

ORIGINALES

## Influencia de los polimorfismos genéticos en *UGT1A1*, *UGT1A7* y *UGT1A9* sobre la farmacocinética de irinotecán, SN-38 y SN-38G

B. Valenzuela Jiménez<sup>1\*</sup>, M. González Sales<sup>2</sup>, V. Escudero Ortiz<sup>1</sup>,  
E. Martínez Navarro<sup>1</sup>, C. Pérez Ruixo<sup>2</sup>, J. Rebollo Liceaga<sup>1</sup>,  
R. González Manzano<sup>1</sup> y J. J. Pérez Ruixo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Plataforma de Oncología, Hospital Quirón, Torrevieja, Alicante. <sup>2</sup>Consulting Projects for Research, SL. Puzol, Valencia.

<sup>3</sup>Translational Sciences, AMGEN, Inc, EE.UU.

### Resumen

**Objetivo:** Evaluar la influencia de los polimorfismos genéticos en *UGT1A1*, *UGT1A7* y *UGT1A9* sobre la farmacocinética poblacional de irinotecán y sus metabolitos, SN-38 y SN-38G.

**Metodología:** Las concentraciones plasmáticas de irinotecán, SN-38 y SN-38G determinadas en 72 pacientes se utilizaron para desarrollar un modelo farmacocinético poblacional en el programa NONMEM VII. Se empleó el método M3 para incluir en el análisis las concentraciones por debajo del límite de cuantificación de la técnica analítica. Se evaluó el efecto de la edad, sexo, superficie corporal, bilirrubina total, medicación concomitante, tipo de tumor y polimorfismos genéticos en *UGT1A1*, *UGT1A7* y *UGT1A9* sobre los parámetros farmacocinéticos del modelo. La validación interna del modelo farmacocinético se realizó mediante *normalized visual predictive check* (NVPC) y *normalized predictive distribution error* (NPDE).

**Resultados:** El valor medio (variabilidad interpaciente, %) del aclaramiento de irinotecán, SN-38 y SN-38G ha sido 42,9 (56,4%), 1340 (76,8%) y 188 L/h (70,1%), respectivamente. La presencia de alelos con baja actividad enzimática (*UGT1A1*\*28, *UGT1A7*\*3 y *UGT1A9*\*22) redujo el aclaramiento de SN-38 entre un 20 y un 36%. La validación interna ha confirmado que el modelo farmacocinético poblacional resulta adecuado para describir la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de irinotecán, SN-38 y SN-38G y su variabilidad en pacientes oncológicos.

**Conclusión:** La inclusión de información farmacocinética-farmacogenética puede añadir valor a la personalización de la dosifi-

### Influence of genetic polymorphisms in *UGT1A1*, *UGT1A7* and *UGT1A9* on the pharmacokinetics of irinotecan, SN-38 and SN-38G

#### Abstract

**Objective:** To evaluate the influence of genetic polymorphism in *UGT1A1*, *UGT1A7* and *UGT1A9* on the population pharmacokinetics of irinotecan and its metabolites, SN-38 and SN-38G. **Methods:** Plasma concentrations of irinotecan, SN-38 and SN-38G from 72 patients were pooled to develop a population pharmacokinetic model using NONMEM VII. M3 method was used to account for plasma concentrations below the limit quantification. The effect of age, sex, body surface area, total bilirubin, co-medication, tumor type, and *UGT1A1*, *UGT1A7* and *UGT1A9* genotypes on the model parameters was evaluated. The model was internally validated using normalized visual predictive check (NVPC) and normalized predictive distribution errors (NPDE).

**Results:** The typical values (between-subject variability; %) of the irinotecan, SN-38 and SN-38G clearances were 42,9 L/h (56,4%), 1340 L/h (76,8%) and 188 L/h (70,1%), respectively. The presence of *UGT1A1*\*28, *UGT1A7*\*3, *UGT1A9*\*22 genotypes decreases SN-38 clearance between 20 and 36%. Internal validation confirms the population pharmacokinetic model describe the time course of irinotecan, SN-38 and SN-38G plasma concentration and their associated variability in cancer patients.

**Conclusion:** The inclusion of pharmacokinetic-pharmacogenomic information can add value to the individualized dose ad-

\* Parte de los resultados de este trabajo fueron presentados en las IV Jornadas de Modelización y Simulación en Biomedicina, celebradas en Alicante del 23 al 25 de Noviembre de 2011.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: belen.valenzuela@quiron.es (B. V. Jiménez).

cación de irinotecán por cuanto que permitirá manejar cuantitativamente las reducciones de dosis en pacientes con toxicidad iatrogénica debido a los polimorfismos genéticos en *UGT1A1*.

#### PALABRAS CLAVE

Irinotecán; Farmacocinética; Genotipo; Isoforma; Polimorfismo; NONMEM; Oncología

Farm Hosp. 2013;37(2):111-127

## Introducción

Irinotecán es un agente antineoplásico que inhibe la ADN topoisomerasa I, enzima que estabiliza la estructura topográfica del ADN durante su replicación y transcripción<sup>1</sup>. La inhibición de la topoisomerasa I produce fragmentos de hebras simples de ADN que conducen a la detención de la división celular y a la muerte de las células en proceso de división. El mecanismo de acción de irinotecán le confiere actividad farmacológica en diversos tipos de tumores sólidos como el cáncer de pulmón, ovario, estómago, páncreas o gliomas<sup>2,3</sup> y está indicado como tratamiento de primera línea en carcinoma colorrectal metastático<sup>4</sup> en combinación con 5-fluorouracilo (5-Fu) y ácido folínico cada dos semanas, con o sin bevacizumab<sup>5</sup>, cetuximab<sup>6</sup> o panitumumab<sup>7</sup>; y también en segunda línea después del tratamiento con 5-Fu u oxaliplatino, tanto en monoterapia como en combinación. Se administra en perfusión intravenosa de entre 60 y 90 minutos de duración y la dosis inicial recomendada en monoterapia es de 125 mg/m<sup>2</sup> en administración semanal o 350 mg/m<sup>2</sup> cada tres semanas<sup>8</sup>.

A las dosis habitualmente utilizadas en la práctica clínica, irinotecán presenta una farmacocinética lineal. Tras su administración intravenosa, el volumen de distribución en estado estacionario ( $V_{ss}$ ), 263 L, refleja su amplia distribución a fluidos y tejidos biológicos<sup>9</sup>. Su unión a proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina, es moderada (30-68%)<sup>10</sup>. La evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de irinotecán presenta un perfil multiexponencial, con un aclaramiento plasmático de 32 L/h y una semivida de eliminación en fase terminal entre 11 y 13 horas<sup>9,11,12</sup>. Las principales vías de eliminación de irinotecán son el metabolismo hepático y la excreción biliar y urinaria. Las carboxilesterasas presentes en los hepatocitos originan el SN-38<sup>13,14</sup>, metabolito entre 100 y 1000 veces más activo que irinotecán y principal responsable de su toxicidad hematológica e intestinal<sup>9,15</sup>. La fracción de irinotecán transformada a SN-38 oscila entre 12 y 15%<sup>16</sup>. El metabolismo oxidativo, mediante las enzimas del citocromo P450 3A4, provoca la apertura del anillo piperidínico del irinotecán y la formación de dos metabolitos de escasa o nula actividad citotóxica, uno de ellos es un derivado del ácido aminopentanoico (APC) y el otro es un derivado de su amina primaria (NPC)<sup>3</sup>. Aproximadamente entre el 3 y 22% del irinotecán administrado se excreta por bilis y sufre ciclo enterohepático. El

justment of irinotecan, because it will let quantitatively handle dose reductions in patients with iatrogenic toxicity due to *UGT1A1*'s genetic polymorphisms.

#### KEYWORDS

Irinotecan; Pharmacokinetics; Genotype; Isoform; Polymorphism; NONMEM; Oncology

Farm Hosp. 2013;37(2):111-127

porcentaje de irinotecán inalterado excretado en orina oscila entre el 10 y 20%<sup>17</sup>.

Al igual que irinotecán, SN-38 presenta una farmacocinética lineal. Las concentraciones plasmáticas máximas de SN-38 se observan aproximadamente una hora después del final de la perfusión intravenosa de irinotecán y disminuyen en función del tiempo de forma biexponencial. El  $V_{ss}$  aparente de SN-38 es 72000 L y alrededor del 95% se une a proteínas plasmáticas, fundamentalmente, albúmina. Sufre metabolismo hepático por glucuronidación, mediada por UDP-glucosiltransferasas (UGT), que origina el metabolito inactivo SN-38G<sup>15</sup>. El SN-38G se acumula en bilis y se libera al lumen intestinal donde, reconvertido a SN-38 por la acción de las beta-glucuronidasas, puede ser reabsorbido. El aclaramiento plasmático aparente de SN-38 y SN-38G es 712 y 67 L/h, respectivamente, y condiciona concentraciones plasmáticas de SN-38G más elevadas que las concentraciones plasmáticas de SN-38<sup>9</sup>. La isoforma UGT1A1 es la principal enzima encargada de la formación de SN-38G aunque otras isoformas, como 1A7 y 1A9, también son capaces de glucuronizar el SN-38<sup>18</sup>. Las isoformas funcionales del enzima UGT1A están codificadas por el gen *UGT1A*, localizado en el cromosoma 2q37. En los pacientes homocigóticos en *UGT1A1*\*28/\*28<sup>13</sup> hay una menor glucuronidación del SN-38 que condiciona una mayor exposición y un mayor riesgo de toxicidad hematológica y/o intestinal, especialmente tras la administración de dosis de irinotecán superiores a 150 mg/m<sup>2</sup> 19-21. Además, pacientes caucásicos con el polimorfismo genético *UGT1A7*\*3/\*3 presentan una glucuronidación del SN-38 comparable a la obtenida en pacientes homocigóticos en *UGT1A1*\*28/\*28<sup>22</sup>. Asimismo, la glucuronidación del SN-38 en pacientes coreanos con *UGT1A9-118(dT)*<sub>9/9</sub> es menor que en pacientes con el polimorfismo genético *UGT1A9-118(dT)*<sub>10/10</sub> y se asocia a una mayor incidencia de toxicidad<sup>13</sup>. Hasta el momento, en población caucásica no se ha determinado la implicación de polimorfismos genéticos de *UGT1A9* en la farmacocinética y farmacodinamia de irinotecán.

La farmacocinética de irinotecán se ha caracterizado con modelos bi-<sup>16</sup>, o tri-<sup>9,11,15,17</sup> compartimentales, mientras que la farmacocinética de SN-38 ha sido descrita mediante modelos de uno,<sup>11,15,16</sup> o dos<sup>9,11,15,16</sup> compartimentos. Para SN-38G, la literatura recoge su modelización a través del modelo bicompartimental<sup>9</sup>. La mayoría los modelos farmacocinéticos poblacionales publicados de irinotecán, SN-38 y SN-38G describen la evolución tempo-

ral de los tres compuestos de forma secuencial. Tan solo Poujol et al.<sup>12</sup> realizaron el análisis simultáneo de irinotecán y SN-38, pero no incluyeron los datos de SN-38G. Hasta el momento, ningún modelo farmacocinético poblacional de la literatura ha cuantificado el efecto de los polimorfismos genéticos en *UGT1A1*, *UGT1A7* y *UGT1A9* sobre el aclaramiento aparente de SN-38 a través del análisis conjunto de las concentraciones plasmáticas de irinotecán, SN-38 y SN-38G de pacientes caucasianos. Por tanto, el objetivo del presente estudio es evaluar la influencia de los polimorfismos genéticos *UGT1A1*, *UGT1A7* y *UGT1A9* en la farmacocinética de irinotecán, SN-38 y SN-38G de pacientes caucasianos con tumores sólidos de distinta etiología.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Criterios de selección y características de los pacientes.** Se incluyeron en el estudio pacientes oncológicos, adultos, de origen caucásiano, subsidiarios de recibir tratamiento con irinotecán, y con una expectativa de vida superior a tres meses. Además, los pacientes debían presentar normalidad en su función medular (recuento de neutrófilos  $> 1,5 \times 10^9/L$ , recuento de plaquetas  $> 150 \times 10^9/L$  y hemoglobina  $\geq 12,0$  g/dL), renal (creatinina sérica  $< 1,5$  mg/dL) y hepática (bilirrubina  $< 1,2$  mg/dL, aspartato aminotransferasa (AST)  $\leq 40$  U/L y alanina aminotransferasa (ALT)  $\leq 40$  U/L). Se excluyeron del estudio las mujeres lactantes o en periodo gestacional y aquellos pacientes que presentasen alguna de las siguientes situaciones: escala ECOG  $> 2$  (o escala Karnofsky  $< 60\%$ ), radioterapia extensa previa, trastornos psiquiátricos o de cualquier otro tipo que comprometiese la participación en el estudio, cualquier circunstancia que impidiese que el tratamiento y su seguimiento se realizase según el protocolo establecido y participación en un estudio clínico al menos 30 días antes. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado del paciente tras una entrevista personal, donde se le informó verbalmente y por escrito de los potenciales riesgos y beneficios del tratamiento y del estudio.

El presente estudio se realizó con un total de 72 pacientes oncológicos, cuyo tumor primario fue carcinoma colorrectal ( $n=21$ ), pulmonar microcítico ( $n=18$ ) y no microcítico ( $n=11$ ), gástrico ( $n=6$ ), de ovario ( $n=5$ ), y de otros orígenes ( $n=11$ ). Los pacientes recibieron tratamiento con irinotecán intravenoso en un régimen de administración bisemanal, con una dosis media de  $151$  mg/m<sup>2</sup> (rango de  $65$ - $350$  mg/m<sup>2</sup>) administrada en perfusión de 60 a 90 minutos. Según el tipo de tumor primario a tratar, irinotecán se administró en terapia combinada con otros antineoplásicos como cisplatino (32%), 5-Fu (29%), doxorubicina (24%), oxaliplatino (20%) y otros (10%). La tabla 1 resume otras características de la muestra al inicio del estudio.

**Toma de muestras sanguíneas y técnica analítica de irinotecán y metabolitos.** De cada paciente se ex-

**Tabla 1.** Características basales de los pacientes del estudio

| Características de los Pacientes      | Media (D.E.) | Ámbito    |
|---------------------------------------|--------------|-----------|
| Edad (años)                           | 60 (12)      | 26-91     |
| Superficie corporal (m <sup>2</sup> ) | 1,8 (0,2)    | 1,4-2,5   |
| Sexo (N, %)                           |              |           |
| Mujer                                 | 22 (31)      |           |
| Hombre                                | 50 (69)      |           |
| Albúmina (g/L)                        | 36 (6)       | 24-46     |
| Proteínas plasmáticas (g/L)           | 67 (7)       | 53-76     |
| Bilirrubina (mg/dL)                   | 0,4 (0,2)    | 0,1-1,1   |
| ALT (IU/L)                            | 29 (5)       | 19-35     |
| AST (IU/L)                            | 19 (6)       | 11-34     |
| Creatinina Sérica (mg/dL)             | 0,8 (0,2)    | 0,4-1,3   |
| Hemoglobina (g/dL)                    | 13,3 (1,2)   | 12,0-16,0 |
| Neutrófilos $\times 10^9/L$           | 3,9 (1,6)    | 1,6-7,5   |
| Plaquetas $\times 10^9/L$             | 268 (76)     | 151-402   |
| <i>UGT1A1</i> *28 (N, %)              |              |           |
| 1/1                                   | 32 (44,4)    |           |
| 1/28                                  | 23 (31,9)    |           |
| 28/28                                 | 4 (5,6)      |           |
| <i>UGT1A7</i> *3 (N, %)               |              |           |
| 1/1                                   | 27 (37,5)    |           |
| 1/3                                   | 27 (37,5)    |           |
| 3/3                                   | 6 (8,3)      |           |
| <i>UGT1A9</i> *22 (N, %)              |              |           |
| 10/10                                 | 9 (12,5)     |           |
| 9/10                                  | 29 (40,3)    |           |
| 9/9                                   | 22 (30,6)    |           |

D.E.: desviación estándar.

Las variables continuas están expresadas como media (desviación estándar), mientras que las variables categóricas han sido expresadas como recuento y porcentaje (%).

trajeron muestras sanguíneas del brazo contralateral al que se administró el primer ciclo de quimioterapia y se recogieron en tubos de plástico con heparina de litio como anticoagulante (Sarstedt®) a las 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 6; 24 y 48 horas después del inicio de la perfusión intravenosa de irinotecán. Posteriormente, éstas muestras se centrifugaron a 3500 r.p.m durante 10 minutos y el plasma se congeló a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su valoración.

La determinación de las concentraciones plasmáticas de irinotecán, SN-38 y SN-38G se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplada a un detector de fluorescencia de múltiple longitud de onda según una técnica analítica previamente publicada<sup>23</sup>. Como fase estacionaria se seleccionó una columna Kromasil C<sub>18</sub> (5  $\mu\text{m}$ ; 4,6 mm  $\times$  150 mm) y como fase móvil se empleó una mezcla de dihidrogenofosfato potásico 0,01 M a pH 4,2 y acetonitrilo en proporción 73:27 (v/v). Se utilizó camptotecina como patrón interno a una concentración de 25  $\mu\text{g/L}$ . Antes de su análisis, las muestras se desproteinizaron con acetonitrilo con un rendimiento superior al 93%. La longitud de onda de excitación seleccionada fue 250 nm y la longitud de onda de emisión

fue de 433 nm. En estas condiciones, los tiempos de retención obtenidos para irinotecán, SN-38 y camptotecina (patrón interno) fueron de 3,8; 6,9 y 8,7 minutos, respectivamente. La cuantificación de SN-38G se realizó de forma indirecta a través de la diferencia entre el SN-38 cuantificado en las muestras tras su incubación con 1000 unidades de  $\beta$ -glucuronidasa a 37°C durante 2 horas y el SN-38 cuantificado en las muestras sin ser sometidas al proceso de incubación con  $\beta$ -glucuronidasa<sup>23</sup>. La técnica analítica se validó según las directrices de validación de métodos analíticos de la FDA<sup>24</sup> y la EMA<sup>25</sup> para un ámbito de concentraciones de irinotecán de 5 a 200 ng/mL y de 2 a 400 ng/mL para SN-38. Esta técnica analítica presentó un adecuada exactitud (error relativo < 11,7% para irinotecán y < 8,5% para SN-38) y precisión (coeficiente de variación (CV) < 6,7% para irinotecán, CV < 11,1% para SN-38). La exactitud y precisión en el límite de cuantificación (LC) de irinotecán (5 ng/mL) y SN-38 (2 ng/mL) fueron inferiores al 0,4% y 3,4%, y al 0,8% y 0,2%, respectivamente.

**Genotipado de *UGT1A1*, *UGT1A7* y *UGT1A9*.** La determinación de los genotipos en 59 (82%) de los pacientes incluidos en este estudio se realizó a partir de la extracción de ADN de sangre total mediante Proteinasa K a 56°C y Tissue and Cell Lysis Buffer (EPICENTRE®). Los polimorfismos genéticos evaluados se determinaron mediante secuenciación directa de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Así, la repetición polimórfica en *UGT1A1*(TA)<sub>n</sub> (n = 6-7) se evaluó con la amplificación de un fragmento del gen con los primers *UGT1A1F* (5'-GATTGAGTATGAAATCCAGCCAG-3') y *211686varR* (5'-TTTGGTGAAGGCAGTTGA3'). La reacción de secuenciación se realizó con los primers *UGT1A1F* y *UGT1A1R* (5'-CCAGTGGCTGCCATCCACT-3'). Los alelos de *UGT1A7* se definieron mediante la combinación de seis SNPs (342G>A, 386A>G, 387T>G, 391C>A, 392G>A, 417G>C y 622T>C) que alteran los aminoácidos codificados G115S, N129R, N129K, R131K, E139D y W208R, respectivamente<sup>26</sup>. Los primers utilizados para la amplificación de estos polimorfismos fueron #18 (5'-CGCTGGACGGCACCATTG-3') y #17 (5'-GCTAAAGGGGAGATACTTACC-3'). Los polimorfismos genéticos en *UGT1A9* también se evaluaron mediante secuenciación directa de un amplicón que abarcó los sitios polimórficos de interés, incluida la repetición -118(dT)<sub>n</sub> (n = 9 o 10), C3Y (8G>A) y M33T (98T>C) entre otras<sup>27</sup>. Para ello se utilizaron los primers #38 (5'-GTCAAAAATGTCATTGTATGAACC-3') y F273 (5'-AAACTTAACATTGCAGCACAGGGC-3').

Las condiciones de amplificación para cada fragmento fueron 35 ciclos a 95°C durante 45 segundos, 63°C de temperatura de anillado para *UGT1A7* y *UGT1A9* y 60°C para *UGT1A1*, durante 45 segundos en los tres casos. La extensión se realizó a 72°C durante 90 segundos con una extensión final durante 7 minutos a la misma temperatura. La reacción de PCR contenía 0,125 u Taq DNA Polimerasa (BIOTAQ DNA polimerasa, BIOLINE), 200  $\mu$ M

dNTP y 25 pmol de cada primer. Los productos de PCR se purificaron con el kit QUIAquick DNA Purification Kit (QIAGEN). Se realizó una reacción de secuenciación sense y antisense de los fragmentos amplificados por PCR mediante ABI BigDye Terminator v1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Posteriormente, se realizó una electroforesis capilar de ambas cadenas en secuenciador automático ABI3100xl. Las variantes se determinaron mediante el software SeqScape (Applied Biosystems) con las secuencias de referencia de GenBank (NM\_000463 para *UGT1A1*, AY435142 para *UGT1A7* y AY395515 para *UGT1A9*). La codificación para los pacientes heterocigotos y homocigotos con alelos asociados con actividad enzimática reducida fue la siguiente: *UGT1A1*\*1/\*28, *UGT1A7*\*1/\*3 y *UGT1A9*\*1/\*22 para los heterocigotos y *UGT1A1*\*28/\*28, *UGT1A7*\*3/\*3 y *UGT1A9*\*22/\*22 para los homocigotos.

**Estudio de haplotipos y desequilibrio de ligamiento.** Como los haplotipos a evaluar son una combinación bialélica de diferentes loci de un mismo cromosoma, fue necesario comprobar que la distribución de los polimorfismos genéticos evaluados no se desviaba de manera significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ ) y, además, evaluar la presencia de desequilibrio del ligamiento (DL) como medida de la desviación respecto de una asociación al azar para dos alelos en loci distintos. El DL se evaluó a partir de la probabilidad observada en el polimorfismo y la esperada en presencia de equilibrio. Estas probabilidades permitieron calcular el desequilibrio escalado ( $D'$ ), el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) y el logaritmo de la likelihood odds ratio (LOD) mediante el software Haploview<sup>27</sup>. Un valor de  $D'$  o  $r^2$  igual a 1 (o  $\text{LOD} \geq 2$ ) indicó que la dependencia era fuerte, incluso podría ser completa, mientras que un valor  $\leq 0$  (o  $\text{LOD} < 2$ ) indicó una débil dependencia, o incluso independencia, en la transmisión de los polimorfismos. Tan sólo se evaluaron aquellos polimorfismos genéticos que en la muestra de pacientes estudiada se encontraron presentes en, al menos, dos de los pacientes incluidos. Finalmente, para establecer la presencia de un bloque haplotípico, definido como una combinación específica de alelos, se utilizó el método de Gabriel et al.<sup>28</sup> implementado en Haploview.

## Análisis farmacocinético - farmacogenético

**Programas informáticos.** El análisis farmacocinético se realizó con el programa informático NONMEM VII (ICON Development Solutions, Ellicott City, MD) compilado con el programa DIGITAL Visual Fortran versión 6.6C. Se utilizó la subrutina ADVAN5 con la aproximación de primer orden condicional con interacción (FOCEI) para el análisis preliminar de los datos. Los parámetros del modelo final se estimaron con el algoritmo Stochastic Approximation Expectation Maximization (SAEM). El análisis gráfico y el análisis exploratorio de las covariables

se realizó con el programa S-Plus® Professional Edition para Windows (Insightful, Seattle, WA, USA).

**Modelo farmacocinético.** Tras el análisis exploratorio gráfico de los datos y la evaluación de la literatura científica, se seleccionó un modelo farmacocinético tri-compartmental para irinotecán y bicompartimental para SN-38 y SN-38G, todos ellos con procesos cinéticos de distribución y eliminación de primer orden. El esquema del modelo farmacocinético utilizado para el análisis simultáneo de las concentraciones plasmáticas de irinotecán, SN-38 y SN-38G se muestra en la figura 1. El modelo se parametrizó en términos de aclaramiento de irinotecán ( $CL_{CPT-11}$ , L/h), volumen de distribución central de irinotecán ( $V_1$ , L), flujo entre el compartimento central y periférico liviano de irinotecán ( $Q_2$ , L/h), volumen del compartimento periférico liviano de irinotecán ( $V_2$ , L), flujo entre el compartimento central y el periférico profundo de irinotecán ( $Q_3$ , L/h) y volumen del compartimento periférico profundo de irinotecán ( $V_3$ , L). Para SN-38, la parametrización se realizó en términos de aclaramiento de SN-38 ( $CL_{SN-38}$ , L/h), volumen de distribución central de SN-38 ( $V_4$ , L), flujo entre el compartimento central y el periférico de SN-38 ( $Q_5$ , L/h) y volumen del compartimento periférico SN-38 ( $V_5$ , L). Para SN-38G, la parametrización empleada fue aclaramiento de SN-38G ( $CL_{SN-38G}$ , L/h), volumen de distribución central de SN-38G ( $V_6$ , L), flujo entre el compartimento central y el periférico de SN-38G ( $Q_7$ , L/h) y volumen del compartimento periférico de SN-38G ( $V_7$ , L). Se asumió que todo el irinotecán se transformó en SN-38 y, a su vez, todo el SN-38 fue glucuronizado, y por tanto, los parámetros farmacocinéticos de SN-38 y SN-38G se estimaron de forma aparente, dada la imposibilidad de determinar la fracción metabolizada de irinotecán a SN-38 y de SN-38 a SN-38G a partir de los datos disponibles. Las ecuaciones diferenciales que describen la evolución temporal de las

cantidades de irinotecán y sus metabolitos en los compartimentos centrales y periféricos son:

$$\frac{dA_1}{dt} = k_0 - \frac{Q_2}{V_1} \cdot A_1 + \frac{Q_2}{V_2} \cdot A_2 - \frac{Q_3}{V_1} \cdot A_1 + \frac{Q_3}{V_3} \cdot A_3 - \frac{CL_{CPT-11}}{V_1} \cdot A_1; \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\text{donde } k_0 = \begin{cases} k_0 \text{ (mg/h) si } t \leq T \\ 0 \text{ si } t > T \end{cases}$$

$$\frac{dA_2}{dt} = \frac{Q_2}{V_1} \cdot A_1 - \frac{Q_2}{V_2} \cdot A_2 \quad \text{Ecuación 2}$$

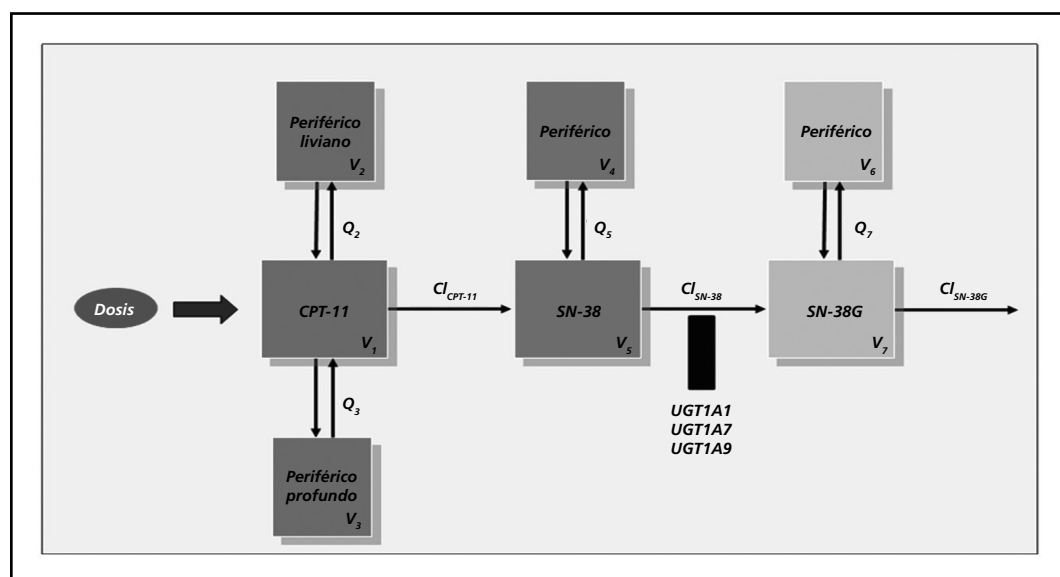
$$\frac{dA_3}{dt} = \frac{Q_3}{V_1} \cdot A_1 - \frac{Q_3}{V_3} \cdot A_3 \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\frac{dA_4}{dt} = \frac{CL_{CPT-11}}{V_1} \cdot A_1 - \frac{Q_5}{V_4} \cdot A_4 + \frac{Q_5}{V_5} \cdot A_5 - \frac{CL_{SN-38}}{V_4} \cdot A_4 \quad \text{Ecuación 4}$$

$$\frac{dA_5}{dt} = \frac{Q_5}{V_4} \cdot A_4 - \frac{Q_5}{V_5} \cdot A_5 \quad \text{Ecuación 5}$$

$$\frac{dA_6}{dt} = \frac{CL_{SN-38}}{V_4} \cdot A_4 - \frac{Q_7}{V_6} \cdot A_6 + \frac{Q_7}{V_7} \cdot A_7 - \frac{CL_{SN-38G}}{V_6} \cdot A_6 \quad \text{Ecuación 6}$$

**Figura 1.** Esquema del modelo farmacocinético de irinotecán, SN-38 y SN-38G.



$$\frac{dA_7}{dt} = \frac{Q_7}{V_6} \cdot A_6 - \frac{Q_7}{V_7} \cdot A_7 \quad \text{Ecuación 7}$$

donde  $k_0$  (mg/h) es la velocidad de perfusión de orden cero,  $T$  es la duración de la perfusión intravenosa, y  $A_1$ ,  $A_2$  y  $A_3$  son las cantidades de irinotecán en el compartimento central, periférico liviano y periférico profundo, respectivamente.  $A_4$  y  $A_5$  son las cantidades de SN-38 en el compartimento central y en periférico. A su vez,  $A_6$  y  $A_7$  son las cantidades de SN-38G en el compartimento central y en periférico.

Se asumió que la variabilidad interindividual en los parámetros farmacocinéticos seguía una distribución log-normal según la ecuación:

$$P_j = P^* \cdot e^{\eta_{pj}} \quad \text{Ecuación 8}$$

donde  $P_j$  es el parámetro individual del modelo para el paciente  $j$ -ésimo,  $P^*$  es el valor típico poblacional del parámetro del modelo,  $\eta_{pj}$  es una variable aleatoria independiente que sigue una distribución normal de media cero y varianza  $\omega_p^2$ , y cuantifica la diferencia entre el valor típico poblacional y el valor individual. Las magnitudes de las variabilidades interindividuales se expresaron, aproximadamente, como CV. Por otra parte, la variabilidad residual se evaluó con un modelo de error aditivo después de la transformación logarítmica de la concentración plasmática de irinotecán, SN-38 o SN-38G de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\ln C_{obs} = \ln C_{pred} + \varepsilon \quad \text{Ecuación 9}$$

donde  $C_{obs}$  es la concentración plasmática observada de irinotecán, SN-38 o SN-38G,  $C_{pred}$  es la correspondiente predicción del modelo y  $\varepsilon$  es una variable aleatoria independiente, con distribución normal de media cero y varianza  $\sigma^2$ , distinta para irinotecán, SN-38 y SN-38G, y que describe la diferencia entre el logaritmo de la concentración plasmática observada y el logaritmo de la predicción del modelo, es decir, el valor residual. Además, dada la presencia de concentraciones de irinotecán, SN-38 y SN-38G por debajo del LC, el modelo farmacoestadístico se adaptó para el análisis según el método M3, que considera las concentraciones plasmáticas por debajo del LC como datos censurados y maximiza la probabilidad de tener concentraciones plasmáticas por debajo del LC en función de los parámetros del modelo<sup>29</sup>.

**Criterios de selección de modelos.** Durante el análisis de los datos, se evaluaron distintos modelos farmacocinéticos compartimentales con el fin de identificar el mejor modelo capaz de describir la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de irinotecán, SN-38 y SN-38G. Se seleccionó el modelo farmacocinético que tenía convergencia satisfactoria, adecuada precisión y

plausibilidad fisiológica de los parámetros farmacocinéticos estimados. Las comparaciones entre modelos anidados, incluido el análisis de covariables descrito posteriormente, se efectuaron mediante la prueba de razón de verosimilitud (LRT, acrónimo del inglés Likelihood Ratio Test). Esta prueba está basada en el cambio de la función mínimo objetivo ( $\Delta FMO$ ) generada por NONMEM entre los modelos anidados, y es un estadístico que sigue una distribución asintótica, aproximadamente similar a una distribución  $\chi^2$  con  $n$  grados de libertad, donde  $n$  es la diferencia en el número de parámetros entre los dos modelos anidados. Se requirió un  $\Delta FMO$  de 3,84 puntos para considerar estadísticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) la inclusión (o exclusión) de un efecto fijo adicional. Además se evaluó la regresión a la media (en inglés, shrinkage), las correlaciones de los efectos aleatorios interindividuales<sup>30</sup>, y los correspondientes gráficos de bondad de ajuste.

**Análisis de covariables.** Las covariables incluidas en el análisis fueron la edad, el sexo, superficie corporal, la bilirrubina total, la medicación concomitante, el tipo de tumor primario y el polimorfismo genético en *UGT1A1*, *UGT1A7* y *UGT1A9*. Para cada una de las tres isoformas del enzima UGT, el análisis de los genotipos se realizó bajo dos categorizaciones distintas: por una parte, se consideró a los pacientes heterocigotos y homocigotos con alelos asociados con actividad enzimática reducida en categorías independientes respecto a los pacientes homocigotos con genotipo salvaje, y por otra, se analizó a los pacientes heterocigotos y homocigotos con alelos asociados con actividad enzimática reducida en una categoría conjunta, respecto a los pacientes homocigotos con genotipo salvaje.

El análisis de las covariables se realizó en dos etapas. En primer lugar, se realizó un análisis exploratorio gráfico donde se representaron los valores individuales de los parámetros farmacocinéticos obtenidos frente a los valores de las distintas covariables evaluadas. Además, se realizó un análisis de regresión lineal entre cada parámetro farmacocinético y cada una de las covariables evaluadas, se calculó su coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y su valor  $p$ . Las variables cuya correlación fue superior a 0,15 y el valor  $p$  inferior a 0,05 se consideraron para un posterior análisis en el contexto del modelo de efectos mixtos. Estas variables, se analizaron en NONMEM mediante la metodología de inclusión y exclusión secuencial, de forma que se incorporaron una a una en el modelo farmacoestadístico hasta obtener el modelo completo, en el cual la inclusión de cualquier covariable adicional ya no mejoraba la FMO ( $\chi^2$ : 7,88, grados de libertad (g.l.): 1,  $p < 0,005$ ). A partir del modelo completo, se evaluó la significación estadística de la exclusión secuencial de las covariables. Así, si la exclusión de la covariable provocaba un  $\Delta FMO$  menor a 10,83 (g.l.: 1,  $p < 0,001$ ), dicha covariable era excluida del modelo completo<sup>31</sup>. Este proceso secuencial estricto permitió conservar únicamente las co-

variables que presentaban una contribución significativa y clínicamente relevante en la estimación final de los parámetros de efecto fijo evaluados.

**Validación del modelo final.** La validación interna del modelo se realizó mediante dos técnicas diferentes y complementarias como son el *normalized visual predictive check* (NVPC) y el *normalized predictive distribution error* (NPDE)<sup>32</sup>. El NVPC comparó las concentraciones plasmáticas de irinotecán, SN-38 y SN-38G normalizadas con la media y el intervalo de predicción (IP) del 90% de las concentraciones plasmáticas de irinotecán, SN-38 y SN-38G normalizadas obtenidas a partir de los parámetros de efecto fijo y aleatorio estimados por el modelo final. La normalización se realizó por la dosis de irinotecán dada la linealidad del sistema. Se evaluó si la distribución de NPDE seguía una distribución normal estandarizada de media 0 y variancia 1, característica necesaria pero no suficiente para validar modelos no lineales de efectos mixtos<sup>32</sup>.

**Efecto del polimorfismo genético en *UGT1A1*, *UGT1A7* y *UGT1A9* en el ratio de glucuronidación (RG) y el índice biliar (IB).** El área bajo la curva de concentración plasmática frente tiempo (AUC) de cada paciente fue obtenida a partir de la integración numérica de las concentraciones plasmáticas de irinotecán, SN-38 y SN-38G desde tiempo 0 hasta tiempo 100 horas. A partir de estos valores, se obtuvo el RG y el IB mediante las siguientes ecuaciones<sup>33</sup>:

|                                                   |             |
|---------------------------------------------------|-------------|
| $RG_i = \frac{[AUC_{SN-38G}]_i}{[AUC_{SN-38}]_i}$ | Ecuación 10 |
| $IB_i = \frac{[AUC_{CPT-11}]_i}{RG_i}$            | Ecuación 11 |

Tanto el  $AUC_{SN-38G}$  como el RG y el IB se compararon entre los distintos genotipos con la prueba estadística no paramétrica U de Mann-Whitney.

## RESULTADOS

El modelo farmacocinético poblacional se desarrolló con un total de 1512 concentraciones plasmáticas (531 de irinotecán, 458 de SN-38 y 523 de SN-38G). El 1,69%, 7,64% y 0,76% de las concentraciones plasmáticas disponibles para irinotecán, SN-38 y SN-38G, respectivamente, se encontraron por debajo del LC de la técnica analítica y así se consideraron en la modelización farmacocinética con el método M3.

Los parámetros farmacocinéticos poblacionales del modelo, junto con sus variabilidades interindividuales y residuales se presentan en la tabla 2. Los parámetros de efecto fijo se estimaron con una moderada precisión (CV <45%) excepto  $V_4$  y  $V_6$ . La variabilidad interindividual

**Tabla 2.** Parámetros farmacocinéticos poblacionales de irinotecán, SN-38 y SN-38G

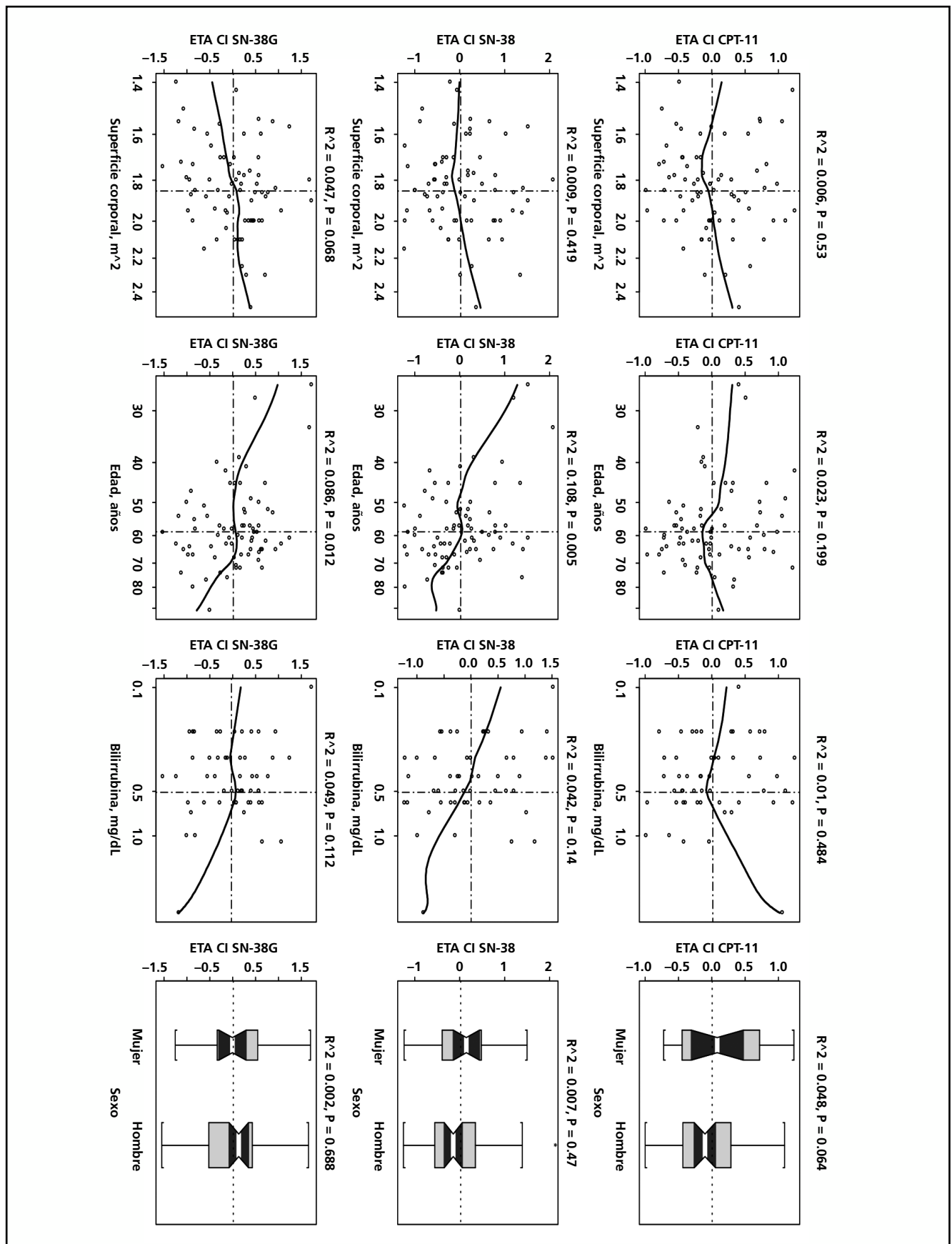
| Parámetros          | Estimación (EER%) | Variabilidad Interindividual (EER%) |
|---------------------|-------------------|-------------------------------------|
| <b>Irinotecán</b>   |                   |                                     |
| $Cl_{CPT-11}$ (L/h) | 42,9 (17,1)       | 56,4 (56,6)                         |
| $Q_2$ (L/h)         | 87,6 (25,6)       | 66,9 (64,4)                         |
| $Q_3$ (L/h)         | 10,5 (41,4)       | 58,7 (91,9)                         |
| $V_1$ (L)           | 99,7 (16,5)       | 55,2 (58,7)                         |
| $V_2$ (L)           | 132 (44,2)        | 93,3 (84,4)                         |
| $V_3$ (L)           | 194 (14,4)        | –                                   |
| <b>SN-38</b>        |                   |                                     |
| $Cl_{SN-38}$ (L/h)  | 1340 (33,2)       | 76,8 (35,9)                         |
| $Q_6$ (L/h)         | 621 (8,45)        | –                                   |
| $V_4$ (L)           | 72,4 (94,1)       | 55,9 (304)                          |
| $V_5$ (L)           | 9630 (20,1)       | –                                   |
| <b>SN-38G</b>       |                   |                                     |
| $Cl_{SN-38G}$ (L/h) | 188 (25,6)        | 70,1 (45,5)                         |
| $Q_7$ (L/h)         | 138 (26,6)        | –                                   |
| $V_6$ (L)           | 46,3 (69,5)       | 155 (176)                           |
| $V_7$ (L)           | 313 (25,5)        | –                                   |

EER: error estándar de estimación.

Los valores de variabilidad residual (expresados como CV%) para irinotecán, SN-38 y SN-38G son: 28.1, 28.8 y 30.5, respectivamente.

fue superior al 50% en todos los parámetros del modelo y los valores de regresión a la media fueron siempre menores de 0,3. La incorporación en el modelo de las correlaciones entre los parámetros  $Cl_{CPT-11}$ ,  $V_1$ ,  $V_2$ ,  $V_4$ ,  $Cl_{SN-38}$ ,  $Cl_{SN-38G}$  y  $V_6$  disminuyó la FMO en 195,8 puntos. La mayor correlación se determinó entre  $Cl_{CPT-11}$  y  $V_2$  ( $r^2=0,81$ ) mientras que el resto de correlaciones fueron moderadas y su  $r^2$  estuvo comprendido entre 0,54 y 0,71. Simplificaciones del modelo que comprendieron la utilización del modelo bicompartimental en lugar del tricompartmental para irinotecán ( $\Delta FMO = 18,6$ , g.l. = 2,  $p < 0,0001$ ) ó del modelo monocompartimental en lugar del bicompartmental para SN-38 ( $\Delta FMO = 80,2$ , g.l. = 2,  $p < 0,0001$ ) y SN-38G ( $\Delta FMO = 219,9$ , g.l. = 2,  $p < 0,0001$ ) empeoraron significativamente la bondad del ajuste de los datos obtenida respecto al modelo propuesto.

El análisis formal de covariables evidenció que el sexo, la superficie corporal y la bilirrubina total no afectaron de forma estadísticamente significativa a ninguno de los parámetros farmacocinéticos del modelo (figura 2). La heterogeneidad en la quimioterapia concomitante y el tipo de tumor primario tampoco se asoció con los parámetros farmacocinéticos de irinotecán, SN-38 o SN-38G (datos no mostrados). La edad evidenció una posible correlación con el  $Cl_{SN-38}$  y el  $Cl_{SN-38G}$ . Dada la correlación entre estos dos parámetros del modelo, el análisis combinado del efecto de la edad sobre  $Cl_{SN-38}$  y el  $Cl_{SN-38G}$  en NONMEM indicó que su influencia en el aclaramiento de los metabolitos no era estadísticamente significativa ( $\Delta FMO =$



**Figura 2.** Efecto de la superficie corporal, la edad, la bilirrubina y el sexo sobre el aclaramiento de irinotecán, SN-38 y SN-38G.

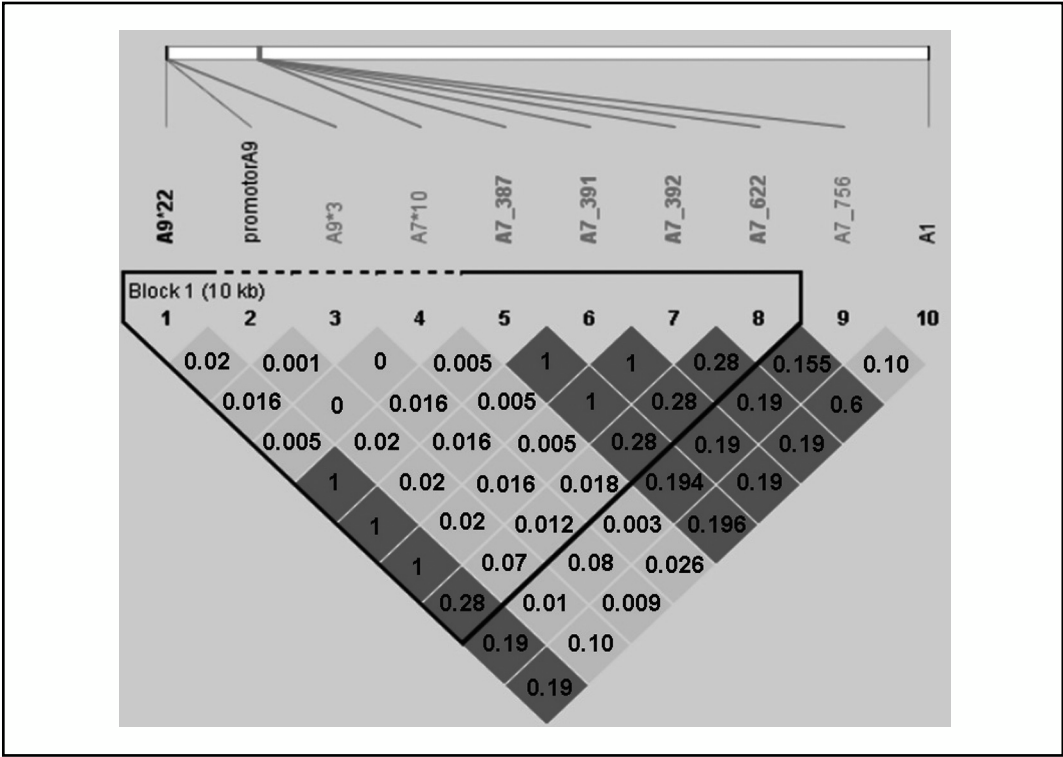
5,44, g.l. = 2,  $p = 0,07$ ), aunque existía cierta tendencia de forma que conforme aumentaba la edad, los aclaramientos de ambos metabolitos se reducían.

En la muestra analizada no se encontró en ningún paciente los polimorfismos genéticos 342G>A (G115S), ni 417G>C (E139D), y por tanto, estos polimorfismos genéticos no se incluyeron en el estudio de haplotipos. Ninguno de los polimorfismos genéticos analizados se desvió significativamente del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,50$ ). El análisis del DL se presenta en figura 3, donde la línea blanca horizontal de la parte superior de la figura representa la ubicación espacial de los polimorfismos genéticos *UGT1A9*, *UGT1A7* y *UGT1A1* de izquierda a derecha, y las líneas que aparecen debajo son simplemente un indicador hacia las ubicaciones de las distintas variantes desde la posición que cada polimorfismo detectado en la población de estudio ocupa en el gráfico. Entre los pares de variantes genéticas evaluadas, el parámetro  $D$  fue 1 en todos los casos, y el valor de  $r^2$  se muestra en la figura 3, donde los cuadrados sombreados en oscuro indican que existe fuerte dependencia en la transmisión de los polimorfismos ( $LOD \geq 2$ ) mientras que los cuadrados sombreados en claro indican una dependencia más débil ( $LOD < 2$ ). También fue posible definir la presencia de un bloque haplotípico que corresponde a 8 de las 10 variantes genéticas evaluadas y que en la figura 3 está limitado por la línea negra continua y discontinua. La presencia de este bloque haplotípico implica que los polimorfismos no sinónimos (es decir, aquellos que producen un cambio de aminoácido) de *UGT1A7* y *UGT1A9* comprenden una región con muy escasa re-

combinación y con un fuerte DL. Estos resultados evidencian la existencia de DL significativo entre las variantes *UGT1A1* y *UGT1A7* y entre las distintas variantes de *UGT1A7* y *UGT1A9*, y explican la correlación existente entre los genotipos de las distintas isoformas. Esta colinealidad impide el análisis multivariante del efecto de los polimorfismos en *UGT1A1*, *UGT1A7* y *UGT1A9* sobre el aclaramiento de SN-38 y justifican su análisis univariante. De hecho, 79% de pacientes con la variante alélica *UGT1A7*\*3 también presentaron la variante *UGT1A1*\*28 que confiere baja actividad enzimática, mientras que el 100% de pacientes con la variante alélica *UGT1A7*\*3, presentó la variante *UGT1A9*\*22.

El análisis del efecto de los polimorfismos genéticos *UGT1A1*, *UGT1A7*, y *UGT1A9* en el aclaramiento de SN-38 indicó que la presencia de, al menos, un alelo asociado con baja actividad enzimática se asociaba con una reducción del aclaramiento de SN-38, independientemente de la isoforma analizada. Este efecto fue significativamente mayor en los individuos homocigotos con variante alélica *UGT1A1*\*28 (tabla 3). Las diferencias en las reducciones del aclaramiento de SN-38 entre individuos heterocigotos y homocigotos con alelos asociados con una actividad enzimática reducida resultó ser similar e inferior al 20% para cada una de las tres isoformas. Así, los individuos heterocigotos u homocigotos con alelos asociados con baja actividad enzimática *UGT1A1* presentaron una reducción media del aclaramiento de SN-38 del 36% (IC95%: 7% – 65%). La misma tendencia, aunque de menor magnitud, se observó con los genes *UGT1A7* y *UGT1A9*, donde no se alcanzó la significación estadística. Por ello, el mo-

**Figura 3.** Desequilibrio de ligamiento por parejas entre polimorfismos de *UGT1A* (los números expresan el valor de  $r^2$ ).



**Tabla 3.** Efecto del polimorfismo genético de UGT sobre el aclaramiento de SN-38

| Genotipo* | Porcentaje de Reducción en CL <sub>SN-38</sub> (IC 95%) |                     |    |                     |       |    |                             |       |
|-----------|---------------------------------------------------------|---------------------|----|---------------------|-------|----|-----------------------------|-------|
|           | N                                                       | Heterocigotos       | N  | Homocigotos         | P     | N  | Heterocigotos + Homocigotos | p     |
| UGT1A1    | 23                                                      | 34,4 (6,2 a 62,6)   | 4  | 40,0 (-50,0 a 29,6) | 0,006 | 27 | 35,7 (6,7 a 64,7)           | 0,003 |
| UGT1A7    | 27                                                      | 20,2 (-19,0 a 59,4) | 6  | 17,1 (-61,0 a 95,5) | 0,195 | 33 | 19,9 (-19,9 a 59,7)         | 0,095 |
| UGT1A9    | 29                                                      | 29,9 (-29,0 a 88,7) | 22 | 35,4 (-15,0 a 85,8) | 0,139 | 51 | 32,0 (-20,3 a 84,3)         | 0,142 |

\* Categoría de referencia: pacientes homocigotos nativos.

IC: intervalo de confianza"

delo final seleccionado únicamente incluyó el efecto del genotipo *UGT1A1* en el aclaramiento de SN-38.

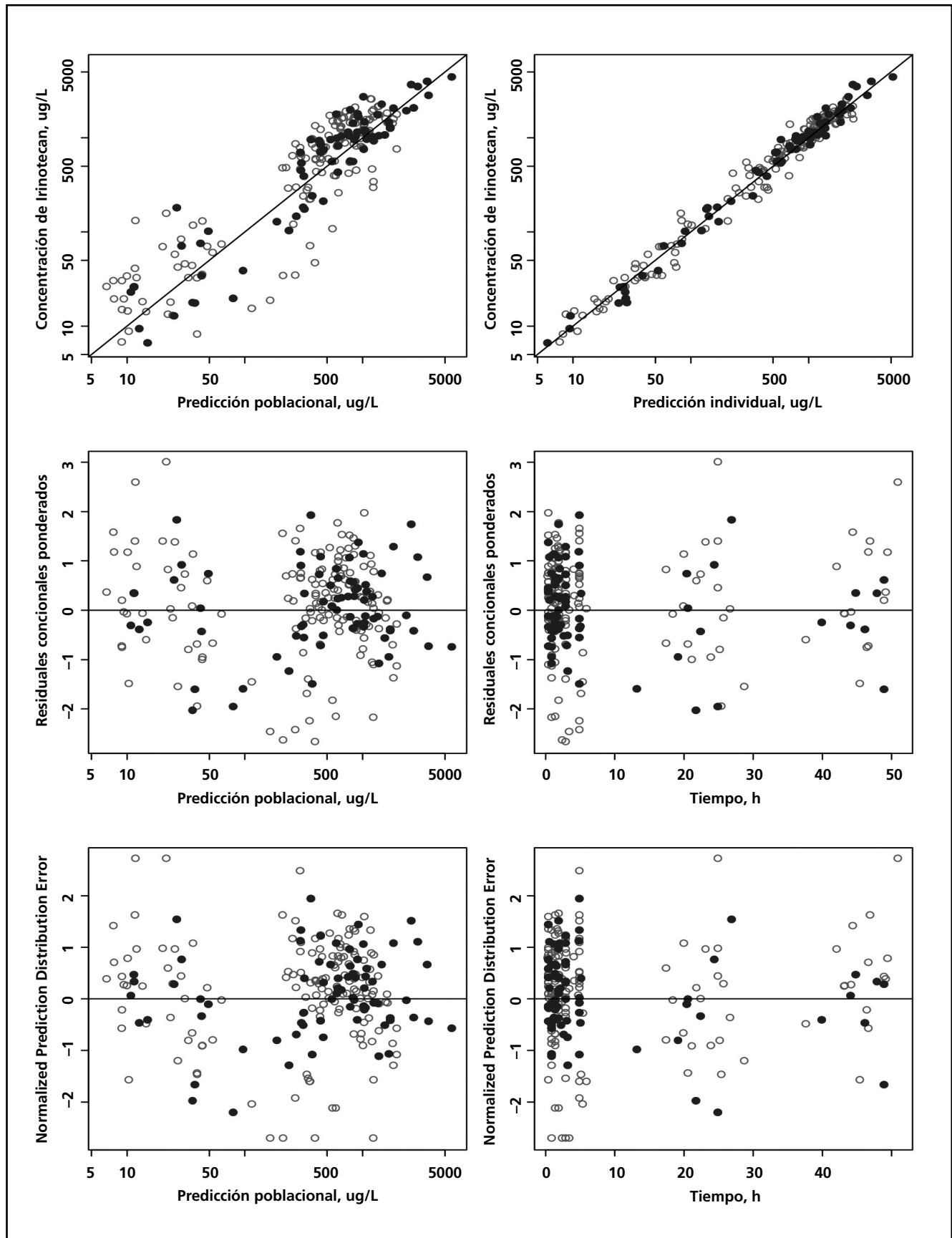
Las figuras 4a, 4b y 4c muestran los gráficos de bondad de ajuste del modelo final para irinotecán, SN-38 y SN-38G, respectivamente. Los círculos se corresponden con las concentraciones plasmáticas de los pacientes homocigoto salvaje mientras que los puntos negros representan los pacientes que presentan alelos asociados con baja actividad enzimática. En los gráficos de las concentraciones plasmáticas de irinotecán, SN-38 y SN-38G frente a su predicción poblacional e individual se observa que los datos se agrupan de manera normal alrededor de la línea identidad, circunstancia que determina la ausencia de sesgos significativos en el modelo. Tampoco se observan tendencias marcadas en la distribución a lo largo de la línea de identidad en los gráficos de residuales condicionales ponderados frente a las predicciones poblacionales y el tiempo tanto para irinotecán como para SN-38G. El sesgo aparente que se evidencia en los gráficos de los residuales condicionales ponderados de SN-38 a concentraciones plasmáticas inferiores a 5 ug/L y/o tiempos superiores a 10 h se debe a la ausencia de las concentraciones por debajo del LC en los gráficos. A estos tiempos de muestreo, el porcentaje de concentraciones de SN-38 por debajo del LC resultó ser un 48,1%, muy superior al obtenido para irinotecán (7,62%) y SN-38G (2,75%). Finalmente, los NPDE frente a la predicción poblacional y el tiempo evidenciaron que las observaciones se distribuían de forma aleatoria alrededor del valor 0, desde aproximadamente -3 hasta 3, tanto para irinotecán, como para SN-38G. La media de NPDE fue -0,028 (Intervalo de confianza (IC) 95%: de -0,078 a 0,021) mientras que el valor de la desviación estándar fue 0,975 (IC 95%: de 0,937 a 1,012) y, por tanto, no fueron estadísticamente diferentes de 0 y 1, respectivamente. En el caso de SN-38, de nuevo se evidenció el sesgo aparente debido a que a tiempos mayores de 10 h el porcentaje de observaciones por debajo del LC era elevado y no está representado en el gráfico, al contrario de lo que sucede en la figura 5, donde se presentan los resultados del NVPC de la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de irinotecán, SN-38 y SN-38G respectivamente, estratificados en individuos homocigotos salvajes (paneles de la izquierda) y en individuos que presentan

alelos asociados con baja actividad enzimática (paneles de la derecha). Las líneas continuas representan los percentiles 5, 50, y 95 de las concentraciones plasmáticas simuladas, y por tanto, el área sombreada representa el IP del 90%. Los círculos representan las observaciones por encima del LC, mientras que los triángulos representan los valores por debajo del LC. De izquierda a derecha y de arriba abajo, el 90,2; 95,5; 88,7; 88,0; 94,7 y 93,3% de las observaciones caen dentro del IP del 90%, y, en consecuencia, confirman que el modelo describe adecuadamente los datos observados tanto de irinotecán, como de SN-38 y SN-38G.

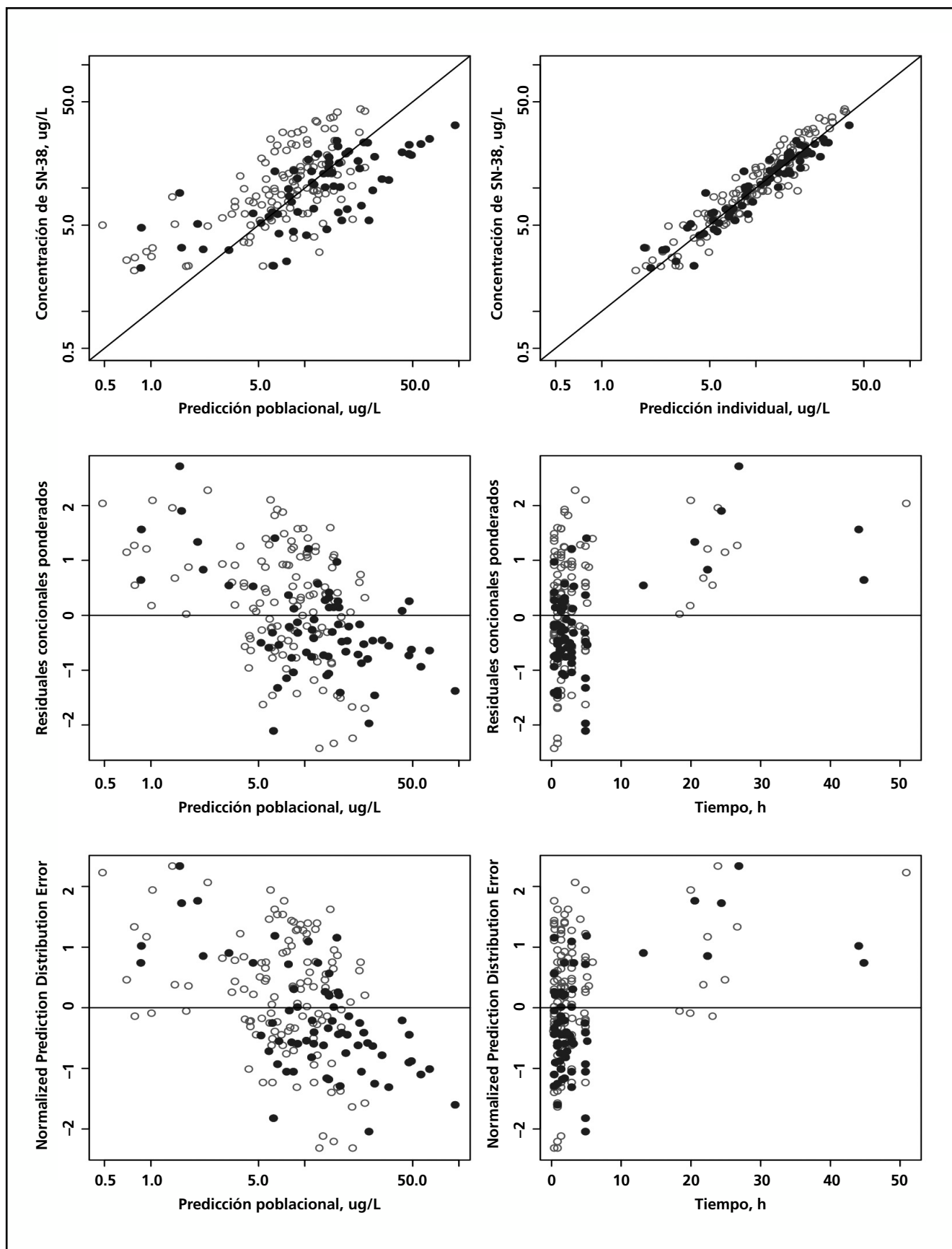
Con el modelo final se procedió a evaluar el RG y el IB estratificado por la ausencia o presencia de alelos asociados con baja actividad enzimática en *UGT1A1*, *UGT1A7* y *UGT1A9* (tabla 4). La presencia de polimorfismos genéticos en *UGT1A1*, *UGT1A7* y *UGT1A9* aumenta significativamente el  $AUC_{SN-38}$ , y es acorde a la reducción del aclaramiento de SN-38 estimada por el modelo. Además, estos cambios se tradujeron en que la reducción en el recuento absoluto de neutrófilos tras el primer ciclo de tratamiento fue un 37,9% (IC 95%: 14,3-61,5) superior en los pacientes con alelos asociados a baja actividad enzimática con respecto a los pacientes con alelos salvajes. El IB resultó ser similar para todos los pacientes homocigotos salvajes y aumentó entre un 27% y un 44% en pacientes que presentaban algún alelo (heterocigoto u homocigoto) asociado con baja actividad enzimática en cualquiera de las isoformas analizadas. Consecuentemente, estos pacientes también presentaron el menor RG, especialmente aquellos con alelos asociados con baja actividad de *UGT1A1*.

## Discusión

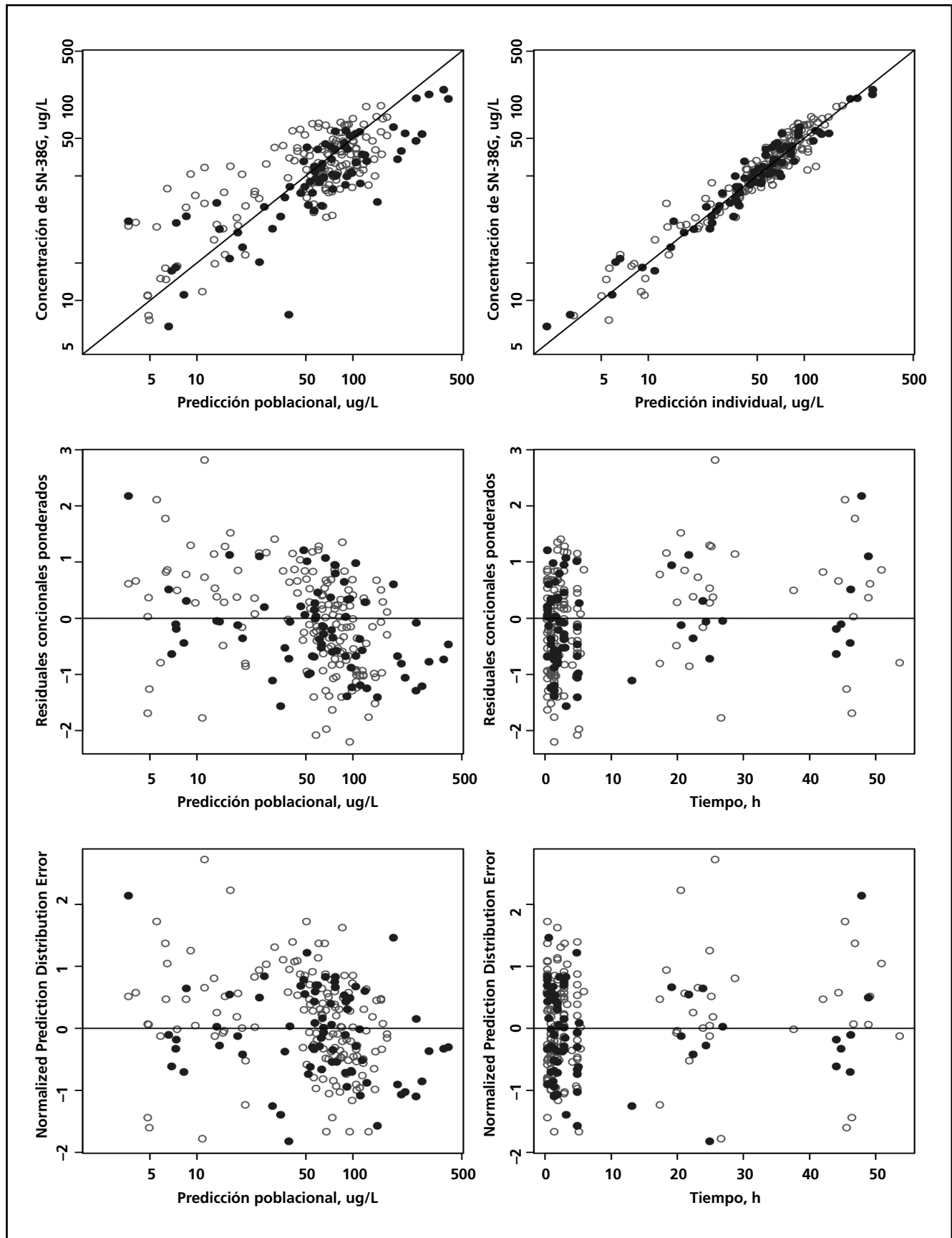
El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo farmacocinético poblacional para caracterizar conjuntamente la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de irinotecán, SN-38 y SN-38G en pacientes oncológicos y estudiar el efecto de los polimorfismo genéticos de *UGT1A1*, *UGT1A7* y *UGT1A9* en los parámetros farmacocinéticos de irinotecán y sus metabolitos. La modelización farmacocinética conjunta del fármaco y sus metabolitos se han aplicado con éxito en diversas situaciones y



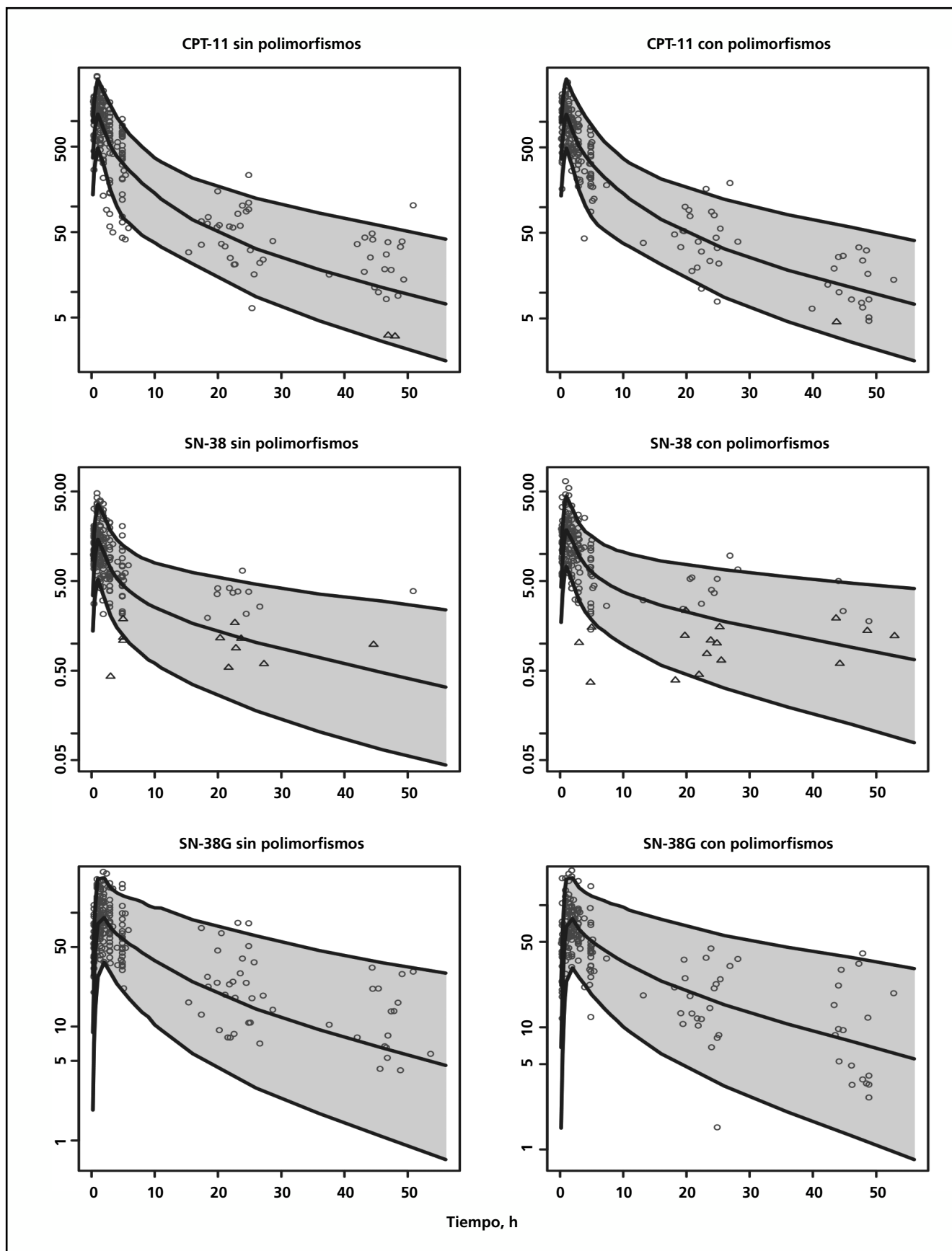
**Figura 4.** (A) Gráficos de bondad de ajuste de irinotecán. Los círculos se corresponden con las concentraciones plasmáticas de los pacientes homocigoto salvaje. Los puntos negros se corresponden con las concentraciones de los pacientes con alelos asociados con baja actividad enzimática.



**Figura 4.** (B) Gráficos de bondad de ajuste de SN-38. Los círculos se corresponden con las concentraciones plasmáticas de los pacientes homocigoto salvaje. Los puntos negros se corresponden con las concentraciones de los pacientes con alelos asociados con baja actividad enzimática.



**Figura 4.** (C) Gráficos de bondad de ajuste de SN-38G. Los círculos se corresponden con las concentraciones plasmáticas de los pacientes homocigoto salvaje. Los puntos negros se corresponden con las concentraciones de los pacientes con alelos asociados con baja actividad enzimática.



**Figura 5.** Control Predictivo Visual Normalizado (VPNC; Normalized Visual Predictive Check) de irinotecán, SN-38 y SN-38G. Los círculos representan las observaciones por encima del LC, mientras que los triángulos representan los valores por debajo del LC.

**Tabla 4.** Relación entre los diferentes genotipos de *UGT1A* y los parámetros que cuantifican la exposición sistémica a SN-38

| Genotipo                       | N  | AUC SN-38 (mg · h/L) |                              |       | Ratio de Glucuronidación |                              |        | Índice Biliar (mg · h/L) |                              |       |
|--------------------------------|----|----------------------|------------------------------|-------|--------------------------|------------------------------|--------|--------------------------|------------------------------|-------|
|                                |    | Mediana              | Diferencia Medianas (IC95%)* | p†    | Mediana                  | Diferencia Medianas (IC95%)* | p†     | Mediana                  | Diferencia Medianas (IC95%)* | p†    |
| <i>UGT1A1</i> *1/*1            | 32 | 0,159                | 0,076 (0,012-0,136)          | 0,021 | 6,960                    | 2,656 (1,297-4,495)          | <0,001 | 0,777                    | 0,471 (0,114-0,879)          | 0,016 |
| <i>UGT1A1</i> *1/*28 y *28/*28 | 27 | 0,253                |                              |       | 4,020                    |                              |        | 1,393                    |                              |       |
| <i>UGT1A7</i> *1/*1            | 27 | 0,154                | 0,073 (0,010-0,135)          | 0,023 | 6,570                    | 1,834 (0,270-3,616)          | 0,023  | 0,797                    | 0,433 (0,048-0,875)          | 0,033 |
| <i>UGT1A7</i> *1/*3 y *3/*3    | 33 | 0,247                |                              |       | 4,430                    |                              |        | 1,213                    |                              |       |
| <i>UGT1A9</i> *10/*10          | 9  | 0,118                | 0,094 (0,021-0,173)          | 0,015 | 8,070                    | 3,485 (0,687-7,593)          | 0,017  | 0,797                    | 0,306 (-0,208-0,923)         | 0,291 |
| <i>UGT1A9</i> *9/*10 y *9/*9   | 51 | 0,214                |                              |       | 4,970                    |                              |        | 1,103                    |                              |       |

\* Intervalo de confianza no paramétrico Hodges-Lehmann.

† Prueba no paramétrica U de Mann-Whitney.

permite obtener simultáneamente la información relativa a la tendencia central y variabilidad de los parámetros farmacocinéticos de cada fármaco y sus metabolitos<sup>34</sup>. Así, la farmacocinética de irinotecán se describió adecuadamente con un modelo tricompartmental lineal, mientras que la farmacocinética de sus metabolitos se describió mediante modelos bicompartimentales lineales, tal como ha sido evidenciado con anterioridad en la literatura<sup>9</sup>.

El valor típico del volumen de distribución en compartimento central de irinotecán fue de 99,7 L mientras que los volúmenes de distribución aparentes en compartimento central de SN-38 y SN-38G, fueron de 72,4 y 46,3 L, respectivamente. Los correspondientes  $V_{ss}$  fueron de 425, 9702 y 359 L. El  $V_{ss}$  para irinotecán claramente excedió el volumen de agua corporal total y refleja la elevada distribución a los tejidos periféricos. Esta misma conclusión se puede inferir para SN-38. Asumiendo que un 15% de la dosis de irinotecán se transforma a SN-38, el  $V_{ss}$  de SN-38 sería de 1455 L, mientras que para SN-38G sería 54 L si se considera que el 100% de SN-38 se transforma a SN-38G. La diferencia entre el  $V_{ss}$  y el volumen estimado en compartimento central informa sobre el alto grado de distribución no específica de SN-38, y en menor medida de SN-38G. El  $CL_{CPT-11}$ ,  $CL_{SN-38}$  y  $CL_{SN-38G}$  fue de 43, 1340 y 188 L/h, respectivamente. El valor del  $CL_{CPT-11}$  es comparable con valores previamente publicados<sup>9,15</sup> mientras que los valores del  $CL_{SN-38}$  y  $CL_{SN-38G}$  fueron superiores a los previamente publicados por otros autores, hecho que podría explicarse por la incorporación al análisis de las concentraciones plasmáticas inferiores al LC de la técnica analítica y, en menor medida, por el análisis simultáneo de los tres compuestos. Destacar que el aclaramiento de SN-38 fue aproximadamente 7 veces mayor que el aclaramiento de SN-38G, circunstancia que determina que las concentraciones de SN-38 sean sistemáticamente inferiores a las alcanzadas con SN-38G, tal y como se ha publicado en la literatura. El análisis de las covariables evidenció que la edad, el sexo, la superficie corporal, la bilirrubina total, la medicación administrada de forma

concomitante y el tipo de tumor tratado no presentaron correlación alguna con los parámetros farmacocinéticos del modelo. Estos resultados concuerdan con la ausencia de efectos clínicamente relevantes de las covariables analizadas sobre los parámetros farmacocinéticos de irinotecán, SN-38 y SN-38G previamente publicados<sup>9,15</sup>.

Cualquier estudio de polimorfismos genéticos debe evaluar la independencia de alelos en un locus entre cromosomas homólogos (equilibrio Hardy-Weinberg) y la asociación entre alelos de diferentes loci en uno de los cromosomas homólogos (desequilibrio de ligamiento). Es necesario verificar que los polimorfismos de un solo nucleótido se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg ya que desviaciones de este equilibrio indicarían la existencia de factores distintos al factor de estudio que podrían afectar las frecuencias alélicas o bien errores de genotipado. Este no ha sido el caso del estudio que se presenta por cuanto las variantes genéticas analizadas no se desviaron significativamente del equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,50$ ). Por otra parte, la presencia de DL indica que la asociación entre alelos no es aleatoria y que los polimorfismos de un solo nucleótido en un alelo condicionarán aquellos en el alelo próximo. En este sentido, el análisis del DL respecto a *UGT1A* evidenció una alta correlación entre las distintas variantes genéticas que está en consonancia con los resultados previamente publicados por Cecchin et al. en pacientes con cáncer colorrectal metastático<sup>22</sup>. Estos resultados también confirman que la correlación entre *UGT1A7* y *UGT1A9* es más fuerte entre ellos que con respecto a *UGT1A1*, probablemente debido a la mayor proximidad de estos genes. La elevada correlación existente entre los distintos polimorfismos evaluados impidió realizar un análisis multivariante de las tres isoformas de UGT sobre el  $CL_{SN-38}$ ; sin embargo, el análisis univariante estableció una reducción del 36% en el aclaramiento de SN-38 en pacientes con polimorfismo genético en *UGT1A1*\*28, tal y como ampliamente se había referenciado en la literatura científica<sup>35</sup>. Aunque los polimorfismos en *UGT1A1*\*60 y *UGT1A1*\*93 también se asocian con efectos adversos he-

matológicos que podrían ser debidos a una mayor exposición al fármaco, este estudio se ha centrado en *UGT1A1*\*28 porque es el principal marcador genético relacionado con toxicidad tras tratamiento con irinotecan. La validación interna del modelo farmacocinético seleccionado confirmó que el modelo predice adecuadamente la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de irinotecán, SN-38 y SN-38G y su variabilidad, tanto en pacientes nativos como en pacientes que presentan algún alelo asociado con baja actividad enzimática en *UGT1A1*, *UGT1A7* y *UGT1A9*. Por tanto, este modelo farmacocinético podría utilizarse de forma exacta y precisa como base de un algoritmo bayesiano para optimizar las pautas posológicas de irinotecan en pacientes oncológicos.

La reducción del aclaramiento en los pacientes con alelos asociados a baja actividad enzimática, concuerda con el aumento del  $AUC_{SN-38}$  y el IB, y la reducción de RG, tal y como previamente se refirió en la literatura<sup>17,22</sup>. En este sentido, la disminución del valor del recuento absoluto de neutrófilos en pacientes con alelos asociados a baja actividad enzimática incrementa la probabilidad de desarrollar neutropenia severa. Lamentablemente es difícil comparar el efecto neutropénico del irinotecan entre diferentes estudios dadas las diferencias en cuanto a la dosis, tiempo de perfusión, intervalo posológico, frecuencia de monitorización de los neutrófilos y tratamientos concomitantes, entre otras diferencias<sup>35</sup>. Además, aunque podría parecer que evitar el desarrollo de neutropenia grado 2 y 3 es positivo, resultados clínicos en pacientes con cáncer colorrectal metastático han demostrado que los pacientes que desarrollan neutropenia moderada o severa también presentan mayor supervivencia global<sup>36</sup>. Por tanto, obtener un equilibrio entre toxicidad asumible y beneficio clínico continua siendo un reto para los profesionales sanitarios encargados de la atención integral del paciente oncológico en tratamiento con irinotecan; no obstante, la identificación de covariables predictoras de toxicidad, como es la exposición a irinotecan y sus metabolitos, que a su vez está condicionada con la presencia de polimorfismo genéticos en *UGT1A1*, es una herramienta que podría contribuir a la mejora de la calidad asistencial que reciben estos pacientes. En este sentido, es necesario realizar más estudios que evalúen la relación coste-beneficio del genotipado de *UGT1A1* y la personalización posológica de irinotecan en pacientes oncológicos.

En conclusión, el modelo farmacocinético-farmacogenético poblacional desarrollado caracteriza simultáneamente la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas de irinotecán, SN-38 y SN-38G y su variabilidad, tanto en pacientes nativos como en pacientes que presentan algún alelo asociado con baja actividad enzimática en *UGT1A1*. El efecto del genotipo *UGT1A1* en la exposición sistémica de SN-38 justifica su determinación de forma rutinaria en pacientes subsidiarios de recibir tratamiento con irinotecán. La inclusión de información farmacocinética-farmacogenética puede añadir valor a la per-

sonalización de la dosificación de irinotecán por cuanto que permitirá manejar cuantitativamente las reducciones de dosis en pacientes con toxicidad iatrogénica debido a los polimorfismos genéticos en *UGT1A1*.

## Bibliografía

1. Creemers GJ, Lund B, Verweij J. Topoisomerase I inhibitors: topotecan and irinotecan. *Cancer Treat Rev.* 1994;20:73-96.
2. Stupp R, Hegi ME, van den Bent MJ, Mason WP, Weller M, Mirimanoff RO, et al. Changing paradigms-an update on the multidisciplinary management of malignant glioma. *Oncologist.* 2006;11:165-80.
3. Ahn BJ, Choi MK, Park YS, Lee J, Park SH, Park JO, et al. Population pharmacokinetics of CPT-11 (irinotecan) in gastric cancer patients with peritoneal seeding after its intraperitoneal administration. *Eur J Clin Pharmacol.* 2010;66:1235-45.
4. Castro Núñez I, Echarri Arrieta E, Ferriols Lisart F, García Silva A, Martínez Cutillas J, Oliveras Arenas M, et al. Medicamentos citostáticos, 1ª Edición Electrónica, 2006. ISBN: 84-689-5619-8. Disponible en: <http://www.sefh.es/libro/Wyeth/pdf/libro.pdf>
5. Sobrero A, Ackland S, Clarke S, Pérez-Carrión R, Chiara S, Gapski J, et al. Phase IV study of bevacizumab in combination with infusional fluorouracil, leucovorin and irinotecan (FOLFIRI) in first-line metastatic colorectal cancer. *Oncology.* 2009;77:113-9.
6. Modest DP, Reinacher-Schick A, Stintzing S, Giessen C, Tannapfel A, Laubender RP, et al. Cetuximab-based or bevacizumab-based first-line treatment in patients with KRAS p.G13D-mutated metastatic colorectal cancer: a pooled analysis. *Anticancer Drugs.* 2012;23: 666-73.
7. Köhne CH, Hofheinz R, Mineur L, Letocha H, Greil R, Thaler J, et al. First-line panitumumab plus irinotecan/5-fluorouracil/leucovorin treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138:65-72.
8. Ficha técnica de Irinotecán. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Disponible en: <https://sinaem4.agemed.es/consaem/especialidad.do?metodo=verFichaWordPdf&codigo=69474&formato=pdf&formulario=FICHAS>. Último acceso 20/05/2012.
9. Xie R, Mathijssen RHJ, Sparreboom A, Verweij J, Karlsson MO. Clinical pharmacokinetics of irinotecan and its metabolites in relation with diarrhea. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;72:265-75.
10. Cárdenas E, Gil I, Honorato J. Irinotecan. *Rev Med Univ Navarra.* 2002;46:49-55.
11. Klein CE, Gupta E, Reid JM, Atherton PJ, Sloan JA, Pitot HC, et al. Population pharmacokinetic model for irinotecan and two of its metabolites, SN-38 and SN-38 glucuronide. *Clin Pharmacol Ther.* 2002;72:638-47.
12. Poujol S, Pinguet F, Ychou M, Abderrahim AG, Duffour J, Bressolle FM. A limited sampling strategy to estimate the pharmacokinetic parameters of irinotecan and its active metabolite, SN-38, in patients with metastatic digestive cancer receiving the FOLFIRI regimen. *Oncol Rep.* 2007;18:1613-21.
13. Han JY, Lim HS, Shin ES, Yoo YK, Park YH, Lee JE, et al. Comprehensive analysis of UGT1A polymorphisms predictive for pharmacokinetics and treatment outcome in patients with non-small-cell lung cancer treated with irinotecan and cisplatin. *J Clin Oncol.* 2006;24:2237-44.
14. Innocenti F, Ratain MJ. Pharmacogenetics of irinotecan. Clinical perspectives on the utility of genotyping. *Pharmacogenomics.* 2006;7: 1211-21.
15. Poujol S, Bressolle F, Duffour J, Abderrahim AG, Astre C, Ychou M, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of irinotecan and its metabolites from plasma and saliva data in patients with metastatic digestive cancer receiving FOLFIRI regimen. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006;58:292-305.
16. Thompson PA, Gupta M, Rosner GL, Yu A, Barrett J, Bomgaars L, et al. Pharmacokinetics of irinotecan and its metabolites in pediatric cancer patients: a report from children's oncology group. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;62:1027-37.

17. Mathijssen RH, van Alphen RJ, Verweij J, Loos WJ, Nooter K, Stoter G, et al. Clinical pharmacokinetics and metabolism of irinotecan (CPT-11). *Clin Cancer Res*. 2001;7:2182-94.
18. Innocenti F, Vokes EE, Ratain MJ. Irinogenetics: What is the right star? *J Clin Oncol*. 2006;24:2221-4.
19. Hoskins JM, Goldberg RM, Qu P, Ibrahim JG, McLeod HL. UGT1A1\*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99:1290-5.
20. Marcuello E, Altes A, Menoyo A, Del Río E, Gómez-Pardo M, Baiget M. UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2004;91:678-82.
21. Massacesi C, Terrazzino S, Marcucci F, Rocchi Mb, Lippe P, Bisonni R, et al. Uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A1 promoter polymorphism predicts the risk of gastrointestinal toxicity and fatigue induced by irinotecan-based chemotherapy. *Cancer*. 2006; 106:1007-16.
22. Cecchin E, Innocenti F, D Andrea M, Corona G, De Mattia E, Biason P, et al. Predictive role of UGT1A1, UGT1A7, and UGT1A9 genetic variants and their haplotypes on the outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with fluoracil, leucovoril, and irinotecan. *J Clin Oncol*. 2009;27:2457-65.
23. Zufía L, Aldaz A, Giráldez J. Separation methods for camptothecin and related compounds. *J Chromatogr B*. 2001;764:141-59.
24. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). May 2001.
25. Validation of Analytical Methods: Methodology. ICH Topic Q2B. CPMP/ICH/281/95.
26. Villeneuve L, Girard H, Fortier LC, Gagne JF, Guillemette C. Novel functional polymorphisms in the UGT1A7 and UGT1A9 glucuronidating enzymes in Caucasian and African-American subjects and their impact on the metabolism of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and flavopiridol anticancer drugs. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;307: 117-28.
27. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21:263-5.
28. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science*. 2002;296:2225-9.
29. Ahn JE, Karlsson MO, Dunne A, Ludden TM. Likelihood based approaches to handling data below the quantification limit using NONMEM VI. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*. 2008;35:401-21.
30. Karlsson MO, Savic RM. Importance of shrinkage in empirical bayes estimates for diagnostics: problems and solutions. *AAPS Journal*. 2009;11:558-69.
31. Mandema JW, Verotta D, Sheiner LB. Building population pharmacokinetic-pharmacodynamic models. I. Models for covariate effects. *J Pharmacokinet Biophar*. 1992;20:511-28.
32. Brendel K, Comets E, Laffont C, Laveille C, Mentré F. Metrics for external model evaluation with an application to the population pharmacokinetics of gliclazide. *Pharm Res*. 2006;23:2036-49.
33. Gupta E, Lestingi TM, Mick R, Ramirez J, Vokes EE, Ratain MJ. Metabolic fate of irinotecan in humans: correlation of glucuronidation with diarrhea. *Cancer Res*. 1994;54:3723-5.
34. Ramón-López A, Escudero-Ortiz V, Duart-Duart MJ, Pérez-Ruixo JJ, Valenzuela B. Population pharmacokinetics of gemcitabine applied to personalize the dosage used in cancer patients. *Farm Hosp*. 2012;36:194-206.
35. Palomaki GE, Bradley LA, Douglas MP, Kolor K, Dotson WD. Can UGT1A1 genotyping reduce morbidity and mortality in patients with metastatic colorectal cancer treated with irinotecan? An evidence-based review. *Genet Med*. 2009;11:21-34.
36. Shitara K, Matsuo K, Takahari D, Yokota T, Inaba Y, Yamaura H, et al. Neutropaenia as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer patients undergoing chemotherapy with first-line FOLFOX. *Eur J Cancer*. 2009;45:1757-63.