

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

**ESTUDIO FARMACOCINETICO DE
ANALOGOS DE LA
SOMATOSTATINA**

Josep Maria Cendrós Carreras, 2006

4. DISCUSIÓN

INDICE

| | | |
|--------------|---|------------|
| 4.1 | INTRODUCCIÓN | 499 |
| 4.2 | METÓDICAS ANALÍTICAS | 499 |
| 4.3 | ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO | 503 |
| 4.3.1 | ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO NO COMPARTIMENTAL | 504 |
| 4.3.2 | ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL | 508 |
| 4.3.3 | COMPARACIÓN ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO NO COMPARTIMENTAL Y POBLACIONAL | 520 |
| 4.4 | ESCALADO ENTRE ESPECIES | 522 |
| 4.5 | REFERENCIAS..... | 530 |

TABLAS

| | | |
|-----------------|--|------------|
| Tabla 1. | Comparación de los principales parámetros farmacocinéticos medios obtenidos tras el análisis no compartimental en cada una de las especies estudiadas. | 505 |
| Tabla 2. | Valores medios del flujo sanguíneo hepático y renal junto con el agua corporal total en las distintas especies ensayadas..... | 506 |
| Tabla 3. | Comparación de los modelos estructurales básicos en cada especie estudiada. | 509 |
| Tabla 4. | Parámetros farmacocinéticos poblacionales medios predichos por el modelo final para cada especie estudiada..... | 513 |
| Tabla 5. | Comparación de los principales parámetros farmacocinéticos medios obtenidos tras el análisis no compartimental y poblacional en cada una de las especies estudiadas. | 520 |
| Tabla 6. | Comparación de los parámetros poblacionales medios predichos por el modelo estructural básico en cada una de las especies estudiadas..... | 525 |
| Tabla 7. | Parámetros farmacocinéticos poblacionales alométricos. | 527 |

4.1 INTRODUCCIÓN

El principio activo sometido a estudio en la presente Memoria es la lanreótida. La lanreótida es un análogo sintético de la somatostatina compuesto por ocho aminoácidos, el cual, se une preferentemente a los receptores pituitarios de la somatostatina para inhibir la secreción de la hormona del crecimiento (GH). La bioestabilidad de este principio activo se ha incrementado mediante la incorporación de dos aminoácidos modificados. Los estudios llevados a cabo *in vivo* ponen de manifiesto que este fármaco presenta una potencia superior a la somatostatina natural, probablemente debido a una mayor bioestabilidad, que se expresa con una semivida biológica de unas dos horas en el hombre. Este valor de semivida es notablemente superior a la de la somatostatina natural que es de aproximadamente unos dos minutos. La lanreótida presenta un efecto inhibitor sobre la secreción de la hormona del crecimiento (GH) y en consecuencia reduce también los niveles de la IGF-I. Las principales indicaciones clínicas de la lanreótida son el tratamiento de la acromegalia, tratamiento de los tumores neuroendocrinos gastrointestinales y en la mejora de los síntomas asociados con el síndrome carcinoide.

En la presente Memoria se han realizado diferentes estudios farmacocinéticos tras la administración intravenosa y extravasal de la lanreótida en distintas especies animales (rata, perro, cerdo y hombre) que han permitido caracterizar la farmacocinética poblacional de la lanreótida en dichas especies. Posteriormente, se ha evaluado la aplicación del escalado entre especies en la predicción de los parámetros farmacocinéticos de la lanreótida en el hombre. Por este motivo, la discusión de los resultados obtenidos se ha estructurado en tres apartados:

- a) En el primero, se discuten los resultados de validación de las diferentes metodías analíticas realizadas, que han permitido cuantificar los niveles de lanreótida en las distintas matrices biológicas obtenidas para cada uno de los estudios farmacocinéticos.
- b) En el segundo, se analizan los resultados del comportamiento del principio activo en el organismo de los diferentes estudios farmacocinéticos desarrollados en cada especie por separado obtenidos mediante dos aproximaciones (análisis no compartimental y análisis poblacional), explorando los resultados desde una perspectiva comparativa entre las distintas especies ensayadas.
- c) En el tercero, se discuten los resultados obtenidos tras el estudio de escalado entre especies, realizado a partir de los datos obtenidos en las tres especies animales estudiadas (rata, perro y cerdo) y evaluando la capacidad de dicho modelo para la predicción de la farmacocinética en el hombre.

4.2 METÓDICAS ANALÍTICAS

La metodología analítica utilizada para la determinación de las concentraciones plasmáticas o séricas de la lanreótida en las muestras de trabajo para cada especie animal ensayada ha sido el radioinmunoensayo (RIA). Esta técnica se basa

principalmente en la unión de un antígeno (Ag) a un anticuerpo (Ac) específico. La unión Ag-Ac suele ser muy sensible a los cambios de la matriz que los rodea (por ejemplo: tampón, matrices biológicas provenientes de distintas especies animales, utilización o no de anticoagulantes, etc.). Este fenómeno se ha podido constatar en el caso de la lanreótida, en el que se ha demostrado que se obtienen porcentajes de unión Ag-Ac diferentes solo por el hecho de utilizar matrices biológicas distintas (soluciones tampón o matrices provenientes de distintas especies animales). Por este motivo, se optó por realizar una validación para cada tipo de matriz biológica utilizada en los diferentes estudios farmacocinéticos programados (suero de rata, suero de perro, plasma de cerdo y suero y plasma humano).

Durante la selección previa de la matriz biológica a utilizar en los estudios farmacocinéticos, se consideró la posible influencia del anticoagulante en la unión Ag-Ac (unión Ag-Ac suele ser muy sensible a la presencia de determinados anticoagulantes). En el caso de la lanreótida, se evaluó el efecto de distintos anticoagulantes sobre la determinación de la lanreótida mediante radioinmunoensayo (RIA) en el cerdo y en el hombre, ya que se disponía de información previa tanto en la rata como en el perro. Las principales conclusiones de este estudio fueron, que el anticoagulante recomendado era la heparina sódica y que el peor anticoagulante era el EDTA potásico. El efecto del EDTA sobre la unión Ag-Ac es tan acentuado, que no permite definir correctamente la curva estándar, y por tanto, se concluyó que en ningún es recomendable la determinación de la lanreótida mediante RIA si se ha obtenido la muestra con este anticoagulante. Una vez seleccionada la heparina sódica como anticoagulante de elección, se procedió a validar la determinación de lanreótida sobre el plasma de cerdo y plasma humano utilizando este anticoagulante. En el caso de la rata y el perro se optó por utilizar el suero (matriz sin anticoagulante) como matriz biológica de elección, ya que a pesar de que la obtención del suero requiere de más tiempo (aproximadamente 30 minutos para la formación del coágulo) evita las posibles interacciones con el anticoagulante.

En base a los estudios farmacocinéticos programados en cuatro especies distintas y a las pruebas previas del efecto de la matriz biológica sobre la determinación de niveles de fármaco, en el presente trabajo se han puesto a punto un total de 5 métodos analíticos, basadas todas ellas en el radioinmunoensayo (RIA), para la determinación de la lanreótida en muestras de suero de rata, perro y hombre y plasma de cerdo y hombre.

En todas las matrices ensayadas se ha realizado una validación completa [determinación del límite de cuantificación, del paralelismo (evalúa el efecto de las diluciones de las muestras), de la precisión, de la exactitud, del efecto matriz y de la estabilidad bajo diversas condiciones], con la excepción del plasma de cerdo, donde solo se dispuso de matriz biológica suficiente para realizar una validación parcial (determinación del límite de cuantificación, del paralelismo, de la precisión, de la exactitud y de la estabilidad solo a -20°C).

A pesar de que la determinación de la lanreótida se haya realizado en distintas especies animales (rata, perro, cerdo y humano), con la presencia o no de anticoagulante (plasma y suero), se han obtenido resultados muy similares en todas las validaciones realizadas. Las principales características de estas técnicas analíticas son las siguientes:

- El radioinmunoensayo (RIA) permite la determinación directa de la lanreótida sin previa extracción del péptido de la matriz biológica. A pesar de la alta sensibilidad de la metodología en la determinación de la lanreótida, esta técnica presenta una limitación que consiste en la posible interferencia provocada por la presencia en la muestra de anticuerpos producidos por el propio organismo que pueden alterar el resultado analítico. Se ha demostrado que la administración en el hombre de la lanreótida (así como de otros péptidos pequeños) durante periodos prolongados de tiempo, produce la aparición de anticuerpos (Ac) anti-péptido (en nuestro caso anticuerpos anti-lanreótida) producidos por el propio organismo en aproximadamente el 10% de los pacientes tratados. El problema analítico que plantea la existencia de estos anticuerpos radica en que si se realiza la determinación de los niveles de lanreótida mediante esta técnica de RIA por determinación directa, estos Ac generados por el paciente interferirán en el análisis, ya que esta cantidad desconocida de Ac propios se sumarán a la cantidad fija de Ac que se añade para realizar el análisis, no permitiendo obtener resultados analíticos fiables, y por tanto invalidando los resultados obtenidos por esta técnica. Para evitar el obtener resultados erróneos, previo al análisis de las muestras humanas, se realiza una prueba de detección de posibles interferencias en las muestras. Solo aquellas muestras que no presentan interferencias, son analizadas mediante esta técnica por determinación directa. Actualmente se está desarrollando una nueva técnica que, previa precipitación de las proteínas, se consigue eliminar de la matriz biológica los Ac generados por el paciente.
- Especificidad del Ac. Una de las principales limitaciones del RIA es la especificidad del anticuerpo (Ac) por el Antígeno (en nuestro caso la lanreótida). Sino se asegura que el Ac es específico para un solo antígeno (lanreótida), invalidará la determinación de la lanreótida utilizando este Ac, ya que el Ac no solo se unirá a la lanreótida sino que también se unirá a otras sustancias, obteniéndose unas determinaciones de niveles del principio activo erróneas. Para confirmar que el Ac utilizado es específico, se han realizado diversas reacciones cruzadas con diferentes productos (ver Material y Métodos). En todos los casos el resultado de estas pruebas ha sido negativo, indicando que ningún producto ensayado se une significativamente al Ac (reacción cruzada no significativa). Se ha ensayado con diferentes fragmentos del péptido para confirmar que ninguno de éstos fragmentos que pueden formarse por biotransformación en el organismo, pueda interferir en el análisis. También se ha ensayado con diferentes hormonas naturales, no solo se ha ensayado con las hormonas estructuralmente similares a la lanreótida (somatostatina 14, somatostatina 28, etc.), sino que también se ha

verificado que las hormonas que su concentración en el organismo se puede ver modificada por la acción de la lanreótida (GH, VIP, etc..), no reaccionan significativamente con el Ac.

- El límite de cuantificación determinado para todas las matrices ensayadas es de 0.078 ng/ml. Este límite de cuantificación se ha considerado adecuado ya que los niveles en todas las especies se han podido seguir aproximadamente durante 5 semividas tras la administración de un bolus iv a la dosis más alta; las extrapolaciones para el calculo del área bajo la curva son aceptables (<20%); y que las concentraciones eficaces de la lanreótida para el tratamiento de la acromegalia son un mínimo de 6 veces superiores al limite de cuantificación (intervalo de concentraciones de 0.5 a 3 ng/ml).
- La exactitud determinada en el intervalo de concentraciones ensayadas para todas las matrices biológicas está comprendida entre el $\pm 15\%$ (-12% a +7 % para concentraciones de 0.1 a 1 ng/ml) (ver Tabla 13 del capítulo Resultados).
- Los resultados de precisión para concentraciones entre 0.1 y 10 ng/ml fueron inferiores en todas las matrices biológicas al 15% (intervalo de 4.6 a 14.0% y de 1.8 a 11.3%, para la precisión intra-ensayo e inter-ensayo, respectivamente) (ver Tabla 13 del capítulo Resultados).
- No se ha detectado efecto matriz tras el estudio estadístico realizado (ANOVA) en cada una de las distintas matrices ensayadas; y ninguna de ellas presenta sustancias que interfieran la determinación de la lanreótida mediante esta técnica analítica.
- Se ha garantizado que la lanreótida en las distintas matrices biológicas es estable un mínimo 2 meses almacenados a -20°C , y tras tres ciclos de congelación y descongelación a dicha temperatura. Estos resultados permiten indicar que la lanreótida es estable durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la obtención de un resultado analítico correcto (pueden transcurrir como mínimo dos meses desde la extracción de la muestra hasta la obtención del resultado analítico), y permiten asegurar que el proceso de descongelación para realizar las posibles repeticiones no afecta al resultado analítico. También se ha comprobado que el péptido es estable tras 24 horas a temperatura ambiente ($+20^{\circ}\text{C}$), asegurando la estabilidad del péptido durante el proceso de análisis de las muestras en las condiciones normales de trabajo (ver Tablas de 9-12 del capítulo Resultados).

Los controles de calidad efectuados a lo largo de los diferentes análisis en rutina necesarios para la caracterización farmacocinética de la lanreótida, ha permitido afirmar que la exactitud y la precisión de los niveles de lanreótida determinados son adecuados para la caracterización farmacocinética del fármaco en las distintas especies ensayadas (Tabla 13 capítulo Resultados).

Estos resultados confirman que el análisis por radioinmunoensayo de las muestras de lanreótida provenientes de los diferentes estudios farmacocinéticos en las distintas especies ensayadas, se ha realizado en condiciones similares y ha permitido cuantificar con precisión y exactitud los niveles de péptido en las muestras de trabajo correspondientes a las distintas matrices biológicas ensayadas.

4.3 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

En la presente Memoria, el análisis farmacocinético de los diferentes estudios desarrollados en cada especie (rata, perro, cerdo y hombre) se ha realizado mediante la aproximación no compartimental y poblacional. Se ha analizado y comparado los resultados farmacocinéticos obtenidos mediante estas dos aproximaciones (análisis no compartimental y poblacional):

- Análisis No Compartimental: esta aproximación se basa en la aplicación de criterios estadísticos al análisis de las curvas de nivel plasmático, de modo que se obtienen parámetros representativos de las mismas sin considerar el concepto de compartimento. El análisis se ha realizado en dos etapas ("Two-Stage Method") para poder obtener los parámetros poblacionales, en una primera etapa se estiman los parámetros farmacocinéticos para cada individuo por separado, y en una segunda etapa, se estiman los parámetros poblacionales a través de los distintos individuos de la población calculando la media de cada parámetro y la varianza.
- Análisis Poblacional (Modelos No Lineales de Efectos Mixtos): análisis farmacocinético compartimental que se realiza en una sola etapa con todos los datos de todos los individuos que conforman la población en estudio, y que permite estimar simultáneamente el valor medio poblacional de los parámetros farmacocinéticos, la variabilidad interindividual y la variabilidad residual.

Como se ha comentado anteriormente, a pesar de utilizar estas dos aproximaciones en el análisis farmacocinético, en el presente trabajo se ha hecho un especial énfasis en el análisis poblacional utilizando modelos de efectos mixtos. Los principales motivos para utilizar el análisis poblacional han sido los siguientes:

- a) Permite analizar simultáneamente los datos de todos los individuos en una sola etapa preservando su individualidad. Esta característica presenta varias ventajas sobre el análisis no compartimental y el análisis compartimental individual, ya que permite analizar simultáneamente datos muy diversos, como por ejemplo: datos intravenosos y extravasales, permite incluir todos los niveles de dosis ensayados, permite incluir en el ajustado individuos con datos escasos (perfiles farmacocinéticos poco definidos con muy pocas observaciones), etc.. Otra característica de esta aproximación, es que permite que todos los individuos de la población sean ajustados al mismo modelo farmacocinético, evitando que cada

individuo se ajuste a un modelo cinético distinto. De esta manera se evita la ambigüedad de resultados tras el análisis individual atribuible al diseño del estudio o la sensibilidad de la metódica analítica.

- b) Permite estimar la variabilidad interindividual de los parámetros farmacocinéticos y la variabilidad residual.
- c) Permite evaluar múltiples factores (demográficos, fisiopatológicos, bioquímicos, etc.) que pueden influenciar la disposición del fármaco.
- d) Si se dispone de los parámetros poblacionales medios, estos programas permiten obtener los parámetros individuales Bayesianos de nuevos individuos de la población no incluidos en el análisis, aunque solo se disponga de muy pocas observaciones (concentraciones) por individuo ($N \geq 1$).
- e) Permite realizar simulaciones a nuevas dosis y nuevos regímenes posológicos.

También hay que comentar que el análisis poblacional presenta como mayor inconveniente la complejidad de los algoritmos de cálculo que hace que se requiera bastante tiempo durante el proceso de cálculo y modelización.

El interés del presente trabajo, al margen de comprobar las ventajas prácticas que conlleva este tipo de tratamiento farmacocinético de los datos experimentales, destaca el hecho de la escasa bibliografía publicada con estudios de escalado entre especies utilizando modelos no lineales de efectos mixtos.

En los últimos años se ha observado un interés creciente en la utilización del análisis poblacional tanto en la farmacocinética como en la farmacocinética-farmacodinamia (se ha incrementado el número de publicaciones que utilizan esta metodología). El principal interés para la aplicación de esta metodología radica, no solo en la capacidad de estimación de parámetros asociados o no a covariables, sino a la proyección de dichos parámetros en diferentes escenarios mediante la utilización de las simulaciones.

4.3.1 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO NO COMPARTIMENTAL

En este apartado se comentan las principales características farmacocinéticas de la lanreótida en las cuatro especies ensayadas tras el análisis no compartimental.

El elevado número de individuos y de observaciones disponibles en cada una de las especies incluidas en esta Memoria, ha permitido caracterizar el comportamiento cinético de la lanreótida en las cuatro especies ensayadas. Indicar que el análisis no compartimental en cada especie se ha realizado por separado por otros autores, utilizando sólo los datos de tiempo concentración obtenidos tras la administración de una dosis única de lanreótida correspondientes a cada nivel de dosis o estudio. En la Tabla 1 se comparan los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos en cada una de las especies ensayadas tras el análisis no compartimental (NC).

| Parám. | | Rata | | | Perro | | | Cerdo | Hombre | | |
|-------------------|--------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | NC ₈₀ ^a | NC ₂₀₀ ^a | NC ₂₀₀₀ ^a | NC ₈₀ ^b | NC ₂₀₀ ^b | NC ₂₀₀₀ ^b | NC ₇ ^c | NC ₇ ^d | NC ₇ ^e | NC ₇ ^f |
| CL | l/h/kg | 2.23 | 1.93 | 1.54 | 1.32 | 1.48 | 0.810 | 0.628 | 0.244 | 0.332 | 0.277 |
| V _{ss} | l/kg | 0.706 | 1.06 | 1.59 | 0.62 | 0.80 | 0.890 | 0.299 | 0.172 | 0.184 | 0.146 |
| t _{1/2γ} | h | 0.98 | 3.15 | 9.68 | 2.91 | 4.91 | 21.38 | 1.60 | 1.32 | 1.05 | 0.94 |
| F1 | - | 0.67 | 0.75 | 0.48 | 0.83 | 1.03 | 0.57 | 1.03 | | 0.83 | |

NC₇: Valores obtenidos por análisis No Compartimental a la dosis 7µg/kg (hombre: bolus iv y sc; cerdo: bolus iv y im)

NC₈₀: Valores obtenidos por análisis No Compartimental a la dosis 80µg/kg (bolus iv y sc)

NC₂₀₀: Valores obtenidos por análisis No Compartimental a la dosis 200µg/kg (bolus iv y sc)

NC₂₀₀₀: Valores obtenidos por análisis No Compartimental a la dosis 2000µg/kg (bolus iv y sc)

^a: In Colom H, et al. Pharmacokinetic linearity and bioavailability study of lanreotide in rats after single iv and sc administration of 80, 200 and 2000 µg/kg. *Methods and Findings and Clinical Pharmacology*, 19 (Supl. A), 1997

^b: In Menargues A, et al. Pharmacokinetic bioavailability and linearity study of lanreotide in dogs after single iv and sc administration of 80, 200 and 2000 µg/kg. *Methods and Findings and Clinical Pharmacology*, 19 (Supl. A), 1997

^c: Informe interno Ipsen Pharma 97/PKS/002

^d: In Barbanj M, et al. Pharmacokinetics of somatostatin analog lanreotide in patients with severe chronic renal insufficiency. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 66(5):485-491, 1999

^e: In Perlik F, et al. Pharmacokinetics of somatostatin analogue lanreotide in moderate to severe hepatic insufficiency. *Methods and Findings and Clinical Pharmacology*, 20 (Sup. A), 1998

^f: In Antonijoo R, et al. Pharmacokinetics of somatostatin analogue lanreotide in elderly. *Methods and Findings and Clinical Pharmacology*, 20 (Sup. A), 1998

Tabla 1. Comparación de los principales parámetros farmacocinéticos medios obtenidos tras el análisis no compartimental en cada una de las especies estudiadas.

En esta tabla se puede observar como en el caso del cerdo y del hombre solo se ha ensayado un nivel de dosis (7 µg/kg), mientras que en la rata y el perro se han ensayado tres niveles de dosis distintos (80, 200 y 2000 µg/kg). En las especies donde se dispone de más de un nivel de dosis, se observan diferencias entre los parámetros correspondientes a los diferentes niveles de dosis, principalmente en el valor de la semivida y no de forma tan acusada en el volumen de distribución en estado estacionario. Estos resultados discrepantes, pueden ser debidos a que al administrar dosis bajas de péptido, las concentraciones de lanreótida a periodos de tiempos prolongados de toma de muestra no se pueden cuantificar, ya que se encuentran por debajo del límite de cuantificación (<loq), provocando una infravaloración de la semivida. De esta manera, se observa una disminución del valor de la semivida al disminuir la dosis administrada. Este hecho se puede explicar por que la semivida calculada al administrar los niveles bajos de dosis (80 y 200 µg/kg), no es totalmente representativa de la última fase de disposición (γ) del fármaco, tal y como sucede al administrar la dosis más alta (2000 µg/kg), sino que corresponde a una constante híbrida de disposición.

En la Tabla 2, se muestra un resumen de los valores medios de referencia del flujo sanguíneo hepático y renal junto con el agua corporal total característicos de cada una de las especies estudiadas^{1,2,3}, para el cálculo de la extracción hepática (CL=φ·E).

| Especie | Flujo Sanguíneo Hepático | Flujo Sanguíneo Renal | Agua Corporal total |
|---------|--------------------------|-----------------------|---------------------|
| | l/h/kg | l/h/kg | l/kg |
| Rata | 3.31 | 2.21 | 0.668 |
| Perro | 1.85 | 1.30 | 0.604 |
| Cerdo | 1.22 | - | 0.600 |
| Hombre | 1.24 | 1.06 | 0.600 |

Tabla 2. Valores medios del flujo sanguíneo hepático y renal junto con el agua corporal total en las distintas especies ensayadas.

A continuación se pasa a comentar especie por especie las principales características farmacocinéticas obtenidos tras el análisis no compartimental:

- **Farmacocinética en la rata:** los valores de aclaramiento obtenidos en los tres niveles de dosis ensayados (80, 200 y 2000 µg/kg) son muy similares entre si (intervalo de 1.54 a 2.23 l/h/kg), obteniendo una tasa de extracción media (E= 0.5-0.7) teniendo en cuenta el flujo sanguíneo hepático en la rata (3.31 l/h/kg) y que el coeficiente de reparto plasma sangre es 1. El valor del volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario (Vss) aumenta considerablemente al aumentar la dosis (0.71 y 1.59 l/kg, para la dosis de 80 y 2000 µg/kg, respectivamente), pero en todos los casos es un valor comprendido entre volumen total de agua corporal en la rata (0.668 l/kg) y 5 l/kg, reflejando una distribución media de la lanreótida en la rata. En el caso de la semivida de la fase de disposición terminal es donde se observa más claramente el efecto de la dosis administrada sobre el valor de dicho parámetro. Se obtienen valores muy distintos de semivida en función de la dosis administrada (0.98, 3.15 y 9.68 h, para los tres niveles creciente de dosis ensayados, respectivamente, por el motivo anteriormente comentado). La biodisponibilidad absoluta tras la administración subcutánea del péptido es incompleta en los tres niveles de dosis ensayados (intervalo de 0.48 a 0.75), y las concentraciones máximas se alcanzan entre 0.5 y 1 hora después de la administración, reflejando una rápida absorción. Tras la comparación estadística de los principales parámetros farmacocinéticos (ANOVA), se concluye que la farmacocinética de la lanreótida en la rata tiene un comportamiento lineal en el intervalo de dosis 80 a 200 µg/kg, ya que no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los parámetros farmacocinéticos (AUC/D, CL y Vss) de las dosis de 80 y 200 µg/kg, pero si (p<0.005) respecto a los parámetros de la dosis de 2000 µg/kg.

- **Farmacocinética en el perro:** los valores de aclaramiento para los niveles de dosis bajo y medio (80 y 200 µg/kg) son muy similares entre si (intervalo de 1.32 y 1.48 l/h/kg) y superiores en aproximadamente un 60 a 80% al aclaramiento obtenido a la dosis más alta (0.81 l/h/kg). En la dosis baja y intermedia se observa una tasa de extracción alta (E= 0.7-0.8), mientras que la dosis alta presenta un valor de extracción hepática medio (E= 0.4) respecto al valor del flujo sanguíneo hepático en el perro (1.85 l/h/kg), asumiendo que el fármaco no se une a las células sanguíneas. En el caso del Vss, al igual que sucede en la rata, se observa que al aumentar la dosis aumenta el valor de Vss, de esta manera se obtienen valores de 0.62 y 0.89

l/kg, para la dosis de 80 y 2000 µg/kg, respectivamente. En todos los casos el valor obtenido esta comprendido entre el volumen total de agua corporal en el perro (0.604 l/kg) y 5 l/kg, reflejando una distribución media de la lanreótida en el perro. Respecto a la semivida aparente de eliminación, se observa que al aumentar la dosis aumenta el valor de la semivida, obteniéndose valores muy distintos de semivida en función de la dosis administrada (2.91, 4.91 y 21.38 h, para los tres niveles de dosis ensayados, respectivamente). Mediante la aproximación no compartimental, se obtiene una biodisponibilidad absoluta incompleta tras la administración subcutánea, con valores muy distintos en función de la dosis administrada (0.83, 1.03 y 0.57, para los tres niveles de dosis respectivamente), pero sin que se observe una tendencia clara entre la biodisponibilidad y la dosis administrada. La lanreótida en solución se absorbe rápidamente por vía sc, alcanzando las concentraciones séricas máximas entre 0.33 a 0.67 horas tras su administración por vía subcutánea. Finalmente, al igual que en la rata, tras la comparación estadística (ANOVA) de los principales parámetros farmacocinéticos (AUC/D, CL, Vss y $t_{1/2}$), se concluye que la farmacocinética de la lanreótida en el perro tiene un comportamiento lineal en el intervalo de dosis 80 a 200 µg/kg.

- **Farmacocinética en el cerdo:** el valor del aclaramiento en el cerdo (0.63 l/h/kg) se considera medio al igual que la tasa de extracción hepática ($E= 0.5$), respecto al valor del flujo sanguíneo hepático en el cerdo (1.22 l/h/kg) considerando un coeficiente de reparto sangre plasma de 1. El valor del volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario (0.30 l/kg) es inferior al volumen total de agua corporal en el cerdo (0.60 l/kg), reflejando una distribución baja de la lanreótida en el cerdo. El valor de la semivida de aparente de eliminación es de aproximadamente 1.6 horas. Tras la administración intramuscular del péptido se obtiene una biodisponibilidad absoluta completa, reflejando una rápida absorción al alcanzar las concentraciones máximas entre 0.033 y 0.5 horas después de la administración.

- **Farmacocinética en el hombre:** los valores de aclaramientos obtenidos en los diferentes estudios han sido muy similares entre si (intervalo de 0.24 a 0.33 l/h/kg), reflejando un valor bajo de tasa de extracción hepática de aproximadamente 4 veces inferior al flujo hepático en el hombre ($E= 0.2-0.3$). La lanreótida presenta una distribución extravascular limitada, con un valor de volumen de distribución en estado estacionario que oscila entre 0.15 a 0.18 l/kg, valores inferiores al volumen total de agua corporal en el hombre (0.600 l/kg). La lanreótida en el hombre presenta un valor de semivida de la fase terminal de aproximadamente 1 hora. Respecto a los parámetros relativos a la absorción tras la administración subcutánea de una solución de péptido, la biodisponibilidad absoluta es incompleta (0.83), reflejando una rápida absorción al presentarse el C_{max} a las 0.25 horas tras la administración extravascular.

A continuación se comparan las principales características farmacocinéticas de la lanreótida con otro análogo de la somatostatina de estructura similar más ampliamente utilizado en clínica, el octreotide⁴. Al comparar los parámetros

farmacocinéticos de los dos péptidos en el hombre, se observa como el octreotide tiene un aclaramiento inferior (9.6 l/h) al de la lanreótida (intervalo de 17.1 a 23.2 l/h utilizando el peso medio de 70 kg), muestra una distribución mayor en el organismo (18-30 l) respecto a la lanreótida (intervalo de 10.2 a 12.9 l) y presenta una semivida de eliminación ligeramente superior que la lanreótida (1.5 horas y 1 hora, respectivamente). Tras la administración subcutánea del octreotide, se obtiene una biodisponibilidad absoluta aproximadamente completa a diferencia de la lanreótida, donde la biodisponibilidad es alta pero incompleta (0.8). La absorción del octreotide es un poco más lenta que la lanreótida ya que los valores de C_{max} se alcanzan un poco más tarde que la lanreótida (T_{max} de 0.5 horas y 0.25 horas, respectivamente). En resumen, se puede afirmar que los dos análogos de la somatostatina poseen características farmacocinéticas similares.

4.3.2 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO POBLACIONAL

El segundo método utilizado para describir el comportamiento farmacocinético de la lanreótida en las diferentes especies estudiadas es la aproximación poblacional mediante la utilización del programa de efectos mixtos NONMEM.

Una de las principales peculiaridades de la modelización farmacocinética mediante la aproximación poblacional es que se realiza el análisis simultáneo de todos los datos en distintas etapas. Así de una manera secuencial se pasa de un modelo simple hasta el modelo más complejo que permiten describir los datos. Durante el proceso de modelización se utilizan análisis gráficos y estadísticos que permiten decidir como modificar el modelo en el siguiente paso. La secuencia típica de desarrollo de un modelo es la siguiente:

- a) En una primera etapa se exploran los datos disponibles, seguidamente se selecciona el modelo estructural básico, que corresponde al modelo que mejor explica los datos sin la inclusión de covariables.
- b) En una segunda fase se explora y evalúa la inclusión de covariables en el modelo.
- c) Finalizada la inclusión las covariables significativas en el modelo, se obtiene el modelo final. Una vez se dispone de este modelo final, se evalúa mediante simulaciones y análisis complementarios la robustez y la consistencia de dicho modelo, permitiendo concluir si el modelo final seleccionado es coherente con los datos observados. Posteriormente, se evalúa la proyección y aplicación del modelo desarrollado mediante simulaciones.

Al disponer en todas las especies de un número considerable de individuos y observaciones permite asegurar una buena caracterización del perfil farmacocinético del péptido en cada especie estudiada. En el capítulo de resultados, se ha comentado y justificado la elección del modelo estructural básico y el modelo final obtenido para cada especie estudiada tras el tratamiento farmacocinético poblacional de los datos experimentales. Por este motivo, la discusión de esta sección del presente trabajo, está basada, por una parte, en el estudio comparativo

de los modelos poblacionales obtenidos (estructural básico y final) para cada especie animal y, por otra, en los valores de los parámetros farmacocinéticos poblacionales de la lanreótida estimados para cada especie animal sometida a estudio.

En la Tabla 3 se comparan las principales características de los diferentes modelos estructurales básicos (sin inclusión de covariables) estimados para cada especie estudiada: valores de los parámetros farmacocinéticos (modelo de tres compartimentos), grado de variabilidad interindividual asociado a diferentes parámetros y el grado de variabilidad residual.

| Parámetro | Unidades | Rata | Perro | Cerdo | Hombre |
|--------------------|-----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| CL | l/h | 0.393 {1.323} | 9.9 {0.792} | 39.9 {0.513} | 18.8 {0.279} |
| V2 | l | 0.0545 {0.184} | 2.87 {0.230} | 4.35 {0.056} | 3.59 {0.053} |
| Q3 | l/h | 0.43 {1.448} | 1.56 {0.125} | 10.7 {0.138} | 12.2 {0.181} |
| V3 | l | 0.146 {0.492} | 2.68 {0.214} | 4.51 {0.058} | 4.65 {0.069} |
| Q4 | l/h | 0.0311 {0.105} | 0.334 {0.027} | 6.58 {0.085} | 2.58 {0.038} |
| V4 | l | 0.478 {1.609} | 10.5 {0.840} | 53.6 {0.689} | 42.6 {0.632} |
| KA | h ⁻¹ | 0.594 | 0.986 | 3.8 | 0.724 |
| F1 | - | 0.5 | 0.748 | 1 | 0.743 |
| ALAG1 | h | - | - | - | 0.0269 |
| Vss | l | 0.679 {2.285} | 16.05 {1.284} | 62.46 {0.803} | 50.84 {0.755} |
| ----- | | | | | |
| ω _{CL} | % | 32 | 21 | 13 | 21 |
| ω _{V2} | % | - | 32 | - | 65 |
| ω _{V3} | % | - | 68 | - | - |
| ω _{Q4} | % | - | 52 | 29 | - |
| ω _{KA} | % | 59 | 38 | 51 | 19 |
| ω _{ALAG1} | % | - | - | - | 14 |
| ----- | | | | | |
| σ _{Ad} | % | - | 0.02 | - | - |
| σ _{Prop} | % | 46 | 40 | 30 | 23 |

Los valores entre corchetes corresponden al valor del parámetro normalizado por el peso corporal (0.297, 12.498, 77.787 y 67.364 kg, para la rata, perro, cerdo y hombre, respectivamente).

CL, Q3 y Q4: acalaramiento total, intercompartimental poco profundo y profundo

V2, V3, V4 y Vss: volumen de distribución del compartimento central, del compartimento periférico poco profundo, del compartimento periférico profundo y en estado de equilibrio estacionario

KA, F1 y ALAG1: constante de absorción, biodisponibilidad y periodo de latencia

ω, σ_{Ad} y σ_{Prop}: variabilidad interindividual, residual correspondiente al modelo aditivo y proporcional, respectivamente

Tabla 3. Comparación de los modelos estructurales básicos en cada especie estudiada.

De acuerdo con lo expuesto en la Tabla 3, se pasa a comentar las principales características farmacocinéticas de la lanreótida a nivel comparativo entre especies tras el análisis farmacocinético poblacional.

Para todas las especies estudiadas, el modelo farmacocinético que mejor describe las concentraciones de lanreótida tras la administración por distintas vías de dicho principio activo (bolus iv, infusión iv, sc y im), es el modelo de tres compartimentos con absorción y eliminación de primer orden (para más detalles ver el capítulo 2 de Material y Métodos). En todas las especies ensayadas se ha podido justificar estadísticamente que el modelo de tres compartimentos es significativamente mejor ($p < 0.005$) que el modelo de dos compartimentos, indicando que el comportamiento cinético de la lanreótida es similar en las cuatro especies ensayadas.

El valor de los parámetros farmacocinéticos poblacionales en cada especie son, en general, bastante similares a los obtenidos mediante el análisis no compartimental.

Las similitudes y diferencias entre ambas aproximaciones se comentan más detalladamente en la próxima sección.

En las dos especies animales en las que se ha ensayado más de un nivel de dosis, la rata y el perro, el análisis poblacional ha permitido concluir que el comportamiento farmacocinético de la lanreótida es lineal (CL y V_{ss}) en todo el intervalo de dosis ensayado, observando ciertas desviaciones que se pasan a comentar a continuación.

En el caso de la rata, se observa que tras la administración subcutánea de la lanreótida a la dosis más alta ensayada (2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$), los niveles de fármaco observados durante todo el perfil cinético son superiores a los niveles predichos por el modelo, mostrando cierto grado de no linealidad a esta dosis por esta vía. La no linealidad se observa solo tras la administración subcutánea, ya que tras la administración mediante un bolus intravenoso a la dosis de 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ si que se obtiene una buena predicción por parte del modelo, permitiendo afirmar que la no linealidad se produce durante el proceso de absorción a dosis elevadas (Figura 40 de Resultados).

En el caso del perro, también se ha apreciado cierto grado de no linealidad, pero en este caso, la tendencia a la no linealidad se observa en los valores de concentración muy altos (>5000 ng/ml) obtenidos tras la administración de un bolus intravenoso a la dosis de 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A estas concentraciones el modelo infravalora los niveles observados de péptido, demostrándose linealidad solo hasta concentraciones de 5000 ng/ml. Se han probado distintos modelos para poder explicar este sesgo (eliminación no lineal, combinación de eliminación lineal más eliminación no lineal y modelo de 4 compartimentos), pero en ninguno de estos modelos se obtuvo una mejora en el ajustado de los valores de concentración altos. El hecho de disponer de pocas observaciones a niveles altos de concentración ($n=13$) respecto al total de 1217 observaciones utilizadas en el ajustado, dificulta la correcta modelización. Por este motivo, se optó por seleccionar el modelo lineal de tres compartimentos con eliminación de primer orden, asumiendo el sesgo a concentraciones elevadas.

Respecto a la distribución de la lanreótida, hay que destacar que el volumen de distribución del compartimento profundo (V_4) representa, en todas las especies animales y el hombre, aproximadamente el 75% (intervalo del 65% al 86%) del valor del volumen de distribución en estado estacionario (V_{ss}), sugiriendo que el fármaco es capaz de distribuirse en los tejidos.

Respecto a las variabilidades interindividuales (ω) estimadas, tal y como se muestra en la Tabla 3, no se ha podido estimar en todos los parámetros farmacocinéticos. Esto no quiere decir que en los parámetros donde no se ha podido determinar la variabilidad interindividual, no existe dicha variabilidad, sino que los datos analizados no aportan la suficiente información para poder explicar la variabilidad en dichos parámetros. Esta tabla permite observar que en todas las especies estudiadas no se ha podido determinar la variabilidad interindividual en los mismos parámetros, con la excepción del aclaramiento y de la constante de absorción. Estas discrepancias

encontradas a nivel de la determinación de más o menos parámetros de variabilidad interindividual entre las especies estudiadas, está condicionada no sólo por la disposición característica de la lanreótida en cada especie, sino también por la cantidad y calidad de los datos disponibles en cada especie. No es de extrañar que en la especie en la que se dispone de más datos a diferentes dosis y vías, el perro, es en la especie donde se han podido determinar más parámetros de variabilidad interindividual. Remarca que la inclusión de las variabilidades interindividuales en los diferentes parámetros farmacocinéticos en el modelo se ha basado en el criterio estadístico de la disminución de la función objetiva en más de 7.88 puntos (distribución χ^2), permitiendo así incluir en el modelo solo las variabilidades estadísticamente significativas ($p < 0.005$).

En todas las especies se ha podido determinar variabilidad interindividual en el aclaramiento del compartimento central (ω_{CL}). La estimación de este parámetro aleatorio en todas las especies está principalmente influenciada por 2 factores: primero, a que las observaciones utilizadas durante la modelización farmacocinética (concentración sérica o plasmática) provienen del compartimento central, y en segundo lugar, a que se dispone de muchas observaciones para cada individuo durante todo el proceso de eliminación. Estos dos factores han permitido determinar con mucha precisión dicho parámetro. Asumiendo que un fármaco se considera variable al obtener un grado de incertidumbre superior al 35% en el aclaramiento, la lanreótida se puede considerar un fármaco con variabilidad baja, ya que la incertidumbre en el CL para todas las especies está comprendido en el intervalo de valores del 13 al 32 %.

En un principio sería lógico esperar que, al igual que en el aclaramiento (CL), se pudiera encontrar variabilidad interindividual en el volumen del compartimento central (ω_{V2}) en todas las especies, sin embargo solo se ha podido determinar en el perro y en el hombre (ver Tabla 3). Una posible explicación es que la estimación del volumen de distribución del compartimento central (V2) se realiza principalmente con la información que se recoge en las muestras correspondientes a periodos cortos de tiempo tras la administración intravenosa, y es justamente en el hombre y en el perro donde se dispone de más observaciones. El grado de variabilidad interindividual determinados se considera moderadamente alto (32 y 68%, para el perro y el hombre, respectivamente).

Respecto al proceso de absorción (sc o im), se ha podido estimar variabilidad interindividual en la constante de absorción (ω_{KA}) en todas las especies, posiblemente gracias a que el fármaco presenta el fenómeno de “flip-flop” tras su administración extravasal, permitiendo disponer de más datos que permiten definir el proceso de absorción. El fenómeno de “flip-flop” se presenta cuando la KA es más pequeña que la constante de eliminación (K), por consiguiente la KA es el proceso limitante y la fase terminal es representativa del proceso de absorción. También contribuye el hecho de que el proceso de absorción ya es por si mismo un proceso bastante variable. El grado de variabilidad interindividual estimado en la KA se

puede considerar moderadamente alto (intervalo de 38 a 59%) en la rata, el perro y el cerdo, y bajo en el hombre (19%).

Destacar que sólo tras la administración sc de la lanreótida en el hombre se ha podido estimar el periodo de latencia (aproximadamente 1.7 minutos), con un bajo grado de variabilidad interindividual (14 %). El disponer de muchos datos en el hombre ha facilitado que este parámetro haya podido ser estimado.

Respecto al resto de variabilidades interindividuales estimadas, sólo se ha estimado variabilidad interindividual en el volumen intercompartimental poco profundo (ω_{V3}) en el perro y en el aclaramiento intercompartimental del compartimento profundo (ω_{Q4}) en el perro y el cerdo, obteniéndose unos grados de variabilidad interindividual entre bajos a moderadamente altos (intervalo de 29 a 68%).

En las cuatro especies ensayadas se ha estimado la variabilidad residual mediante un modelo proporcional a la concentración, estimando un grado de variabilidad residual medio a moderadamente alto (intervalo de 23 a 46%). El ámbito de concentraciones de la lanreótida determinados comprende varios ordenes de magnitud, por lo que el modelo de variabilidad residual proporcional a la concentración parece el modelo más adecuado. En todas las especies se comprobó que la adición de un modelo de error aditivo en el error residual no resultaba significativo, con la excepción del perro. En esta especie, debido al elevado número de observaciones, resultó significativo la inclusión de un término aditivo en el modelo de error, obteniéndose un valor de desviación estándar de 0.034 ng/ml (2 veces inferior al límite de cuantificación). Este termino de error solo tiene relevancia cuando los valores de concentración son bajos y cercanos al límite de cuantificación (0.078 ng/ml). Se constata que en las especies donde se dispone de más datos (rata y perro) el grado de incertidumbre es superior al obtenido en las especies donde solo se ha ensayado una dosis (cerdo y hombre).

El análisis global de los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos en las distintas especies por el modelo estructural básico, permiten afirmar que la lanreótida tiene un comportamiento farmacocinético similar en todas las especies ensayadas.

La siguiente etapa durante la modelización es la determinación del modelo final. El modelo final es el modelo estructural básico en el cual se han incluido en algunos parámetros farmacocinéticos las covariables estadísticamente significativas. Estas covariables permiten explicar parte de la variabilidad interindividual encontrada en el parámetro farmacocinético, mejoran el ajustado y aportan información sobre el comportamiento del fármaco. Es posible que durante el proceso de inclusión de las covariables algunas variabilidades interindividuales encontradas significativas en el modelo estructural básico se vean modificadas o incluso no puedan ser estimadas.

Las diferentes etapas desarrolladas para la inclusión de las covariables son las siguientes: primero identificar las covariables susceptibles de ser incluidas en el modelo; después comprobar que estas covariables son capaces de mejorar el ajustado mediante la evaluación de la bondad del ajustados y la disminución de la

función objetiva (criterio estadístico); y finalmente, solo se retendrán en el modelo final las covariables que mejoran el ajustado y tengan relevancia clínica o fisiológica. La inclusión de covariables puede ser un proceso muy lento dependiendo del número de covariables y parámetros disponibles. Por este motivo, se ha utilizado una técnica que permite identificar que covariables son susceptibles de ser incluidas en el modelo denominado análisis GAM (“Generalised Additive Modelling”). Este método permite discriminar que covariables son susceptibles de tener relevancia para cada uno de los parámetros farmacocinéticos.

El número de covariables recopiladas en los diferentes estudios farmacocinéticos no fue muy extenso disponiendo para cada especie las siguientes covariables: peso, sexo y nivel de dosis.

En la Tabla 4 se muestran conjuntamente todos los valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos por los diferentes modelos finales estimados para cada especie estudiada (ver modelo final de cada especie en Resultados).

| Parámetro | Unidades | Rata | Perro | Cerdo | Hombre |
|--------------------|-----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| CL | l/h | 0.391 {1.316} | 9.9 {0.792} | 39.9 {0.513} | 18.8 {0.279} |
| V2 | l | 0.0523 {0.176} | 2.87 {0.230} | 4.35 {0.056} | 3.59 {0.053} |
| Q3 | l/h | 0.442 {1.488} | 1.56 {0.125} | 10.7 {0.138} | 12.2 {0.181} |
| V3 | l | 0.146 {0.492} | 2.68 {0.214} | 4.51 {0.058} | 4.65 {0.069} |
| Q4 | l/h | 0.0309 {0.104} | 0.334 {0.027} | 6.58 {0.085} | 2.58 {0.038} |
| V4 | l | 0.472 {1.589} | 10.5 {0.840} | 53.6 {0.689} | 42.6 {0.632} |
| KA | h ⁻¹ | 0.721 | 0.986 | 3.8 | 0.724 |
| KA ₂₀₀₀ | h ⁻¹ | 0.219 | - | - | - |
| F1 | - | 0.50 | 0.748 | 1 | 0.743 |
| ALAG1 | h | - | - | - | 0.0269 |
| Vss | l | 0.670 {2.257} | 16.05 {1.284} | 62.46 {0.803} | 50.84 {0.755} |
| ω _{CL} | % | 32 | 21 | 13 | 21 |
| ω _{V2} | % | - | 32 | - | 65 |
| ω _{V3} | % | - | 68 | - | - |
| ω _{Q4} | % | - | 52 | 29 | - |
| ω _{KA} | % | 37 | 38 | 51 | 19 |
| ω _{ALAG1} | % | - | - | - | 14 |
| σ _{Ad} | % | - | 0.02 | - | - |
| σ _{Prop} | % | 46 | 40 | 30 | 23 |
| t _{1/2γ} | h | 11 | 23 | 6.6 | 13 |

Los valores entre corchetes corresponden al valor del parámetro normalizado por el peso corporal (0.297, 12.498, 77.787 y 67.364 kg, para la rata, perro, cerdo y hombre, respectivamente).

CL, Q3 y Q4: acalaramiento total, intercompartmental poco profundo y profundo

V2, V3, V4 y Vss: volumen de distribución del compartimento central, del compartimento periférico poco profundo, del compartimento periférico profundo y en estado de equilibrio estacionario

KA, F1 y ALAG1: constante de absorción, biodisponibilidad y periodo de latencia

KA₂₀₀₀: valor de KA para la dosis=2000 µg/kg

^a: valor de KA para dosis < 2000 µg/kg

ω, σ_{Ad} y σ_{Prop}: variabilidad interindividual, residual correspondiente al modelo aditivo y proporcional, respectivamente

t_{1/2γ}: semivida aparente de eliminación

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos poblacionales medios predichos por el modelo final para cada especie estudiada.

De acuerdo con lo expuesto en la Tabla 4, se observa que solo en la rata se ha podido incluir una covariable (dosis en KA). La inclusión de una covariable en el algún parámetro farmacocinético permite explicar parte de la variabilidad interindividual encontrada en dicho parámetro. Por este motivo, la inclusión de una covariable conlleva una disminución del grado de variabilidad interindividual respecto

al modelo estructural básico. En nuestro caso, la inclusión de la dosis en la KA ha permitido disminuir el grado de variabilidad interindividual del 59% al 37% (ver Tabla 3 y 4).

A continuación se pasa a comentar la estrategia utilizada durante el proceso de inclusión de las covariables en el modelo, así como las características principales del modelo final seleccionado en cada una de las especies ensayadas:

- **Rata:** en esta especie solo se recopiló como covariable demográfica el peso corporal (intervalo de 0.222 a 0.346 kg). Al administrarse la lanreótida a diferentes niveles de dosis (80, 200 y 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$), también se incluyó como covariable la dosis (DOS), permitiendo así evaluar la linealidad. Se realizó el análisis GAM sobre todos los parámetros farmacocinéticos del modelo básico, y dicha aproximación únicamente identificó el peso y la dosis como posibles covariables predictoras en el aclaramiento (CL) y la dosis en la constante de absorción (KA). Una vez comprobado si la inclusión de dichas covariables era relevante mediante la exploración gráfica y la disminución de la función objetiva, solo se encontró como covariable significativa la inclusión de la dosis (DOS) en la constante de absorción (KA). Este hallazgo está en concordancia con las observaciones realizadas durante la exploración del modelo estructural básico, donde se percibía que el modelo tendía a infravalorar las concentraciones predichas tras la administración subcutánea de una dosis de 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de péptido. Durante esta etapa de la modelización, se ensayaron diferentes modelos para la inclusión de la covariable dosis en la constante de absorción: una KA distinta al administrar por vía subcutánea una dosis de 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$; una regresión lineal entre KA y el nivel de dosis; un modelo E_{max} inhibitorio entre KA y el nivel de dosis; y finalmente, un modelo de absorción no lineal (Michaelis-Menten). Los dos últimos modelos se descartaron al no obtenerse una mejora en la función objetiva en relación con el modelo estructural básico. Respecto a los dos primeros modelos, una KA distinta a la dosis de 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por vía subcutánea y la regresión lineal, se obtuvo una disminución estadísticamente significativa de la función objetiva similar (-28.3 y -26.8 puntos, respectivamente). Finalmente, se optó por seleccionar el modelo en el que a la dosis más alta ensayada (2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) exista una constante de absorción distinta e inferior a la constante de absorción asociada al resto de dosis ensayadas (80 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$). No se optó por seleccionar el modelo de regresión lineal, ya que este modelo permitía la predicción de la KA a niveles de dosis no ensayados (dosis más altas de 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$), y por tanto, no era posible confirmar la veracidad de dicha hipótesis. La inclusión de la covariable dosis en KA permitió disminuir la variabilidad interindividual de la KA del 59 al 37%, y permitió corregir el sesgo que tenía el modelo estructural básico de infravalorar los niveles de lanreótida tras la administración subcutánea a la dosis de 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ durante todo el perfil farmacocinético.

Una posible explicación para la obtención de una constante de absorción distinta a dosis elevadas, puede deberse a que al administrar la dosis más alta de solución de lanreótida por vía subcutánea (2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) en el mismo volumen que el resto de las

dosis, la lanreótida precipite en el punto de inyección y el fármaco quede retenido en esta matriz y se vaya liberando de una forma más lenta, provocando así una disminución de la constante de absorción. Sin embargo, este fenómeno no se ha observado al administrar por vía subcutánea la misma dosis de lanreótida en el perro, aunque el volumen administrado en el perro (5 ml) es muy superior al administrado en la rata (0.28 ml), dificultando así la precipitación del fármaco.

Con los resultados obtenidos, se concluye que las características farmacocinéticas principales del modelo final en la rata tras el análisis farmacocinético poblacional son las siguientes:

- Modelo farmacocinético de tres compartimentos abiertos con absorción y eliminación de primer orden, parametrizado en términos de aclaramientos y volúmenes de distribución.
- La variabilidad interindividual ha sido modelada en el CL y la KA utilizando un modelo proporcional, para evitar valores negativos de los parámetros.
- Sólo se ha identificado la covariable dosis (DOS) como predictora de la KA, modelando que la KA tras la administración subcutánea a la dosis más alta ensayada (2000 µg/kg) es menor que la KA tras la administración de las dosis más bajas (80 y 200 µg/kg).
- El modelo de error residual utilizado es el modelo proporcional a la concentración predicha.

Se evaluó la robustez del modelo final en diferentes etapas: estimando la precisión en todos los parámetros (en todos los casos inferior al 40 %), se exploró gráficamente la bondad de ajustado, no observándose ninguna desviación relevante, y se realizaron varias pruebas para validar el modelo. Durante la validación del modelo (ver Resultados) se determinó el error de predicción medio, obteniéndose valores inferiores al 25% en todos los parámetros, indicando que no hay sesgo en las estimas de los parámetros; se realizó una validación cruzada, donde la exclusión de los animales con perfiles farmacocinéticos más discrepantes no ha provocado un cambio relevante en el valor final de los parámetros, confirmando que no hay ningún animal que tenga una influencia relevante en el ajustado; y finalmente, se evaluó que el modelo final no se encontraba en un mínimo local, ya que al variar las estimas iniciales de los parámetros se obtuvieron resultados muy similares a los obtenidos por el modelo final.

El valor del aclaramiento (CL) de la lanreótida en la rata es de 1.32 l/h/kg, valor que sugiere una tasa de extracción hepática mediana ($E = 0.4$) teniendo en cuenta el flujo sanguíneo hepático en la rata (3.31 l/h/kg) y considerando que el fármaco no se une a las células sanguíneas. El péptido presenta una distribución media en la rata, al obtener un valor del volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario ($V_{ss} = 2.26$ l/kg) comprendido entre volumen total de agua corporal en la rata (0.668 l/kg) y 5 l/kg. El valor de la semivida de la fase terminal ($t_{1/2\gamma}$) es de aproximadamente 11 horas. Tras la administración intravenosa, se observa un comportamiento lineal en todo el intervalo de dosis ensayados (80 a 2000 µg/kg), ya que la covariable

dosis ha resultado no significativa al incluirla en todos los parámetros cinéticos. Sin embargo, tras la administración subcutánea del fármaco, solo se observa un comportamiento lineal en el intervalo de dosis de 80 a 200 µg/kg, ya que a la dosis de 2000 µg/kg se ha modelado una distinta constante de absorción (precipitación en el lugar de absorción). Tras la administración subcutánea, la biodisponibilidad absoluta no es completa (valor medio de 0.50) y las concentraciones máximas se alcanzan entre 0.5 a 1 hora después de la administración, sugiriendo degradación de la lanreótida en el lugar de absorción. Por otra parte, en otro estudio no incluido en esta Memoria, se determinó el valor de la unión de la lanreótida a las proteínas plasmáticas. En este estudio se concluyó que la rata presenta un valor medio de unión proteínas plasmáticas, con un porcentaje de unión a proteínas de la lanreótida marcada radioactivamente con Carbono 14 (^{14}C -lanreótida), de aproximadamente el 78.8% en el intervalo de concentraciones ensayadas (12 a 240 ng/ml). En otro estudio, se determinó que el porcentaje de unión a proteínas plasmáticas en el ratón es muy similar al obtenido en la rata, con un valor de 79.2 % en el intervalo de concentraciones de ^{14}C -lanreótida de 12 a 8000 ng/ml.

- **Perro:** en esta especie, del total de los 18 perros incluidos en los diferentes estudios farmacocinéticos, se recopilaron como covariables demográficas el peso corporal (intervalo 9.3 a 16.8 kg) y el sexo (14 machos y 4 hembras). Para evaluar la linealidad del fármaco también se ha ensayado la dosis (DOS) como covariable. Se realizó el análisis GAM sobre todos los parámetros farmacocinéticos del modelo básico, y dicha aproximación únicamente identificó: el peso (WGT) como posible covariable predictora en el aclaramiento (CL) y en el volumen en el compartimento central (V2); y la dosis (DOS) como covariable del volumen en el compartimento central (V2) y de la biodisponibilidad (F1). Ninguna de las covariables ensayadas fue encontrada significativa, y por tanto el modelo estructural básico se ha considerado como modelo final. Ninguna de las covariables ha sido capaz de explicar el cierto grado de no linealidad observado a concentraciones >5000 ng/ml tras la administración de un bolus intravenoso a la dosis de 2000 µg/kg.

Con los resultados obtenidos, se concluye que las características farmacocinéticas principales del modelo final en el perro tras el análisis poblacional son las siguientes:

- Modelo farmacocinético de tres compartimentos abiertos con absorción y eliminación de primer orden, parametrizado en términos de aclaramientos y volúmenes de distribución.
- La variabilidad interindividual ha sido modelada en CL, V2, V3, Q4 y KA utilizando un modelo proporcional.
- No se ha identificado ninguna covariable significativa.
- El modelo de error residual utilizado es el modelo combinado (aditivo y proporcional).

Se evaluó la robustez del modelo final en varias etapas: estimando la precisión en todos los parámetros (en todos los casos inferior al 40 %, con la excepción de ETA_{CL} y ETA_{Q4}); se exploró gráficamente la bondad de ajustado, sólo observándose una

infravaloración de las concentraciones elevadas (>5000 ng/ml) predichas por el modelo; y se realizaron varios ajustados para validar el modelo. Durante la validación del modelo (ver Resultados) se determinó el error de predicción medio, obteniéndose valores inferiores al 25% en la mayoría de los parámetros, indicando que no hay sesgo en las estimas de los parámetros; se realizó una validación cruzada, donde la exclusión de los todos los animales incluidos en el estudio y la exclusión de las distintas vías de administración (también se ha probado la exclusión de la vía iv a la dosis de 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) no ha provocado un cambio relevante en el valor final de los parámetros, confirmando que no hay ningún animal ni vía de administración que tenga una influencia relevante en el ajustado; y finalmente, se evaluó que el modelo final no se encontraba en un mínimo local, ya que al variar las estimas iniciales se obtuvieron resultados en todos los parámetros muy similares a los obtenidos en el modelo final.

El valor del aclaramiento (CL) de la lanreótida en el perro es de 0.79 l/h/kg, valor que sugiere una tasa de extracción hepática mediana ($E=0.4$) teniendo en cuenta el flujo sanguíneo hepático en el perro (1.85 l/h/kg) y considerando un coeficiente de reparto sangre plasma de 1. Se obtiene una distribución media de la lanreótida en el perro al obtener unos valores del volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario (V_{ss} de 1.29 l/kg) comprendidos entre el volumen total de agua corporal en el perro (0.604 l/kg) y 5 l/kg. El valor de la semivida de la fase terminal ($t_{1/2\gamma}$) es de aproximadamente unas 23 horas. Tras la administración intravenosa se observa un cierto comportamiento no lineal a la dosis de 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Mientras que tras la administración subcutánea de la lanreótida en el perro, se observa un comportamiento lineal en el intervalo de dosis ensayadas de 80 a 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (la inclusión de la dosis en la KA resultó no significativa). La biodisponibilidad absoluta tras la administración subcutánea no es completa (valor medio de 0.64), y las concentraciones máximas se alcanzan entre 0.33 a 0.67 horas después de la administración, causado por la degradación del fármaco en el lugar de inyección.

- **Cerdo:** en el caso del cerdo, de los 11 animales incluidos en los diferentes estudios farmacocinéticos, se recopilaron como covariables demográficas el peso (intervalo de 36 a 107 kg) y el sexo (5 machos y 6 hembras). Indicar que en esta Memoria solo se ha dispuesto de datos a una dosis (7 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Se ha realizado el análisis GAM sobre todos los parámetros farmacocinéticos del modelo estructural básico, y dicha aproximación únicamente identificó el sexo (SEX) como posible covariable predictora en el aclaramiento (CL) y en el volumen del compartimento periférico profundo (V_4) y la dosis (DOS) en la constante de absorción (KA). Se comprobó mediante la exploración gráfica y la disminución de la función objetiva que la inclusión de la covariable sexo en el modelo no era significativa, concluyendo que el modelo final es el mismo que el modelo estructural básico.

Con los resultados obtenidos, se concluye que las características farmacocinéticas principales del modelo final en el cerdo tras el análisis poblacional son las siguientes:

- Modelo farmacocinético de tres compartimentos abiertos con absorción y eliminación de primer orden, parametrizado en términos de aclaramientos y volúmenes de distribución.
- La variabilidad interindividual ha sido modelada en el CL, el Q4 y la KA utilizando un modelo proporcional.
- No se ha identificado ninguna covariable significativa.
- El modelo de error residual utilizado es el modelo proporcional a la concentración predicha.

Se evaluó la robustez del modelo en varias etapas: estimando la precisión en todos los parámetros (en todos los casos inferior al 40 % con la excepción de V_4 y ETA_{Q4} que están próximos al 60%); se exploró gráficamente la bondad de ajustado, no observándose ninguna desviación evidente; y se realizaron varios ajustados para validar el modelo. Durante la validación del modelo (ver Resultados) se determinó el error de predicción medio, obteniendo valores inferiores al 35% en todos los parámetros indicando que no hay sesgo en las estimas de los parámetros; se realizó una validación cruzada, donde la exclusión de uno a uno todos los animales no ha provocado un cambio relevante en el valor final de los parámetros, confirmando que no hay ningún animal que tenga una influencia relevante en el ajustado; y finalmente, se evaluó que el modelo final no se encontraba en un mínimo local, ya que al variar las estimas iniciales se obtuvieron resultados en todos los parámetros muy similares a los obtenidos en el modelo final.

Las principales características farmacocinéticas de la lanreótida en el cerdo, basándose en los parámetros poblacionales estimados por el modelo final, son las siguientes: el valor del aclaramiento es de 0.51 l/h/kg, obteniendo una tasa de extracción media ($E = 0.4$) respecto al valor el flujo sanguíneo hepático en el cerdo (1.22 l/h/kg) y considerando un coeficiente de reparto sangre plasma de 1. El valor del volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario (0.80 l/kg) es similar al volumen total de agua corporal en el cerdo (0.600 l/kg), reflejando una distribución media de la lanreótida en el cerdo. El valor de la fase terminal ($t_{1/2\gamma}$) es de aproximadamente unas 6.6 horas. Tras la administración intramuscular de la lanreótida en el cerdo a la dosis de 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, la biodisponibilidad es completa, y las concentraciones máximas se alcanzan entre 0.033 y 0.5 horas después de la administración.

- **Hombre:** De los 61 voluntarios sanos incluidos en los diferentes estudios farmacocinéticos, se recopilaron las siguientes covariables demográficas: peso (intervalo de 51 a 88 kg), edad (intervalo de 19 a 39 años) y sexo (42 hombres y 19 mujeres). Al igual que en el cerdo no se ha podido explorar la linealidad farmacocinética ya que solo se ha dispuesto de datos a un nivel de dosis (7 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Se ha realizado el análisis GAM sobre todos los parámetros farmacocinéticos del modelo básico, y dicha aproximación únicamente identificó la covariable sexo como posible predictor en el volumen del compartimento central (V_2) y el peso (WGT) en la constante de absorción. Ninguna de las covariables ensayadas fue encontrada

significativa, y por tanto el modelo estructural básico se ha considerado como modelo final.

Con los resultados obtenidos, se concluye que las características farmacocinéticas principales del modelo final en el hombre tras el análisis poblacional son las siguientes:

- Modelo cinético de tres compartimentos abiertos con absorción (con periodo de latencia) y eliminación de primer orden, parametrizado en términos de aclaramientos y volúmenes.
- La variabilidad interindividual ha sido modelada en CL, V₂, KA y ALAG₁ utilizando un modelo proporcional (distribución log-normal).
- No se ha identificado ninguna covariable significativa.
- El modelo de error residual utilizado es el modelo proporcional a la concentración predicha.

Se evaluó la robustez del modelo final en varias etapas: estimando la precisión en todos los parámetros (en todos los casos inferior al 45 %, con la excepción de V₄ y ETA_{ALAG1} en que se obtuvieron valores de 86 y 58%, respectivamente); se exploró gráficamente la bondad de ajustado, sólo observándose una infravaloración del modelo a concentraciones elevadas (>100 ng/ml); y se realizaron varios ajustados para validar el modelo. Durante la validación del modelo (ver Resultados) se determinó el error de predicción medio (MPE), obteniendo valores inferiores al 20% en la mayoría de los parámetros indicando que no hay sesgo en las estimas de los parámetros; se realizó una validación cruzada, donde la exclusión de los sujetos con perfiles farmacocinéticos más discrepantes no provocó un cambio relevante en el valor de los parámetros, confirmando que no hay ningún individuo que tenga una influencia relevante en el ajustado; y finalmente se evaluó que el modelo final no se encuentra en un mínimo local, ya que al variar las estimas iniciales se obtienen resultados en todos los parámetros muy similares a los obtenidos en el modelo final. Con los valores de los parámetros poblacionales obtenidos por el modelo final, el comportamiento farmacocinético medio poblacional de la lanreótida en el hombre, se puede resumir en una baja tasa de extracción hepática ($E=0.2$) teniendo en cuenta que el valor del aclaramiento (0.28 l/h/kg) es 4 veces inferior al valor el flujo sanguíneo hepático en el hombre (1.24 l/h/kg) y asumiendo que el fármaco no se une a las células sanguíneas. La lanreótida presenta una distribución extravascular media, con un volumen de distribución en estado estacionario (0.75 l/kg) similar al volumen total de agua corporal en el hombre (0.60 l/kg). El valor de la semivida de la fase terminal ($t_{1/2\gamma}$) es de aproximadamente unas 13 horas. Tras la administración subcutánea de la lanreótida en el hombre a la dosis de 7 µg/kg, la biodisponibilidad absoluta no es completa, presentando un valor medio de 0.68. Al igual que en las otras especies tras la administración sc, la principal causa de esta pérdida de fármaco se puede atribuir a la degradación del producto en el lugar de absorción. A pesar de que las concentraciones máximas se alcanzan a las 0.25 horas tras la administración subcutánea, se ha podido determinar un valor muy bajo del periodo

de latencia (1.7 minutos), sugiriendo que la estimación de este parámetro artefactual. En el hombre, la unión a proteínas plasmáticas es aproximadamente del 80.7% en el intervalo de concentraciones de ¹⁴C-lanreótida de 12 a 60 ng/ml. Al igual que en las otras especies se considera un valor medio de unión a proteínas.

4.3.3 COMPARACIÓN ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO NO COMPARTIMENTAL Y POBLACIONAL

Una vez comentado los resultados del análisis poblacional en cada una de las diferentes especies ensayadas, se pasa a discutir las similitudes y diferencias encontradas tras el análisis farmacocinético de los datos mediante las dos aproximaciones: el análisis no compartimental y el análisis poblacional.

En la Tabla 5 se comparan los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos en cada una de las especies ensayadas tras el análisis no compartimental (NC) y tras el análisis poblacional utilizando los parámetros obtenidos por el modelo final (PopF). Hay que destacar que el análisis no compartimental se ha realizado utilizando sólo los datos de tiempo concentración obtenidos tras la administración de una dosis única de lanreótida correspondientes a cada nivel de dosis o a cada estudio. Sin embargo, en el análisis poblacional se han analizado conjuntamente todos los datos disponibles de cada especie (dosis única y dosis múltiple).

| Parám. | | Rata | | | | Perro | | | | Cerdo | | Hombre | | | |
|-------------------|-----|-------|------------------|-------------------|--------------------|-------|------------------|-------------------|--------------------|-------|-----------------|--------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | | Pop F | NC ₈₀ | NC ₂₀₀ | NC ₂₀₀₀ | Pop F | NC ₈₀ | NC ₂₀₀ | NC ₂₀₀₀ | Pop F | NC ₇ | Pop F | NC ₇ [#] | NC ₇ [#] | NC ₇ [#] |
| CL | l/h | 0.391 | 0.513 | 0.563 | 0.500 | 9.90 | 16.99 | 19.12 | 10.45 | 39.9 | 48.9 | 18.9 | 17.23 | 23.32 | 19.40 |
| V _{ss} | l | 0.670 | 0.162 | 0.308 | 0.515 | 16.1 | 7.98 | 10.34 | 11.5 | 62.5 | 23.3 | 50.8 | 12.1 | 12.9 | 10.2 |
| t _{1/2γ} | h | 11 | 0.98 | 3.15 | 9.68 | 23 | 2.91 | 4.91 | 21.38 | 6.60 | 1.60 | 13.05 | 1.32 | 1.05 | 0.94 |
| F1 | - | 0.50 | 0.67 | 0.75 | 0.48 | 0.75 | 0.83 | 1.03 | 0.57 | 1.00 | 1.03 | 0.74 | | 0.83 | |

Pop F: Valores obtenidos por el modelo poblacional Final

NC₇: Valores obtenidos por análisis No Compartimental (dosis 7µg/kg)

NC₈₀: Valores obtenidos por análisis No Compartimental (dosis 80µg/kg)

NC₂₀₀: Valores obtenidos por análisis No Compartimental (dosis 200µg/kg)

NC₂₀₀₀: Valores obtenidos por análisis No Compartimental (dosis 2000µg/kg)

#: Diferentes estudios farmacocinéticos realizados en el voluntario sano.

Tabla 5. Comparación de los principales parámetros farmacocinéticos medios obtenidos tras el análisis no compartimental y poblacional en cada una de las especies estudiadas.

La Tabla 5 permite observar como en las especies donde solo se ha ensayado un solo nivel de dosis (cerdo y hombre), los aclaramientos estimados mediante las dos aproximaciones (no compartimental y poblacional) son bastante similares entre si (no hay diferencias estadísticamente significativas), obteniéndose valores casi idénticos en el caso del hombre, mientras que en el cerdo se obtiene mediante el análisis no compartimental un aclaramiento un 20% superior al determinado mediante la aproximación poblacional. Esta diferencia en el aclaramiento puede atribuirse a la infraestimación del cálculo del área bajo la curva tiempo-concentración al realizar el análisis no compartimental, ya que no en todos los animales se ha podido caracterizar adecuadamente la última fase de disposición.

Respecto al volumen de distribución en estado estacionario (V_{ss}) estimado en el cerdo y el hombre, el valor poblacional es aproximadamente 3 veces superior al obtenido tras el análisis no compartimental. El principal parámetro responsable de esta discrepancia es el elevado valor obtenido en el volumen del 3^{er} compartimento (V_4) tras el análisis poblacional. El valor de V_4 está condicionado a que, aunque la inclusión de este tercer compartimento está estadísticamente justificada, pocos datos de concentración ha sido cuantificables durante en esta fase. También se observa que el valor de la semivida de la fase terminal poblacional es de 4 a 8 veces superior a la estimada mediante el análisis no compartimental. Estas discrepancias se deben a que la estimación de la constante aparente de eliminación de la fase terminal mediante el análisis no compartimental, no corresponde solo a la constante γ , como en el caso del análisis poblacional, sino que refleja un proceso de disposición híbrido entre las fases β y γ . Una posible explicación es que el análisis poblacional realiza el ajuste simultáneamente con todos los datos en un solo paso, mientras que el análisis no compartimental el análisis se realiza individualmente, viéndose afectada la determinación de dicha constante por la cantidad de concentraciones detectables a tiempos prolongados de toma de muestra. Por otro lado, en ninguna de estas dos especies se observan diferencias relevantes entre los valores obtenidos en la biodisponibilidad absoluta tras la administración de I fármaco por vía sc o im mediante las dos aproximaciones.

La comparación de los parámetros farmacocinéticos obtenidos mediante las dos aproximaciones donde se ha ensayado más de un nivel de dosis (rata y perro) no es fiable, ya que como se ha comentado anteriormente, el análisis no compartimental solo se ha realizado utilizando los datos tras la administración de dosis única, mientras que el análisis poblacional ha utilizado todos los datos disponibles (análisis simultaneo de dosis única y dosis múltiples).

Asumiendo que no se han utilizado exactamente los mismos datos para la obtención de los parámetros farmacocinéticos mediante la aproximación no compartimental y poblacional (en el análisis no compartimental solo se han utilizado los datos tras la administración a dosis única), se observa que los parámetros poblacionales tienden a parecerse más a los parámetros obtenidos por el análisis no compartimental correspondientes a la dosis más alta ensayada (2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Este fenómeno está causado a que al analizar los datos correspondientes a la dosis baja y media (80 y 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) con la aproximación no compartimental, las concentraciones de lanreótida a periodos de tiempo prolongado de toma de muestra no se pueden cuantificar, ya que se encuentran por debajo del límite de cuantificación ($<loq$). Este hecho provoca que se obtengan diferentes resultados en los parámetros farmacocinéticos no compartimentales en función del nivel de dosis administrado. Las diferencias encontradas en los parámetros farmacocinéticos entre las dos aproximaciones no se consideran relevantes al comparar los valores poblacionales y los valores tras la administración de la dosis más alta ensayada.

Respecto a la linealidad farmacocinética, el análisis no compartimental concluye que la lanreótida en ambas especies es lineal en el intervalo de dosis 80 a 200 µg/kg. En el análisis poblacional se han observado una tendencia similar a la no linealidad a la dosis más alta, ya que en la rata se ha encontrado cierta tendencia a la no linealidad tras la administración de la dosis más alta (2000 µg/kg) por vía subcutánea y en el perro se observa no linealidad a los valores de concentración elevados (>5000 ng/ml) tras la administración del bolus iv de 2000 µg/kg.

Las principales discrepancias obtenidas en el valor de los parámetros farmacocinéticos mediante las dos aproximaciones (no compartimental y poblacional) se manifiestan en los niveles de dosis inferiores. Los valores poblacionales son más próximos a los no compartimentales de la dosis superior. Es posible que al utilizar dosis tan elevadas, los parámetros farmacocinéticos poblacionales de la lanreótida descritos en esta memoria correspondan a parámetros toxicocinéticos.

4.4 ESCALADO ENTRE ESPECIES

El escalado entre especies es un método de interpolación y extrapolación, que se basa en la premisa de la existencia de similitudes anatómicas, fisiológicas y bioquímicas entre mamíferos, que pueden ser descritas mediante modelos matemáticos, y que permite extrapolar datos en animales al hombre bajo ciertas condiciones experimentales. Actualmente, se ha establecido que varios procesos fisiológicos y ciertos tamaños de órganos exhiben una relación de potencia con el peso corporal de dichas especies animales. Estas relaciones constituyen la base científica para el establecimiento del escalado entre especies.

La extrapolación en el hombre se puede realizar principalmente mediante dos aproximaciones: los modelos fisiológicos y la alometría. Si los modelos fisiológicos tratan de ser más realísticos y proporcionar un sentido fisiológico a los parámetros farmacocinéticos, ésta aproximación es mucho más complicada, más cara y de un consumo de tiempo superior que los métodos alométricos, que son más simples y utilizan datos que son comúnmente disponibles durante el desarrollo preclínico de los principios activos. Dentro del campo de la alometría, se han utilizado varias variantes en las predicciones alométricas que permiten obtener una mejor correlación y mejorar la predicción en el hombre. Por ejemplo, la predicción del aclaramiento se puede realizar simplemente utilizando los valores del CL frente al peso corporal, pero existen otras variantes basadas en el producto del CL por la esperanza máxima de vida (MLP) o por el peso del cerebro (BW). También se han obtenido predicciones cinéticas aceptables en el hombre al aplicar los tiempos invariantes. En la última década, se ha incrementado el interés por el escalado entre especies de los parámetros farmacocinéticos más relevantes (CL, V y $t_{1/2k}$), principalmente para la predicción de la exposición (AUC y C_{max}) en diversos escenarios. Estos parámetros de exposición son importantes para la interpretación de los efectos terapéuticos, efectos adversos, y la posible acumulación del fármaco después de la administración repetida. Además, la

utilización de los parámetros farmacocinéticos predichos en el hombre, junto con los datos de seguridad y dinámicos, y el conocimiento de las concentraciones efectivas en los animales, permite proponer diseños de dosificación seguros durante la primera administración del compuesto en el hombre y facilitar el escalado de dosis en los estudios de fase II.

Tradicionalmente, la alometría se estudia calculando el coeficiente y exponente alométrico para los diferentes parámetros farmacocinéticos utilizando el gráfico doble logarítmico o estimando los parámetros farmacocinéticos utilizando los perfiles cinéticos de todas las especies colapsados en un solo perfil mediante la modificación de la escala de tiempo (tiempos invariantes). La alometría poblacional permite combinar ambas aproximaciones, estimando en un solo paso los coeficientes y exponentes alométricos de los parámetros farmacocinéticos para obtener el mejor modelo que ajuste mejor los datos tiempo-concentración provenientes de todas las especies simultáneamente. Esta aproximación permite tratar con datos escasos y no balanceados y estimar la variabilidad interindividual y residual. Otra ventaja de este método es la posible inclusión de covariables distintas al peso que permitan describir parte de la variabilidad interindividual encontrada. Mediante esta aproximación se evitan las críticas sobre los modelos alométricos clásicos en relación a la escasa habilidad para tratar con la variabilidad de los datos, y además, al no utilizar las transformaciones logarítmicas, evita la crítica sobre la distorsión de resultados del escalado alométrico tradicional basado en la transformación logarítmica.

En el presente trabajo se han evaluado el escalado entre especies de la lanreótida aplicando la aproximación poblacional, utilizando los datos de tiempo concentración provenientes de varias especies animales mediante dos métodos distintos: la alometría y los tiempos invariantes. Se ha evaluado retrospectivamente la capacidad de predicción de la farmacocinética de la lanreótida en el hombre a partir de datos preclínicos.

Como apoyo para su desarrollo clínico, la disposición de este análogo de la somatostatina, ha sido caracterizada en las especies animales comúnmente utilizadas en los primeros estudios de farmacocinética no clínica y estudios de seguridad y toxicología. Más concretamente, se han utilizado los datos farmacocinéticos provenientes de la rata, el perro y el cerdo. Además, se han utilizado los datos tras la administración del fármaco en el voluntario sano para evaluar la capacidad de predicción en el hombre del modelo alométrico.

Antes de iniciar el análisis alométrico, para asegurar la viabilidad de dicha metodología, se comprobó que la lanreótida cumplía una serie de características comunes a todos los fármacos susceptibles de ser analizados mediante alometría:

- Comportamiento farmacocinético similar y lineal en el ámbito de dosis ensayado en todas las especies. La lanreótida tiene una disposición similar en todas las especies, y tal y como se ha comentado anteriormente, se ha considerado que la farmacocinética de la lanreótida tiene un comportamiento lineal en todas las especies estudiadas en el ámbito de dosis ensayadas, a pesar de que se ha

observado cierta tendencia a la no linealidad tras la administración de la dosis más alta ensayada (2000 µg/kg) en la rata tras la administración por vía subcutánea y en el perro tras la administración mediante un bolus intravenoso. Al igual que otros péptidos pequeños, las propiedades farmacocinéticas son indicativas de un fármaco con una distribución a tejidos media-baja en todas las especies. Se obtienen valores medios para el aclaramiento, aunque se observan ciertas diferencias, obteniéndose los valores más altos y los más bajos en la rata y el cerdo, respectivamente.

- El porcentaje de unión a las proteínas plasmáticas sea similar en el intervalo de concentraciones que incluyen el rango de los niveles de fármaco determinados tras la administración del fármaco en todas las especies. En relación a este criterio, la lanreótida se puede considerar un buen candidato, ya que presenta un porcentaje de unión a proteínas plasmáticas medio y razonablemente constante entre especies (79.2% para el ratón, 78.8% para la rata y 80.7% para el hombre), no observándose saturación en el intervalo de concentraciones ensayadas (12 a 8000 ng/ml). A pesar de no disponer de los datos de unión a proteínas en todas las especies (no se dispone de datos de unión a proteínas ni en el perro ni en el cerdo), durante el análisis alométrico se ha asumido un porcentaje de unión a proteínas plasmáticas igual para todas las especies ensayadas.
- El proceso de eliminación sea renal o biliar, y similar entre especies (ausencia de mecanismos de aclaramiento específicos para cada especie). Tanto en la rata como en el perro la principal vía de excreción de la lanreótida es por eliminación biliar. La excreción urinaria de la lanreótida es muy baja, al igual que otras moléculas peptídicas de peso molecular inferior a 5000 (1096.34 para la lanreótida), que son normalmente filtradas inalteradas a través de los glomérulos del riñón, vía endocitosis luminal, seguido por un proceso de reabsorción a la circulación sistémica. Durante la reabsorción, el fármaco sufre una degradación proteolítica por los enzimas lisosomales (metabolismo renal), excretándose cantidades insignificantes de fármaco por la orina.
- Disponer de suficientes datos de disposición farmacocinética del fármaco tras la administración del principio activo como mínimo en tres especies animales distintas. En este trabajo se disponen de datos farmacocinéticos de la lanreótida en tres especies animales distintas (rata, perro y cerdo) y se ha utilizado la farmacocinética en el hombre como valores de referencia.

Los resultados farmacocinéticos poblacionales que permiten determinar el comportamiento farmacocinético de la lanreótida en todas las especies y que a la vez actúan como valores de referencia al realizar el escalado entre especies, son los obtenidos por los modelos estructurales básicos en cada especie (sin la inclusión de covariables). Se han utilizado los modelos estructurales básicos y no los modelos finales como valores de referencia ya que en los modelos finales, la inclusión de covariables es distinta en cada una de las especies, dificultando así la comparación.

Por este motivo, y previo a la realización del escalado entre especies, se ha realizado una exploración de los datos obtenidos en los modelos estructurales básicos en cada una de las especies ensayadas. En la Tabla 6, se comparan los valores de los parámetros poblacionales medios obtenidos por los diferentes modelos estructurales básicos estimados para cada especie estudiada. Este estudio revela que la farmacocinética poblacional de la lanreótida en la rata, el perro, el cerdo y el hombre después de la administración intravenosa y extravascular fue mejor descrita por un modelo de tres compartimentos abiertos con absorción de primer orden y eliminación lineal desde el compartimento central. En general, se observa que los valores de los principales parámetros farmacocinéticos (CL y Vss) aumentan al aumentar el peso corporal, sugiriendo la viabilidad del escalado entre especies para la lanreótida.

| Parámetro | Unidades | Rata | Perro | Cerdo | Hombre |
|----------------------|----------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Nº sujetos | - | 54 | 18 | 11 | 61 |
| Observ./sujeto | - | 7-12 | 10-25 | 6-11 | 6-12 |
| Nº Observaciones | - | 533 | 1217 | 123 | 587 |
| Peso corporal | | | | | |
| Media | kg | 0.297 | 12.498 | 77.787 | 67.364 |
| CV | % | 8.22 | 14.80 | 34.07 | 14.00 |
| CL | l/h | 0.393 {1.323} | 9.9 {0.792} | 39.9 {0.513} | 18.8 {0.279} |
| Vss | l | 0.679 {2.285} | 16.05 {1.284} | 62.46 {0.803} | 50.84 {0.755} |

Los valores entre corchetes corresponden al valor del parámetro normalizado por el peso corporal (0.297, 12.498, 77.787 y 67.364 kg, para la rata, perro, cerdo y hombre, respectivamente).

CL y Vss: aclaramiento total y volumen de distribución en estado de equilibrio estacionario, respectivamente

Tabla 6. Comparación de los parámetros poblacionales medios predichos por el modelo estructural básico en cada una de las especies estudiadas.

La lanreótida es un péptido pequeño, por este motivo, además de disponer de las características anteriormente comentadas, debe de cumplir otra serie de requisitos que permiten garantizar el escalado entre especies. Las premisas requeridas para moléculas pequeñas son las siguientes:

- Los animales pequeños tienden a eliminar las proteínas más rápidamente que los humanos. El valor del aclaramiento normalizado por el peso corporal medio en las tres especies animales ensayadas se encuentran en el intervalo de 0.513 a 1.323 l/h/kg (rata>perro>cerdo), siendo todos superiores a aquellos obtenidos por el hombre (0.279 l/h/kg). Estos valores confirman que la rata elimina la lanreótida del organismo casi cinco veces más rápido que el hombre.
- Los volúmenes de distribución tienden a ser proporcionales al peso a través de las distintas especies. Utilizando los valores de volumen en estado estacionario (Vss) normalizados por el peso corporal medio, se obtiene los siguientes valores: 2.28, 1.28, 0.80 y 0.75 l/kg, para la rata, el perro, el cerdo y el hombre, respectivamente. Se observa que para las especies con mayor peso (perro, cerdo y hombre) se obtiene un volumen similar de aproximadamente 1 l/kg, mientras que para la especie con peso corporal más pequeño (rata), el valor obtenido es aproximadamente el doble al obtenido por el resto de especies.
- Al representar gráficamente en escala doble logarítmica (log-log), la relación entre el peso corporal medio y los principales parámetros farmacocinéticos

poblacionales medios para cada especie (CL y Vss), se observa un aumento del valor del parámetro farmacocinético al aumentar el peso corporal, indicando que el escalado entre especies parece factible.

- Los exponentes alométricos para los parámetros farmacocinéticos tienden a aproximarse a los exponentes correspondientes a las variables fisiológicas, los exponentes deben tender a 0.75 y 1 para el aclaramiento y el volumen de distribución, respectivamente⁵. Si utilizamos como primera aproximación los datos obtenidos en la regresión lineal con los parámetros medios, se obtienen unos valores de exponentes muy cercanos a los valores fisiológicos (0.83 y 0.82 para el aclaramiento y el volumen de distribución en estado estacionario, respectivamente).

Una vez comprobado la existencia de garantías suficientes para la implementación del escalado entre especies para la lanreótida, se procedió al modelaje del escalado entre especies utilizando la aproximación poblacional. El principal objetivo fue evaluar la posible correlación de los principales parámetros cinéticos entre los animales y el hombre. Habitualmente, esta aproximación relaciona los principales parámetros farmacocinéticos con las características demográficas de las distintas especies (mayoritariamente el peso corporal). Normalmente, la ecuación alométrica simple, suele ser el modelo más adecuado para interpolar y extrapolar parámetros farmacocinéticos entre especies para fármacos excretados por vía renal y/o biliar y con la unión a proteínas plasmáticas similares entre especies.

El modelo poblacional alométrico simple incorpora la función de potencia del peso en todos los parámetros farmacocinéticos (excepto para la biodisponibilidad y la constante de absorción). De acuerdo con los principios de la alometría, los parámetros farmacocinéticos suelen estar relacionados con el peso corporal con unos exponentes teóricos de 0.75 y 1.0 para los procesos fisiológicos flujo dependientes y los volúmenes de distribución, respectivamente.

En la Tabla 7, se muestran los parámetros farmacocinéticos poblacionales estimados utilizando la alometría simple. Este análisis muestra que el volumen del compartimento central se correlaciona directamente proporcional al peso corporal con un exponente alométrico de 0.90, que está comprendido dentro del intervalo de $\pm 10\%$ del valor teórico de 1. La correlación entre el aclaramiento y el peso corporal fue también adecuada estimando un exponente alométrico de 0.81, valor solo desviado un 8% respecto al valor teórico de 0.75. Estos valores de los exponentes alométricos estimados se encuentran dentro del ámbito de valores esperados y son consistentes con aquellos identificados previamente por otras moléculas pequeñas, péptidos y proteínas.

| Parámetros | | Ecuación alométrica | | | | IIV (%) | Res. (%) | | |
|-----------------|--------------------|---------------------|-----------|----------|--------------|----------|-----------------|-----------------|---|
| CL | (l/h) | 1.18 | (5.9%) | W | 0.810 | (2.1%) | 16.2% (17.9%) | - | - |
| V2 | (l) | 0.148 | (16.5%) | W | 0.896 | (4.4%) | 86.0% (41.1%) | - | - |
| Q3 | (l/h) | 0.799 | (19.0%) | W | 0.614 | (7.7%) | - | - | - |
| V3 | (l) | 0.316 | (8.0%) | W | 0.712 | (3.8%) | - | - | - |
| Q4 | (l/h) | 0.106 | (12.7%) | W | 0.725 | (8.3%) | 19.4% (56.2%) | - | - |
| V4 | (l) | 1.48 | (12.8%) | W | 0.753 | (6.5%) | - | - | - |
| KA [§] | (h ⁻¹) | - | - | - | - | - | 50.2% (21.0%) | - | - |
| F1 | - | 0.65 | (6.2%) | - | - | - | - | - | - |
| W_Add | % | - | - | - | - | - | - | 0.07% (15.6%) | - |
| W_Prop | % | - | - | - | - | - | - | 42.5% (5.8%) | - |

IIV (%): Variabilidad interindividual expresada en coeficiente de variación (%)

Res (%): Variabilidad residual expresada en coeficiente de variación (%)

W_Add: modelo de error residual aditivo expresado en coeficiente de variación (%)

W_Prop: modelo de error residual proporcional expresado en coeficiente de variación (%)

§: Se obtiene un valor de KA (h⁻¹) distinto para cada especie (rata, perro y cerdo): 0.45 (7.1%), 0.793 (7.2%) y 6.74 (21.0%), respectivamente.

Tabla 7. Parámetros farmacocinéticos poblacionales alométricos.

No se han obtenido mejoras en el modelo alométrico al aplicar otros factores como peso cerebro, esperanza de vida máxima (MLP), etc. Estos resultados son consistentes con la bibliografía, ya que, generalmente los fármacos proteicos con el exponente alométrico en el CL más grande de 0.7 y menor que 1, no requieren el uso del MLP o el peso del cerebro como factores de corrección. Sin embargo, los fármacos no proteicos suelen requerir la aplicación del MLP como factor de corrección para mejorar la predicción del aclaramiento cuando los exponentes del CL obtenidos por alometría simple se encuentran entre 0.71 y 0.99.

Con las ecuaciones alométricas obtenidas, se observa que los exponentes alométricos de los aclaramientos intercompartimentales (Q2 y Q3) también se obtienen valores próximos a 0.75 (0.61 y 0.73, respectivamente), mientras que los exponentes de los volúmenes periféricos se encuentran más alejados del valor teórico de 1 (0.71 y 0.75, para el V2 y V3, respectivamente). Respecto a la constante de absorción (KA) y a la biodisponibilidad (F1), al no existir una relación obvia con el peso corporal, se decidió no relacionar dichos parámetros con el peso corporal.

En base a los resultados obtenidos, el mejor modelo para el escalado entre especies de la lanreótida es el alométrico simple. En este modelo, desarrollado a partir de los datos en distintas especies (rata, perro y cerdo), todas las especies animales han sido adecuadamente ajustadas, obteniendo unos valores medios predichos para el CL y el Vss basados en la ecuación alométrica en la rata, el perro y el cerdo muy cercanos a los valores de los parámetros obtenidos en cada especie por separado (aproximadamente entre 0.8 y 1.1 veces respecto a los valores reales).

Para evaluar si el modelo alométrico es capaz de prospectivamente predecir adecuadamente los parámetros farmacocinéticos en el hombre (los datos en el hombre no incluidos en el análisis), se sustituyó el peso medio de los voluntarios (67.8

kg) en las ecuaciones alométricas, para así obtener el valor predicho en el hombre del CL (35.7l/h) y el Vss (48.01 l). Comparado los valores obtenidos por alometría con los valores estimados en el hombre (18.8l/h para el CL y 50.84l para el Vss), el CL en el hombre fue sobreestimado aproximadamente 1.9 veces, mientras que el Vss fue ligeramente infraestimado (0.9 veces). Estos valores se consideran aceptables ya que se encuentran comprendidos dentro del intervalo ± 2 veces el valor real. A pesar de que el aclaramiento se encuentra sobreestimado, estos parámetros predichos mediante alometría podían haber proporcionado una guía de trabajo para el diseño de los primeros estudios PK en el hombre, ya que los perfiles cinéticos observados en el hombre se encuentran en la banda superior pero dentro del intervalo de confianza del 90% de los perfiles predichos por el modelo alométrico.

La alometría simple es un modelo empírico que puede no ser aplicable a ciertos fármacos o puede proporcionar cierto grado de no similitud entre especies, por este motivo los resultados obtenidos se encuentran dentro del ámbito de incertidumbre inherente a esta metodología. Una posible explicación para las diferencias farmacocinéticas observadas entre las distintas especies animales ensayadas y el hombre, pueden ser debidas a cierto grado de especificidad de cada especie para los mecanismos de aclaramiento de la lanreótida. También estas diferencias pueden ser atribuibles a que las comparaciones se han basado en diferentes fuentes de información, como son diferentes dosis, regimenes y esquemas de muestreo para cada especie. Otro factor a tener en cuenta al evaluar la alometría de péptidos, es que no todas las especies pueden presentar la misma respuesta inmune. En otras palabras, algunas especies pueden no presentar repuesta inmune, mientras que otras especies pueden eliminar el compuesto vía formación de anticuerpos. Por lo tanto, estas especies pueden presentar diferentes mecanismos de aclaramiento que pueden no estar relacionados con el peso. En general, la presencia de anticuerpos específicos para el fármaco suele aparecer en los animales que han estado expuestos al principio activo en más de una ocasión, preferiblemente en animales tratados durante periodos prolongados de tiempo. En el presente trabajo se corresponden a los animales (rata y perro) administrados en régimen de dosis múltiple. Sin embargo, no se han observado evidencias de una cinética distinta en estos animales respecto a los perfiles obtenidos tras la administración única, sugiriendo que, con los datos disponibles, el efecto de la posible formación de anticuerpos no supone una modificación significativa de la cinética de la lanreótida.

La predicción del aclaramiento en el hombre a partir de datos obtenidos en animales requiere de un mínimo de tres especies (excluyendo el hombre que actúa como referencia). Sin embargo, en algunos casos concretos, datos con solo dos especies animales pueden proporcionar una aceptable predicción del CL en el hombre. Con la lanreótida se ha obtenido una razonable predicción de la cinética en el hombre al analizar solamente dos especies comúnmente utilizadas en estudios preclínicos (rata y perro), sugiriendo que los datos de estas dos especies son suficientes para el escalado entre especies de la lanreótida.

El escalado entre especies basado en el concepto de tiempo invariante no ha sido todavía explorado a fondo. En la presente memoria se ha aplicado esta metodología, permitiendo comparar los parámetros predichos mediante la aproximación alométrica simple y mediante el método de tiempos invariantes entre especies. Al no tratarse de un estudio prospectivo y los resultados a obtener son conocidos (parámetros cinéticos en el hombre), ha sido posible evaluar si el uso de tiempos invariantes permite mejorar la capacidad de predicción del escalado entre especies.

La aproximación de los tiempos invariantes se basa en que cada especie animal esta dotada con un reloj farmacocinético característico, de esta manera, en general, los animales pequeños tienden a eliminar el fármaco más rápidamente que los animales que pertenecen a especies mayores. Por este motivo, tal y como se preveía, no se ha observado ninguna similitud en los perfiles farmacocinéticos de las distintas especies al representar las concentraciones normalizadas por la dosis frente al tiempo cronológico. Sin embargo, al representar el gráfico elemental de Dedrick (ver Resultados), se observa que los perfiles de tiempo concentración representativos de la disposición de la lanreótida en varias especies animales tienden a colapsarse en una sola curva, indicando la viabilidad de esta aproximación.

Con los datos de las tres especies animales, se ensayaron diferentes modelos basados en los distintos tiempos invariantes, para poder determinar cual de ellos era el modelo más adecuado para la lanreótida y poder comparar esta aproximación con los resultados obtenidos por la alometría simple. A pesar de que el mejor ajustado para los curvas de niveles de lanreótida versus el tiempo en las diferentes especies fue observado cuando el tiempo se transformó a unidades de tiempo equivalente (exponente de 0.75 y 1 para el aclaramiento y el volumen de distribución, respectivamente), todos los tiempos ensayados, a excepción del cronológico, proporcionaron una razonable superposición de los perfiles farmacocinéticos homogénea e independientemente de la especie (ver Resultados).

Estos datos permiten concluir que para la lanreótida, el tiempo equivalente permite definir una curva de tiempo-concentración común para todas las especies. Esto implica que todas las especies animales ensayadas tienden a eliminar la lanreótida en el mismo intervalo de tiempo biológico. Utilizando el tiempo equivalente se obtiene un valor de CL en el hombre similar al obtenido mediante alometría simple (32.5 y 35.7 l/h, respectivamente), pero 1.7 veces superior al valor observado (18.8 l/h). Sin embargo, el valor que se obtiene para el Vss es casi el doble (86.9 l) al predicho por alometría (50.8 l) y al observado (48.0 l).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos mediante los dos métodos de escalado entre especies, nos permite concluir que el modelo alométrico simple mediante la aproximación poblacional es el modelo que proporciona una mejor predicción en el hombre. También hay que destacar que al utilizar como unidad de tiempo invariante el tiempo equivalente (exponente de 0.75 y 1 para el CL y Vss, respectivamente) permite obtener unas predicciones de los perfiles cinéticos en el hombre bastante aceptables.

4.5 REFERENCIAS

- ¹ Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharmaceutical Research*, 10 (7), 1993.
- ² Yu WK, Chow PKH, *et al.* A non-invasive isotope dilution technique for quantifying blood flow using radiolabelled red blood cells. *Nuclear Medicine Communications*. 21:269-276, 2000.
- ³ Kaneko. Clinical biochemistry of domestic animals. Fourth edition. *Academic Press INC*, 1989.
- ⁴ Chansson P, Timsit J, Harris G. Clinical pharmacokinetics of octreotide. *Clinical Pharmacokinetics* 25 (5): 375-391, 1993.
- ⁵ West GB, Brown JH, Enquist BJ. The fourth dimension of life: fractal geometry and allometric scaling of organisms. *Science*. Vol 284: 1677-1679, 1999.