mantuvieron en un baño de agua-hielo durante un máximo de 6 horas. En caso de no usarse inmediatamente, se guardaron a una temperatura de $-80\pm 10^{\circ}\text{C}$ con una caducidad de 6 meses.

4.6.5 *Procesado de las Muestras*

4.6.5.1 *Procesado de muestras de plasma*

Las muestras de plasma se descongelaron en un baño de agua-hielo y se centrifugaron a 2000 g durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se realizó una revisión visual de la coloración del plasma para valorar de forma cualitativa el grado de hemólisis. En el supuesto de que fuese necesaria la dilución de la muestra, ésta se realizó con plasma blanco.

A un volumen de 100 µl de las muestras de plasma, de los estándares de calibrado y de los controles de calidad, se añadieron 25 µl de estándar interno (20 ng/ml) y 100 µl de una solución de acetonitrilo:agua 10:90 (con un 1% de ácido fórmico).

En el caso de las muestras de plasma blanco, se añadieron 25 µl de solución de acetonitrilo:agua 10:90 (con un 1% de ácido fórmico) en lugar de estándar interno.

4.6.5.2 *Procesado de muestras de sangre*

Las muestras de sangre se descongelan en baño de agua-hielo y se agitaron en el vórtex. En el supuesto de que fuese necesaria la dilución de la muestra, ésta se realizó con el sobrenadante obtenido de centrifugar a 12000g durante 30 minutos a 4°C una mezcla de 1 ml de sangre de la especie correspondiente con 4 ml de agua:ácido fórmico 50:50.

A un volumen de 200 µl de las muestras de sangre, de los estándares de calibrado y de los controles de calidad, se añadieron 25 µl de estándar interno (20 ng/ml).

En el caso de las muestras de sangre blanco, se añadieron 25 µl de una solución de acetonitrilo:agua 50:50 (con un 0.1% de ácido acético) en lugar de estándar interno.

4.6.6 *Condiciones Instrumentales*

Las condiciones más relevantes del método instrumental se encuentran resumidas en los siguientes puntos.

1. El proceso de extracción en línea en fase sólida (on-line SPE) de la muestra se realizó con cartuchos HySphere C18 HD (Spark Holland), de 7 µm de tamaño medio de partícula.
2. La separación cromatográfica (HPLC) se realizó con una columna Supelcosil LC-ABZ C18 de 5 µm de tamaño de partícula y 15 cm x 4.6 mm de diámetro interno, utilizando una pre-columna de la misma fase estacionaria. La velocidad del flujo fue de 1 ml/min y la columna y pre-columna se mantuvieron a 45°C usando el horno para columnas. La elusión se realizó de la siguiente manera:
 - 4 minutos en condiciones isocráticas con acetonitrilo:agua 75:25

- 0.25 minutos en condiciones de gradiente lineal hasta llegar a 100% de acetonitrilo
 - 0.35 minutos en acetonitrilo 100 %.
3. El espectrómetro de masas (MS/MS) trabajó en modo MRM (*multireaction monitoring*) con iones negativos.

Las transiciones monitorizadas fueron 307.8>229.2 para irosustat, m/z=229.1>198.7 y m/z=229.0>188.0 (se suman ambas transiciones) para IDP 17619, m/z=311.8>233.2 para IDP 18090 y m/z=233.2>202.7 para IDP 18091.

La adquisición de los datos y el control del aparato se realizaron a través del programa validado Analyst 1.4.

4.6.7 *Criterios de Aceptación*

La calidad y aceptabilidad de cada secuencia analítica se monitorizó a través de la introducción de seis controles de calidad (dos replicados para tres niveles de concentración). Para que la secuencia analítica fuese válida, cuatro de estos seis controles de calidad debían estar dentro del 15% de su valor nominal. Los dos controles de calidad que no cumplieren este criterio no podían ser del mismo nivel de concentración.

4.6.8 *Resumen de la Validación*

Durante la validación de la metodología se valoró la precisión y exactitud intra e inter ensayo, el límite de cuantificación, la selectividad, el efecto matriz, el efecto de la dilución, la recuperación y el “carry-over”. Además, también se comprobó la estabilidad del irosustat y del IDP 17619 en las soluciones de trabajo, en la sangre y en el plasma de ambas especies, en el inyector y en los ciclos de congelación-descongelación. Finalmente se estudió la estabilidad a largo plazo.

Los resultados de precisión intra e inter-ensayo, expresados como coeficiente de variación, así como los resultados de exactitud intra e inter-ensayo, expresados como porcentaje de error, se resumen en la Tabla 27 mediante sus valores mínimo y máximo.

El límite de cuantificación de irosustat e IDP 17619 en plasma y sangre de ambas especies se estableció en 0.250 ng/ml.

Tabla 27 Precisión y Exactitud, Intra e Inter-Ensayo, Establecidos Durante la Validación.

Parámetro		Analito	Plasma		Sangre	
			Rata	Perro	Rata	Perro
Precisión (%CV)	Intra-ensayo	IROSUSTAT	1.53 – 16.27%	0.60 – 14.13%	1.26 – 8.15%	1.17 – 6.96%
		IDP 17619	2.10 – 12.83%	2.75 – 14.83%	0.98 – 11.05%	1.85 – 12.71%
	Inter-ensayo	IROSUSTAT	3.52 – 10.10%	3.85 – 9.89%	5.01 – 8.16%	2.54 – 5.92%
		IDP 17619	4.23 – 9.62%	5.01 – 11.54%	4.77 – 12.64%	3.90 – 10.93%
Exactitud (%error)	Intra-ensayo	IROSUSTAT	-12.16 – 3.18%	-10.33 – 8.16%	-7.35 – 13.18%	-9.06 – 1.12%
		IDP 17619	-8.58 – 6.31%	-7.59 – 9.54%	-11.87 – 12.90%	-7.25 – 12.10%
	Inter-ensayo	IROSUSTAT	-4.96 – 0.76%	-1.19 – 5.44%	1.25 – 4.79%	-4.77 – -2.10%
		IDP 17619	-2.36 – 1.35%	-0.70 – 6.18%	-1.36 – 3.09%	-4.94 – 0.67%

En cuanto a la selectividad, los cromatogramas de seis muestras de cada matriz blanco (plasma y sangre de rata y plasma y sangre de perro), mostraron que no aparecen picos de interferencia en los tiempos de retención de los compuestos estudiados (aproximadamente 2.5 minutos para el irosustat y el IDP 18090 y 3.4 minutos para el IDP 17619 y el IDP 18091). En las siguientes figuras se muestra un cromatograma representativo del análisis del irosustat en cada una de las matrices.

Figura 3 Cromatograma Representativo de una Muestra de Plasma de Rata (Derecha) y de Perro (Izquierda) con 0.25 ng/ml de Irosustat.

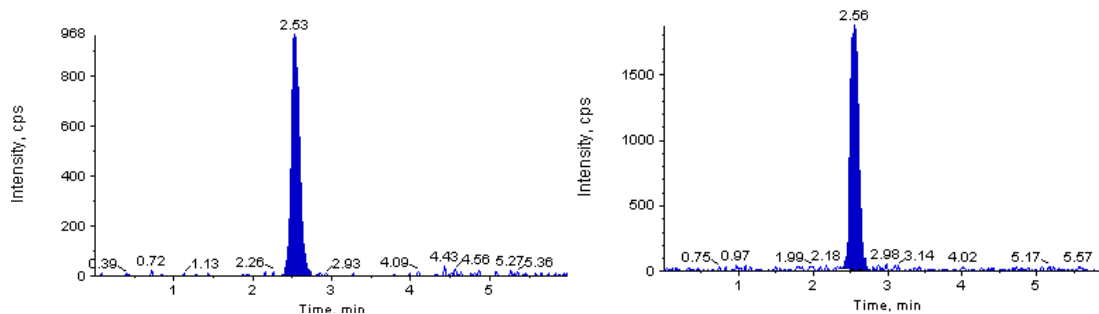
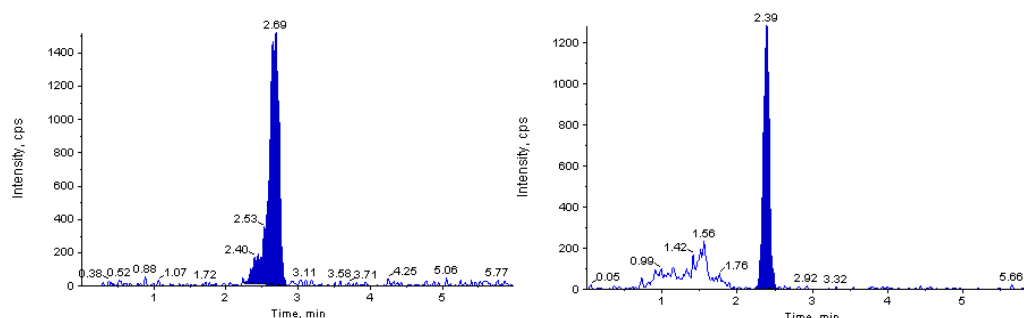


Figura 4 Cromatograma Representativo de una Muestra de Sangre de Rata (Derecha) y de Perro (Izquierda) con 0.25 ng/ml de Irosustat.



No se observó ningún efecto matriz relevante, ni tampoco un fenómeno de “carry-over”. Además, una dilución de 250 veces y de 2000 veces en una muestra de concentración 1000 ng/ml no tuvo efecto significativo sobre los niveles de irosustat e IDP 17619 cuantificados en las cuatro matrices ensayadas (plasma y sangre de rata y de perro).

En cuanto a la estabilidad, se verificó que el irosustat y el IDP 17619, así como sus respectivos estándares internos, eran estables en las soluciones de trabajo mantenidas en baño de agua hielo durante un período de 6 horas.

En las muestras de plasma, estudios previos de estabilidad, pusieron de manifiesto que el irosustat presentaba un porcentaje de degradación de hasta el 65% tras permanecer durante 6 horas a temperatura ambiente en lugar de en un baño de agua-hielo. En consecuencia, se estableció que la manipulación de todas las muestras debía realizarse en un baño de agua-hielo. Durante la validación del método de bioanálisis, se comprobó que las muestras de las cuatro matrices ensayadas (plasma y sangre de rata y de perro) a dos niveles de concentración (5 y 80 ng/ml) mantenidas en un baño de agua-hielo eran suficientemente estables durante un período de 6 horas. En todos los casos, la diferencia entre la concentración nominal de irosustat y la encontrada fue <15% y la degradación a IDP 17619 fue <5.1%.

Las muestras de cada una de las cuatro matrices, a los dos niveles de concentración (5 y 80 ng/ml), también resultaron ser suficientemente estables tras permanecer en el inyector durante 24 horas a 4°C y tras tres ciclos de congelación-descongelación. En todos los casos, la diferencia entre la concentración nominal de irosustat y la encontrada fue <15% y la degradación a IDP 17619 fue <5.5%.

Los ensayos de estabilidad a largo plazo (1, 3, 6 y 12 meses), permitieron verificar que el irosustat y el IDP 17619 en las muestras de plasma (rata y perro) se mantenían estables a $-80\pm 10^{\circ}\text{C}$ durante un período de al menos 12 meses. En el caso de la sangre, dado que la determinación de niveles sanguíneos de irosustat e IDP 17619, en realidad siempre se realiza en el extracto de sangre obtenido al tratar la sangre con una solución de agua:ácido fórmico al 50:50 que provoca la lisis de los eritrocitos y la liberación del irosustat de su interior, *a priori* la manipulación de las muestras se podía hacer de dos maneras distintas:

Opción A: guardar congelada la muestra de sangre y realizar el tratamiento con la solución de agua:ácido fórmico justo antes del análisis.

Opción B: tratar la muestra de sangre con la solución de agua:ácido fórmico justo después de obtener la muestra y por tanto guardar congelado el extracto.

Los resultados de estabilidad a largo plazo, resumidos en la Tabla 28, pusieron de manifiesto que la única opción válida para manipular las muestras de sangre era la opción B, debido a la inestabilidad de IDP 17619. Por tanto, congelando a $-80\pm 10^{\circ}\text{C}$

el extracto de sangre, el irosustat y el IDP 17619 se mantenían estables durante un período de al menos 6 meses.

Tabla 28 Estabilidad a Largo Plazo de Irosustat e IDP 17619 en Plasma y Sangre.

Analito	Matriz	Rata		Perro	
		-22±4°C	-80±10°C	-22±4°C	-80±10°C
IROSUSTAT	Plasma	3 meses	12 meses	3 meses	12 meses
	Sangre - Opción A	12 meses	12 meses	12 meses	12 meses
	Sangre - Opción B	-	6 meses	-	6 meses
IDP 17619	Plasma	3 meses	12 meses	3 meses	12 meses
	Sangre - Opción A	< 1 mes	< 1 mes	< 1 mes	< 1 mes
	Sangre - Opción B	-	6 meses	-	6 meses

-.: No evaluado.

4.7 Procedimiento Experimental para la Cuantificación de Radioactividad Total Tras la Administración de ¹⁴C-Irosustat

4.7.1 Cuantificación de la Radioactividad en Muestras de Rata

4.7.1.1 Muestras del estudio de ADME

La cuantificación de los niveles de radioactividad en las muestras del estudio R1, junto con muestras blanco representativas, se realizó con un contador de centelleo líquido (Packard TR 2100) con corrección automática de la extinción o quenching. Para cada tipo de muestra se calculó un valor de ruido de fondo (*background*, BKG) igual al valor medio de radioactividad de las muestras blanco. El límite de cuantificación (LOQ) en cada matriz se consideró como el valor obtenido de sumar 30 d.p.m. al resultado de ruido de fondo (LOQ = BKG + 30 d.p.m.). Antes de realizar los cálculos para dar el resultado de radioactividad, el valor de ruido de fondo se restó de las cuentas (d.p.m.) de cada muestra.

La preparación previa de las muestras biológicas para realizar la determinación de radioactividad se describe a continuación:

Plasma y Sangre

En viales de centelleo se pesaron dos alícuotas de 25 µl de plasma y se mezclaron con 1 ml de agua destilada y 10 ml de líquido de centelleo AquaSafe 500 Plus®.

En el caso de las muestras de sangre, se realizó una combustión de dos alícuotas de 25 µl con un oxidante (Tri-Carb 307 Automatic Sample Oxidiser). El ¹⁴CO₂ generado fue absorbido en 8 ml de Carbosorb®, en el que se añadieron 10 ml de líquido de centelleo Permafluor® E⁺.

Orina y Bilis

A cada muestra se le añadió un volumen equivalente a su peso de solución 250 mM de acetato de sodio (pH 4).

Después de homogeneizar, dos alícuotas de 1 ml de orina se mezclaron con 10 ml de líquido de centelleo AquaSafe 500 Plus® y dos alícuotas de 50 µl de bilis se mezclaron con 1 ml de agua destilada y 10 ml de líquido de centelleo AquaSafe 500 Plus®.

Heces, Tracto Gastrointestinal y Carcasa

A cada muestra se le añadió un volumen equivalente a su peso de solución 250 mM de acetato de sodio (pH 4) con un 1% de carboximetilcelulosa.

Después de homogeneizar, se realizó una combustión de dos alícuotas de 0.3 gramos de cada muestra con un oxidante, tal y como se ha descrito para las muestras de sangre.

4.7.1.2 *Muestras del Estudio de Autoradiografía (QWBA, Quantitative Whole Body Autoradiography)*

El nivel de radioactividad en los órganos y tejidos de las secciones de cuerpo entero del estudio R2 se determinó mediante la técnica de autoradiografía PhosphorImaging^[68, 69]. Para ello, se utilizó un analizador de imágenes Fuji FLA-5000 y el programa AIDA (versión 4.06.034, Raytest Isotopenmeßgerate GmbH).

Esta técnica se caracteriza por ser mucho más exacta en la cuantificación de radioactividad que la autoradiografía estándar sobre película de rayos X. El fundamento de la autoradiografía PhosphorImaging es el siguiente: cada sección de cuerpo entero se pone en contacto con una placa *phosphorimager*, que absorbe las partículas beta que emite el isótopo radioactivo presente en la muestra. Estas partículas beta excitan las moléculas de la placa que permanecen en un estado de excitación hasta que el phosphoimager explora la placa con un láser. En ese momento, la partícula beta atrapada por la placa es liberada y monitorizada por un detector computarizado. El equipo convierte la energía que se detecta en una imagen que representa la distribución de radioactividad en el tejido.

Las secciones de cuerpo entero del estudio R2 permanecieron en contacto con la placa *phosphorimager* durante siete días. Además, en cada una de estas placas también se colocaron una serie de estándares externos. Estos estándares se prepararon a partir de sangre de rata a la cual se le añadió una serie de diluciones de la solución de referencia con ¹⁴C-irosustat. Posteriormente, esta sangre se congeló en bloques de carboximetilcelulosa y se seccionó de la misma manera que las muestras de cuerpo entero.

El software calculó automáticamente la concentración de radioactividad en cada tejido en µg equivalente/gramo, así como un valor de background de cada sección que restó del resultado de cada estándar y de cada tejido analizado. El límite de

cuantificación se consideró como el valor medio de background más tres desviaciones estándar.

4.7.2 *Cuantificación de la Radioactividad en Muestras de Perro y Mono*

La cuantificación de los niveles de radioactividad en las muestras de los estudios M1 y P4 se realizó con un contador de centelleo líquido (Beckman LS 6000) con corrección automática de la extinción o quenching.

Para cada tipo de muestra se calculó un valor de ruido de fondo (BKG) igual al valor medio de radioactividad de las muestras basales. El límite de cuantificación (LOQ) en cada matriz se consideró como el doble del valor de ruido de fondo ($LOQ = 2 \times BKG$). Antes de realizar los cálculos para dar el resultado de radioactividad, el valor de ruido de fondo se restó de las cuentas (d.p.m.) de cada muestra. Los resultados finales de radioactividad se expresaron como ngEq del compuesto / gramo de tejido o fluido biológico.

La radioactividad en las muestras de plasma y aguas de lavado se midió directamente, sin ningún tratamiento previo de las muestras. Para cada tiempo de muestreo se analizaron dos alícuotas de 100 μ l de plasma y dos alícuotas de 1 ml de aguas de lavado.

La preparación previa de las muestras biológicas para realizar la determinación de radioactividad se describe a continuación:

Plasma y Sangre

Dos alícuotas de 100 μ l de plasma se pesaron en viales de centelleo y se mezclaron con 10 ml de líquido de centelleo Hionic-Fluor®.

En el caso de la sangre, dos alícuotas de 25 μ l se trataron de forma secuencial con solueno-350:isopropanol (50:50) y después con peróxido de hidrógeno al 30%. Finalmente, se añadió a cada vial 10 ml de líquido de centelleo Hionic-Fluor®.

Orina

A cada muestra se le añadió un volumen equivalente a su peso de solución 250 mM de acetato de sodio (pH 4).

Después de homogeneizar, dos alícuotas de 1 ml de orina se mezclaron con 10 ml de líquido de centelleo Hionic-Fluor®.

Heces

A cada muestra se le añadió un volumen equivalente a su peso de solución 250 mM de acetato de sodio (pH 4) con un 0.025% de carboximetilcelulosa sódica.

Después de homogeneizar, dos alícuotas de 100-150 mg se trataron de forma secuencial con solueno-350:isopropanol (50:50) y después con peróxido de hidrógeno al 30%. Finalmente, se añadió a cada vial 10 ml de líquido de centelleo Hionic-Fluor®.

4.8 Análisis Farmacocinético No Compartimental

Se utilizaron las concentraciones individuales (perros y monos) o medianas (ratas) de irosustat e IDP 17619, en plasma y sangre, para realizar un análisis farmacocinético no compartimental con el programa WinNonlin versión 3.3^[70]. Las concentraciones por debajo del límite de cuantificación se consideraron como cero. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon como se describe a continuación^[71, 72].

- AUC_t : área bajo la curva concentración-tiempo, desde tiempo cero hasta el último tiempo con concentraciones cuantificables, calculada aplicando la regla de los trapecios a la curva log-lineal.
- AUC_τ : área bajo la curva concentración-tiempo, del período comprendido entre dos administraciones, calculada aplicando la regla de los trapecios a la curva log-lineal.
- AUC : área bajo la curva concentración-tiempo, desde tiempo cero hasta el infinito, calculada aplicando la siguiente ecuación:

$$AUC = AUC_t + \frac{C_t}{\lambda_z}$$

siendo C_t la última concentración cuantificable y λ_z la constante de velocidad de eliminación.

- $AUC_{extrap.}$: porcentaje de área (AUC) que se calcula por extrapolación desde el último tiempo con concentraciones cuantificables hasta el infinito.
- C_0 : concentración a tiempo cero tras una administración intravenosa, calculada por regresión lineal de los dos primeros puntos de la curva log-lineal de concentración-tiempo.
- C_{max} : concentración máxima.
- CL : aclaramiento, calculado con la siguiente ecuación:

$$CL = \frac{D}{AUC}$$

- λ_z : constante de velocidad de eliminación, calculada por regresión lineal de los puntos de la fase terminal de la curva log-lineal de concentración-tiempo tras una administración intravenosa.
- λ_{zapp} : constante aparente de velocidad de eliminación, calculada por regresión lineal de los puntos de la fase terminal de la curva log-lineal de concentración-tiempo tras una administración oral.

- MRT_t y MRT : tiempo medio de residencia desde tiempo cero hasta el último tiempo con concentraciones cuantificables y hasta el infinito, respectivamente, calculados con las siguientes ecuaciones:

$$MRT_t = \frac{AUMC_t}{AUC_t} \quad MRT = \frac{AUMC}{AUC}$$

siendo $AUMC_t$ y $AUMC$ el área bajo el primer momento de la curva desde tiempo cero hasta el último tiempo con concentraciones cuantificables y hasta el infinito, respectivamente.

- $t_{1/2\lambda_z}$: semivida de eliminación asociada a la fase terminal tras una administración intravenosa, calculada con la siguiente ecuación:

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

- $t_{1/2\lambda_{zapp}}$: semivida aparente de eliminación asociada a la fase terminal tras una administración oral, calculada con la siguiente ecuación:

$$t_{1/2\lambda_{zapp}} = \frac{\ln 2}{\lambda_{zapp}}$$

- t_{max} : tiempo en el que se alcanza la concentración máxima.
- V_{ss} : volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario, calculado con la siguiente ecuación:

$$V_{ss} = MRT \cdot CL$$

- V_z : volumen de distribución calculado en la fase terminal con la siguiente ecuación:

$$V_z = \frac{D}{AUC \cdot \lambda_z}$$

Otros parámetros farmacocinéticos se calcularon como sigue utilizando una hoja de cálculo del Excel XP.

- AUC/D : área bajo la curva concentración-tiempo, desde tiempo cero hasta el infinito, normalizada por la dosis. En determinados casos se utilizó AUC_t o AUC_τ para realizar este cociente.
- $AUC_{IDP17619/irosustat}$: cociente indicativo de la exposición a IDP 17619 con respecto a irosustat. En determinados casos se utilizó AUC_t o AUC_τ para realizar este cociente.
- $AUC_{Plasma/Sangre}$: cociente indicativo de la exposición en plasma con respecto a sangre. En determinados casos se utilizó AUC_t o AUC_τ para realizar este cociente.

- C_{max}/AUC : cociente indicativo de la velocidad de absorción.
- C_{max}/D : concentración máxima normalizada por la dosis.
- C_{avg} : concentración media en estado de equilibrio estacionario, calculada con la ecuación:

$$C_{avg} = \frac{AUC_{\tau}}{\tau}$$

siendo τ el período de tiempo entre dos administraciones.

- F: biodisponibilidad, calculada con la ecuación:

$$F = \frac{(AUC / D)_{Oral}}{(AUC / D)_{i.v}}$$

- $R_{ac(AUC)}$: índice de acumulación, calculado con los valores de área bajo la curva concentración-tiempo del período comprendido entre dos administraciones, mediante la siguiente expresión:

$$R_{ac(AUC)} = \frac{(AUC_{\tau})_{ss}}{(AUC_{\tau})_{Dia 1}}$$

4.9 Análisis Farmacocinético Poblacional

El objetivo de este análisis fue desarrollar un modelo poblacional^[73], tanto para perro como para rata, para caracterizar los perfiles farmacocinéticos en plasma y sangre de irosustat tras una administración única.

El tipo de análisis que se siguió para la construcción de cada modelo de efectos mixtos se basa en el principio de que los parámetros farmacocinéticos de un individuo en particular surgen de una distribución de dichos parámetros en la población, la cual se puede describir mediante una media poblacional y una variabilidad interindividual. Así, la unidad de análisis de los modelos de efectos mixtos es la población y no el individuo.

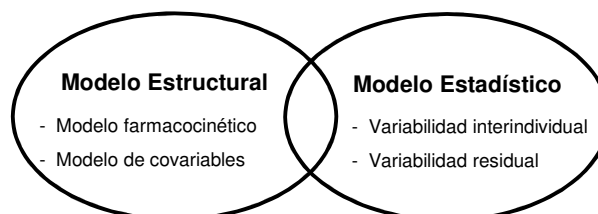
Los modelos de efectos mixtos consideran conjuntamente la influencia de los parámetros de efectos fijos y aleatorios sobre las concentraciones observadas de fármaco, permitiendo la estimación simultánea de todos los parámetros que cuantifican esta influencia.

Componentes de un modelo de efectos mixtos

Dentro de un modelo de efectos mixtos podemos distinguir dos partes: un modelo estructural y un modelo estadístico (ver Figura 5). 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 o en este caso, de los animales. El modelo estadístico tiene el objeto de evaluar la magnitud de la variabilidad de los parámetros farmacocinéticos y de la variabilidad residual.

Figura 5 Componentes de un Modelo Farmacocinético de Efectos Mixtos.



a) *Modelo Estructural*

El componente estructural de un modelo de efectos mixtos define el comportamiento cinético del fármaco en el individuo típico (medio) de la población en función de ciertos factores (covariables) capaces de alterarlo.

Modelo farmacocinético: En general, los modelos farmacocinéticos pueden dividirse en modelos mecanísticos o fisiológicos y modelos empíricos o compartimentales. Los modelos desarrollados para irosustat corresponden a modelos compartimentales, y por tanto los componentes del sistema que son cinéticamente homogéneos se agrupan en un número discreto de compartimentos, con entradas y pérdidas del fármaco especificadas con las correspondientes ecuaciones^[74].

Teniendo en cuenta únicamente el modelo farmacocinético, y englobando el conjunto de parámetros farmacocinéticos del individuo i dentro del vector PK_i , la evolución temporal de las concentraciones de un fármaco puede describirse del siguiente modo:

$$Y_{ij}=f(D_i,PK_i,t_{ij})+\varepsilon_{ij}$$

donde Y_{ij} representa las observaciones al tiempo t_j en el individuo i , f representa la estructura del modelo, D_i es la dosis de fármaco administrada y ε_{ij} representa la diferencia residual entre el valor predicho por el modelo y el observado para el individuo i en el tiempo j .

Modelo de covariables: Una covariable se define como aquella característica específica de un individuo que puede afectar al comportamiento del fármaco a través de un cambio en sus parámetros cinéticos. La forma en la que el parámetro de interés cambia dependiendo de los valores de las covariables se puede modelar mediante diferentes expresiones matemáticas, dependiendo de las características de cada una de las covariables (categórica o continua) y de su influencia en el parámetro^[75].

En esta investigación la forma en que se han incorporado las covariables categóricas ha sido mediante expresiones condicionales. En el caso de una covariable que puede tomar valores de 1 o 2, por ejemplo, la expresión sería la siguiente:

$$p_i = \theta_1$$
$$\text{si (COV=2) } p_i = \theta_2$$

donde p_i es el valor del parámetro p en el individuo i , θ_1 representa el valor del parámetro cuando la covariable (COV) toma el valor de 1, y θ_2 representa el valor del parámetro cuando la covariable toma el valor de 2.

Para incorporar variables continuas, se consideró el modelo de cambio fraccional. De esta manera, el efecto de una covariable continua se expresa en relación con el valor mediano de la población, según la expresión:

$$p_i = \theta_1 * (1 + \theta_2 * (\text{COV} - \text{mediana}))$$

donde p_i es el valor del parámetro p en el individuo i , θ_1 representa el valor del parámetro cuando la covariable (COV) toma el valor de la mediana, y θ_2 representa la variación relativa del parámetro por cada unidad de cambio en la covariable respecto a su mediana.

También se ha utilizado la expresión alternativa del modelo de cambio fraccional que consiste en normalizar la covariable por el valor mediano de la población, según la expresión:

$$p_i = \theta_1 * (1 + \theta_2 * (\text{COV} / \text{mediana}))$$

Durante la fase de incorporación de covariables en el modelo, el grado de la mejoría del ajuste de los datos por la adición de cada nuevo factor se evaluó mediante el criterio estadístico descrito en la sección 4.9.4.

b) *Modelo Estadístico*

Puede diferenciar dos fuentes de variabilidad cinética en una población: la variabilidad interindividual y la variabilidad residual.

Variabilidad interindividual: Es la variabilidad en los parámetros cinéticos observada entre diferentes individuos de la población. La elección de cómo modelar la variabilidad interindividual se basa en las características de los datos.

En esta investigación se ha utilizado el modelo más frecuentemente empleado para este fin que es el modelo exponencial. Este modelo implica que los parámetros individuales seguirán una distribución log-normal y que no alcanzarán valores negativos, lo que se ajusta a lo esperable desde el punto de

vista fisiológico. Por tanto, la variabilidad interindividual (VII) se modeló de forma exponencial tal y como se muestra a continuación^[76]:

$$p_i = \theta_{p, pop} * e^{\eta_{pi}}$$

donde p_i es el valor del del parámetro individual del individuo i , $\theta_{p, pop}$ es el valor típico poblacional del parámetro y η_{pi} es la desviación de p_i con respecto a $\theta_{p, pop}$. Si la población cuenta con un número m de individuos, los valores de η_{p1} , η_{p2} , $\eta_{p3} \dots \eta_{pm}$ representan la desviación de los parámetros de cada individuo respecto al valor medio poblacional. Esta desviación tiene una distribución aleatoria, simétricamente distribuida alrededor del valor 0 y con una varianza igual a ω_p^2 . El valor de ω_p^2 representa la variabilidad interindividual asociada al parámetro p .

Variabilidad residual: La variabilidad residual de un modelo (ε), también conocida como error residual, cuantifica la desviación entre las concentraciones predichas por el modelo y las concentraciones realmente observadas en el individuo que no se pueden explicar mediante el modelo poblacional propuesto. Durante el desarrollo del modelo poblacional de irosustat, el error residual se modeló de forma aditiva, proporcional y mixta (aditivo más proporcional), según las siguientes expresiones^[77]:

$$\text{Error aditivo} \quad Y_{ij} = \hat{Y}_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

$$\text{Error proporcional} \quad Y_{ij} = \hat{Y}_{ij} * (1 + \varepsilon_{ij})$$

$$\text{Error mixto} \quad Y_{ij} = \hat{Y}_{ij} * (1 + \varepsilon_{ij1}) + \varepsilon_{ij2}$$

donde Y_{ij} es la concentración observada en el individuo i en el punto de tiempo j , \hat{Y}_{ij} es la concentración del fármaco predicha para el individuo i al tiempo j , y ε_{ij} representa la diferencia residual entre el valor predicho por el modelo y el observado para el individuo i en el tiempo j .

En los dos modelos finales de irosustat (para rata y para perro), el error residual, tanto en plasma como en sangre, se modeló mediante un modelo de error aditivo.

4.9.1 *Análisis de los Datos*

El análisis farmacocinético poblacional de los datos de los estudios de proporcionalidad de dosis P6 y R3 se realizó con el programa NONMEM (NONlinear Mixed Effects Modeling) versión VI^[78] mediante el método de estimación condicional de primer orden (FOCE) con interacción^[79]. El NONMEM es básicamente un programa de regresión no lineal que utiliza una función objetiva

de máxima probabilidad. Este programa estima mediante regresión no lineal y simultáneamente los parámetros de efectos fijos (parámetros farmacocinéticos poblacionales correspondientes al modelo estructural) y los parámetros de efectos aleatorios (variabilidad interindividual y residual).

Con el fin de trabajar con cifras de concentración de un orden de magnitud similar y facilitar el ajustado del modelo, las concentraciones de irosustat en plasma y sangre expresadas en ng/ml se transformaron a $\mu\text{mol/l}$ y se aplicaron logaritmos.

4.9.2 Desarrollo del Modelo

4.9.2.1 Modelo Farmacocinético en Perro

En la exploración de los datos se vio que el irosustat presentaba un comportamiento farmacocinético no lineal, tanto en plasma como en sangre aunque en esta última matriz esta no linealidad era algo más pronunciada.

Para el desarrollo del modelo se hicieron tres aproximaciones:

- Se verificó que un modelo farmacocinético lineal (monocompartimental, bicompartimental o tricompartmental) no se ajustaba a los datos.
- Se comprobó que un modelo con una distribución saturable no instantánea (Michaelis-Menten) del plasma hacia los eritrocitos no podía explicar los datos.
- Se confirmó que un modelo que asumiera una distribución instantánea del irosustat desde el plasma hacia los eritrocitos se ajustaba a los datos observados. Este modelo fue previamente descrito por Wagner^[80] y aplicado en varias ocasiones^[81].

Las características del modelo y su descripción matemática se detallan en el apartado “Análisis Farmacocinético Poblacional” de la sección 5.1.2.4.

4.9.2.2 Modelo Farmacocinético en Rata

El modelo farmacocinético poblacional en rata se empezó a construir una vez se tenía definido el modelo para perro y por tanto en este caso se partía de un conocimiento previo más profundo sobre la farmacocinética de irosustat. De esta manera, una vez verificado que un modelo farmacocinético lineal no se ajustaba a los datos, se confirmó que, al igual que se había observado en el perro, un modelo que asumiera una distribución instantánea del irosustat desde el plasma hacia los eritrocitos se ajustaba a los datos observados.

Las características del modelo y su descripción matemática se detallan en el apartado “Análisis Farmacocinético Poblacional” de la sección 5.1.1.3.

4.9.3 *Selección del Modelo*

La selección entre los distintos modelos se realizó mediante la inspección de los gráficos de bondad de ajuste^[82] y la precisión de los parámetros estimados, en el caso de que esta pudiera ser calculada.

Durante el desarrollo del modelo se utilizó como guía el mínimo valor de función objetiva facilitada por NONMEM, que es igual a -2 veces el valor del logaritmo de la función de máxima verosimilitud (-2xlog likelihood, -2LL). Para dos modelos anidados, al añadir un nuevo parámetro una disminución de la función objetiva de 3.84 puntos se consideró estadísticamente significativa con un valor de $p=0.05$.

En resumen, la construcción del modelo con la ayuda del programa NONMEM se realizó partiendo de un modelo poblacional básico denominado Modelo Estructural Básico, en el cual se optimizaron los parámetros del modelo farmacocinético (ej.: aclaramiento y volumen aparente de distribución) sin covariables. Del Modelo Estructural Básico se pasó a un Modelo Estructural Final en que se comprobó si la incorporación de covariables continuas o categóricas era estadísticamente significativa.

En el modelo farmacocinético final, tanto para la rata como para el perro, la variabilidad interindividual se expresó como CV(%), la magnitud del error residual se expresó como $\log(\mu\text{mol/l})$ y cada uno de los parámetros farmacocinéticos estimados se expresó con las correspondientes unidades.

4.9.4 *Análisis de las Covariables*

Para la selección de covariables que integran el modelo poblacional se utilizó el procedimiento GAM (modelo aditivo generalizado)^[83, 84]. Este procedimiento se basa en optimizar un modelo de regresión múltiple para modelar la dependencia entre el parámetro farmacocinético y las diferentes covariables. Para la aproximación GAM se utilizó la aplicación XPOSE^[85] integrado en el programa R^[86] versión 2.12.0.

Posteriormente, se valoró la diferencia en el valor de la función objetiva proporcionada por NONMEM para cada modelo poblacional cuando se incorporan las covariables seleccionadas por el GAM. Esta aproximación se basa en asumir que la introducción de una covariable con influencia en el parámetro estudiado mejora el modelo de regresión y esto se traduce en una reducción en el valor de la función objetiva. Si la reducción observada en la función objetiva responde a un criterio estadístico predeterminado, se considera que la covariable estudiada influye de manera significativa en el modelo analizado. Durante el proceso de incorporación de covariables este test estadístico se utilizó con una probabilidad $p<0.01$ que equivale de acuerdo con las tablas estadísticas para este tipo de distribución (chi-cuadrado) a una diferencia en los valores de función objetiva de 6.63.

4.9.5 *Evaluación del Modelo*

Se realizó una evaluación interna del modelo mediante la técnica del “Visual Predictive Check” (VPC) [87, 88].

Esta técnica consiste en evaluar el modelo mediante una simulación con los parámetros finales estimados y posteriormente comparar la distribución de las concentraciones simuladas con la distribución de las concentraciones observadas. El gráfico concentración-tiempo de las observaciones y del intervalo de simulación proporciona la evaluación predictiva visual (“visual predictive check”) del modelo.

Se considera que el modelo predice de forma razonable la evolución de las observaciones con el tiempo si el intervalo de confianza del 95% de las concentraciones simuladas se solapa con las concentraciones observadas.

Los pasos para realizar el VPC son:

- Estimar los parámetros con el modelo a evaluar.
- Utilizando el modelo y los parámetros, simular 1000 observaciones para cada tiempo de muestreo.
- Realizar el gráfico de concentración vs. tiempo de las concentraciones observadas junto con el valor medio y el intervalo de confianza del 95% de las concentraciones simuladas.

4.10 *Análisis Estadístico*

4.10.1 *Estadística Descriptiva*

Las concentraciones de irosustat e IDP 17619 obtenidas en las ratas fueron estadísticamente descritas por la mediana y el número de casos.

Las concentraciones de irosustat e IDP 17619 obtenidas en los perros, así como los correspondientes parámetros farmacocinéticos, fueron estadísticamente descritos por la media, la desviación estándar de la media y el número de casos.

Las concentraciones por debajo del límite de cuantificación se consideraron como cero en la estadística descriptiva. La concentración media para cada tiempo de muestreo sólo se calculó cuando la proporción de valores numéricos era igual o superior al 50%.

Estos cálculos se realizaron con una hoja de cálculo del Excel XP.

4.10.2 *Modelo de Potencia para la Evaluación de la Proporcionalidad de Dosis*

La proporcionalidad de dosis se evaluó mediante el Modelo de Potencia (*Power Model*) [89, 90]. La relación entre cada parámetro farmacocinético (y) y la dosis se define mediante la siguiente función potencial:

$$y = \alpha * dosis^{\beta}$$

Tras una transformación logarítmica, se realizó una regresión lineal de la siguiente expresión mediante el programa SAS Enterprise Guide versión 4.1^[91]:

$$\log (y) = \mu + \beta * \log (dosis)$$

donde “y” es el parámetro de interés (AUC, C₀ o C_{max}), μ la ordenada origen y β la pendiente de la recta.

Cuando β es igual a 1 se considera una proporcionalidad de dosis perfecta. El valor estimado de β junto con su intervalo de confianza del 95% (IC95%) se utiliza para cuantificar el grado de proporcionalidad. De esta manera, si el IC95% de β incluye el 1 se considera que hay proporcionalidad de dosis para el parámetro farmacocinético estudiado.

4.10.3 *Análisis Estadístico para Evaluar el Efecto de la Comida en la Absorción de Irosustat*

Para evaluar el efecto de la comida en la velocidad y magnitud de absorción de irosustat se utilizó el programa WinNonlin^[70] versión 3.3. Los parámetros farmacocinéticos AUC y C_{max}, obtenidos tras administrar en irosustat en condiciones de ayuno y tras una comida, se logotransformaron y se compararon utilizando la herramienta *Bioequivalence Wizard* de WinNonlin. El método estadístico se basa en calcular el intervalo de confianza del 90% para el cociente de medias geométricas del correspondiente parámetro obtenido en las dos condiciones de ensayo (comida/ayuno). Si este intervalo de confianza del 90% está dentro los límites de 0.8 y 1.25^[92], se considera que la comida no tiene efecto en la magnitud de absorción de irosustat.

Los valores de t_{max} obtenidos tras administrar en irosustat en condiciones de ayuno y tras una comida se compararon mediante el test no paramétrico de Wilcoxon con el programa SAS Enterprise Guide versión 4.1^[91]. Se consideró p<0.05 como el límite de significación estadística.

4.10.4 *ANOVA para la Comparación de Formulaciones*

Se utilizó el análisis de la varianza de una vía (ANOVA) para:

- investigar el efecto del tamaño de partícula del irosustat dentro de cápsulas en los parámetros de exposición (C_{max}/D y AUC_t/D)
- comparar la exposición a irosustat tras la administración de distintas formulaciones de comprimidos y cápsulas

Antes de realizar el análisis de la varianza, los valores de C_{max}/D y AUC_t/D fueron logotransformados para obtener una distribución normal de los mismos. Después se

verificaron las asunciones de normalidad (contraste de asimetría y curtosis) y homogeneidad de las varianzas (test modificado de Levene).

Para realizar estos cálculos se utilizó el programa NCSS 2001^[93] y se consideró $P < 0.05$ como el límite de significación estadística.

RESULTADOS

AVÍS IMPORTANT

El text d'aquest capítol ha estat retirat seguint instruccions de l'autora de la tesi, en existir participació d'empreses, existir conveni de confidencialitat o existeix la possibilitat de generar patents

AVISO IMPORTANTE

El texto de este capítulo ha sido retirado siguiendo instrucciones de la autora, al existir participación de empresas, convenio de confidencialidad o la posibilidad de generar patentes.

IMPORTANT NOTICE

The text of this chapter has been withdrawn on the instructions of the author, as there is participation of undertakings, confidentiality agreement or the ability to generate patent

DISCUSIÓN

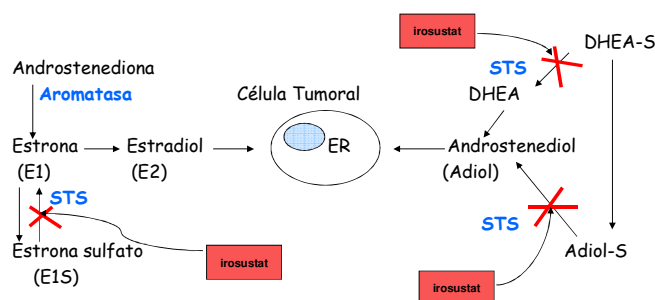
6 DISCUSIÓN

El cáncer de mama está siendo ampliamente investigado en los últimos años, ya que éste es el tumor maligno más frecuente entre las mujeres de todo el mundo.

La investigación se ha dirigido principalmente a la identificación de inhibidores de la aromatasa para el tratamiento del cáncer de mama hormonodependiente. El hecho de que muchos tumores de mama no respondan a la terapia endocrina o progresen después de un periodo de tiempo relativamente corto, ha conducido al desarrollo de nuevas moléculas que actúen sobre otros enzimas.

Irosustat es una nuevo compuesto en fase de desarrollo, inhibidor irreversible de la sulfatasa esterooidal (STS), que actúa bloqueando la síntesis de estrógenos que están implicados en el desarrollo y progresión del cáncer de mama hormonodependiente (ver Figura 66).

Figura 66 Vía de la Sulfatasa vs. Vía de la Aromatasa



Así, irosustat, representa una opción de futuro muy prometedora para el tratamiento del cáncer de mama hormonodependiente en mujeres posmenopáusicas, fundamentalmente por tres motivos:

- Por la vía de la STS se sintetizan 10 veces más de estrógenos que por la vía de la aromatasa (2.8 pmol/g proteína por hora vs. 0.27 pmol/g proteína por hora, respectivamente)^[17]
- La concentración circulante de estrona sulfato (E1S) es muy superior a la de sus derivados no conjugados estrona y estradiol. Esta elevada concentración circulante de E1S, junto con su larga semivida debida a la unión con albúmina, sugieren que la E1S podría actuar como reservorio para la formación de estrógenos biológicamente activos mediante la acción de la STS, la cual permite la hidrólisis de E1S a estrona^[25]
- El adiol, aunque es un andrógeno, puede unirse al receptor de estrógenos y estimular el crecimiento de las células tumorales. Su síntesis es independiente de la aromatasa, pero dependiente de la sulfatasa^[18]

La actividad farmacológica *in vivo* de irosustat se valoró inicialmente en la rata. La administración de una dosis única oral de 10 mg/kg de irosustat a ratas hembra Wistar, produjo una inhibición casi completa (> 90%) de la actividad E1-STS en hígado^[50]. El tiempo que tardó la actividad E1-STS en estar un 50% recuperada tras la administración de irosustat fue de 3.5 días, tiempo similar al periodo de recambio de la E1-STS^[51]. Una vez establecida la actividad farmacológica de irosustat, era indispensable estudiar su comportamiento farmacocinético, con el objeto de dilucidar qué sucede con irosustat desde el momento en el que es administrado hasta su total desaparición del organismo.

La primera información farmacocinética del producto se publicó en ratas hembra Wistar tras la administración intravenosa y oral de irosustat a la dosis de 10 mg/kg^[98]. Ireson y colaboradores indicaron que irosustat presentaba una buena biodisponibilidad oral, a pesar de mostrar una rápida degradación en plasma. Además, señalaron que irosustat en sangre se unía de forma reversible a los eritrocitos y esto lo protegía de la degradación y/o metabolismo. En este trabajo no se estableció ningún protocolo de trabajo que pudiese minimizar la degradación en plasma de irosustat hacia el producto inactivo IDP 17619 por pérdida del grupo sulfamato.

Los investigadores de Sterix Ltd. y Cancer Research UK, en un intento de mejorar la estabilidad de irosustat en plasma, en el primer ensayo de Fase I de irosustat, añadieron ácido cítrico a las muestras de sangre humana inmediatamente tras su extracción. El plasma obtenido a partir de esta sangre acidificada probablemente presentaba un alto grado de hemólisis y en consecuencia, tanto las concentraciones de irosustat en plasma como los valores de AUC en plasma a las dosis orales de 5 mg (7233 ng·h/ml) y 20 mg (16323 ng·h/ml)^[52] es muy posible que estuviesen sobreestimados debido a la salida de irosustat desde el interior de los eritrocitos.

Durante este ensayo clínico, también se pusieron de manifiesto algunos inconvenientes de la formulación empleada, consistente en un polvo liofilizado de irosustat con un 7.5% (v/v) de ciclodextrinas, reconstituido en agua antes de la administración. Por un lado, esta preparación presentaba un sabor muy amargo que ocasionó quejas por parte de todos los pacientes y por otro lado, el proceso de liofilización era difícil de reproducir de forma consistente. Todo ello, hizo necesario el desarrollo de otra forma farmacéutica, la cual se evaluó en perros en el presente trabajo, para continuar con la Fase I de desarrollo clínico.

En la investigación objeto de la presente tesis, una vez establecidas las bases para garantizar la estabilidad de irosustat en muestras de fluidos biológicos, se ha profundizado en el conocimiento del comportamiento farmacocinético del producto en diferentes especies animales, con el fin de facilitar la interpretación de los

resultados farmacocinéticos en humanos, ayudar a diseñar e interpretar los estudios de toxicología del producto y, a la vez, cumplir con los requisitos necesarios, desde un punto de vista de reglamentación sanitaria para elaborar un futuro dossier de registro del producto.

El primer aspecto característico del producto, y relevante desde un punto de vista farmacocinético, es su elevada unión a eritrocitos. Concretamente, la unión de irosustat a la anhidrasa carbónica II (CA II) del interior de los eritrocitos se debe al grupo sulfamato, que presenta una similitud estructural con las sulfonamidas, que por lo general, actúan como potentes inhibidores de la CA II^[55]. De hecho, la cristalización de la CA II en presencia de irosustat^[56] demostró la unión reversible del grupo sulfamato de irosustat al átomo de zinc del sitio activo de la CA II.

Los estudios realizados con CA II proveniente de eritrocitos, revelaron que el irosustat es un potente inhibidor de la CA II con una IC₅₀ de 25 nM^[57], demostrando ser equipotente a la acetazolamida, inhibidor de referencia de la CA II.

Esta unión reversible de irosustat a la CA II del interior de los eritrocitos afecta a su comportamiento farmacocinético^[58]. La farmacocinética de los compuestos que se unen fuertemente a la CA II de los eritrocitos, depende de la magnitud de dicha unión: el aumento de la unión a CA II se espera que prolongue la semivida en sangre de estos compuestos, mientras que un desplazamiento de dicha unión provocaría una aceleración en la eliminación. Asimismo, el hecho de que los sulfamatos sean capaces de transitar por el hígado en el interior de los eritrocitos, los protege de la degradación y facilita que estos compuestos tengan una buena biodisponibilidad cuando se administran por vía oral.

Todo ello supuso, desde el inicio, una dificultad para el estudio farmacocinético de este producto, y especialmente en cuanto a la manipulación y conservación de las muestras biológicas. Aunque, gran parte del trabajo desarrollado en este sentido, no se ha incluido en la memoria, fue necesario en un inicio investigar y profundizar en los resultados iniciales “algo inconsistentes” de los diferentes estudios llevados a cabo de forma previa a este trabajo. En las muestras de sangre, la hemólisis ocasiona que en el plasma resultante se encuentren concentraciones artefactualmente elevadas de irosustat, observándose este fenómeno en mayor o menor medida en función de la especie estudiada.

El desarrollo y validación de la metodología analítica por HPLC acoplada a espectrometría de masas para la cuantificación de irosustat y de uno de sus metabolitos y/o productos de degradación, IDP 17619, en plasma y en sangre fue fundamental para establecer las bases de trabajo relativas a la manipulación de las muestras biológicas. Durante las validaciones analíticas de estas metodologías se hizo especial énfasis en el estudio de la estabilidad del producto, diseñándose estudios específicos que permitieran evaluar y fijar, durante las diferentes etapas de

obtención y posterior manipulación de las muestras, las condiciones idóneas que permitieran el estudio farmacocinético del producto. Como resultado de estos estudios previos se estableció un protocolo estricto de trabajo para la manipulación de las muestras, cuyas principales características son las siguientes:

- Los tubos con las muestras de sangre y de plasma deben sumergirse en un baño de agua con hielo inmediatamente tras su obtención.
- Las alícuotas de sangre hay que tratarlas con una solución acuosa de ácido fórmico al 50% para romper los eritrocitos y liberar el irosustat de su interior.
- Todas las muestras deben centrifugarse a +4°C y congelarse a -80°C en un tiempo inferior a 6 horas desde su obtención.

Una vez fijadas las condiciones de manipulación de las muestras y establecida una metodología de análisis, esto permitió cuantificar de forma fiable el compuesto y el metabolito, en plasma y en sangre, en los estudios realizados en las diferentes especies animales. Así pues, la metodología consistente en una extracción en línea en fase sólida acoplada a HPLC y seguida de espectrometría de masas (*on-line* SPE HPLC-MS/MS) resultó adecuada para la cuantificación de irosustat y de IDP 17619 en plasma y sangre, en el intervalo de concentraciones que van desde 100 ng/ml hasta 0.250 ng/ml, siendo este último el límite de cuantificación para ambos compuestos. Los resultados de precisión intra e inter-ensayo para ambos compuestos, expresados como coeficiente de variación, estuvieron entre 0.60% y 16.3% y los resultados de exactitud intra e inter-ensayo, expresados como porcentaje de error, oscilaron entre -12.16% y 13.18%.

Aunque no es habitual determinar simultáneamente la concentración de fármaco en estos dos fluidos biológicos, en la mayoría de estudios se consideró necesario para entender la influencia de la unión a eritrocitos en la farmacocinética de irosustat, de igual manera que otros investigadores habían realizado para otros compuestos que se unen a eritrocitos, como el topiramato, indisulam y metazolamida^[99-101].

Se realizaron un total de diecisiete estudios en rata, perro y mono para investigar los diferentes procesos que intervienen en el paso del compuesto por el organismo. En cuanto a las características farmacocinéticas se refiere, se evaluaron la absorción, la proporcionalidad de dosis, la distribución y la excreción de irosustat.

Durante el desarrollo preclínico de irosustat, también se administró ¹⁴C-irosustat por vía intravenosa y oral a estas tres especies animales para evaluar el perfil cinético en plasma y sangre de la radioactividad resultante, así como determinar las principales vías de excreción. Para este fin, se consideró adecuada la introducción de ¹⁴C en todo el anillo bencénico de irosustat.

Absorción

Se administró ^{14}C -irosustat a la dosis de 3 mg/kg a ratas, perros y monos por vía oral e intravenosa, en forma de solución con solventes orgánicos para facilitar la disolución del producto. Después de la administración oral, se investigaron los porcentajes de absorción del producto a partir de los datos de excreción de radioactividad en orina (animales intactos) o en orina y bilis (animales con conducto biliar canulado) recuperados tras la administración del producto por vía oral e intravenosa. Los porcentajes de absorción y los principales parámetros farmacocinéticos de la radioactividad derivada de la administración oral de ^{14}C -irosustat se resumen en la Tabla 128.

Tabla 128 Porcentajes de Absorción y Valores de C_{\max} y t_{\max} de Radioactividad Derivada de la Administración Oral de ^{14}C -Irosustat a la Dosis de 3 mg/kg.

Especie	Estudio	n	% absorción		Plasma				Sangre			
					t_{\max} (h)		C_{\max} (ngEq/ml)		t_{\max} (h)		C_{\max} (ngEq/ml)	
			M	H	M	H	M	H	M	H	M	H
Rata (Intacta)	R1	3M / 3H	92.89	90.03	---	---	---	---	---	---	---	---
Rata (Cánula Biliar)		2M / 2H	86.86	86.23	---	---	---	---	---	---	---	---
Rata		6M / 6H	---	---	1	1	993	800	1	3	9740	9440
Perro	P4	1M / 1H	71.6	~100	1	0.25	1854	5529	0.5	0.25	5555	10580
Mono	M1	1M / 1H	~100	~100	1	1	981.9	845.2	1	1	18210	19518

M: machos; H: hembras; ---: No aplica

En la rata se realizó un estudio completo de ADME, y en el perro y el mono, atendiendo a las existencias limitadas de producto marcado, estos estudios se realizaron con un único animal de cada sexo y especie con la idea de ser utilizados como estudios exploratorios.

De los resultados hallados se desprende que la absorción del producto es prácticamente completa en las diferentes especies cuando se administra a la dosis de 3 mg/kg. En la rata y el mono no se observaron diferencias entre ambos sexos. Mientras que en el perro, la diferencia en el porcentaje de absorción se debió a que en el macho la radioactividad se recuperó principalmente en heces y en la hembra la mayoría de la radioactividad fue excretada por orina.

Los valores máximos de radioactividad (C_{\max}) fueron mucho más grandes en sangre que en plasma, especialmente en el mono, poniendo de manifiesto la unión de irosustat al interior de los eritrocitos. No se hallaron diferencias entre sexos, con la excepción del perro, en el que el macho presentó unos niveles de radioactividad más bajos, pero más duraderos en el tiempo, que la hembra.

Los valores de C_{\max} de radioactividad generalmente se alcanzaron alrededor de 1 hora, indicando que la absorción del producto es relativamente rápida.

La cinética de absorción de irosustat, administrado en forma de suspensión acuosa (1% metilcelulosa) a las dosis de 3, 30 y 300 mg/kg a grupos de 12 ratas/dosis y de 0.25, 2.5 y 25 mg/kg a grupos de 9 perros/dosis, se modeló en el análisis farmacocinético poblacional mediante un proceso de primer orden. Ello implica que la velocidad de absorción de irosustat disminuye con la cantidad de producto que queda por absorberse y, por lo tanto, el número de moléculas que se absorbe en la unidad de tiempo disminuye con el tiempo de forma exponencial^[102].

La velocidad de absorción de irosustat fue relativamente rápida a dosis pequeñas, con semividas de velocidad de absorción de 0.44 y 0.65 horas en rata y perro, respectivamente. Al incrementar las dosis, la velocidad de absorción en rata disminuyó considerablemente, alcanzándose valores de semivida de absorción de 1.06 y 2.60 horas a las dosis de 30 y 300 mg/kg, respectivamente. No obstante, en perro, la semivida de absorción se mantuvo constante a la dosis de 2.5 mg/kg, y el cociente C_{\max}/AUC reflejó una velocidad aparente de absorción prácticamente estable a las tres dosis ensayadas (Tabla 129).

Los valores de t_{\max} de irosustat oscilaron entre 1.1 y 3 horas en rata y alrededor de 1 hora en perro.

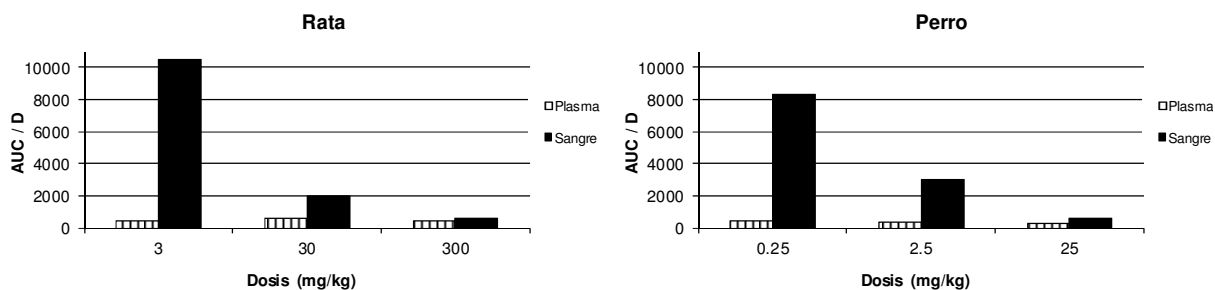
La magnitud de absorción de irosustat, en el intervalo de dosis de 3 a 300 mg/kg en rata y de 0.25 a 25 mg/kg en perro, puso de manifiesto valores de C_{\max} y de AUC que incrementaron en menor proporción que la dosis administrada (Tabla 129), indicando una falta de linealidad cinética en el intervalo de dosis ensayadas^[103]. Ello se atribuyó a una falta de absorción, que fue especialmente evidente en sangre, debido a la escasa solubilidad del producto (Figura 67).

Tabla 129 Parámetros Farmacocinéticos de Absorción Obtenidos tras la Administración Oral de Irosustat

Especie:	Rata			Perro		
Estudio:	R3			P6		
Nº de animales y Sexo:	12M	12M	12M	9H	9H	9H
Dosis (mg/kg)	3	30	300	0.25	2.5	25
PLASMA						
t _{max} (h)	1.11	1.14	3.00	1.00	1.00	0.834
C _{max} (ng/ml)	708.8	5908	16800	49.96	582	3791
AUC (ng·h/ml)	1257	17700	118406	100.6	968.1	6546
C _{max} /AUC (h ⁻¹)	0.564	0.334	0.142	0.509	0.615	0.563
F (%) (NC)	27.0	21.2	11.9	84.1	73.4	44.5
F (%) (PopPK)	34.7	24.3	10.6	78.7	78.7	---
K _a (h ⁻¹)	1.57	0.66	0.27	1.06	1.06	---
t _{1/2 abs} (h)	0.44	1.06	2.60	0.65	0.65	---
SANGRE						
t _{max} (h)	1.11	0.667	1.10	1.00	1.00	0.333
C _{max} (ng/ml)	8910	15220	19640	1041	3360	5282
AUC (ng·h/ml)	31380	60228	171090	2079	7597	15018
C _{max} /AUC (h ⁻¹)	0.284	0.253	0.115	0.508	0.431	0.367
F (%) (NC)	93.4	80.3	19.0	97.7	99.1	27.1

NC: análisis no compartimental; PopPK: análisis poblacional;
M: machos; H: hembras; ---: no determinado

Figura 67 Valores de Exposición Normalizados por la Dosis Obtenidos tras la Administración Oral de Irosustat.



Los valores de biodisponibilidad absoluta, determinados en plasma, indicaron una biodisponibilidad incompleta del producto y decrecieron al incrementar las dosis administradas. Los valores hallados oscilaron entre 27.0% y 11.9% (34.7% a 10.6% en el modelo poblacional) en rata y entre 84.1% y 44.5% (78.7% en el modelo poblacional a las dos dosis inferiores) en perro. En ambas especies animales, cuando la biodisponibilidad absoluta se determinó a partir de los valores en sangre, los resultados hallados a las dos dosis inferiores fueron muy superiores, siendo de 80.3% a 99.1%. A las dosis superiores, la biodisponibilidad absoluta disminuyó a 19% y 27% en rata y perro, respectivamente.

La diferencia entre la absorción completa observada en el estudio con ¹⁴C-irosustat y la biodisponibilidad parcial constatada en el estudio con producto no radiomarcado, puede explicarse por un efecto de primer paso hepático, que es

especialmente intenso en la rata. En consecuencia, aunque el compuesto sea absorbido en el tracto gastrointestinal, al llegar al hígado a través de la vena porta, es metabolizado antes de alcanzar la circulación sistémica. Este efecto se observa con menor intensidad en los niveles sanguíneos de irosustat que en los de plasma, debido al efecto protector que ejercen los eritrocitos frente a la degradación y/o el metabolismo de irosustat^[98].

A las dosis más altas, además del efecto de primer paso, la caída en los valores de biodisponibilidad es debida probablemente a que la limitada solubilidad de irosustat condiciona su absorción.

Irosustat, dentro del sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS), está incluido en la Clase 2, compuesto de alta permeabilidad y baja solubilidad, y por ello, antes de iniciar el desarrollo preclínico de irosustat se valoró la necesidad de micronizar el compuesto para lograr una mejora de la solubilidad *in vivo* que se tradujese en un aumento de la biodisponibilidad.

Amidon y colaboradores definieron que los parámetros clave que controlan la absorción de fármacos son tres números adimensionales^[104]: número de dosis, número de disolución y número de absorción, que representan los procesos fundamentales de dosificación, disolución y permeación, respectivamente. En el caso de un producto de Clase 2, como irosustat, una forma de aumentar el número de disolución es reducir el tamaño de partícula. De esta manera, al aumentar la superficie específica, disminuye el tiempo requerido para que se disuelva cada partícula de fármaco.

El efecto del tamaño de partícula en la magnitud y velocidad de absorción de irosustat se evaluó en perros hembra *beagle* (estudios P1, P2 y P3). Para ello, se administraron cinco formulaciones de cápsula con irosustat micronizado a distintos tamaños de partícula (de 3 a 15 μm).

El cociente indicativo de velocidad de absorción ($C_{\text{max}}/\text{AUC}$) generalmente decreció con el aumento del tamaño de partícula.

La variabilidad en la magnitud de absorción fue elevada entre los diferentes perros que recibieron la misma formulación, especialmente en los tamaños de partícula de los extremos (3 y 15 μm) (Figura 68). Esta absorción variable se presenta en numerosos fármacos de Clase 2, debido a que existen muchas variables *in vivo* y de la formulación que pueden modificar el perfil de disolución^[104].

Considerando los valores de área bajo la curva, la mayor exposición a irosustat se consiguió con el irosustat micronizado a 5 μm (Tabla 130). Aunque en el análisis de la varianza de un factor, no se pudieron demostrar diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) con este tamaño de muestra entre los valores logotransformados de AUC_t/D y C_{max}/D obtenidos para formulación, los niveles de exposición de irosustat permitieron establecer en 5 μm el tamaño óptimo de

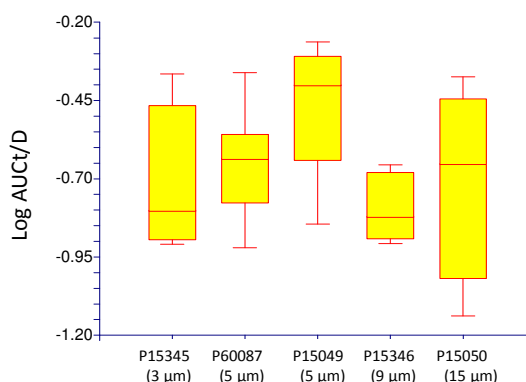
partícula de irosustat. Por lo tanto, se seleccionó este tamaño de partícula para continuar con el desarrollo del producto.

Tabla 130 Parámetros Farmacocinéticos Medios Obtenidos en Perro tras la Administración de Irosustat Micronizado a 3, 5, 9 y 15 μm .

Parámetro	Cápsulas				
	P15345 (3 μm)	P15049 (5 μm)	P60087 (5 μm)	P15346 (9 μm)	P15050 (15 μm)
Dosis (mg/kg)	3.4	3.2	3.3	3.4	3.2
t_{max} (h) [#]	1.00	2.00	1.00	1.50	1.75
C_{max} (ng/ml)	489.2	457.7	330.2	230.0	215.7
AUC_t (ng·h/ml)	769.6	1189	769.6	546.1	712.9
AUC (ng·h/ml)	825.9	1198	805.6	581.3	748.4
C_{max}/AUC (h ⁻¹)	0.59	0.38	0.41	0.40	0.29

[#]: t_{max} se describe con el valor mediano

Figura 68 Box Plot de los Valores Logotransformados de AUC_t/D Obtenidos para Cada Formulación.



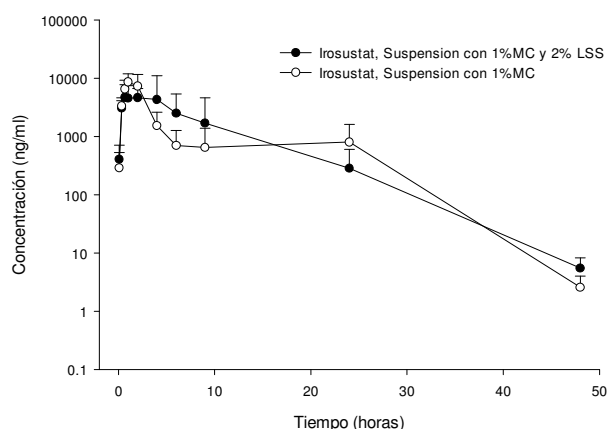
Otra aproximación frecuentemente utilizada para mejorar la solubilidad de compuestos muy insolubles en agua consiste en añadir algún tensioactivo a la formulación^[105, 106]. En los estudios iniciales de dosis repetidas (estudios de toxicidad), debido a la administración de dosis altas de irosustat, se añadió un 2% de lauril sulfato sódico a la suspensión con el fin de aumentar la solubilidad del compuesto.

En el estudio toxicocinético de irosustat a dosis repetidas durante 1 mes en perro, se había observado una incidencia relativamente alta de vómitos, incluso en los animales del grupo control. Dado que los animales del grupo control sólo recibían vehículo (suspensión acuosa con un 1% de metilcelulosa y un 2% de lauril sulfato sódico), se consideró la posibilidad de que los vómitos fuesen debidos al tensioactivo. Se realizó el estudio P5 para comparar el perfil farmacocinético obtenido al administrar la suspensión con o sin lauril sulfato sódico, y verificar si la retirada del tensioactivo tenía un impacto negativo en la biodisponibilidad de la suspensión. En ambas formulaciones, la concentración máxima de irosustat en plasma se alcanzó alrededor de las 2 horas post administración (Figura 69),

obteniéndose un valor medio de C_{max} superior en la suspensión sin lauril sulfato sódico (10023 ng/ml *versus* 8150 ng/ml).

El incremento en los valores de AUC_t alcanzado con la incorporación de lauril sulfato sódico, con respecto a la suspensión sin este compuesto, fue de tan sólo 2.3%. Estos hallazgos, junto con la presencia de vómitos asociada a este tensioactivo, justificaron su retirada de la composición de la suspensión.

Figura 69 Concentraciones Medias y Desviación Estándar (n=5) de Irosustat en Plasma (ng/ml) Obtenidas en Perro tras la Administración de Dos Suspensiones de Irosustat, Con o Sin Lauril Sulfato Sódico, a la Dosis de 400 mg/kg. Gráfica Semilogarítmica.



La selección de la formulación más adecuada para la Fase I de desarrollo en humanos se realizó en el estudio P7, cuyo objetivo fue evaluar la exposición y el perfil farmacocinético de irosustat en perros hembra tras la administración única oral de la cápsula RBNX y los comprimidos P15492, P15573, P15574 y P15579, así como el cálculo de la biodisponibilidad relativa de irosustat en las cuatro formulaciones de comprimido teniendo en cuenta la cápsula RBNX como referencia.

La elección de la formulación de referencia se realizó en base a los resultados de los estudios de selección de tamaño de partícula, en los que la administración de cuatro cápsulas P60087, con 10 mg de irosustat cada una, permitió alcanzar una buena exposición a irosustat. La cápsula de referencia RBNX se preparó con la misma composición centesimal que la cápsula P60087 pero multiplicando por cuatro el contenido de irosustat, así como de los correspondientes excipientes, para conseguir administrar 40 mg de irosustat en una única preparación farmacéutica.

La variabilidad en la exposición a irosustat fue elevada, obteniéndose valores de biodisponibilidad relativa para los comprimidos P15492, P15573, P15574 y P15579 de $134 \pm 62\%$, $109 \pm 43\%$, $97 \pm 35\%$ y $72 \pm 16\%$, respectivamente, teniendo en cuenta la cápsula RBNX como referencia.

Puesto que no se pudieron demostrar diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) con este tamaño de muestra entre los valores logotransformados de AUC_t/D y C_{max}/D obtenidos para cada formulación mediante el ANOVA de un factor, y que el aumento en la exposición a irosustat registrado en los comprimidos P15492 y P15573 con respecto a la cápsula RBNX no se consideró relevante por la elevada variabilidad observada en los valores de biodisponibilidad relativa, se decidió empezar la Fase I en humanos con la cápsula RBNX.

Para un compuesto de Clase 2 de la BCS la presencia de comida en el tracto gastrointestinal puede tener efecto en la absorción del fármaco y por ello, en el estudio P8 se evaluó el efecto de la comida en la velocidad y magnitud de absorción de irosustat a partir de la cápsula RBNX. El ensayo se realizó tras la administración de una comida rica en grasa, tal y como recomienda la FDA^[92], porque se espera que tales condiciones tengan mayores efectos sobre la fisiología gastrointestinal, y en consecuencia la biodisponibilidad del fármaco se afecte en mayor medida.

Fleisher y colaboradores establecieron que el efecto de la comida sobre la biodisponibilidad generalmente puede ser predicho a partir de la clasificación del BCS^[107]. Posteriormente, Wu y Benet incorporaron en dicha predicción el efecto de la comida sobre el tiempo que tarda el fármaco en alcanzar la concentración máxima^[64].

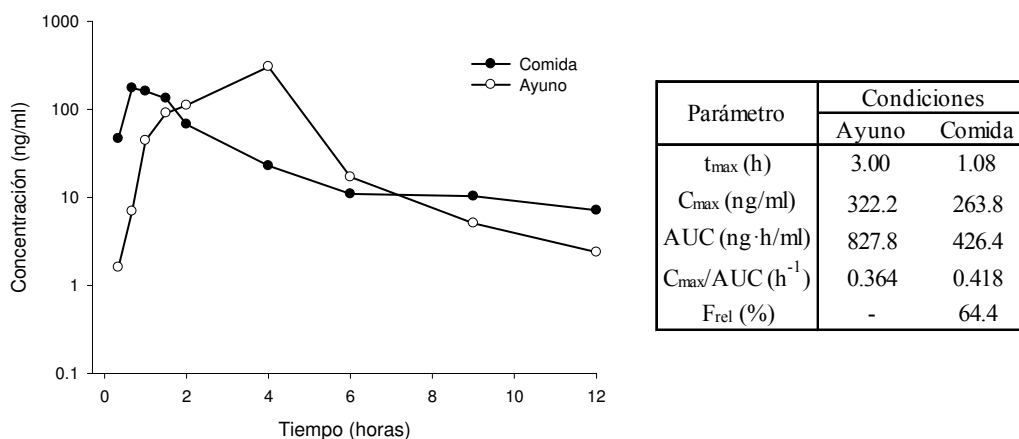
Dispusieron que para compuestos de Clase 2, se espera que una comida rica en grasa pueda disminuir el valor de t_{max} mediante la inhibición de los transportadores de eflujo intestinal^[108]. En este sentido, para irosustat, se obtuvieron valores medianos de t_{max} de 1.08 y 3.00 horas tras la administración después de comer y en condiciones de ayuno, respectivamente. Además, el cociente indicativo de velocidad aparente de absorción permitió observar en general que la comida produjo una absorción ligeramente más rápida de irosustat, obteniéndose valores medianos de C_{max}/AUC de 0.418 y 0.364 h^{-1} tras la administración de irosustat después de comer y en ayunas, respectivamente (Figura 70).

En cuanto a la magnitud de absorción, era de esperar que para un compuesto de Clase 2, la comida rica en grasa produjese una solubilización adicional del compuesto en el lumen intestinal (por ejemplo mediante la formación de micelas), que contribuyese a aumentar la biodisponibilidad. Contrariamente a esto, observamos que la comida tuvo un impacto negativo en la magnitud y la extensión (C_{max} y AUC_t) de absorción de irosustat (Figura 70). El valor mediano de biodisponibilidad relativa de la cápsula RBNX administrada tras una comida fue de 64.4%, teniendo en cuenta la administración en condiciones de ayuno como referencia. La explicación para este fenómeno puede estar en una degradación de irosustat solubilizado en el fluido gastrointestinal^[109] antes de la permeación a través de la membrana intestinal. Beignet constató que el taurocolato sódico (sal biliar) y la

lecitina (fosfolípido) presentes en un fluido intestinal simulado tras una comida, mejoran la solubilidad de irosustat, pero en contrapartida, tan pronto como irosustat está en forma soluble, se observa una pérdida de pureza que aumenta en función del tiempo (86% de pureza a los 15 minutos hasta 37% a las 2.5 horas) (datos no publicados).

Por tanto, se concluyó a partir de este estudio que existía una interacción de irosustat con la comida y que debía investigarse este fenómeno en ensayos clínicos. En consecuencia, por precaución, se recomendó tomar la medicación en ayunas.

Figura 70 Concentraciones Medianas (n=6) de Irosustat en Plasma (ng/ml) Obtenidas en Perro tras la Administración de la Cápsula RBNX con 40 mg de Irosustat en Condiciones de Ayuno y Después de Comer. Gráfica Semilogarítmica y Principales Parámetros Farmacocinéticos.



Las características farmacocinéticas de irosustat tras la administración de dosis múltiples se determinaron a partir de los resultados toxicocinéticos derivados de los estudios de toxicidad para minimizar el uso de animales.

En las tres especies evaluadas (estudios R5, P10 y M2), generalmente no se observaron diferencias marcadas entre machos y hembras, tal y como se detalla en los apartados 5.2.1.2, 5.2.2.2. y 5.2.3.1., respectivamente. A modo de resumen, los principales parámetros de exposición obtenidos en los machos tras la administración diaria repetida de irosustat se muestran en la Tabla 131. En ella se observa que en ninguna de las tres especies se produjo una acumulación relevante de irosustat a las dosis ensayadas. En el plasma de mono, se produjo una elevada degradación de irosustat a IDP 17619 que fue más intensa el día 1 que el día 7, conduciendo a un valor de índice de acumulación anormalmente alto en esta matriz.

Tabla 131 Parámetros Farmacocinéticos Obtenidos tras la Administración Diaria Repetida de Irosustat.

Especie:	Rata				Perro			Mono
Dosis:	25	50	100	200	50	250	1000	2000
PLASMA								
t_{max} (h)								
Día 1	0.5	2	0.5	2	0.5	1	1.5	1
Dosis repetida (6m o 7d)*	2	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2
C_{max} (h)								
Día 1	3965	6557	8886	11980	9578	33015	31167	1006
Dosis repetida (6m o 7d)*	6333	9654	13820	11170	23625	33108	45590	2050
AUC (h)								
Día 1	9266	17633	34804	62803	13962	56108	102132	3590
Dosis repetida (6m o 7d)*	17256	40160	49790	40040	37734	55822	101792	12612
$R_{ac(AUC)}$								
Dosis repetida (6m o 7d)*	1.86	2.28	1.43	0.64	3.62	1.13	1.42	3.51
SANGRE								
t_{max} (h)								
Día 1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.75	1	1	0.5
Dosis repetida (6m o 7d)*	0.5	2	0.5	0.5	1	1	1	2
C_{max} (h)								
Día 1	12815	14150	15640	9885	9512	24048	19492	9449
Dosis repetida (6m o 7d)*	15190	15960	18510	16150	12370	20963	22896	9026
AUC (h)								
Día 1	32759	43971	60744	76578	19321	49466	87214	105007
Dosis repetida (6m o 7d)*	38346	91061	96746	75427	24094	44580	65436	129184
$R_{ac(AUC)}$								
Dosis repetida (6m o 7d)*	1.18	2.08	1.60	1.03	1.43	0.97	1.12	1.23

*: 6 meses en rata y perro, y 7 días en mono

Para la dosis repetida, los valores de AUC corresponden a AUC_t

La exposición a irosustat resultó ser generalmente superior en sangre que en plasma, excepto a las dosis en las que se alcanzó el nivel de saturación de irosustat en el interior de los eritrocitos. La magnitud de la diferencia entre las concentraciones de irosustat en plasma y sangre fue más grande en el mono que en la rata y el perro.

Distribución

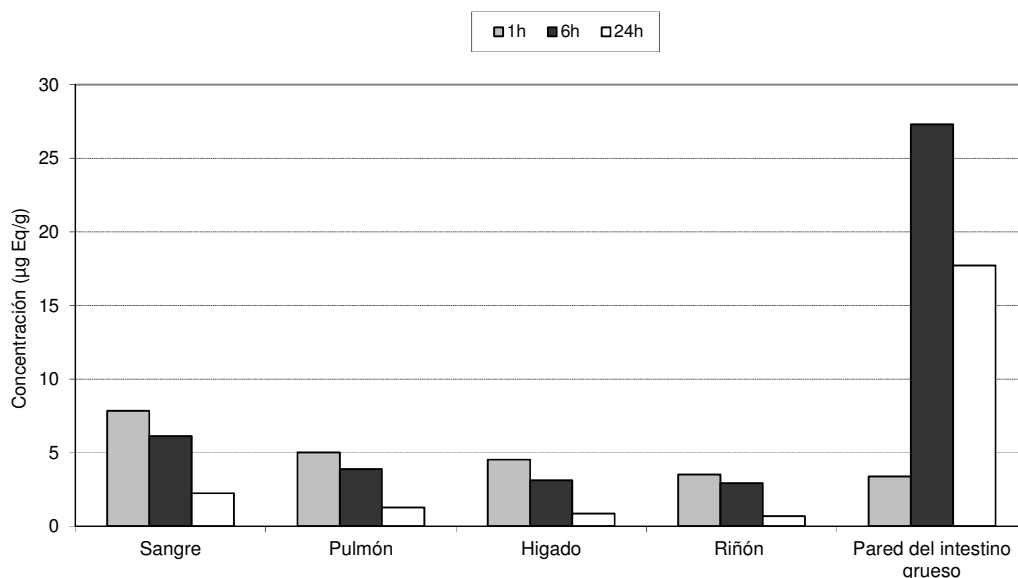
El proceso de distribución de irosustat se investigó *in vivo* mediante autoradiografía cuantitativa de cuerpo entero (QWBA, *quantitative whole body autoradiography*)^[110], con el fin de obtener información farmacocinética con respecto a cualquier unión específica de este compuesto o sus metabolitos a tejidos u órganos.

En el estudio R2, tras la administración oral de ¹⁴C-irosustat a una dosis de 3 mg/kg a veintiuna ratas albinas y a cinco ratas pigmentadas, la radioactividad se distribuyó ampliamente en los tejidos. En la mayoría de tejidos, las concentraciones más elevadas de radioactividad se alcanzaron en el primer punto de muestreo 1 hora tras la administración, con la excepción de las paredes del intestino en las cuales el proceso de absorción hizo que el pico de concentración de radioactividad se alcanzara 6 horas tras la administración de acuerdo al muestreo establecido en este

ensayo. La radioactividad se eliminó con relativa rapidez, de forma que a las 72 horas post administración la radioactividad ya no era cuantificable en la mayoría de los tejidos.

En la Figura 71 se muestra la evolución de los niveles de radioactividad en los tejidos más relevantes durante las 24 horas post administración. En esta figura se puede apreciar como los niveles de radioactividad en sangre fueron elevados, y en consecuencia, también se detectaron concentraciones elevadas de radioactividad en los órganos bien irrigados como el intestino, pulmón, hígado y riñón.

Figura 71 Tejidos con Mayor Concentración de Radioactividad 1, 6 y 24 Horas tras la Administración Oral de ¹⁴C-Irosustat a la Dosis de 3 mg/kg (Equivalente a 100 µCi/kg) a Ratas Macho Albinas.



Los niveles altos de radioactividad en riñón e hígado pusieron de manifiesto el rol de estos órganos en la eliminación de irosustat y/o sus metabolitos. Por una lado, como se observó en el estudio R1, entre el 50% y el 65% de la radioactividad administrada por vía oral se excreta por orina y por otro lado, el irosustat es un compuesto que se elimina extensivamente metabolizado por el hígado según corresponde a un compuesto de Clase 2 del sistema de clasificación biofarmacéutica de disposición de fármacos (BDDCS, *biopharmaceutics drug disposition classification system*)^[64]. Las investigaciones realizadas por Ventura y colaboradores^[111] permitieron establecer que las principales reacciones metabólicas de fase 1 son de oxidación, formándose en microsomas de hígado derivados monooxidados de irosustat y de su producto inactivo por pérdida del grupo sulfamato (IDP 17619). Las principales reacciones de fase 2 fueron de conjugación con ácido glucurónico y con sulfatos, obteniéndose un perfil metabólico *in vitro* de irosustat bastante similar entre rata, perro, mono y hombre (ambos sexos).

En las ratas pigmentadas, la distribución de radioactividad fue muy similar a la de las ratas albinas. Los bajos niveles de radioactividad ($<0.9 \mu\text{g equiv/g}$) en la piel pigmentada, el tracto uveal y el ojo de estas ratas indicaron que no se produjo un fenómeno de fijación de radiactividad asociada a la melanina^[112, 113].

Otro aspecto a evaluar, por su importante impacto en la farmacocinética de irosustat, fue la distribución saturable de irosustat hacia los eritrocitos a causa de su unión a la anhidrasa carbónica, que regula el intercambio de CO_2 y O_2 entre la sangre y los alvéolos y tejidos. En este sentido, la prolongación en la semivida de irosustat observada en sangre con respecto a plasma, fue atribuida a la unión reversible de irosustat a la anhidrasa carbónica II del interior de los eritrocitos^[47, 57], de forma similar a lo previamente descrito para algunos fármacos con grupo sulfonamida como el topiramato^[99] y la metazolamida^[101]. Lloyd demostró mediante cristalografía, la unión del grupo sulfamato de irosustat con el átomo de zinc del centro activo de la anhidrasa carbónica II humana^[56].

La unión de irosustat al interior de los eritrocitos dio lugar a que la evolución del cociente de concentraciones plasma/sangre fuera concentración dependiente. A medida que las concentraciones de irosustat en sangre aumentaron, el porcentaje de irosustat unido a los eritrocitos resultó progresivamente inferior y el cociente de concentraciones plasma/sangre alcanzó valores alrededor de 1.

En la Figura 72, Figura 73 y Figura 74 se muestran los cocientes de concentración plasma/sangre obtenidos en rata, perro y mono, respectivamente, tras la administración de dosis repetidas de irosustat.

La evolución del cociente de concentraciones plasma/sangre con respecto las concentraciones de sangre fue distinto para cada especie. Se observó que la especie en la cual se alcanzó con más facilidad la saturación de los eritrocitos fue el perro, seguido de la rata y finalmente del mono. En el mono, a una concentración en sangre de casi 20000 ng/ml el cociente de concentraciones plasma/sangre todavía era concentración-dependiente, indicando que no se había alcanzado la saturación de los eritrocitos.

Figura 72 Cociente de Concentraciones Plasma/Sangre de Irosustat Respecto las Concentraciones de Irosustat en Sangre Alcanzadas en Ratas Macho y Hembra los Días 1, 29, 87 y 170 tras una Administración Diaria de Irosustat a las Dosis de 25, 50, 100 y 200 mg/kg/día. Gráfica Semilogarítmica.

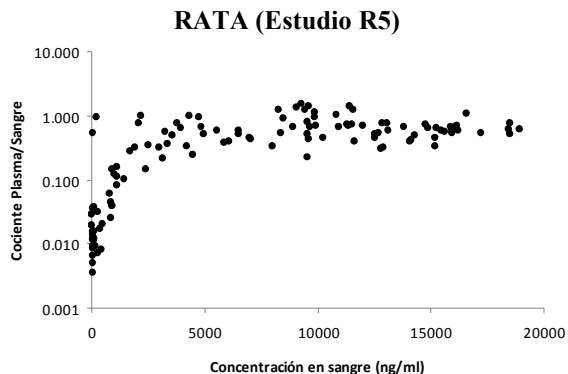


Figura 73 Cociente de Concentraciones Plasma/Sangre de Irosustat Respecto las Concentraciones de Irosustat en Sangre Alcanzadas en Perros Macho y Hembra los Días 1, 29, 85 y 176 tras una Administración Diaria de Irosustat a las Dosis de 50, 250 y 1000 mg/kg/día. Gráfica Semilogarítmica.

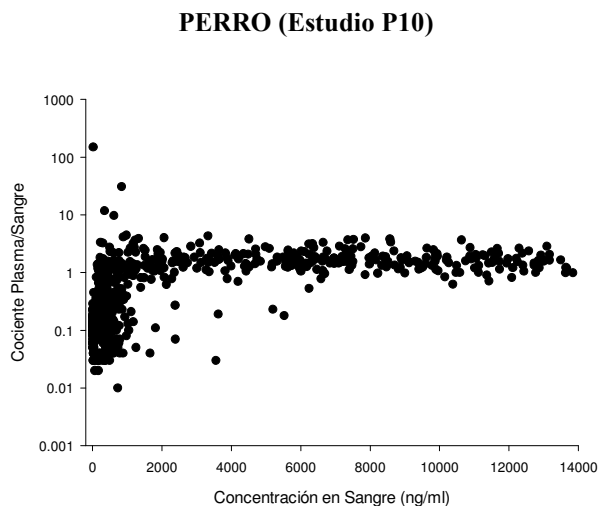
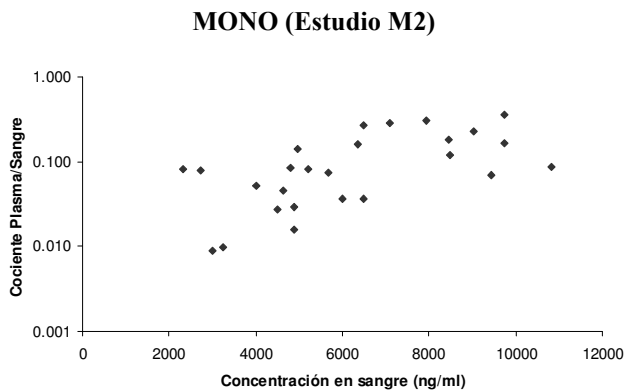


Figura 74 Cociente de Concentraciones Plasma/Sangre de Irosustat Respecto las Concentraciones de Irosustat en Sangre Alcanzadas en Perros Macho y Hembra los Días 1, 29, 85 y 176 tras una Administración Diaria de Irosustat a las Dosis de 50, 250 y 1000 mg/kg/día. Gráfica Semilogarítmica.



El desarrollo de un modelo farmacocinético poblacional en rata y perro permitió verificar que la entrada de irosustat al interior de los eritrocitos se produce de forma instantánea. El mejor ajustado de los datos se consiguió teniendo en cuenta un único sitio de unión de irosustat con los eritrocitos. Cabe resaltar que durante la valoración de la fijación de irosustat a eritrocitos se consideró que la fracción libre de irosustat en el plasma es constante ya que los estudios *in vitro* realizados por Solà y colaboradores demostraron que el ^{14}C -irosustat presenta un porcentaje elevado (> 96%) de unión a proteínas plasmáticas en rata, perro y mono en el intervalo de concentraciones de 50 a 12000 ng/ml, siendo la albúmina la principal proteína (> 90%) de unión para irosustat (datos no publicados).

La entrada de irosustat al interior de los eritrocitos se modeló teniendo en cuenta la suma de dos procesos^[95, 96]: un proceso no lineal de unión saturable a la anhidrasa carbónica del eritrocito (Michaelis-Menten) más un proceso lineal (presumiblemente por difusión), mediante la expresión:

$$C_E = \frac{B_{\max} \times C_P}{K_D + C_P} + NS \cdot C_P$$

donde B_{\max} es la concentración máxima de sitios de unión, K_D la concentración de irosustat necesaria para ocupar la mitad de la concentración máxima de sitios de unión, C_P la concentración plasmática y NS el coeficiente lineal.

La estimación de los parámetros de fijación (B_{\max} y K_D) se realizó *in vivo* mediante aproximación poblacional porque representa una opción muy válida para la estimación de estos parámetros puesto que, por un lado se evalúa un amplio intervalo de concentraciones y por el otro se alcanzan condiciones de equilibrio porque la unión a los eritrocitos es instantánea.

Los valores de B_{\max} y K_D calculados con el modelo poblacional y que definen la unión de irosustat a los eritrocitos, se resumen en la Tabla 132.

Tabla 132 Parámetros de Unión de Irosustat a Eritrocitos Calculados con el Modelo Poblacional.

Especie	Sexo	Estudio	B_{\max} (μM)	K_D (μM)	NS (μM)
Rata	Macho	R3	4.00	0.027	4.52
Perro	Hembra	P6	3.95	0.106	16.5

Los valores de B_{\max} estuvieron alrededor de 4 μM (≈ 1250 ng/ml), tanto en rata como en perro, indicando una capacidad de unión saturable a irosustat similar en los eritrocitos de ambas especies.

Los valores de constante de disociación K_D fueron más pequeños en rata que en perro, indicando que probablemente la anhidrasa carbónica II (CAII) de los eritrocitos de rata presenta una mayor afinidad por irosustat.

El parámetro NS señaló que en ambas especies, además de la unión saturable, se produce una distribución de irosustat al interior de los eritrocitos mediante un proceso lineal, probablemente mediante difusión.

Dado que la CAII, más allá de los eritrocitos, se encuentra ampliamente distribuida por el organismo (intestino, riñón, pulmón e hígado, entre otros), nos planteamos estudiar la fijación de irosustat a la CAII de estos tejidos. Esta valoración se realizó con el modelo poblacional y sólo fue posible realizarla en el perro porque para esta especie se disponía de una mayor riqueza de datos que en el caso de la rata. La afinidad de irosustat por la CAII de estos tejidos resultó inferior a la observada para los eritrocitos. Además, la distribución saturable de irosustat hacia la CAII de los tejidos, a diferencia de lo observado para los eritrocitos, no se produciría de forma instantánea.

En definitiva, la unión de irosustat a la anhidrasa carbónica II de los eritrocitos y de otros tejidos, actuaría como reservorio de irosustat para amortiguar la eliminación del compuesto desde el plasma.

El IDP 17619 procedente del metabolismo y/o degradación de irosustat, no presentó capacidad de unión a la anhidrasa carbónica II de los eritrocitos porque carece del grupo sulfamato necesario para unirse al átomo de zinc del centro activo de este enzima. En consecuencia, los niveles de IDP 17619 en sangre fueron inferiores a los de plasma porque los eritrocitos no ejercieron ningún efecto *depot* para este compuesto.

Excreción

Para la determinación de las principales vías de excreción de irosustat se administró una solución de ¹⁴C-irosustat en solventes orgánicos por vía intravenosa y oral a ratas (intactas y canuladas), perros y monos. En la Tabla 133 se resumen los valores medios de porcentaje de dosis radioactiva recuperada en orina, heces y bilis de cada especie.

Tabla 133 Porcentaje de Dosis Radioactiva en Orina, Heces y Bilis tras la Administración de ¹⁴C-Irosustat a una Dosis de 3 mg/kg.

Especie	Estudio	n	IV						ORAL					
			Orina		Heces		Bilis		Orina		Heces		Bilis	
			M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H
Rata (intacta)	R1	3M / 3H	69.9	57.5	22.0	26.9	-	-	65.0	51.7	29.5	39.1	-	-
Rata (cánula biliar)		2M / 2H	14.3	22.0	14.4	0.8	57.9	59.7	29.0	26.5	1.8	1.9	56.9	63.8
Perro	P4	1M / 1H	38.3	55.8	51.7	36.1	-	-	27.4	59.6	52.0	30.3	-	-
Mono	M1	1M / 1H	71.7	65.0	5.6	3.0	-	-	72.9	70.7	5.3	3.4	-	-

M: machos; H: hembras; -: no aplica

La principal vía de excreción de radioactividad fue la orina en ratas intactas, y la bilis en las ratas con cánula biliar. Esto indicó que en las ratas intactas posiblemente

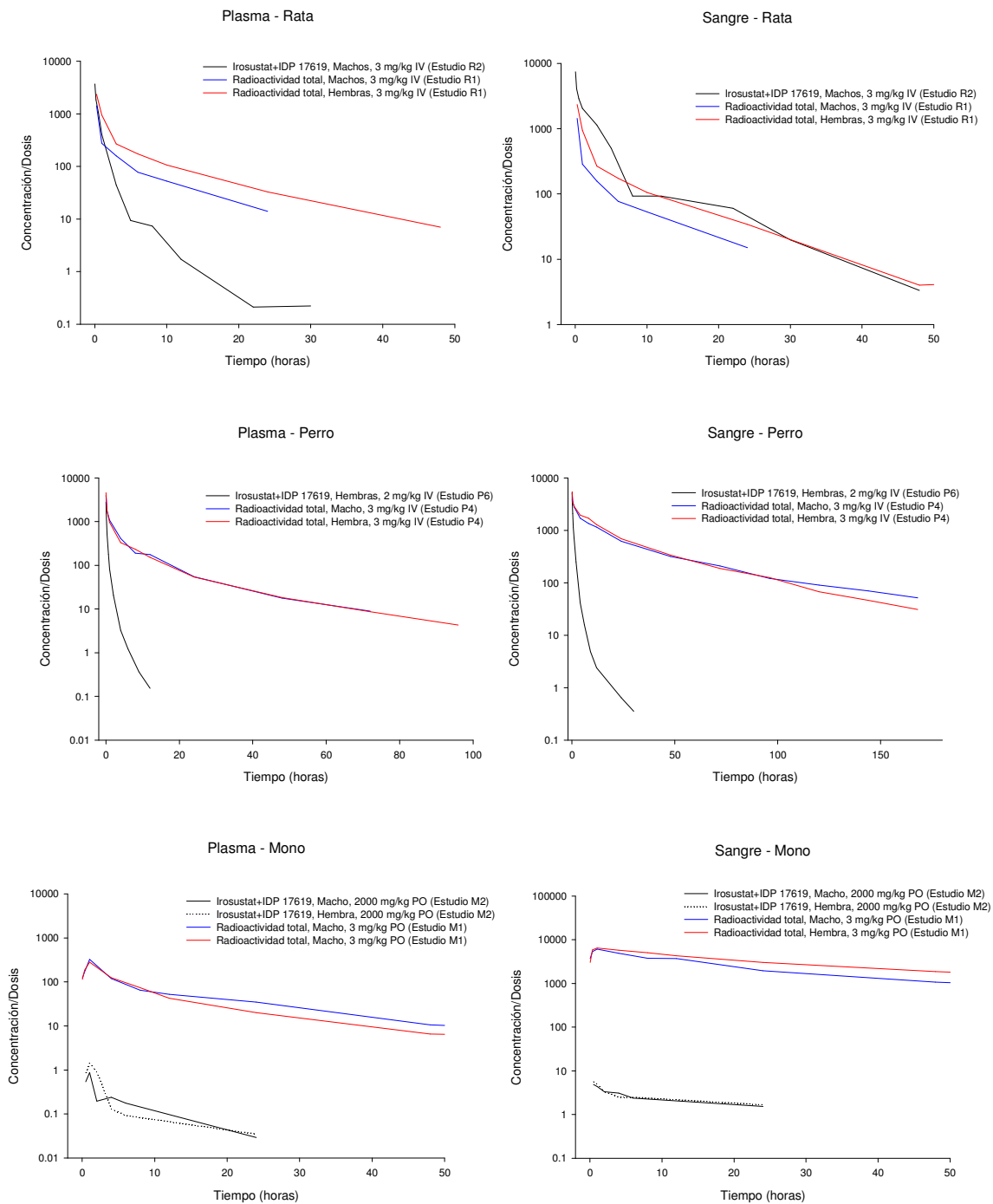
se produjo una reabsorción de los compuestos eliminados por vía biliar y por tanto, el ciclo enterohepático de estos compuestos contribuyó a la elevada eliminación de radioactividad por orina observada en los animales intactos. En el mono (ambos sexos), así como en el perro hembra, la radioactividad también se recuperó principalmente en orina. En el perro macho, la radioactividad se excretó principalmente en heces pero esto no se consideró relevante debido al bajo número de animales empleados (1 de cada sexo)

En las tres especies, la excreción de la radioactividad fue relativamente rápida, recuperándose más del 50% de la radioactividad administrada durante las primeras 24 horas post administración. Posteriormente, la radioactividad fue excretándose muy lentamente, de forma que en orina y heces se cuantificaron niveles hasta un mínimo de 7 días post administración en rata y de 11 días post dosis en perro y mono.

En perro y mono, al comparar las concentraciones de radioactividad total (ng-equiv irosustat/ml) normalizadas por dosis obtenidas tras la administración de ^{14}C -irosustat con las concentraciones de irosustat e IDP 17619 normalizadas por la dosis obtenidas tras la administración de irosustat no marcado, se observó que los niveles de radioactividad eran mucho más grandes y duraderos que los de producto no marcado, sugiriendo una lenta eliminación de alguno(s) de los metabolito(s) de irosustat, tanto en plasma como en sangre (ver Figura 75). En el caso de la rata, la lenta eliminación de alguno(s) de los metabolito(s) de irosustat sólo se observó en plasma.

Cabe resaltar que en el mono, la comparativa de la Figura 75 se realizó con los datos de la vía oral porque no se disponía de datos intravenosos tras la administración de producto no marcado. En esta especie, esta comparativa debe ser interpretada con cautela debido a la diferencia de dosis entre los estudios M1 y M2 (3 y 2000 mg/kg, respectivamente). Entonces, una baja absorción de irosustat a la dosis de 2000 mg/kg podría explicar parcialmente la diferencia entre los niveles de radioactividad total y los niveles de irosustat e IDP 17619.

Figura 75 Perfil Comparativo de Concentración/Dosis en Rat, Perro y Mono tras la Administración de Irosustat y ¹⁴C-Irosustat.

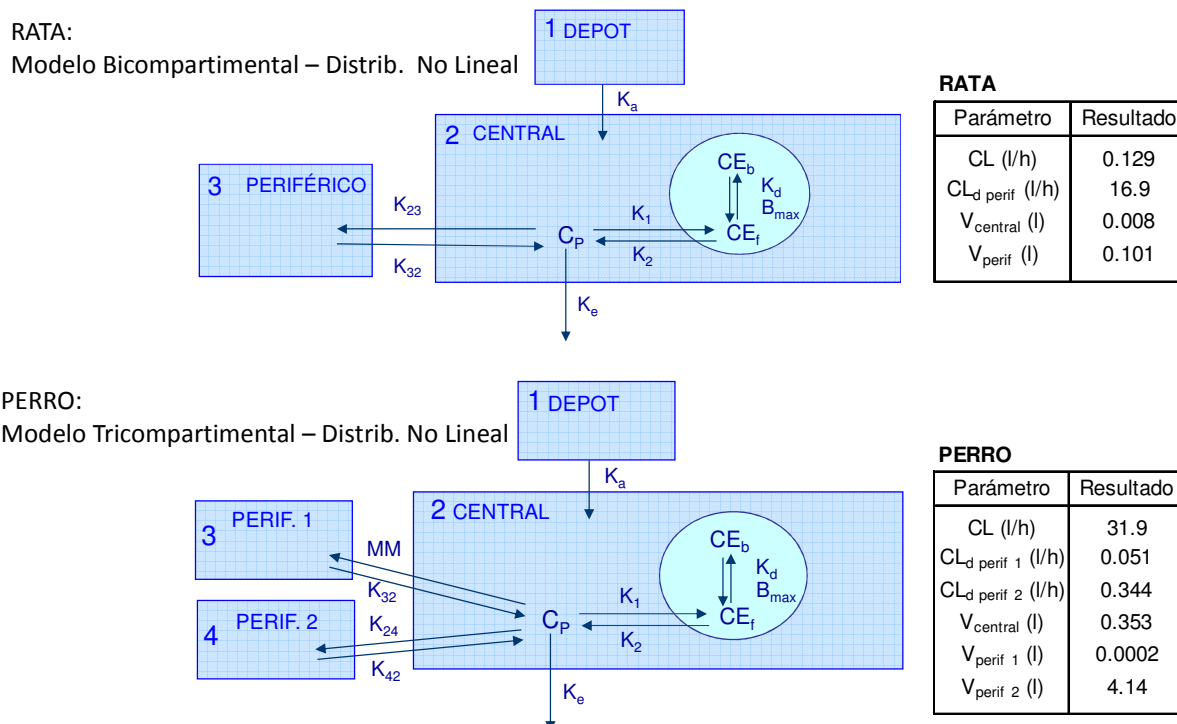


Las parámetros farmacocinéticos representativos de distribución y eliminación de irosustat se evaluaron fundamentalmente en la rata y en el perro. Por un lado, se realizó un análisis farmacocinético no compartimental (Tabla 134) y por otro lado, se construyó un modelo farmacocinético no lineal que permitiera el cálculo de parámetros farmacocinéticos a partir de un ajustado simultáneo de las concentraciones de irosustat en plasma y sangre. La representación esquemática del modelo para rata y del modelo para perro, junto con el aclaramiento y el volumen de distribución calculados en plasma, se muestran en la Figura 76.

Tabla 134 Parámetros Farmacocinéticos Obtenidos tras la Administración Única Intravenosa (Bolus) de Irosustat.

Especie	Estudio	Dosis (mg/kg)	CL (l/h/kg)		V _z (l/h)		V _{ss} (l/h)		t _{1/2αz} (h)	
			Plasma	Sangre	Plasma	Sangre	Plasma	Sangre	Plasma	Sangre
Rata	R3	0.3	3.86	0.023	32.1	0.127	24.3	0.110	5.77	3.78
		3	0.677	0.094	4.31	0.855	0.662	0.444	4.41	6.32
		30	0.404	0.448	1.48	10.4	0.371	0.892	2.54	16.1
Perro	P6	0.1	2.42	0.104	3.32	0.212	3.13	0.129	0.958	1.39
		0.4	2.03	0.116	2.96	1.06	2.21	0.165	1.02	6.04
		2	1.78	0.398	3.82	3.61	0.760	0.499	1.59	6.37

Figura 76 Representación Esquemática de los Modelos de Absorción y Disposición Utilizados para Describir Simultáneamente las Concentraciones en Plasma y Sangre de Irosustat tras su Administración Vía Oral e Intravenosa a Ratas (arriba) y Perros (abajo).



El desarrollo de estos dos modelos se realizó con el programa NONMEM mediante el método de estimación condicional de primer orden (FOCE) con interacción. Inicialmente, se empezaron a modelar las concentraciones de irosustat en plasma considerando una entrada saturable de irosustat al interior del eritrocito, regulada mediante la ecuación de Michaelis-Menten. Esta aproximación no consiguió explicar las concentraciones observadas en plasma para irosustat y puso de manifiesto la necesidad de construir un modelo más complejo que considerase de forma simultánea las concentraciones de irosustat en plasma y en sangre.

Para este ajustado simultáneo de concentraciones en plasma y sangre, se hicieron dos aproximaciones: a) calcular los parámetros de unión al eritrocito de forma aislada y luego incorporarlos al modelo farmacocinético, y b) calcular los parámetros de unión al eritrocito de forma conjunta con el resto de parámetros farmacocinéticos (CL, V, etc). Se comprobó que el ajustado del modelo resultaba más idóneo si se calculaban todos los parámetros de forma conjunta y por tanto, la opción b fue la seleccionada para realizar la modelización poblacional de irosustat.

La aproximación definitiva para la construcción de un modelo capaz de ajustar de forma simultánea las concentraciones en sangre y plasma, consistió en considerar que la entrada de irosustat al interior de los eritrocito se producía de forma instantánea. En la Figura 76 se aprecia como la entrada inmediata de irosustat al interior del eritrocito está regulada por una constante de afinidad K_1 (constante de velocidad de segundo orden) y una constante de disociación K_2 (constante de velocidad de primer orden). Esta aproximación supuso un gran paso adelante en la construcción del modelo final de irosustat para la rata y el perro y además, aportó un dato muy relevante para entender el comportamiento farmacocinético de irosustat.

La precisión con que se estimaron los parámetros farmacocinéticos no pudo ser calculada por el programa, pero esto no se consideró un factor limitante para valorar la idoneidad del modelo final ya que los gráficos de bondad de ajuste (concentración observada vs. predicción poblacional y concentración observada vs. predicción individual) fueron satisfactorios. Además, se verificó que no había tendencias en la distribución de los residuales y que estos seguían una distribución normal. Finalmente, en la evaluación interna del modelo mediante la técnica de la evaluación predictiva visual (“visual predictive check”), que consistió en la simulación de 1000 observaciones para cada tiempo de muestreo, se verificó que ambos modelos predicen de forma satisfactoria la evolución con el tiempo de las concentraciones de irosustat en plasma y sangre.

Al igual que Shank constató para el topiramato^[99] y Boddy para otras sulfonamidas^[58], se observó una diferencia significativa entre los parámetros farmacocinéticos de irosustat calculados a partir de los datos en sangre y en plasma. En ambas matrices, el aclaramiento, el volumen de distribución y la semivida fueron

dosis-dependientes, y los parámetros farmacocinéticos calculados a partir de las concentraciones en sangre, en contraste con el plasma, aumentaron al incrementar la dosis. Durante la eliminación, la fijación de irosustat a los eritrocitos contribuye a la reducción del aclaramiento y el volumen de distribución observada en sangre a las dosis más bajas (en las que no se alcanza el nivel de saturación de irosustat al interior de los eritrocitos).

Los valores de semivida de irosustat en plasma estuvieron entre 2.5 y 5.8 horas en rata y entre 1 y 1.6 horas en perro. Debido a que los eritrocitos actuaron como reservorio de irosustat, los valores de semivida de irosustat fueron generalmente mayores en sangre que en plasma, oscilando entre 3.8 y 16 horas en rata y entre 1.4 y 6.4 horas en perro.

En el análisis farmacocinético poblacional realizado en rata y perro, teniendo en cuenta un proceso de eliminación de primer orden, se obtuvieron valores de aclaramiento en plasma de 0.129 l/h y 31.9 l/h, respectivamente. Considerando que las ratas tuvieron un peso medio de 0.28 kg y los perros de 14 kg, estos valores de CL fueron acordes con los resultados de aclaramiento obtenidos mediante el análisis no compartimental (1.08-0.113 l/h en rata y 33.8-24.9 l/h en perro).

Teniendo en cuenta el flujo sanguíneo hepático en rata y en perro (3.31 l/h/kg y 1.85 l/h/kg, respectivamente^[114]), el aclaramiento sanguíneo de irosustat obtenido en los estudios R3 y P6 podría clasificarse como bajo a las dosis pequeña y mediana, y medio a las dosis altas. El CL plasmático de irosustat no pudo utilizarse para realizar esta comparativa ya que la relación plasma/sangre de irosustat no es constante a lo largo del tiempo.

El volumen de distribución de irosustat en estado de equilibrio estacionario obtenido en plasma con el modelo poblacional, y correspondiente a la suma de volúmenes de distribución en el compartimento central y los periféricos, fue de 0.106 litros en rata y de 4.5 litros en perro. Teniendo en cuenta el volumen total de agua de cada especie (0.17 litros la rata y 6 litros el perro^[114]) y los parámetros farmacocinéticos poblacionales, el volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario de irosustat en plasma se consideraría medio tanto en la rata como en el perro.

En el mono, se dispone de menos información que en las otras dos especies estudiadas. La única administración intravenosa de irosustat se realizó con producto radioactivo (estudio M1), y por tanto la semivida que se determinó no fue la del irosustat, sino la de radioactividad total que reflejaría tanto la semivida de irosustat como la de todos sus metabolitos y/o productos de degradación. No obstante, en el estudio M2, la administración de irosustat (no radioactivo) por vía oral a la dosis de 2000 mg/kg a un macho y una hembra *cynomolgus*, permitió calcular un tiempo medio de residencia de irosustat desde tiempo cero hasta el último tiempo con

concentraciones cuantificables (MRT_t) de aproximadamente 5 horas en plasma y 10 horas en sangre.

A modo de resumen, durante la evaluación farmacocinética preclínica de irosustat se observaron las siguientes características: una absorción oral relativamente rápida (t_{max} entre 1 y 3 horas), una biodisponibilidad elevada que disminuye al aumentar las dosis, una alta fijación a proteínas plasmáticas (>96%), un extenso metabolismo hepático, una excreción renal mayoritaria y una unión reversible del compuesto a los eritrocitos, que es la principal causa de su comportamiento farmacocinético no lineal. Desde un punto de vista clínico, la unión de irosustat a la CAII de los eritrocitos y otros tejidos sirve como depósito para amortiguar la eliminación de irosustat, y por tanto en caso de interrumpir la dosificación, la desaparición de irosustat a partir del plasma es más gradual de lo que sería de otra manera. Por consiguiente, algunos aspectos importantes a valorar en humanos serán por un lado, la magnitud de unión de irosustat a los eritrocitos humanos, y por el otro, la evaluación de qué factores (por ejemplo, la coadministración con otros inhibidores de la CAII) pueden provocar un desplazamiento de dicha unión, ya que un incremento del cociente de concentraciones plasma/sangre aceleraría la eliminación de irosustat.

Finalmente, en cuanto a tolerancia se refiere, cabe resaltar que en los estudios de administración a dosis única, irosustat no produjo efectos adversos relevantes. En consecuencia, no se prevén problemas de seguridad significativos asociados a la administración de irosustat en humanos.

CONCLUSIONES

7 CONCLUSIONES

Las principales conclusiones obtenidas en esta investigación se resumen en los siguientes puntos:

1. Se estableció el protocolo a seguir para manipular correctamente las muestras de plasma y sangre a fin de evitar la degradación de irosustat, por pérdida del grupo sulfamato, a su derivado inactivo IDP 17619. Este protocolo consistió en mantener las muestras de ambas matrices en un baño de agua-hielo, centrifugarlas a +4°C y congelarlas a -80°C en un tiempo inferior a 6 horas desde su obtención. Adicionalmente, en el caso de las alícuotas de sangre, antes de centrifugarlas se añadió ácido fórmico para liberar el irosustat del interior de los eritrocitos.
2. La absorción de irosustat es relativamente rápida, puesto que los valores de C_{max} en plasma se alcanzaron generalmente alrededor de 1 hora post administración en rata, perro y mono.
3. En plasma de rata y perro, la biodisponibilidad absoluta de irosustat en 1% metilcelulosa fue incompleta y decreció al incrementar las dosis. Los valores hallados en rata oscilaron entre 27.0% y 11.9% en el intervalo de dosis de 3 a 300 mg/kg, y en perro entre 84.1% y 44.5% a las dosis de 0.25 a 25 mg/kg. La ausencia de linealidad cinética a las dosis superiores se atribuyó a una falta de absorción debido a su limitada solubilidad, puesto que este producto pertenece a la Clase 2 de la BCS.
4. La biodisponibilidad de irosustat se incrementó al micronizar el producto a un tamaño de partícula de 5 μ m, mientras que la incorporación de lauril sulfato sódico a la suspensión apenas produjo cambios y se asoció además a la aparición de vómitos en el perro.
5. El perfil farmacocinético evaluado durante el desarrollo farmacéutico de distintas formulaciones sólidas de administración oral permitió seleccionar la cápsula RBNX, con manitol y lactosa como principales excipientes y el principio activo micronizado, para llevar a cabo estudios clínicos en humanos.
6. La diferencia observada entre la absorción completa tras la administración de 14 C-irosustat y la biodisponibilidad incompleta, puede explicarse por un efecto de primer paso hepático. Este efecto se manifiesta con menor intensidad en los niveles sanguíneos de irosustat que en los de plasma, debido al efecto protector que ejercen los eritrocitos frente la degradación y/o el metabolismo de irosustat.

7. La administración de irosustat después de comer produjo en general una absorción más rápida pero tuvo un impacto negativo en la magnitud de absorción (C_{max} y AUC_t) del compuesto. Probablemente, la comida rica en grasa mejoró la solubilidad del compuesto en el lumen intestinal pero en contrapartida, el irosustat solubilizado se degradó rápidamente antes de ser absorbido a través de la membrana intestinal.
8. Tras la administración diaria repetida de irosustat a las dosis de 25 a 200 mg/kg/día en la rata y de 50 a 1000 mg/kg/día en el perro durante seis meses, y de 2000 mg/kg/día en el mono durante siete días, no se observaron diferencias marcadas en la exposición entre machos y hembras, ni se produjo una acumulación relevante de irosustat a las dosis ensayadas.
9. Irosustat presenta una unión a proteínas plasmáticas superior al 96% en las tres especies estudiadas, siendo la albúmina la principal proteína de unión.
10. Al administrar ^{14}C -irosustat a ratas albinas y pigmentadas, la radioactividad se distribuyó ampliamente en los tejidos y se eliminó de forma relativamente rápida. Los altos niveles de radioactividad en hígado y riñón pusieron de manifiesto la importancia de estos órganos en la eliminación de irosustat, que presenta un extenso metabolismo hepático y una excreción renal mayoritaria. No se observó una unión específica de irosustat a tejidos pigmentados.
11. El modelo que explica adecuadamente las concentraciones de irosustat en plasma y sangre se caracteriza por tres procesos. Uno de absorción de primer orden, otro de distribución no lineal que considera la entrada inmediata de irosustat al interior de los eritrocitos y una unión a la anhidrasa carbónica II de los mismos modelada por la suma de un término no lineal (Michaelis-Menten) más otro lineal, y finalmente un proceso de eliminación de primer orden.
12. De acuerdo con el modelo farmacocinético poblacional, el valor de la constante de velocidad de absorción osciló entre 0.267 h^{-1} a la dosis de 300 mg/kg y 1.57 h^{-1} a la dosis de 3 mg/kg en la rata, y resultó ser de 1.06 h^{-1} en el perro con una variabilidad interindividual del 51%.
13. La capacidad máxima de unión específica a los eritrocitos o B_{max} estuvo alrededor de $4\text{ }\mu\text{M}$ ($\approx 1250\text{ ng/ml}$), tanto en rata como en perro, indicando que los eritrocitos de ambas especies poseen una capacidad similar de unión saturable a irosustat. Los valores de la constante de disociación K_D fueron más pequeños en rata ($0.027\text{ }\mu\text{M}$) que en perro ($16.5\text{ }\mu\text{M}$), indicando que probablemente la anhidrasa carbónica II de los eritrocitos de rata presenta una mayor afinidad por irosustat.

14. El aclaramiento plasmático de irosustat fue de 0.129 l/h en la rata y de 31.9 l/h en el perro, con variabilidades interindividuales de 3.8% y 33%, respectivamente. El volumen de distribución poblacional fue de 0.11 l en la rata y de 4.5 l en el perro, no pudiéndose incluir variabilidad interindividual para este parámetro.
15. Los valores de semivida de irosustat en plasma estuvieron comprendidos entre 2.5 y 5.8 horas en rata y entre 1 y 1.6 horas en perro. Debido a que los eritrocitos actúan como reservorio para amortiguar la eliminación de irosustat, los valores de semivida fueron generalmente mayores en sangre que en plasma, alcanzando valores de hasta 16 horas en rata y 6.4 horas en perro.
16. La principal vía de excreción de radioactividad fue mayoritariamente la vía renal en las tres especies ensayadas (rata, perro y mono). En las ratas con el conducto biliar canulado, la radioactividad se recuperó principalmente en la bilis, poniendo de manifiesto la presencia de un ciclo enterohepático.
17. En los diferentes estudios preclínicos realizados, irosustat no produjo efectos adversos destacables, indicando una buena tolerancia del compuesto a las dosis ensayadas.

REFERENCIAS

8 REFERENCIAS

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010; 127(12):2893-917
2. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*. 2006; 24(14):2137-50
3. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe. *Ann Oncol* 2005; 16:481-6
4. Estadísticas de defunciones según la causa de muerte. Instituto Nacional de Estadística, 2008
5. Fackenthal JD, Olopade OI. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7(12):937-48
6. Marchionni L, Wilson RF, Marinopoulos SS, Wolf AC, Parmigiani GP, Bars EB, et al. Impact on gene expression profiling tests in breast cancer outcomes. Evidence Reports/Technology Assessments, No. 160. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); January 2008
7. Cuadros M, Llanos A. Validez clínica y analítica de MammaPrint® en tratamiento del cáncer de mama. *Med Clin (Barc)*. 2011; 136:627-32
8. Duraker N, Çaynak ZC. Pronostic value of the 2002 TNM classification for breast carcinoma with regard to the number of metastatic axillary lymph nodes. *Cancer*. 2005; 104(4):700-7
9. Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al., editors. *AJCC cancer staging manual*, 6th ed. New York: Springer-Verlag, 2002
10. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician*. 2010; 81(11):1339-1346
11. Arce C, Martínez-Tlahuel J, Lara FU. Quimioterapia adyuvante en el cáncer de mama: presente y futuro. *Cancerologia*. 2006; 1:177-185
12. Baum M, Budzar AU, Cuzick J, Forbes J, Houghton JH, Klijn JG, et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet*. 2002; 359(9324):2131-9
13. Normanno N, Di Maio M, De Maio E, De Luca A, Matteis A, Giordano A, et al. Mechanisms of endocrine resistance and novel therapeutic strategies in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2005; 12(4): 721-47
14. Sasano H, Suzuki T, Harada N. From endocrinology to intracrinology. *Endocr Pathol*. 1998; 9(1):9-20

REFERENCIAS

15. Bernstein L, Ross RK. Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev.* 1993; 15(1):48-65
16. Sasano H, Suzuki T, Nakata T, Moriya T. New development in intracrinology of breast carcinoma. *Breast Cancer.* 2006; 13(2):129-36
17. Santen RJ, Leszczynski D, Tilson-Mallet N, Feil PD, Wright C, Manni A, et al. Enzymatic control of estrogen production in human breast cancer: relative significance of aromatase versus sulfatase pathways. *Ann N Y Acad Sci.* 1986; 464:126-37
18. Nakata T, Takashima S, Shiotsu Y, Murakata C, Ishida H, Akinaga S, et al. Role of steroid sulfatase in local formation of estrogen in post-menopausal breast cancer patients. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 86(3-5):455-60
19. Van Landeghem AA, Poortman J, Nabuurs M, Thijssen JH. Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue. *Cancer Res.* 1985; 45(6):2900-6
20. Pasqualini JR, Chetrite G, Blacker C, Feinstein MC, Delalonde L, Talbi M, et al. Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81(4):1460-4
21. Hobkirk R. Steroid sulfation current concepts. *Trends Endocrinol Metab.* 1993; 4(2):69-74
22. Miki Y, Nakata T, Suzuki T, Darnel AD, Moriya T, Kaneko C, et al. Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(12):5760-8
23. Stanway SJ, Delavault P, Purohit A, Woo LW, Thurieau C, Potter BV, et al. Steroid sulfatase: a new target for the endocrine therapy of breast cancer. *Oncologist.* 2007; 12(4):370-4
24. Purohit A, Woo LW, Chander SK, Newman SP, Ireson C, Ho Y, et al. Steroid sulphatase inhibitors for breast cancer therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 86:423-432
25. Reed MJ, Purohit A, Woo LWL, Newman SP, Potter BVL. Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition. *Endocr Rev.* 2005; 26(2):171-202
26. Maggiolini M, Donzé O, Jeannin E, Andò S, Picard D. Adrenal androgens stimulate the proliferation of breast cancer cells as direct activators of estrogen receptor alpha. *Cancer Res.* 1999; 59(19):4864-9
27. Billich A, Nussbaumer P, Lehr P. Stimulation of MCF-7 breast cancer cell proliferation by estrone sulfate and dehydroepiandrosterone sulfate: inhibition by novel non-steroidal steroid sulfatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; 73(5):225-35

28. Santner SJ, Feil PD, Santen RJ. In situ estrogen production via the estrone sulfatase pathway in breast tumors: relative importance versus the aromatase pathway. *J Clin Endocrinol Metab.* 1984; 59(1):29-33
29. Utsumi T, Yoshimura N, Takeuchi S, Maruta M, Maeda K, Harada N. Elevated steroid sulfatase expression in breast cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; 73(3-4):141-5
30. Utsumi T, Yoshimura N, Takeuchi S, Ando J, Maruta M, Maeda K, et al. Steroid sulfatase expression is an independent predictor of recurrence in human breast cancer. *Cancer Res.* 1999; 59(2):377-81
31. Lykkesfeldt. Human steroid sulfatase deficiency. *Dan Med Bull.* 1987; 34(2):69-83
32. Willemsen R, Kroos M, Hoogeveen AT, Van Dongen JM, Parenti G, Van Der Loos CM, et al. Ultrastructural localization of steroid sulfatase in cultured human fibroblasts by immunocytochemistry: a comparative study with lysosomal enzymes and the mannose-6-phosphate receptor. *Histochem J.* 1988; 20:41-51
33. Purohit A, Chapman O, Duncan L, Reed MJ. Modulation of oestrone sulphatase activity in breast cancer cell lines by growth factors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992; 41(3-8):563-6
34. Reed MJ, Purohit A. Sulphatase inhibitors: the rationale for the development of a new endocrine therapy. *Rev Endocr Rel Cancer.* 1993; 45:51-62
35. Bonney RC, Scanlon MJ, Reed MJ, Jones DL, Beranek PA, James VHT. Adrenal androgen concentrations in breast tumours and in normal breast tissue. The relationship to oestradiol metabolism. *J Steroid Biochem.* 1984; 20:501-4
36. Chen WC, Thiboutot D, Zoubolis CC. Cutaneous androgen metabolism: basic research and clinical perspectives. *J Invest Dermatol.* 2002; 119:992-1007
37. Daynes RA, Araneo BA, Dowell TA, Huang K, Dudley D. Regulation of murine lymphokine production in vivo. *J Exp Med.* 1990; 171:979-996
38. Rook GAW, Hernandez-Pando R, Lightman S. Hormones, peripherally activated hormones and regulation of Th1/Th2 balance. *Immunol Today.* 1994; 15:301-303
39. Li PK, Rhodes ME, Jagannathan S, Johnson DA. Reversal of scopolamine induced amnesia in rats by the steroid sulfatase inhibitor estrone-3-O-sulfamate. *Brain Res Cogn.* 1995; 2:251-254
40. Selcer KW, Kabler H, Sarap J, Xiao Z, Li KP. Inhibition of steryl sulfatase activity in LNCap human prostate cancer cells. 2002; 67:821-826
41. Gooyer ME, Overlift GT, Kleyn V, Smits KC, Ederveen AGH, Verheuel HAM, et al. Tibolone: a compound with tissue specific inhibitory effects on sulfatase. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 183:55-62
42. Birnböck H, von Angerer E. Sulfate derivatives of 2-phenylindoles as novel steroid sulfatase inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 1990; 39:1709-13

43. Boivin RP, Luu-The V, Lachance R, Labrie F, Poirier D. Structure-activity relationships of 17 α -derivatives of estradiol as inhibitors of steroid sulfatase. *J Med Chem.* 2000; 43:4465-78
44. Elger W, Schwarz S, Hedden A, Reddersen G, Schneider B. Sulfamates of various estrogens are prodrugs with increased systemic and reduced hepatic estrogenicity at oral application. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1995; 55:395-403
45. Purohit A, Hejaz HAM, Woo LWL, Van Strien AE, Potter BVL, Reed MJ. Recent advances in the development of steroid sulphatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1999; 69:227-238
46. Raobaikady B, Purohit A, Chander SK, Woo LWL, Leese MP, Potter BVL, et al. Inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation and in vivo steroid sulphatase activity by 2-methoxyoestradiol-bis-sulphamate. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 84:351-358
47. Woo LWL, Purohit A, Malini B, Reed MJ, Potter BVL. Potent active site-directed inhibition of steroid sulfatase by tricyclic coumarin-based sulphamates. *Chem Biol.* 2000; 7:773-791
48. Malini B, Purohit A, Ganeshapillai D, Woo LWL, Potter BVL, Reed MJ. Inhibition of steroid sulphatase activity by tricyclic coumarin sulphamates. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000; 75:253-258
49. Purohit A, Woo LWL, Potter BVL, Reed MJ. In Vivo inhibition of estrone sulfatase activity and growth of nitrosomethylurea-induced mammary tumors by 667 COUMATE. *Can Res.* 2000; 60(13):3394-6
50. Purohit A, Woo LWL, Barrow D, Hejaz HAM, Nicholson RI, Potter BVL, et al. Non-steroidal and steroidal sulfamates: new drugs for cancer therapy. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 171(1-2):129-35
51. Canary J, Nauwerth A, Burns G, Hasilik A, Von Figura K. Steroid sulfatase biosynthesis and processing in normal and mutant fibroblasts. *Europ J Biochem.* 1986; 158:71-6
52. Stanway SJ, Purohit A, Woo LWL, Sufi S, Vigushin D, Ward R. Phase I study of STX 64 (667 Coumate) in breast cancer patients: the first study of a steroid sulfatase inhibitor. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(5):1585-92
53. Wykoff CC, Beasley NJP, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, et al. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res.* 2000; 60:7075-83
54. Winum JY, Vullo D, Casini A, Montero JL, Scozzafava A, Supuran CT. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic isozymes I and II and transmembrane, tumor-associated isozyme IX with sulfamates including EMATE also acting as steroid sulfatase inhibitors. *J Med Chem.* 2003; 46:2197-2204

55. Maren TH. Carbonic anhydrase: chemistry, physiology, and inhibition. *Physiol Rev.* 1967; 47(4):595-781
56. Lloyd MD, Pederick RL, Natesh R, Woo LWL, Purohit A, Reed MJ, et al. Crystal structure of human carbonic anhydrase II at 1.95 angstrom resolution in complex with 667-courmate, a novel anti-cancer agent. *Biochem J.* 2005; 385:715-720
57. Ho YT, Purohit A, Vicker N, Newman SP, Robinson JJ, Leese MP, et al. Inhibition of carbonic anhydrase II by steroidal and non-steroidal sulphamates. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305:909-914
58. Boddy A, Edwards P, Rowland M. Binding of sulfonamides to carbonic anhydrase: influence on distribution within blood and on pharmacokinetics. *Pharm Res.* 1989; 6(3):203-9
59. Aarons L. Population pharmacokinetics: theory and practice. *Br J Clin Pharmacol.* 1991; 32:669-670
60. Malvar MC, Benítez Estevez AJ. Papel de los modelos farmacocinéticos de población. Revisión de métodos. *Química Clínica.* 2004; 23(6):417-422
61. Farris J, Ader AW, Ku RH. History, implementation and evolution of the pharmaceutical hazard categorization and control system. *Chemistry Today,* 2006; 24(2):5-10
62. Obiols J, Solans X, García V. Industria farmacéutica: prevención de la exposición a principios activos en los laboratorios. NTP 855. Notas técnicas de prevención. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo
63. Lennernäs H, Abrahamsson B. The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension. *J Pharm Pharmacol.* 2005; 57(3):273-85
64. Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug classification system. *Pharma Res.* 2005; 22(1):11-23
65. Festing S, Wilkinson R. The ethics of animal research. *EMBO reports.* 2007; 8:526-530
66. Dadgar D, Burnett PE, Choc MG, Gallicano K, Hooper JW. Application issues in bioanalytical method validation, sample analysis and data reporting. *J Pharm Biomed Anal.* 1995; 13(2):89-97
67. Food and Drug administration. Guidance for industry: Bioanalytical method validation. May 2001
68. Van Kirk, C, Feinberg, LA, Robertson, DJ, Freeman, WM, and Vrana, KE (Sep 2010) Phosphorimager. En: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. <http://www.els.net> [doi: 0.1002/9780470015902.a0002973.pub2]

69. Solon EG, Kraus L. Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry. Survey results on study design, methods, and regulatory compliance. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2001; 46(2):73-81
70. WinNonlin Version 3.3. 2001. Software for the Statistical Analysis on Nonlinear Models on Micros. SCI Software
71. Doménech J, Lauroba J. Farmacocinética no lineal. En: Doménech J, Martínez J, Pla JM., editores. *Biofarmacia y Farmacocinética. Volumen I: Farmacocinética*. Madrid: Editorial Síntesis; 1997. p. 391-420
72. Gabrielsson J, Weiner D. *Pharmacokinetic & pharmacodynamic data analysis: concepts and applications*. 4th ed. Stockholm: Swedish pharmaceutical press; 2000. p. 161-180
73. Food and Drug administration. Guidance for industry: Population pharmacokinetics. February 1999
74. Fooster DM. Noncompartmental vs. compartmental approaches to pharmacokinetic analysis. En: Atkinson AJ et al, editors. *Principles of clinical pharmacology*. 1^a ed. California: Academia Press; 2001. p. 75-92
75. Mandema JW, Verotta D, Sheiner LB. Building population pharmacokinetic-pharmacodynamic models I: models for covariate effects. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1992; 20(5):511-28
76. Bonate P. Nonlinear mixed effects models: theory. En: Bonate P, editors. *Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling and simulation*. 1^a ed. Nueva York: Springer Science+Business Media, Inc. 2006. p. 205-65
77. Ette EI, Williams PJ. Population pharmacokinetics I: background, concepts, and models. *Ann Pharmacother* 2004; 38(10):1702-6
78. NONMEM (NONlinear Mixed Effects Modeling) versión VI. ICON Development Solutions
79. Ette EI, Williams PJ, Ahmad A. Population pharmacokinetic estimation methods. En: Ette E, Williams PJ, editors. *Pharmacometrics: the Science of quantitative pharmacology*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2007. p. 265-285
80. Wagner JG. A new generalizad nonlinear pharmacokinetic model and its implications. En: Wagner, editor. *Biopharmaceutics and Relevant Pharmacokinetics*. Hamilton: Drug Intelligence Publications; 1971. p. 302-317
81. Picard-Hagen N, Gayrard V, Alvinerie M, Smeyers H, Ricou R, et al. A nonlabeled method to evaluate cortisol production rate by modeling plasma CBG free cortisol disposition. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001; 281(5):E946-56
82. Jonsson EN, Karlsson MO, Milligan PA. Graphical displays for modeling population data. En: Ette E, Williams PJ, editors. *Pharmacometrics: the Science of quantitative pharmacology*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2007. p. 183 222

83. Ette EI. Pharmacometric knowledge discovery from clinical trial data sets. En: Ette E, Williams PJ, editors. *Pharmacometrics: the Science of quantitative pharmacology*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2007. p. 388–390
84. Martínez J. Conceptos en farmacocinética clínica. En: Herrera J, editor. *Manual de farmacia clínica y farmacocinética*. Madrid: Elsevier España; 2003. p. 169-171
85. Jonsson E.N, Karlsson M.O. (1999) Xpose-an S-PLUS based population pharmacokinetic/pharmacodynamic model building aid for NONMEM. *Comput Methods Programs Biomed*. 1999; 58(1):51-64
86. R Development Core Team (2010). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
87. Holford NH. The visual predictive check-superiority to standard diagnostic (Rorschach) plots. *PAGE 14 (2005) Abstr 738* [www.page-meeting.org/?abstract=738]
88. Karlsson MO, Holford NH. A tutorial on visual predictive checks. *PAGE 17 (2008) Abstr 1434* [www.page-meeting.org/?abstract=1434]
89. Hummel J, McKendrick S, Brindley C, French R. Exploratory assessment of dose proportionality: review of current approaches and proposal for a practical criterion. *Pharmaceut Statist*. 2009; 8:38-49
90. Smith BP, Vandenhende FR, DeSante KA, Farid NA, Welch PA, et al. Confidence interval criteria for assessment of dose proportionality. *Pharm Res*. 2000; 17(10):1278-83
91. SAS Institute Inc. 2006. *Administering SAS® Enterprise Guide® 4.1*. Cary, NC: SAS Institute Inc.
92. Food and Drug administration. *Guidance for industry: Food-effect bioavailability and fed bioequivalence studies*. December 2002
93. Hintze J (2001) *NCSS and PASS*. Number Cruncher Statistical Systems. Kaysville, Utah, USA. [www.ncss.com]
94. Rowland M, Tozer TN. *Clinical pharmacokinetics: concepts and applications*. 3rd ed. Pennsylvania: Lippincott Williams & Wilkins; 1994. p. 502-503
95. Zandvliet AS, Copalu W, Schellens JHM, Beijnen JH, Huitema ADR. Saturable binding of indisulam to plasma proteins and distribution to human erythrocytes. *Drug Metab Dispos*. 2006; 34(6):1041-6
96. Wallace S, Riegelman S. Uptake of acetazolamide by human erythrocytes in vitro. *J Pharm Sci*. 1977; 66(5):729-31
97. Chou TC, Talaly P. A simple generalized equation for the analysis of multiple inhibitions of Michaelis-Menten kinetic systems. *J Biol Chem*. 1977; 252(18):6438-42

REFERENCIAS

98. Ireson CR, Chander SK, Purohit A, Parish DC, Woo LWL, Potter BVL, et al. Pharmacokinetics of the nonsteroidal steroid sulphatase inhibitor 667 COUMATE and its sequestration into red blood cells in rats. *Br J Cancer*. 2004; 91(7):1399-404
99. Shank RP, Doose DR, Streeter AJ, Bialer M. Plasma and whole blood pharmacokinetics of topiramate: the role of carbonic anhydrase. *Epilepsy Res*. 2005; 63(2-3):103-12
100. Zandvliet AS, Copalu W, Schellens JH, Beijnen JH, Huitema AD. Saturable binding of indisulam to plasma proteins and distribution to human erythrocytes. *Drug Metab Dispos*. 2006; 34(6):1041-6
101. AbuTarif MA, Taft DR. Simulation of the pharmacokinetic profile of methazolamide in blood: effect of erythrocyte carbonic anhydrase binding on drug disposition. *Pharma Res*. 2002; 19(4):551-5
102. Armijo JA. Absorción, distribución y eliminación de fármacos. En: Florez J, editor. *Farmacología humana*. Barcelona: Editorial Masson; 1997. p. 54-56
103. Blanch S, Menargues A, Bielsa R, Pérez A, Celma C, Peraire C, Obach R. Pharmacokinetic linearity following intravenous and oral administration of a steroid sulfatase inhibitor (BN83495) to rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2007; 29(Suppl. 1):104
104. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharm Res*. 1995; 12(3):413-20
105. Tang L, Khan SU, Muhammad NA. Evaluation and selection of bio-relevant dissolution media for a poorly water-soluble new chemical entity. *Pharm Dev Technology*. 2001; 6(4):531-40
106. Shah VP, Konecny JJ, Everett RL, McCullough B, Noorizadeh AC, Skelly JP. *In vitro* dissolution profile of water-insoluble drug dosage forms in the presence of surfactants. *Pharm Res*. 1989; 6(7):612-8
107. Fleisher D, Li C, Zhou Z, Pao LH, Karim A. Drug, meal and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration. Clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 1999; 36(3):233-54
108. Custodio JM, Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008; 60(6):717-33
109. Food and Drug administration. Guidance for industry: Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System. August 2000
110. Solon EG, Balani SK, Lee FW. Whole-body autoradiography in drug discovery. *Curr Drug Metab*. 2002; 3(5):451-62

-
111. Ventura V, Solà J, Celma C, Peraire C, Obach R. In vitro metabolism of irosustat, a novel steroid sulfatase inhibitor: interspecies comparison, metabolite identification, and metabolic enzyme identification. *Drug Metab Dispos.* 2011; 39(7):1235-46
 112. Whitby B. Quantitative whole-body autoradiography. En: Temple S, Lappin G, editores. *Radiotracers in drug development.* Boca Raton (Florida): CRC Press; 2006. p. 139-40
 113. Richter WF, Starke V, Whitby B. The distribution pattern of radioactivity across different tissues in quantitative whole-body autoradiography (QWBA) studies. *Eur J Pharm Sci.* 2006; 28(1-2):155-65
 114. Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res.* 1993; 10(7):1093-5

ANEXO I

9 ANEXO I

9.1 Modelo Final de NONMEM (Rata - Estudio R3)

```
$PROB BN83495_Rat_Plasma&Blood
$INPUT ID THEO TIME LIN DV AMT Dx EVID CMT WGT RUTE MATR FLAG DOSE DOX HTC
$DATA 06pke064datos09.dat IGNORE=#
$SUBROUTINES ADVAN9 TRANS=1 TOL=4
$MODEL COMP=(DEPOT,DEFDOSE)
          COMP=(CENTRAL,DEFOBS)
          COMP=(PERIPH1)
$PK
;-----Disposition Parameters-----
TVCL=THETA(1)
CL=TVCL*EXP(ETA(1))
TVV2=THETA(2)
V2=TVV2
TVQ=THETA(3)
Q=TVQ
TVV3=THETA(4)
V3=TVV3

S2=V2
VSS=V2+V3
;-----Absorption & Bioavailability-----
TVKA=THETA(5)
IF(DOX.EQ.6) TVKA=THETA(6)
IF(DOX.EQ.7) TVKA=THETA(7)
KA=TVKA

TVF1=THETA(8)
IF(DOX.EQ.6) TVF1=THETA(9)
IF(DOX.EQ.7) TVF1=THETA(10)
F1=TVF1
;-----Lag Time-----
TALAG1=THETA(11)
ALAG1=TALAG1
;-----Binding Parameters-----
BMAX=THETA(12)
SLP=THETA(13)
KD=BMAX/SLP

AMAX=BMAX*V2
K=KD*V2
```

ANEXO I

```
;-----Rate Constants-----
K20=CL/V2
K23=Q/V2
K32=Q/V3

$DES
DADT(1)=-KA*A(1)
LIN2=KA*A(1)-K20*A(2)+K32*A(3)-K23*A(2)
CIRC2=AMAX*K/(A(2)+K)**2
DADT(2)=LIN2/(1+CIRC2)
DADT(3)=-K32*A(3)+K23*A(2)

$error
CP=A(2)/S2 ;Conc. in Plasma
CRC=(BMAX*CP/(KD+CP))+THETA(14)*CP ; Conc. in Red Blood Cells
CB=CRC*HTC+CP*(1-HTC) ; Conc. in Blood

IPRED=-7
IF(F.GT.0.AND.MATR.EQ.1) IPRED=LOG(CP) ;Individual Prediction in Plasma
IF(F.GT.0.AND.MATR.EQ.2) IPRED=LOG(CB) ;Individual Prediction in Blood

W=1 ;Weight Factor

Y=IPRED+W*EPS(1) ;Prediction + Intraindividual variability in Plasma
IF(MATR.EQ.2) Y=IPRED+W*EPS(2) ;Prediction + Intraindividual variability in Blood

IRES= DV-IPRED
IWRES=IRES/W

$THETA
(0,0.15) ;TVCL
(0,0.01) ;TVV2
(0,20) ;TVQ
(0,0.11) ;TVV3
(0,1.2) ;TVKA_3
(0,0.54) ;TVKA_30
(0,0.26) ;TVKA_300
(0,0.3,1) ;TVF1_3
(0,0.26,1) ;TVF1_30
(0,0.09,1) ;TVF1_300
(0,0.078) ;TALAG1
(0,4.7) ;BMAX
(0,193) ;SLP
(0,2.3) ;NS
```

```
$OMEGA
  0.1      ;Proportional IIV in CL
$SIGMA
  0.25     ;EPS(1)
  0.25     ;EPS(2)
$ESTIMATION PRINT=10 MAXEVAL=9999 METHOD=1 INTERACTION MSFO=msfb82
$COVARIANCE
$TABLE ID THEO TIME IPRED ONEHEADER APPEND NOPRINT FILE=sdtab82
$TABLE ID TVCL TVV2 TVQ TVV3 CL V2 Q V3 KA F1 TALAG1 BMAX SLP ETA1 ONEHEADER APPEND
NOPRINT FILE=patab82
$TABLE ID DOSE WGT ONEHEADER APPEND NOPRINT FILE=cotab82
$TABLE ID RUTE MATR ONEHEADER APPEND NOPRINT FILE=catab82
$TABLE ID THEO TIME IPRED DOSE HTC RUTE MATR DOX
ONEHEADER APPEND NOPRINT FILE=fit82
```


9.2 Modelo Final de NONMEM (Perro - Estudio P6)

```
$PROB BN83495_dog_Plasma&Blood
$INPUT ID THEO TIME DV LIDV DRUG AMT EVID CMT WGT SEX OCC RUTE MATR DOSE DOX HTC
ERY=DROP HEMO=DROP
$DATA 06pkx097datos13.dat IGNORE=# IGN(DOX.EQ.6)
$SUBS ADVAN9 TRANS=1 TOL=3
$MODEL COMP=(DEPOT,DEFDOSE)
        COMP=(CENTRAL,DEFOBS)
        COMP=(PERIPH1)
        COMP=(PERIPH2)
$PK
;-----Disposition Parameters-----
TVCL=THETA(1)
CL=TVCL*EXP(ETA(1))
TVV2=THETA(2)
V2=TVV2
TVQ3=THETA(3)
Q3=TVQ3
TVV3=THETA(4)
V3=TVV3
TVQ4=THETA(5)
Q4=TVQ4
TVV4=THETA(6)
V4=TVV4

TVM=THETA(7)
VM=TVM
KM=THETA(8)

S2=V2
VSS=V2+V3+V4

;-----Absorption & Bioavailability-----
TVKA=THETA(9)
KA=TVKA*EXP(ETA(2))

TVF1=THETA(10)
F1=TVF1

;-----Lag Time-----
TALAG1=THETA(11)
ALAG1=TALAG1
```

ANEXO I

```

;-----Binding Parameters-----
  BMAX=THETA (12)
  SLP=THETA (13)

  KD=BMAX/SLP

  AMAX=BMAX*V2
  K=KD*V2

$DES

;-----Rate Constants-----
  K20=CL/V2
  MM=VM/ (KM+ (A (2) /S2) )
  K23=MM/V2
  K32=Q3/V3
  K24=Q4/V2
  K42=Q4/V4

;-----Mass Balance-----
  DADT (1) =-KA*A (1)
  LIN2=KA*A (1) -K20*A (2) +K32*A (3) -K23*A (2) +K42*A (4) -K24*A (2)
  CIRC2=AMAX*K/ (A (2) +K) **2
  DADT (2) =LIN2/ (1+CIRC2)
  DADT (3) =-K32*A (3) +K23*A (2)
  DADT (4) =-K42*A (4) +K24*A (2)

$ERROR
  CP=A (2) /S2           ;Conc. in Plasma
  CRC= (BMAX*CP/ (KD+CP)) +THETA (14) *CP       ; Conc. in Red Blood Cells
  CB=CRC*HTC+CP*(1-HTC)   ; Conc. in Blood

  IPRED=-7
  IF (F.GT.0.AND.MATR.EQ.1) IPRED=LOG (CP)      ;Individual Prediction in Plasma
  IF (F.GT.0.AND.MATR.EQ.2) IPRED=LOG (CB)      ;Individual Prediction in Blood

  W=1                   ;Weight Factor

  Y=IPRED+W*EPS (1)           ;Prediction + Intraindividual variability in
Plasma
  IF (MATR.EQ.2) Y=IPRED+W*EPS (2) ;Prediction + Intraindividual variability in
Blood

  IRES= DV-IPRED
  IWRES=IRES/W

$THETA

```

```
(0,30) ;TVCL
(0,0.423) ;TVV2
(0,0.0522) ;TVQ3
(0.0001,0.0002) ;TVV3
(0,0.325) ;TVQ4
(0,3.68) ;TVV4
(0,20800) ;TVM
(0,2.74) ;TKM
(0,1.05) ;KA
(0,0.799,1) ;F1
(0,0.0753) ;tlag
(0,3.87) ;BMAX
(0,31.1,100) ;SLP
(0,14.7) ;NS

$OMEGA
  0.11 ;Proportional IIV in CL
  0.3 ;Proportional IIV in KA

$SIGMA
  0.3 ;EPS(1)
  0.3 ;EPS(2)

$ESTIMATION PRINT=10 MAXEVAL=9999 METHOD=1 INTERACTION MSFO=msfb352
$COVARIANCE
$TABLE ID THEO TIME IPRED ONEHEADER APPEND NOPRINT FILE=sdtab352
$TABLE ID VM KM BMAX SLP CL V2 Q3 V3 Q4 V4
KA F1 ALAG1 ETA1 ETA2 ONEHEADER APPEND NOPRINT FILE=patab352
$TABLE ID WGT DOSE HTC ONEHEADER APPEND NOPRINT FILE=cotab352
$TABLE ID SEX OCC RUTE MATR DOX ONEHEADER APPEND NOPRINT FILE=catab352
$TABLE ID THEO TIME IPRED DOSE HTC RUTE MATR DOX ONEHEADER
APPEND NOPRINT FILE=fit352
```


9.3 Tabla Resumen de Desarrollo del Modelo Farmacocinético Poblacional en Rata

Run	Dosis Incluidas (mg/kg)	Características del Modelo	-2LL	Δ -2LL	Comentarios
1	0.3 IV - PL	Monocompartimental, Eta1 en CL, Error Residual Mixto, Concentraciones en Micromolar	-305.491	-	-
2	0.3 IV - PL	¿Es más adecuado un error residual proporcional?	-	-	No funciona
3	0.3 IV - PL	Bicompartimental, Eta1 en CL, Error Residual Mixto, Concentraciones en Micromolar	-382.059	-76.568	El modelo bicompartimental mejora el ajustado
3b	0.3 IV - PL	¿Es mejor considerar Eta1 en V2 en lugar de CL?	-390.663	-8.604	Mejor Eta 1 en V2
4	0.3 IV - PL	Tricompartimental, Eta1 en CL, Error Residual Mixto, Concentraciones en Micromolar	-387.140	-5.081	Diferencia respecto run 3. El modelo tricompartimental mejora el ajustado
4b	0.3 IV - PL	¿Es mejor considerar Eta1 en V2 en lugar de CL?	-395.572	-8.432	Mejora respecto run 4
5	0.3 IV - PL	¿En el modelo 3b, es más adecuado un error residual proporcional?	-365.603	25.060	El error proporcional no mejora
6	0.3 IV - PL	¿En el modelo 4b, es más adecuado un error residual proporcional?	-370.838	-	Gradiente 0 en CL y Eta1
7	0.3 y 3 IV - PL	Se añade la dosis de 3 mg/kg IV al modelo 3b (bicompartimental)	-308.921	-	Gradiente 0 en la parte aditiva del error residual mixto
7b	0.3 y 3 IV - PL	Se añade la dosis de 3 mg/kg IV al modelo 5 (bicompartimental)	-2788.071	-	El error proporcional ajusta mejor
8	0.3 y 3 IV - PL	Se añade la dosis de 3 mg/kg IV al modelo 5 (tricompartimental)	-259.755	-	Gradiente 0 en Q3
9	0.3 y 3 IV - PL	Se logotransforman los datos y se ejecuta el run 7b. El modelo de error se cambia a aditivo	80.873	-	Minimización exitosa. Se continúa el ajustado de los datos log-tranf.
10	0.3, 3 y 30 IV - PL	Al modelo 9 se añade la dosis de 30 mg/kg IV	175.650	-	Gradiente 0 en Eta1
11	0.3, 3 y 30 IV - PL	Se añade Eta1 en CL, en lugar de V2	175.652	-	Continúa gradiente 0 en Eta1
12	0.3, 3 y 30 IV - PL	¿Es posible que el volumen de distribución sea diferente entre la dosis más pequeña y las otras dos?	114.338	-	Gradiente 0 en Q3
13	0.3, 3 y 30 IV - PL	¿Es posible que el volumen de distribución se pueda explicar con una función asintótica?	147.055	-	Gradiente 0 en Eta1
14	0.3, 3 y 30 IV - PL	¿Además de un V diferente entre la dosis pequeña y las otras dos, se puede definir también un CL diferente?	62.083	-	Hay indicios de no linealidad. Se empieza el ajustado simultáneo Plasma y Sangre con un modelo no
15	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG	Modelo no lineal (entrada inmediata en el eritrocito) Bicomp.	303.357	-	Gradiente 0 en el volumen
16	3 y 30 IV - PL & SG	Modelo no lineal (entrada inmediata en el eritrocito) Bicomp.	39.651	-	Minimización exitosa.
17	3 y 30 IV - PL & SG	Se añade Eta2 en V2 al modelo 16	40.802	1.151	No mejora el ajustado
18	3 y 30 IV - PL & SG	Se añade Eta2 en SLP al modelo 16	-	-	No termina el ajustado
19	3 y 30 IV - PL & SG	En la ecuación de conc. en eritrocito se elimina el parámetro NS	45.075	5.424	No mejora respecto el run 16
19b	3 y 30 IV - PL & SG	En la ecuación de conc. en eritrocito se elimina toda la parte lineal	61.114	21.463	No mejora respecto el run 16
20	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	Se estudia la fijación a eritrocitos, sin calcular parámetros PK. 1 sitio de unión. Eta 1 en Bmax	95.959	-	-
21	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	Se estudia la fijación a eritrocitos, sin calcular parámetros PK. 1 sitio de unión. Eta 1 en Kd	73.799	-22.160	Mejora estadísticamente significativa respecto run 20
22	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	Se estudia la fijación a eritrocitos, sin calcular parámetros PK. 1 sitio de unión. Eta 1 en NS	103.590	7.631	Empeora respecto run 20
23	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	Se estudia la fijación a eritrocitos, sin calcular parámetros PK. 1 sitio de unión. Eta 1 en Kd i Eta 2 en Bmax	73.800	-	Gradiente 0 Eta1
24	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG	¿Cambian los resultados del modelo 21 si sólo considero la vía IV?	57.468	-	Resultados similares
25	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	Como el run 21 pero en la ecuación de conc. en eritrocito se elimina el parámetro NS	78.389	4.590	Empeora respecto run 21
26	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	Como el run 21 pero en la ecuación de conc. en eritrocito se elimina toda la parte lineal	77.821	4.022	Empeora respecto run 22
27	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	En el run 21, se considera C _p libre en lugar de C _p .	289.706	215.907	Empeora respecto run 21
28	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	Se consideran 2 sitios de unión en el eritrocito, en lugar de uno.	401.380	-	Se concluye que 1 lugar de unión en el eritrocito explica mejor los datos
29	3 y 30 IV - PL & SG	El run 16 (bicomp.) se ejecuta con los resultados de Bmax, KD y NS (valores fijados) del run 21	233.875	-	Error residual en plasma elevado
30-36	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG	La misma aproximación realizada en el run 29 se aplica a las tres dosis IV	233.375 - 222.139	-	Se decide continuar el ajustado sin fijar los parámetros Bmax, KD y NS
37	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG	Modelo Bicompartimental. ¿Se puede considerar que la entrada de irosustat en el eritrocito no es inmediata?	-	-	El ajustado no termina. Se tendrá en cuenta una entrada inmediata en el eritrocito.
38	3 y 30 IV - PL & SG	Modelo Bicompartimental. Entrada inmediata en el eritrocito. ¿Se puede considerar una distribución saturable al compartimento periférico?	160.123	120.472	Incremento de LL2 respecto run 16. La distribución saturable al comp. periférico no mejora el ajustado.

ANEXO I

Run	Dosis Incluidas (mg/kg)	Características del Modelo	-2LL	Δ -2LL	Comentarios
39	3 y 30 IV - PL & SG	¿Un modelo tricompartmental no lineal explica mejor los datos?	83.491	43.840	Un modelo tricompartmental no mejora el ajustado.
40	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG	¿Mejora el ajustado si se aplica el modelo tricompartmental a las tres dosis IV?	232.491	-	El ajustado empeora respecto el run 39.
41-43	0.3 IV - PL & SG	¿Mejora el ajustado si en el modelo bicompartmental se considera CP_{libre} (conc. libre en plasma) en lugar de CP?	157.724	-	Se registra gradiente 0 en varios parámetros.
44	3 y 30 IV - PL & SG 3 PO - PL & SG	En el modelo bicompartmental (run 16) se incorpora una dosis oral	159.521	-	Error residual en plasma elevado
45	3 y 30 IV - PL & SG 3 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado si en el modelo bicompartmental se incorpora el parámetro biodisponibilidad?	132.238	-27.283	Mejora estadísticamente significativa respecto run 44 en incorporar la biodisponibilidad
46	3 y 30 IV - PL & SG 3 y 30 PO - PL & SG	El el run 45 se incorpora otra dosis oral.	274.405	-	-
47	3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	En el run 46 se incorpora la dosis más alta oral. Se considera un único valor de Ka.	-	-	No finaliza el ajustado.
48	3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado el incorporar dos valores de Ka, uno para las dosis pequeña y mediana y otro para la dosis alta oral?	383.524	-	El incorporar dos valores de Ka ha permitido ajustar el modelo a los datos.
49	3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado el incorporar tres valores de Ka, uno para cada dosis oral?	335.650	-47.874	El incorporar tres valores de Ka mejora significativamente el ajustado.
50	3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿En lugar de definir 3 valores de Ka, se puede utilizar una función asintótica para definir la reducción de Ka para las dosis crecientes?	344.074	8.424	Incremento de LL2 respecto run 49.
51	3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	En el run 50, se cambia Eta1 en CL por Eta1 en V	-	-	El modelo no funciona.
52-54	3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	Se fija el error residual para evaluar como ajusta el modelo en estas condiciones.	523.431- 834.903	-	-
55	3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	Modelo bicompartmental no lineal (como run50). Eta 1 en CL y Eta2 en KA.	459.339	-	Gradiente 0 en Eta1 y 2
56	3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	Modelo bicompartmental no lineal (como run50). Eta 1 en CL y Eta2 en error residual	303.589	-	Gradiente 0 en Eta1
57	3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado del run 50 si cambio ADVAN9 por ADVAN6?	-	-	No finaliza el ajustado. ADVAN6 no mejora el ajustado.
58-61	3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	A partir del run 50, se ponen límites al valor de error residual para evaluar como ajusta el modelo en estas	346.484- 476.628	-	Aparece gradiente 0 en varios parámetros.
62-63	3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado del run 50 si cambio METHOD 1 INTERACTION por METHOD 1 LAPLACE?	-	-	No finaliza el ajustado. Method 1 Laplace no mejora el ajustado.
64	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	Al run 50, se incorpora la dosis más pequeña IV	688.947	344.873	El incorporar la dosis 0.3 IV empeora el ajustado.
65	0.3, 3 y 30 IV - SG 3, 30 y 300 PO - SG	¿Mejora el ajustado del run 64 si sólo considero las concentraciones obtenidas en sangre?	292.851	-	Error residual en sangre elevado
66-68	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado del run 64 (datos log-transf.) si cambio el error residual aditivo por uno de proporcional?	686.883- 1274.468	-	El error residual proporcional no mejora el ajustado. Se confirma que el error residual aditivo explica mejor los
69-70	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	Al run 64 (bicompartmental, entrada inmediata en el eritrocito), ¿Se puede considerar una distribución saturable al compartimento periférico?	680.138	-8.809	Disminuye la función objetiva pero el error residual en sangre es demasiado elevado.
71-73	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado del run 64 si se incluyen los valores BQL en el ajustado?	-	-	No finaliza el ajustado
74	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG	Modelo bicompartmental no lineal (entrada inmediata al eritrocito). Se EXCLUYEN las concentraciones en plasma de irosustat a la dosis de 0.3 IV debido a la elevada degradación a IDP 17619.	101.055	-	Minimización exitosa. Se decide EXCLUIR las concentraciones en plasma de irosustat a la dosis de 0.3 IV debido a la elevada degradación a IDP 17619.
75	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 30 PO - PL & SG	Al run 74 se le incorpora una dosis oral	278.912	-	-
76	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 30 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado del run 75 si se considera tiempo de latencia en la absorción oral?	160.203	-118.709	El incorporar tiempo de latencia en la absorción oral mejora significativamente el ajustado.
77	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 30 y 300 PO - PL & SG	Al run 76 se incorpora la dosis de 300 mg/kg oral	287.694	-	-
78	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 30 y 300 PO - PL & SG	Al run 77 se consideran 2 valores de Ka, uno para cada dosis oral.	250.031	-37.663	Mejora significativa respecto run 77.
79	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 30 y 300 PO - PL & SG	Al run 78 (dos valores de Ka), se consideran 2 valores de biodisponibilidad, uno para cada dosis oral.	188.124	-61.907	Mejora significativa respecto run 78.
80	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	Se incorpora la dosis pequeña oral. ¿Se puede utilizar una función asintótica para definir la reducción de Ka para las dosis crecientes?	267.667	-	Ajustado correcto.
81	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿Se puede utilizar una función asintótica para definir la reducción de biodisponibilidad para las dosis crecientes?	310.666	42.999	Peor ajustado que en el run 80.
82	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado si se considera un valor de Ka y de biodisponibilidad para cada dosis oral?	229.928	-	Minimización exitosa. MODELO ESTRUCTURAL BÁSICO.

Run	Dosis Incluidas (mg/kg)	Características del Modelo	-2LL	Δ -2LL	Comentarios
83	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta2 (variabilidad interindividual) en en parámetro SLP?	216.504	-	Gradiente 0 en Eta2
84	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta2 en en parámetro B _{max} ?	-	-	No finaliza el ajustado
85	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta2 en en parámetro BIO (biodisponibilidad)?	311.252	-	Gradiente 0 en Eta2
86	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta2 en en parámetro Ka?	239.636	-	Gradiente 0 en Eta1
87	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta2 en en parámetro Q (aclaramiento de distribución)?	-	-	No finaliza el ajustado
88	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta2 en en parámetro t _{lag} (tiempo de latencia)?	309.517	79.589	No significativo
89	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta2 en en parámetro V2 (volumen comp. central)?	-	-	No finaliza el ajustado
90	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta2 en en parámetro V3 (volumen comp. periférico)?	233.905	3.977	No significativo
91	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta2 en en parámetro NS (unión no específica al eritrocito)?	221.193	-	Gradiente 0 Eta 2
92	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la incorporación de la covariable Dosis en el aclaramiento (CL)?	247.042	17.114	No significativo
93	0.3, 3 y 30 IV - PL & SG 3, 30 y 300 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la incorporación de la covariable Peso en el aclaramiento (CL)?	230.903	0.975	No significativo

PL: Plasma; SG: Sangre

9.4 Tabla Resumen de Desarrollo del Modelo Farmacocinético Poblacional en Perro

Run	Dosis Incluidas (mg/kg)	Características del Modelo	-2LL	Δ -2LL	Comentarios
1-2	0.1 IV - PL	Modelo Monocompartimental	503.227-730.415	-	-
3-7	0.1 IV - PL	Modelo Bicompartmental	144.316-162.660	-	El modelo bicompartmental mejora el ajustado
8-14	0.1 IV - PL	Modelo Tricompartmental	138.439-156.492	-	El modelo tricompartmental, a este nivel de dosis, no supone una mejora evidente respecto el bicompartmental
15-19	0.1 y 0.4 IV - PL	Modelo Bicompartmental. Introducción de variab. Interindividual en los distintos parámetros	595.274-633.200	-	-
20-26	0.1 y 0.4 IV - PL	Modelo Tricompartmental. Introducción de variab. Interindividual en los distintos parámetros	590.924-595.957	-	-
27	0.1 y 0.4 IV - PL	En el run 17 (Bicompartmental) se define un aclaramiento distinto para cada dosis	595.789	-0.484	El ajustado mejora. Hay indicios de no linealidad farmacocinética
28	0.1 y 0.4 IV - PL	En el run 17 (Bicompartmental) se define un volumen de distribución distinto para cada dosis	540.943	-54.330	Mejor ajustado que en el run anterior
29-31	0.1, 0.4 y 2 IV - PL	Modelo Bicompartmental con las tres dosis IV	1556.349-1590.097	-	La introducción de la dosis más alta IV empeora el ajustado.
32-34	0.1, 0.4 y 2 IV - PL	Modelo Tricompartmental con las tres dosis IV	1551.254-1561.744	-	El ajustado continúa sin ser idóneo. Se pasa a estudiar la dosis de 2 mg/kg.
35-37	2 IV - PL	Modelo Bicompartmental con la dosis más alta IV	596.860-657.541	-	-
38-40	2 IV - PL	Modelo Tricompartmental con la dosis más alta IV	545.349-551.637	-	El modelo tricompartmental ajusta mejor a la dosis de 2 mg/kg. Se continua el ajustado con las tres dosis IV
41	0.1, 0.4 y 2 IV - PL	Al run 33 (tricompartmental) se define un volumen de distribución en el central distinto para cada dosis	1202.142	-349.112	Mejor ajustado
42	0.1, 0.4 y 2 IV - PL	Al run 33 (tricompartmental) se define una función asintótica para modelar la reducción del volumen de distribución para las dosis crecientes	1236.453	34.311	El modelo 41 ajusta mejor los datos. Pero este modelo permite ajustar cualquier dosis comprendida entre 0.1 y 2 mg/kg
43-50	0.1, 0.4 y 2 IV - PL	A partir del run 42 (tricompartmental) y con una función asintótica en V2 (central), se añade variab. Interindividual en los distintos parámetros	1221.641-1241.648	-	-
51-58	0.1, 0.4 y 2 IV - PL 0.25 PO - PL	Se añade la dosis más baja oral. Se prueba un modelo Bicompartmental	1933.051-2017.822	-	-
59-70	0.1, 0.4 y 2 IV - PL 0.25 PO - PL	Se añade la dosis más baja oral. Se prueba un modelo Tricompartmental	1927.050-2017.845	-	El modelo Tricompartmental no mejora el ajustado respecto el Bicompartmental.
71-73	0.1, 0.4 y 2 IV - PL 0.25 PO - PL	El el run 58 (Bicompartmental) se añade una distribución saturable al compartimento periférico	1653.918	-279.918	La distribución saturable al compartimento periférico mejora el ajustado del run 58
74-75	0.1, 0.4 y 2 IV - PL 0.25 y 2.5 PO - PL	Se añade otra dosis oral (2.5 mg/kg) al run 71 (bicompartmental, distrib. saturable)	2492.460	-	-
76	0.1, 0.4 y 2 IV - PL 0.25 y 2.5 PO - PL	Se añade la dosis oral (2.5 mg/kg) a un modelo tricompartmental con distrib. saturable al periférico	2490.871	-1.589	Ligera mejora del ajustado respecto el run 74
77-130	0.1, 0.4 y 2 IV - PL 0.25, 2.5 y 25 PO - PL	Se añade la dosis oral mas alta (25 mg/kg) a un modelo Bicompartmental con distrib. saturable al periférico	3823.821-4396.945	-	-
131-181	0.1, 0.4 y 2 IV - PL 0.25, 2.5 y 25 PO - PL	Se añade la dosis oral mas alta (25 mg/kg) a un modelo Tricompartmental con distrib. saturable al periférico	3259.980-3527.197	-	No se ha conseguido un buen ajustado de los datos. Se empieza el ajustado simultáneo de plasma y sangre (entrada inmediata al eritrocito)
182-200	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG	Ajustado simultáneo plasma y sangre de la vía IV (Bicompartmental). Entrada inmediata al eritrocito.	5241.533-5281.417	-	No se ha conseguido un buen ajustado de los datos. Se empieza el ajustado de los datos log-transformados
201	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG	Ajustado simultáneo plasma y sangre de la vía IV (Bicompartmental) con datos log-transformados	297.212	-	-
202-232	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG	Ajustado simultáneo plasma y sangre de la vía IV (Tricompartmental) con datos log-transformados	120.126-292.990	-	No se ha conseguido un buen ajustado de los datos. Se empieza el ajustado teniendo en cuenta conc. libre en plasma
233-281	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG	Ajustado simultáneo plasma y sangre de la vía IV (Tricompartmental) con datos log-transformados. Se considera conc. libre en plasma	39.528-52.076	-	No se ha conseguido un buen ajustado de los datos. Las concentraciones se convierten de ng/ml a μmol/l y posteriormente se log-transforman
282-284	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG	Ajustado simultáneo plasma y sangre de la vía IV (Tricompartmental) con datos log-transformados (μ mol/l). Error residual aditivo	92.677	-	-
285	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG	¿Añadir una distribución saturable a un comp. periférico mejora el ajustado del run 284?	-140.174	-192.851	La distribución saturable al compartimento periférico mejora el ajustado
286-287	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG	¿Añadir una eliminación saturable desde el comp. central mejora el ajustado del run 284?	92.749	0.072	Considerar una eliminación saturable desde el compartimento central no mejora el ajustado

ANEXO I

Run	Dosis Incluidas (mg/kg)	Características del Modelo	-2LL	Δ -2LL	Comentarios
288-290	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25, 2.5 y 25 PO - PL & SG	Se estudia la fijación a eritrocitos, sin calcular parámetros PK. 1 sitio de unión	-264.846	-	-
291	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25, 2.5 y 25 PO - PL & SG	Se estudia la fijación a eritrocitos, sin calcular parámetros PK. 1 sitio de unión. Se considera un coeficiente de Hill	-265.471	-0.625	Mejora no significativa
292-294	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25, 2.5 y 25 PO - PL & SG	Se estudia la fijación a eritrocitos, sin calcular parámetros PK. 2 sitios de unión	-221.996	42.850	Se concluye que 1 lugar de unión en el eritrocito explica mejor los datos
295-317	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG	¿Mejora el ajustado del run 285 si se ejecuta con los resultados de Bmax, KD y NS (valores fijados) del run 290?	-99.750 - -104.750	-	No se consigue un buen ajustado. Es mejor no fijar de antemano los parámetros de unión a eritrocitos
318	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 PO - PL & SG	Al run 285 (Tricompartimental, distrib. saturable al comp. periférico) se añade la dosis pequeña oral	130.668	-	-
319-320	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	Al modelo 318 se incorpora la dosis mediana oral	567.924	-	-
321	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción del parámetro biodisponibilidad?	516.589	-51.335	Mejora Significativa al introducir el parámetro biodisponibilidad
322	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta2 (variabilidad interindividual) en en parámetro biodisponibilidad?	502.409	-14.180	Gradiente 0 en el ajustado de Eta2
323	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado del run 321 la introducción del parámetro tiempo de latencia?	465.113	-51.476	Mejora Significativa al introducir el parámetro tiempo de latencia
324	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta2 (variabilidad interindividual) en en parámetro Ka (cte. absorción)?	314.491	-150.622	Mejora Significativa en introducir Eta2 en Ka
325-351	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25, 2.5 y 25 PO - PL & SG	Se incorpora la dosis más alta oral	1008.084- 1159.444	-	La dosis más alta oral muestra un comportamiento distinto al resto de dosis. Se decide excluir esta dosis del ajustado.
352	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	Al run 324 (Tricompartimental, distrib. saturable al comp. Periférico, Eta1 en CL y Eta2 en Ka, error residual aditivo) se ponen límites al parámetro SLP	175.954	-138.537	MODELO ESTRUCTURAL BÁSICO
353	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta3 (variabilidad interindividual) en en parámetro NS?	173.011	-2.943	No significativo
354	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta3 (variabilidad interindividual) en en parámetro SLP?	321.665	145.711	No significativo
355	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta3 (variabilidad interindividual) en en parámetro Bmax?	-	-	No finaliza el ajustado
356	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta3 (variabilidad interindividual) en en parámetro V2 (volumen central)?	-	-	No finaliza el ajustado
357	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta3 (variabilidad interindividual) en en parámetro Vmax?	199.259	23.305	No significativo
358	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta3 (variabilidad interindividual) en en parámetro Q3?	221.171	45.217	No significativo
359	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta3 (variabilidad interindividual) en en parámetro biodisponibilidad?	173.014	-2.940	No significativo
360	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta3 (variabilidad interindividual) en en parámetro tiempo de latencia?	165.762	-10.192	Gradiente 0 en el ajustado de Eta1
361	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta3 (variabilidad interindividual) en en parámetro Q4?	383.819	207.865	No significativo
362	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta3 (variabilidad interindividual) en en parámetro V4?	374.697	198.743	No significativo
363	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la introducción de Eta3 (variabilidad interindividual) en en parámetro V3?	184.815	8.861	Gradiente 0 en el ajustado de Eta1 y Eta3
364	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la incorporación de la covariable Hematocrito en el aclaramiento (CL)?	208.398	32.444	No significativo
365	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la incorporación de la covariable Ocasión en el aclaramiento (CL)?	185.988	10.034	No significativo
366	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la incorporación de la covariable Ocasión en la cte. de absorción (Ka)?	175.954	0.000	No significativo
367	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la incorporación de la covariable Matriz en la cte. de absorción (Ka)?	-	-	No finaliza el ajustado
368	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la incorporación de la covariable Dosis en la cte. de absorción (Ka)?	183.182	7.228	No significativo
369	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la incorporación de la covariable Peso en la cte. de absorción (Ka)?	157.370	-18.584	Significativo, pero sin sentido fisiológico
370	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la incorporación de la covariable Hematocrito en la cte. de absorción (Ka)?	192.996	17.042	No significativo
371	0.1, 0.4 y 2 IV - PL & SG 0.25 y 2.5 PO - PL & SG	¿Mejora el ajustado la incorporación de la covariable Conc. de Eritrocitos en la cte. de absorción (Ka)?	177.802	1.848	No significativo

PL: Plasma; SG: Sangre

ANEXO II

10 ANEXO II**10.1 Póster Presentado en el 29º Congreso de la Sociedad Española de Farmacología**

Esta comunicación fue presentada en setiembre de 2007 en el contexto del 29º Congreso de la Sociedad Española de Farmacología celebrado en Alcalá de Henares (Madrid), y publicada como abstract en la revista *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*.

Este póster fue elaborado en el año 2007, durante el periodo de investigaciones previas para la presente tesis, por lo que no se trata de un resumen o transcripción de la misma, sino que constituye la idea inicial y el punto de partida de los trabajos posteriores.

En los resultados recopilados para esta comunicación se observó que en el plasma de rata los valores de exposición de irosustat no incrementaban de forma proporcional a la dosis administrada, lo que condujo posteriormente, durante el desarrollo de esta tesis, a investigar los motivos y mecanismos por los cuales se observaba una falta de linealidad cinética en el intervalo de dosis ensayadas.

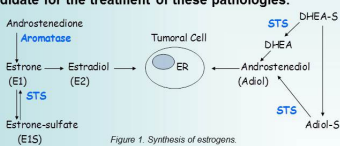
PHARMACOKINETIC LINEARITY FOLLOWING INTRAVENOUS AND ORAL ADMINISTRATIONS OF A STEROID SULFATASE INHIBITOR (BN83495) TO RATS

Blanch S., Menargues A., Bielsa R., Pérez A., Celma C., Paire C., and Obach R.

Drug Metabolism, Pharmacokinetics and Immunology Department. Preclinical Pharmacokinetics Unit. IPSEN Pharma S. A. Ctra. Laureà Miró, 395. 08980 Sant Feliu de Llobregat. Barcelona. Spain

INTRODUCTION

Breast cancer is the most common form of cancer among women in the developed world and estrogens are considered to be the most important hormones that influence the development and growth of these tumours. Estrogens can be synthesised in peripheral tissues by two main pathways, that is, the aromatase and sulfatase routes (see Figure 1). BN83495 is a potent inhibitor of the steroid sulfatase enzyme (STS), which allows the hydrolysis of estrone-sulfate to estrone and, since the STS activity is considerably higher than that of the aromatase in breast tumours (Santen et al.), BN83495 is a relevant candidate for the treatment of these pathologies.

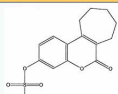


OBJECTIVES

The aim of the study was to evaluate the pharmacokinetic linearity of BN83495, following its single intravenous administration as a solution at 0.1, 0.3, 3 and 30 mg/kg and its single oral administration as an aqueous suspension at 3, 30 and 300 mg/kg to male Sprague-Dawley rats.

MATERIAL AND METHODS

DRUG: Micronised BN83495 (free base) (6-oxo-8,9,10,11-tetrahydro-7H-cyclohepta-[c][1]benzopyran-3-O-sulfamate) from Sterix (see Figure 2).



FORMULATIONS: Four solutions of micronised BN83495 at concentrations of 0.05, 0.15, 1.5 and 15 mg/g were prepared by sequential dissolution of the appropriate amount of micronised BN83495 in Soluphor P, PEG400 and WFI (36:24:40). Three aqueous suspensions of micronised BN83495 in 1% methyl cellulose were prepared at the concentrations of 0.75, 7.5 and 75 mg/g.

ANIMALS: A total of eighty four male albino Sprague-Dawley rats 7-8 weeks old and 200 to 300 g bodyweight were used. The experimental procedures were appropriately approved by the IACUC and the Regulatory Office. Animals were fasted overnight before administration.

ADMINISTRATION ROUTE AND DOSE: The single intravenous bolus administration of BN83495 was done through the jugular vein at four theoretical dose levels of 0.1, 0.3, 3 and 30 mg/kg. The single oral administration was done by gavage at three theoretical doses of 3, 30 and 300 mg/kg. A constant dosage-volume of 2 mL/kg and 4 mL/kg was used for IV and oral administrations, respectively.

BLOOD SAMPLING: Blood samples of 0.9 mL were withdrawn, from isoflurane-anaesthetised rats through the retro-orbital sinus, by means of Pasteur micro-pipettes at different time intervals from time 0 up to 48 hours post-administration. Three rats were used to obtain blood at every sampling time-point. Samples were placed into lithium heparin tubes and kept in an ice-water bath until being centrifuged (1600 g for 20 min at +4°C). Finally, the plasma was decanted into the corresponding identified polypropylene cryotubes and kept rapidly frozen at -70°C until its analysis.

ANALYTICAL METHOD: The levels of BN83495 in rat plasma samples were analyzed by a validated on line SPE-LC-MS/MS method using IDP 18090 (stable isotope labeled analogue of BN83495) as internal standard. The analytical method consisted in the on-line solid phase extraction of the plasma coupled to a LC-MS/MS system, working the mass spectrometer in multiple reaction monitoring (MRM) mode. Data were acquired and analysed using Analyst 1.4 software. The validated calibration range was 0.250-100 ng/mL and the limit of quantification was 0.250 ng/mL. The accuracy of the plasma quality control samples, expressed as %Bias, ranged between 0.04% and 2.41% and precision, expressed as %CV, ranged between 2.75% and 7.29%.

PHARMACOKINETIC ANALYSIS: A non-compartmental pharmacokinetic analysis of the median BN83495 plasma concentrations at each experimental time-point was performed by means of the WinNonlin software version 3.3. Plasma concentration values of BN83495 below the limit of quantification were taken as 0.

RESULTS

The semilogarithmic plot of BN83495 plasma levels versus sampling times following IV bolus administration at different dose-levels (0.1, 0.3, 3 and 30 mg/kg) denotes a multiexponential profile (see Figure 3). BN83495 plasma levels were quantified from the first sampling time point at 1 minute up to 8, 12, 30 and 22 hours for increasing dose-levels, respectively. The semilogarithmic plasma concentration-time profile of BN83495 following its oral administration as an aqueous suspension (1% methylcellulose) at different dose-levels (3, 30 and 300 mg/kg) to rats is shown in Figure 4. Peak plasma levels are achieved rapidly, in 1 hour (low and mid dose) or 3 hours (high dose). BN83495 plasma levels were detected from the first sampling time point at 5 minutes up to 12, 30 and 48 hours for increasing dose-levels, respectively.

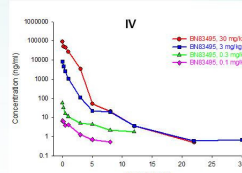


Figure 3. Median plasma concentration-time profiles of BN83495 following single IV bolus administration at dose levels of 0.1, 0.3, 3 and 30 mg/kg to rats.

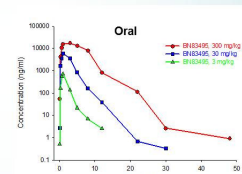


Figure 4. Median plasma concentration-time profiles of BN83495 following single oral administration at dose levels of 3, 30 and 300 mg/kg to rats.

Parameter	Units	0.1 mg/kg	0.3 mg/kg	3 mg/kg	30 mg/kg
Dose	mg/kg	0.100	0.304	2.95	28.9
C ₀	ng/ml	6.794	62.66	6679	100813
C _{12h}	-	67.6	296	3006	2486
AUC	(ng/ml)·h	16.24	78.82	4356	71607
AUC/D	-	162	259	1476	2478
T _{1/2α}	h	4.12	5.77	4.41	2.54
CL	l/kg	6.16	3.96	0.677	0.404
V _{ss}	l/kg	27.0	24.3	0.662	0.371

Table 1. Pharmacokinetic parameters of BN83495 following single IV bolus administration at dose levels of 0.1, 0.3, 3 and 30 mg/kg to rats.

Parameter	Units	3 mg/kg	30 mg/kg	300 mg/kg
Dose	mg/kg	3.10	30.8	334
T _{max}	h	1.11	1.14	3.00
C _{max}	ng/ml	708.8	5908	16600
C _{12h}	-	229	192	50.4
AUC	(ng/ml)·h	1257	17700	118406
AUC/D	-	405	574	355
T _{1/2α}	h	2.32	2.34	3.51

Table 2. Pharmacokinetic parameters of BN83495 following single oral administration at dose levels of 3, 30 and 300 mg/kg to rats.

Ratio	BN83495 in Plasma (ngEq/mL)
PLA	0.199
SMA	0.185
BLOOD	0.185
	0.227
	0.742
	1.193

Table 3. In vitro binding of ¹⁴C-BN83495 to Rat erythrocytes.

Pharmacokinetic parameters of BN83495 following single IV and oral administrations at different dose levels to rats are summarised in Tables 1 and 2, respectively. BN83495 binds to erythrocytes and after its IV administration at 0.1 and 0.3 mg/kg the compound is removed very quickly from the plasma for distributing inside the erythrocytes, so the CL and V_{ss} values are high. Following doses of 3 and 30 mg/kg the erythrocytes easily get saturated (see Table 3) and the CL and V_{ss} values are lower. The CL and V_{ss} values of BN83495 suggest a non-linear behaviour of the compound, as reflected in the fact that AUC values normalized by dose (AUC/D) after IV or oral administrations do not remain constant for increasing dose-levels. Further studies are now on going to fully elucidate the reasons of this non-linearity.

CONCLUSIONS

- The decrease of CL and V_{ss} values with increasing dose-levels of BN83495 suggest a non-linear behaviour of the compound in this animal species, so AUC/D values after IV and oral administrations do not remain constant.
- The BN83495 binds to erythrocytes and its saturation contributes to the non-linearity.

BIBLIOGRAPHY

- Reed M.J., Purohit A., Woo L.W.L., Newman S.P., and Potter B.V.L.: Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition. *Endocr. Rev.* 26(2): 171-202, 2005.
- Santen R.J., Leszczynski D., Tilson-Mallet N., Feil P.D. et al: Enzymatic control of estrogen production in human breast cancer: relative significance of aromatase versus sulfatase pathways. *Ann N Y Acad Sci.* 464: 126-137, 1986.
- Davies B., Morris T: Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm. Res.* 10: 1093-1095, 1993.
- Boddy A., Edwards P., and Rowland M.: Binding of sulfonamides to carbonic anhydrase: influence on distribution within blood and on pharmacokinetics. *Pharm. Res.* 6: 203-209, 1989.

