

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Farmacología y Terapéutica



**INFLUENCIA DE VARIABLES DEMOGRÁFICAS,
CLÍNICAS Y FARMACOGENÉTICAS EN LA DOSIS
ESTABLE DE ACENOCUMAROL Y DESARROLLO
DE UN ALGORITMO DE DOSIFICACIÓN**

TESIS DOCTORAL

ALBERTO M. BOROBIA PÉREZ

MADRID, 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Farmacología y Terapéutica



**INFLUENCIA DE VARIABLES DEMOGRÁFICAS,
CLÍNICAS Y FARMACOGENÉTICAS EN LA DOSIS
ESTABLE DE ACENOCUMAROL Y DESARROLLO DE
UN ALGORITMO DE DOSIFICACIÓN**

Memoria para optar al título de Doctor en Medicina presentada por:

D. Alberto M. Borobia Pérez

Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina.
Universidad Autónoma de Madrid.

DIRECTOR DE TESIS:

Prof. Dr. Antonio J. Carcas Sansuán

Departamento de Farmacología y Terapéutica. Facultad de Medicina.
Universidad Autónoma de Madrid.

MADRID, DICIEMBRE DE 2012

D. ANTONIO J. CARCAS SANSUAN, DOCTOR EN MEDICINA Y PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA Y TERAPÉUTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

INFORMA:

Que **D. ALBERTO M. BOROBIA PÉREZ** ha realizado bajo mi dirección la Tesis Doctoral “**INFLUENCIA DE VARIABLES DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y FARMACOGENÉTICAS EN LA DOSIS ESTABLE DE ACENOCUMAROL Y DESARROLLO DE UN ALGORITMO DE DOSIFICACIÓN”**

Estimo que su trabajo es novedoso y original, además de reunir los requisitos necesarios de interés científico y rigor metodológico para ser aceptado para su presentación

Madrid, 23 de noviembre de 2012

Antonio J. Carcas Sansuán

A mis padres, por su entrega

A mi mujer, Miriam, y a mi hijo David

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Doctor Antonio J. Carcas, director de esta Tesis Doctoral, porque sin su dirección, conocimiento, atención y entusiasmo nunca se habría podido realizar este proyecto. Gracias, sobre todo, por su comprensión y apoyo personal durante mis años de formación en el hospital y mi corta trayectoria profesional.

Al Doctor Jesús Frías, Jefe de Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario La Paz y Director del Departamento de Farmacología y Terapéutica, por su apoyo incondicional en la realización de este proyecto, y por el privilegio intelectual que supone trabajar cerca de personas con tan intensa experiencia médica, docente e investigadora.

A la Doctora Carmen Fernández Capitán, responsable de la Consulta de Enfermedad Tromboembólica del Hospital Universitario La Paz, por su siempre desinteresada colaboración y sabios consejos. Gracias a su inestimable ayuda y a la de la Doctora Alicia Lorenzo a la hora de reclutar pacientes con enfermedad tromboembólica, este trabajo ha podido culminar con éxito.

A los doctores Eduardo Arroyo y Ana María López Parra, del Laboratorio de Genética Forense de la Universidad Complutense de Madrid, por su ayuda en el desarrollo de la técnica de genotipado y su casi permanente disponibilidad, imprescindible para la buena marcha de la fase final de este proyecto.

Al Doctor Manuel Quintana, Coordinador de Urgencias del Hospital Universitario La Paz, por su apoyo incondicional, y al resto de compañeros del Servicio de Urgencias por su desinteresada ayuda en el reclutamiento de pacientes en la última fase del proyecto.

Al Doctor Francisco Abad, del Servicio de Farmacología Clínica, y a las doctoras Carmen Suárez y Nuria Ruiz Giménez, del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario La Princesa, por su importante contribución para el buen desarrollo del ensayo clínico.

A todos los profesionales del Servicio de Farmacología Clínica del Hospital La Paz, y de la Unidad de Ensayos Clínicos del Departamento de Farmacología, por el placer de compartir el día a día con ellos, y porque de una u otra manera han participado en la creación de esta Tesis.

A mi mujer, Miriam, por su incondicional apoyo y constante ánimo. Tanto ella como mi hijo, David, me recuerdan permanentemente las cosas importantes de esta vida.

A mis padres, César e Isabel, y a mi hermana, Ana, por su cariño, entrega y dedicación. Ellos me han ayudado a crecer rodeado de cariño y han hecho posible mi formación humana y profesional.

Y por supuesto a todos los pacientes con enfermedad tromboembólica venosa. Ellos son la auténtica realidad de este trabajo, y sin su desinteresada participación no hubiera sido posible este proyecto.

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	2
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1. Farmacogenética y anticoagulantes orales.....	5
2.2. Algoritmos farmacogenéticos de ajuste de dosis	8
2.3. Validación prospectiva de modelos de predicción de dosis	9
3. HIPÓTESIS	11
4. OBJETIVOS.....	13
5. PACIENTES Y MÉTODOS	15
5.1. Artículos publicados	16
6. RESULTADOS	18
6.1. Desarrollo de un algoritmo farmacogenético y validación retrospectiva.	18
6.2. Desarrollo de un método eficiente de genotipado	30
6.3. Protocolo de un ensayo clínico para la evaluación de la eficiencia y efectividad del algoritmo farmacogenético	35
7. DISCUSIÓN.....	45
8. CONCLUSIONES.....	54
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

ANEXO I: ARTÍCULOS PUBLICADOS

ANEXO II: ABSTRACTS PUBLICADOS

ANEXO III: PREMIO LILLY

ANEXO IV: APLICACIÓN WEB AJUSTE FARMACOGENÉTICO

ABREVIATURAS

1. ABREVIATURAS

AEMyPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

ApoE: Apolipoproteína E

BLAST Basic Local Alignment Search Tool

CAIBER: Consorcio de Apoyo a la Investigación Biomédica en Red

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

CrCl: Aclaramiento de creatinina

CRD: Cuaderno de recogida de datos

CYP2C9: Isoforma 2C9 del citocromo P450

CYP4F2: Isoforma 4F2 del citocromo P450

DC: Cohorte de derivación

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EACPT: European Association of Clinical Pharmacology and Therapeutic

ETEV: Enfermedad tromboembólica venosa

EU-PACT: European Pharmacogenetics of Anticoagulant Therapy

FA: Fibrilación auricular

FIS: Fondo de investigación sanitaria

GGCX: γ -glutamil carboxilasa

HBPM: Heparina de bajo peso molecular

IC95%: Intervalo de confianza al 95%

INR: International Normalized Ratio

ISTH: International society on Thrombosis and Haemostasis

MAE: Error medio absoluto

ME: Error medio

MLR: Regresión lineal múltiple

NNG: Número necesario a genotipar

OR: Odds ratio

R²: Coeficiente de determinación

RAR: Reducción absoluta del riesgo

SD: Desviación estándar

SEFC: Sociedad Española de Farmacología Clínica

SNP: Single nucleotide polymorphism

TC: Cohorte test o de validación

TEP: Tromboembolismo pulmonar

TVP: Trombosis venosa profunda

VKORC1: Complejo 1 de la vitamina K epóxido reductasa

INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Farmacogenética y anticoagulantes orales

La respuesta terapéutica a un tratamiento farmacológico en los seres humanos presenta una enorme heterogeneidad, tanto en lo que se refiere a la eficacia del tratamiento, como a sus efectos adversos o tóxicos. Entre las causas posibles de esta variabilidad en la respuesta terapéutica figuran la patogenia y la gravedad de la enfermedad del paciente, la administración concomitante de otros fármacos y las características propias de cada individuo, (edad, sexo, peso, factores nutricionales, función hepática, renal, etc.). Pese a la importancia de estos factores sobre la eficacia y seguridad de los fármacos, parece evidente que las diferencias interindividuales en la biodisponibilidad y metabolismo de los medicamentos (expresadas por sus características farmacocinéticas) y las diferencias en las estructuras celulares y moleculares que sirven de diana a los fármacos, reguladas ambas por mecanismos genéticos, pueden tener un peso específico aún mayor sobre la eficacia y toxicidad de los medicamentos que las circunstancias anteriormente citadas (1,2)

Así, en las últimas décadas, el gran desarrollo de la biología molecular y del conocimiento del genoma humano han permitido profundizar en aquellos factores genéticos que influyen en la variabilidad interindividual que existe en la respuesta (eficacia y tolerancia) a los medicamentos, desarrollando dentro de la farmacología una nueva disciplina denominada *Farmacogenética*. Su objetivo es la personalización o individualización terapéutica, pues tiene el potencial de identificar el fármaco y la dosis que va a ser con más probabilidad eficaz y segura para cada paciente.

Acenocumarol es un anticoagulante oral antagonista de la vitamina K, derivado de la cumarina, utilizado en España y en diversos países europeos (Francia, Irlanda, Reino Unido, Holanda, Austria, Bélgica, Italia, Portugal, Polonia, Suiza y Hungría), así como otros países (Argentina, Chile, India, Ucrania, Israel, México o Canadá) (3). Se trata de un fármaco muy efectivo para el tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa (trombosis venosa profunda y tromboembolismo pulmonar) así como para la profilaxis primaria y secundaria de eventos cardioembólicos en pacientes con fibrilación auricular y portadores de válvulas cardíacas mecánicas (4).

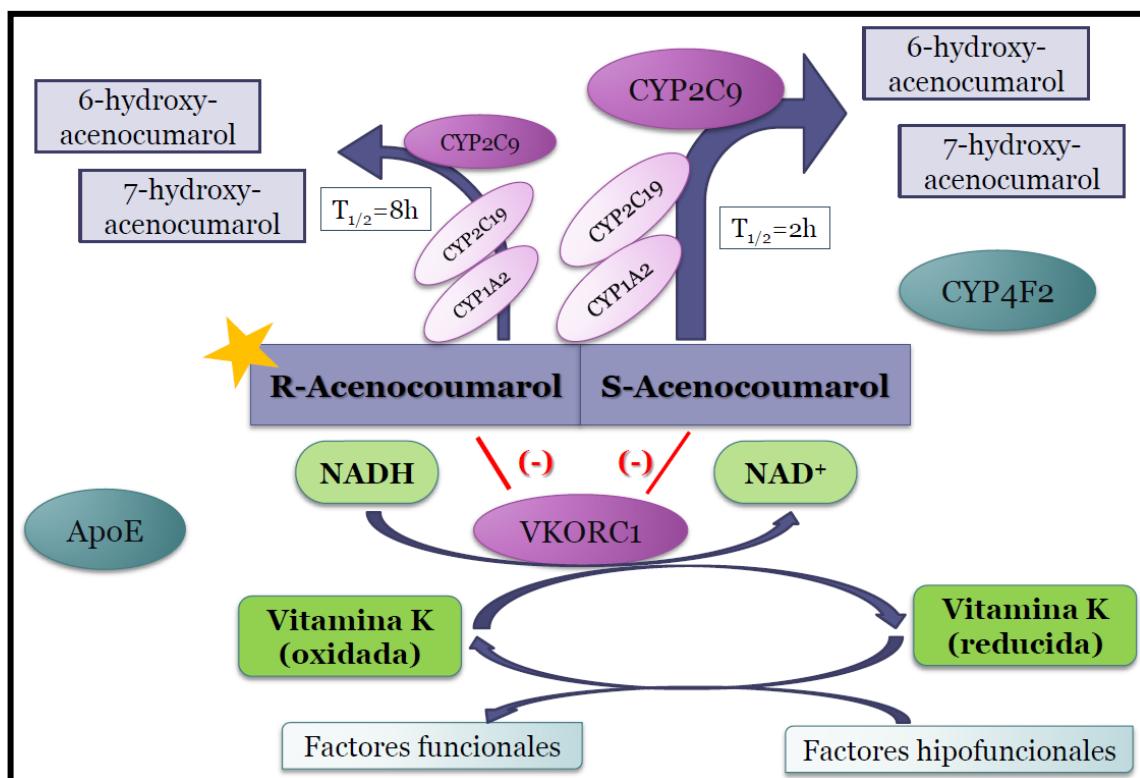
Su uso está ampliamente extendido en nuestro medio, estimándose que más de un 1% de la población requiere terapia anticoagulante oral y que sus indicaciones sufren un importante incremento anual (5). A pesar de ello, es un fármaco con un estrecho margen terapéutico y una gran variabilidad interindividual en la farmacocinética y farmacodinamia. Esto determina que su utilización requiera un ajuste de dosis difícil y prolongado, de manera que el tiempo necesario para alcanzar un efecto dinámico (INR) estable pueda llegar a 40,27 días (IC95%: 35,9-44,6 días) en el caso de la warfarina (6-8). Además su uso se asocia a una elevada incidencia de complicaciones secundarias tanto a la sobredosificación (eventos hemorrágicos), como a su infradosificación (retrombosis) (4) especialmente cuando no se alcanza con rapidez o no se mantiene en el tiempo una dosis de INR estable.

Entre los factores que influyen en la variabilidad interindividual en la dosis administrada necesaria se han descrito factores socio-demográficos del paciente (edad, peso, talla, ingesta variable de vitamina K en la dieta, hábito tabáquico,...) y factores clínicos (comorbilidad, interacciones farmacológicas, interacciones con productos de herbolario,...) (9-13). Sin embargo los factores clínicos, según diversos estudios, sólo contribuyen aproximadamente un 20% a la variabilidad en los requerimientos de dosis, permaneciendo hasta hace pocos años desconocido otros factores importantes: los factores genéticos. Así, los anticoagulantes orales antagonistas de la vitamina K son candidatos ideales para estudiar el paradigma de la dosificación basada en la farmacogenética.

En los últimos años se ha realizado un gran número de estudios con warfarina, y en menor número con acenocumarol, que han intentado profundizar en la relación entre distintas variantes genotípicas en genes implicados tanto en la farmacocinética como en la farmacodinamia de estos fármacos, y los requerimientos de dosis para conseguir un INR estable y dentro del rango terapéutico diana. A nivel farmacocinético (ver figura 1), la eliminación de ambos enantiómeros de acenocumarol (R- y S-) depende de su biotransformación hepática por la isoenzima 2C9 del citocromo P450 (cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9; chromosome 10), también llamado CYP2C9 (14). Aquellos pacientes portadores de alelos defectivos (en particular *2 y *3, polimorfismos frecuentes en población caucásica) requieren menor dosis de acenocumarol para conseguir un INR dentro de rango, teniendo un riesgo aumentado de

presentar un evento hemorrágico (15). A nivel farmacodinámico (ver figura 1) acenocumarol realiza su efecto reduciendo la regeneración de vitamina K a través de la inhibición de la vitamina K epóxido reductasa. Esta enzima está codificada por el gen VKORC1 (subunidad 1 del complejo vitamina K epóxido-reductasa) (12). Se ha estudiado la contribución del haplotipo A de este gen, también llamado alelo *2, en los requerimientos de dosis, describiendo que aquellos pacientes portadores de este alelo requieren una reducción de dosis para conseguir un INR dentro de rango. En conjunto, estos dos genes contribuyen en torno al 30-50% a la variabilidad de la cumarinas, tanto warfarina como acenocumarol (4, 12, 13, 16-20). Estos factores descritos son los únicos de los que existía suficiente evidencia en el momento en que se planificó este proyecto (finales del año 2006), por lo que el primer protocolo que se redactó, y para el que se recibió una ayuda del Fondo de Investigación Sanitaria en su convocatoria del año 2007 (FIS PI070710) únicamente estaba previsto genotipar las variantes alélicas de los genes CYP2C9 y VKORC1.

Figura 1: Farmacocinética y farmacodinamia del acenocumarol



Posteriormente se identificaron otros polimorfismos que influyen en la dosis de warfarina y acenocumarol necesaria para mantener un INR estable. El CYP4F2 hidroxilaría la cadena lateral como primer paso en la inactivación de la vitamina E, aunque su papel en la vía vitamina K/acenocumarol no se conoce todavía (21-23). La apolipoproteína E (ApoE) por su parte, media la captación de lipoproteínas ricas en vitamina K en el hígado y otros tejidos (24,25). Inicialmente la influencia de estos genes se describió para warfarina, momento en el cual decidimos ampliar nuestro proyecto e incluir estos dos genes en nuestro estudio con el fin de demostrar su influencia también para acenocumarol. Aunque en la actualidad existen ya trabajos que describen esta influencia, hasta el momento no hay ningún trabajo publicado que la haya demostrado de manera conjunta para estos cuatro genes, añadido a los factores clínico-demográficos ya descritos.

2.2. Algoritmos farmacogenéticos de ajuste de dosis

Una vez demostrada la influencia de estos factores genéticos y clínicos en la dosis de acenocumarol necesaria para mantener un INR estable, es preciso desarrollar nuevas estrategias de predicción de la dosis apropiada de este fármaco. En el momento de iniciar este proyecto de investigación (finales de 2006-principios de 2007) se estaban desarrollando varios algoritmos farmacogenéticos para warfarina (26-35), los primeros en el año 2007, pero no existía ninguno para acenocumarol. Posteriormente se describieron dos algoritmos para acenocumarol en poblaciones caucásicas. El primero desarrollado únicamente para acenocumarol en el año 2010 (20) está basado en una muestra pequeña e incluye como variables genéticas el CYP2C9 y VKORC1. Estos autores desarrollan un “score” (AGS) basado en el número de alelos asociados a requerimientos elevados de dosis (score máximo = 100). Un AGS superior a 70 se asocia a un incremento del *odds ratio* (OR) de requerir dosis altas de acenocumarol (OR: 3,347; 95% CI: 1,112–10,075; P=0,032). El segundo ha sido publicado por el grupo EU-PACT (European Pharmacogenetics of Anticoagulant Therapy) en el año 2011 (36) e incluye variables clínicas (edad, sexo, peso, talla y uso de amiodarona) y genéticas (CYP2C9 y VKORC1). Este algoritmo es capaz de predecir la dosis estable de acenocumarol en base a estas variables, explicando una variabilidad en los requerimientos de dosis de 52,6%.

Hasta el momento no se ha desarrollado ningún algoritmo que incluya otros genes que se han asociado a la dosis necesaria de las cumarinas, como CYP4F2 o ApoE. Por otro lado, para la implementación en la práctica clínica habitual de algoritmos farmacogenéticos que incluyen varios genes, es necesario el desarrollo y validación de nuevas técnicas de genotipado que sean eficientes y permitan realizar determinaciones de manera rápida y económica.

2.3. Validación prospectiva de modelos de predicción de dosis

El siguiente paso, ineludible para la validación e implantación de estos métodos de ajuste individualizado de dosis, es demostrar con evidencias clínicas de alto nivel la efectividad de algoritmos de dosificación farmacogenéticos. Actualmente existe en marcha un ensayo clínico en Europa con fármacos antagonistas de la vitamina k (incluyendo acenocumarol) teniendo en cuenta variables clínicas y farmacogenéticas (CYP2C9 y VKORC1) en pacientes que precisan anticoagulación oral por enfermedad tromboembólica venosa (ETEV) o fibrilación auricular (FA) (37) y otro en USA con warfarina (ClinicalTrial.com; NCT00511173). Actualmente estos dos ensayos clínicos se encuentran en fase de reclutamiento.

HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

La creación de un algoritmo de dosificación farmacogenético de acenocumarol que incluya factores demográficos, clínicos y genéticos (genes del CYP2C9, VKORC1, ApoE y CYP4F2) permitirá predecir de forma más precisa y rápida la dosis necesaria para alcanzar un INR estable dentro del rango terapéutico diana, mejorando la eficacia del tratamiento, así como disminuyendo el número de visitas de control y la aparición de episodios de hemorragia severa, y consiguiéndose, por tanto, una monitorización más costo-efectiva.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

1. Determinar la contribución de los factores genéticos y los factores no genéticos sobre la variabilidad en los requerimientos de dosis del acenocumarol para alcanzar un INR estable y dentro de rango.
2. Desarrollar un algoritmo farmacogenético de dosificación para el acenocumarol que incluya las variables ya consideradas en la actualidad en la práctica clínica así como las características genotípicas del paciente en relación a los polimorfismos en estudio.
3. Validar de forma retrospectiva el algoritmo farmacogenético de dosificación en un grupo de pacientes incluidos en esta primera fase del estudio.
4. Desarrollar un método de genotipado que permita determinar los polimorfismos genéticos incluidos en el algoritmo de dosificación de una manera rápida, sencilla y barata.
5. Plantear la validación prospectiva del algoritmo farmacogenético que se desarrolle con el fin de evaluar su eficiencia en la práctica clínica habitual.

PACIENTES Y MÉTODOS

5. PACIENTES Y MÉTODOS

Todos los materiales y métodos utilizados en este proyecto se detallarán en los apartados correspondientes de cada uno de los capítulos de resultados. Los tres estudios incluidos en esta memoria de proyecto de tesis doctoral han sido aprobados por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario La Paz de Madrid. Todos los pacientes incluidos han sido informados y han firmado el consentimiento informado previo a participar en los respectivos estudios. El protocolo del ensayo clínico ha sido además aprobado por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMyPS), como se detallará en el apartado correspondiente.

La planificación de este proyecto de investigación se realizó a finales del año 2006 y principios del año 2007. El primer protocolo del proyecto se redactó en el año 2007. El desarrollo se ha llevado a cabo a lo largo de 3 años (abril de 2008-marzo de 2011), con la ayuda de financiación pública obtenida en las siguientes convocatorias:

- Proyectos de Investigación en Salud. Fondo de Investigación Sanitaria (FIS). Instituto de Salud Carlos III (FIS PI070710). Convocatoria del año 2007.
- Ayudas para el fomento de la traslación de la aplicación terapéutica de medicamentos huérfanos y terapias avanzadas (TRA-010). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Convocatoria del año 2009.

Este proyecto ha dado lugar a 3 publicaciones que dan respuesta a los 5 objetivos generales planteados.

5.1. Artículos publicados

- 1- **TÍTULO:** AN ACENOCOUMAROL DOSING ALGORITHM USING CLINICAL AND PHARMACOGENETIC DATA IN SPANISH PATIENTS WITH THROMBOEMBOLIC DISEASE.

AUTORES: Alberto M. Borobia, Rubin Lubomirov, Elena Ramírez, Alicia Lorenzo, Armando Campos, Raúl Muñoz-Romo, Carmen Fernández-Capitán, Jesús Frías y Antonio J. Carcas.

REVISTA: PLoS One. Factor de Impacto (JCR 2011): 4.092 (Q1)

CITA: Borobia AM, Lubomirov R, Ramírez E, Lorenzo A, Campos A, et al. (2012) An Acenocoumarol Dosing Algorithm Using Clinical and Pharmacogenetic Data in Spanish Patients with Thromboembolic Disease. PLoS ONE 7(7): e41360. doi:10.1371/journal.pone.0041360

- 2- **TÍTULO:** A MULTIPLEX ASSAY TO DETECT VARIATIONS IN THE CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 AND APOE GENES INVOLVED IN ACENOCOUMAROL METABOLISM

AUTORES: Ana M^a López-Parra, Alberto M. Borobia, Carlos Baeza, Eduardo Arroyo-Pardo y Antonio J. Carcas

REVISTA: Clinical Biochemistry. Factor de Impacto (JCR 2011): 2.076 (Q2)

CITA: López-Parra AM, Borobia AM, Baeza C, Arroyo-Pardo E, Carcas AJ. A multiplex assay to detect variations in the CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 and APOE genes involved in acenocoumarol metabolism. Clin Biochem (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.08.005>

- 3- **TÍTULO:** EFFICIENCY AND EFFECTIVENESS OF THE USE OF AN ACENOCOUMAROL PHARMACOGENETIC DOSING ALGORITHM VERSUS USUAL CARE IN PATIENTS WITH VENOUS THROMBOEMBOLIC DISEASE INITIATING ORAL ANTICOAGULATION: STUDY PROTOCOL FOR A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL.

AUTORES: Antonio J. Carcas, Alberto M. Borobia, Marta Velasco, Francisco Abad-Santos, Manuel Quintana, Carmen Fernández-Capitán, Nuria Ruiz-Giménez, Olga Madridano, Pilar Llamas Sillero y PGX-ACE Spanish Investigators Group.

REVISTA: Trials. Factor de Impacto (JCR 2011): 2.496 (Q2)

CITA: AJ Carcas, AM Borobia, M Velasco, F Abad-Santos, M Quintana, C Fernández-Capitán, N Ruiz-Giménez, O Madridano, P Llamas Sillero and PGX-ACE Spanish Investigators Group. Efficiency and effectiveness of the use of an acenocoumarol pharmacogenetic dosing algorithm versus usual care in patients with venous thromboembolic disease initiating oral anticoagulation: Study protocol for a randomized controlled trial. Trials (2012) (In press)

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Desarrollo de un algoritmo farmacogenético y validación retrospectiva.

"An acenocoumarol dosing algorithm using clinical and pharmacogenetic data in spanish patients with thromboembolic disease"

Alberto M. Borobia, Rubin Lubomirov, Elena Ramírez, Alicia Lorenzo, Armando Campos, Raúl Muñoz-Romo, Carmen Fernández-Capitán, Jesús Frías y Antonio J. Carcas.

PLoS ONE 7(7): e41360. doi:10.1371/journal.pone.0041360

- Este trabajo responde a los objetivos 1, 2 y 3.
- Trabajo ganador de los siguientes premios:
 1. Ganador del Premio a la **Mejor Comunicación Oral** en el área de la Farmacogenética y Terapias Biológicas, entregado en el XXII Congreso de la Sociedad Española de Farmacología Clínica (Badajoz, 2009)
 2. Ganador del **Premio Lilly 2012** a la **Mejor Publicación** en el área de la Farmacología Clínica, entregado en el XXV Congreso de la Sociedad Española de Farmacología Clínica (Alicante, 2012)
- Se han presentado resultados parciales de este trabajo en los siguientes congresos Nacionales e Internacionales como **Comunicación Oral**:
 1. XXII Congreso de la *Sociedad Española de Farmacología Clínica (SEFC)*. Badajoz, 2009

"Clinical and genetic factors relating to acenocoumarol dose"

Borobia AM, Lei SH, Fudio S, Piñana E, Lorenzo A, Fernández-Capitán C, Ramírez E, Frías J, Carcas AJ.

-
2. 10th Congress of the *European Association of Clinical Pharmacology and Therapeutic (EACPT)*. Budapest (Hungria), 2011.

“Acenocoumarol dosing algorithm including clinical, demographic and pharmacogenetic data (CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 and ApoE) for use in patients with the thromboembolic disease “

Borobia AM, Lubomirov R, Ramírez E, Lorenzo A, Campos A, Fernández Capitán C, Frías J, Carcas A.J.

- Se han **publicado en formato abstract** resultados parciales de este trabajo en las siguientes revistas Nacionales e Internacionales indexadas:

1. Lorenzo Hernández, **A.M. Borobia Pérez**, C. Navarro San Francisco, A. Martín Quirós, N. Iniesta Arandia, S. Lei, A. Carcas Sansuán y C. Fernández Capitán. Influencia de factores demográficos, clínicos y farmacogenéticos en la dosis estable de acenocumarol en pacientes con enfermedad tromboembólica. Rev Clin Esp. 2009;209 (Espec Congr 1): 242

Factor de impacto: 2.008 (Q2)

2. **Borobia AM**, Lubomirov R, Ramírez E, Lorenzo A, Campos A, Fernández Capitán C, Frías J, Carcas A.J. Acenocoumarol dosing algorithm including clinical, demographic and pharmacogenetic data (CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 and APOE) for use in patients with the thromboembolic disease. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 2011;109 (Suppl. 1):28.

Factor de Impacto: 2.179 (Q2)

ALGORITMO DE DOSIFICACIÓN DE ACENOCUMAROL INCLUYENDO VARIABLES CLÍNICAS Y FARMACOGENÉTICAS EN PACIENTES ESPAÑOLES CON ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Estudio observacional, prospectivo y transversal. Se han incluido pacientes de la Consulta de Enfermedad Tromboembólica del Servicio de Medicina Interna del Hospital Universitario La Paz, durante los meses de abril de 2008 y junio de 2009. Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz.

Pacientes y recogida de datos

Los criterios de inclusión fueron:

- Pacientes con diagnóstico de tromboembolismo pulmonar y/o trombosis venosa profunda
- En tratamiento con dosis estables de acenocumarol (variaciones de dosis semanales <20% en los últimos 3 meses) y un INR dentro del rango 1.8 – 3.5 en los tres meses previos.

Se excluyeron pacientes con:

- Insuficiencia renal (aclaramiento calculado de creatinina < 30 mL/min)
- Enfermedad hepática avanzada (Child-Pugh estadío C)
- Disfunción tiroidea
- Enfermedad oncológica.

A todos los pacientes se les extrajo una muestra de sangre durante la visita clínica para la determinación de las variantes genotípicas de CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 y ApoE, tras haber firmado el consentimiento informado. Se recogió de cada paciente las siguientes variables: edad, sexo raza, peso y talla (y se calculó el Índice de Masa Corporal), hábitos tabáquicos, determinaciones de INR y dosis administrada en los

últimos 3 meses, nivel de estudios del paciente y medicación concomitante. Se realizó también un test de Mini-Mental.

Genotipado

Las muestras de sangre extraídas se almacenaron en tubos con EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) y fueron guardadas a -20°C tras la extracción. Se aisló el DNA usando QuickGene DNA blood kit S (Fujifilm®, Düsseldorf, Germany). Para el genotipado se utilizó la tecnología KASPar® (KBiosciences®, Hoddesdon, UK) para la determinación de los alelos CYP2C9*3 (rs1057910), CYP4F2 (rs2108622), VKORC1 (-1639 G→A = rs9923231) y ApoE (8016 C→T = rs7412 y 7878 T→C = rs429358). Se utilizaron sondas Taqman® (Applied Biosystems®, Foster City, USA) para la detección del alelo CYP2C9*2 (rs1799853). Se calculó el equilibrio de Hardy-Weinberg mediante el software STP-Analyzer 1.2A (Istech, INC®).

Generación del algoritmo y evaluación de su exactitud y precisión.

Se ha seleccionado el 80% de los pacientes incluidos (estratificando por el genotipo de CYP2C9 anidado a los genotipos VKORC1 A/A vs. VKORC1 A/G y G/G) que han constituido la cohorte de derivación (DC) utilizada para la generación del modelo de predicción. El 20% restante ha constituido la cohorte de validación o test (TC), que se ha utilizado para la validación retrospectiva del modelo.

Tras un análisis preliminar utilizando test univariantes y multivariante, y tras revisión de los métodos utilizados por otros autores, se ha seleccionado una regresión lineal múltiple (MLR) para la generación del modelo de predicción. La variable dependiente utilizada ha sido la dosis semanal necesaria para alcanzar un INR estable (con transformación logarítmica), y como variables independientes todas las variables demográficas, clínicas y variantes genotípicas recogidas, tal como se especifican en la siguiente tabla (tabla 1):

Tabla 1: Variables demográficas, clínicas y genéticas incluidas

Variable	
Sexo	Hombre o Mujer
Edad	En años
Índice de Masa Corporal (IMC)	En kg/m ²
Fumador	Si o No
Test de Mini-Mental	0-30
Nivel de estudios	Sin estudios, Escuela Primaria, Educación Secundaria, Estudios Universitarios
Tratamiento con inductores enzimáticos	Si (fenitoína, carbamazepina and rifampicina) o No
Tratamiento con inhibidores enzimáticos	Si (azoles, inhibidores de la bomba de protones y estatinas) o No
Tratamiento con amiodarona	Si o No
Tratamiento con antiinflamatorios no esteroideos	Si o No
<i>CYP2C9</i>	
*1/*2	Si, No o Desconocido ⁽¹⁾
*1/*3	Si, No o Desconocido
*2/*2 or *2/*3 or *3/*3	Si, No o Desconocido
<i>VKORC1</i>	
A/G	Si o No
A/A	Si o No
<i>CYP4F2</i>	
VM	Si, No o Desconocido ⁽²⁾
MM	Si, No o Desconocido
<i>ApoE</i> rs7412	
C/T	Si or No
T/T	Si or No
<i>ApoE</i> rs429358	
T/C	Si, No o Desconocido ⁽³⁾
C/C	Si, No o Desconocido

(1) Un caso para *CYP2C9*(2) Seis casos para *CYP4F2*(3) Tres casos para *ApoE* rs429358

Se ha desarrollado inicialmente un modelo de regresión lineal múltiple para la cohorte entera y para la cohorte de derivación, mediante el método “introducir”, “por pasos hacia delante” y “por pasos hacia atrás” mediante SPSS. Después de este proceso se han seleccionado aquellas variables con valores “p” (significancia) por debajo de 0,1 en todos los análisis, tal como se observa en la tabla suplementaria 2 de este primer artículo (anexo).

Estas variables han sido incluidas en el modelo final (algoritmo farmacogenético) utilizando la cohorte de derivación. Con el fin de realizar posteriormente comparaciones con una aproximación clínica de ajuste de dosis, se ha construido un modelo clínico, utilizando la misma metodología que el modelo farmacogenético, pero incluyendo como variables independientes todas excepto las variantes genéticas.

La creación de los modelos farmacogenético y clínico se ha evaluado en tres cohortes: cohorte total, cohorte de derivación y cohorte de validación, calculando el coeficiente de determinación (R^2) para cada modelo, como expresión de la variabilidad total explicada por el modelo. Para evaluar la contribución de cada grupo de variables (clínico-demográficas y genéticas) se ha calculado la R^2 no ajustada de las variables clínicas y se han ido añadiendo el resto de variables del modelo.

Tras retransformación de la dosis predicha por los modelos, se ha calculado el error medio (ME; media de las diferencias entre las dosis observadas y predichas), error medio absoluto (MAE; diferencia absoluta entre las dosis observadas y predichas), y el ME y MAE expresado como porcentaje de la dosis de acenocumarol observada (%ME y %MAE). Para estos parámetros se ha calculado la desviación estandar y el intervalo de confianza al 95% (IC 95%). El ME refleja la exactitud en la predicción y el MAE la precisión de predicción del modelo.

Para todos los análisis se ha utilizado el software estadístico SPSS 16.0 (SPSS Inc., IL, USA).

Relevancia clínica del modelo

Para evaluar la relevancia clínica del modelo, se han clasificado los pacientes en tres grupos de dosis: pacientes con requerimientos bajos ($<$ percentil 25; ≤ 11 mg/semanales), con requerimientos altos de dosis ($>$ percentil 75; ≥ 21 mg/semanales) y aquellos pacientes con requerimientos medios (percentil 25 – 75). Después se calculó el porcentaje de pacientes en los que la dosis predicha se encontraba dentro del $\pm 20\%$ de la dosis estable observada.

Para evaluar el beneficio potencial de usar un algoritmo farmacogenético, se ha usado el número necesarios a genotipar (NNG), definido como número de pacientes que es necesario genotipar para evitar un paciente mal clasificado (en uno de los tres grupos definidos previamente) por el algoritmo farmacogenético comparado con el modelo clínico.

RESULTADOS

Características de los pacientes

Se han incluido un total de 147 pacientes caucásicos, 117 en la cohorte de derivación (DC) y 30 en la cohorte de validación (TC). Las características de los pacientes se resumen en la tabla 2. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre ambas cohortes. No hay ningún paciente en tratamiento con amiodarona o inductores enzimáticos, ni portadores del alelo rs7412 de la ApoE en la cohorte de validación. Todos los SNP se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Algoritmo clínico y farmacogenético de dosificación de acenocumarol

La tabla 3 recoge las variables finalmente incluidas en ambos algoritmos tras la realización de la regresión lineal múltiple, incluyendo los valores β y la significancia de cada una de ellas. La tabla 4 muestra la variabilidad explicada por cada uno de los factores en ambos algoritmos. La variabilidad total explicada (R^2) por el modelo farmacogenético es de 60,6%, mientras que para el clínico es del 22,0%. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p<0,001$; Test de McNemar's para proporciones pareadas).

Exactitud y precisión de ambos algoritmos de dosificación

La exactitud (ME y %ME) y precisión (MAE y %MAE) del algoritmo farmacogenético fue muy similar en las cohortes de derivación, validación y total (tabla 5). El ME fue de -0,66 (SD 5,01), 0,31 (SD 4,99) y -0,46 (SD 5,00) en la cohorte de derivación, validación y total, respectivamente. La precisión, parámetro clínicamente más relevante, es también baja y similar en todas las cohortes: (3,63 mg ($\pm 3,50$) en la de derivación, 3,75 mg ($\pm 3,24$) en la de validación y 3,65 mg ($\pm 3,44$) en la total.

Tabla 2: Características de ambas cohortes

Variables	Cohorte de derivación (N=117)	Cohorte de validación (N=30)	Significancia (p)
Sexo [n (%)]			0,29
Hombre	61 (52,1)	14 (46,7)	
Mujer	56 (47,9)	16 (53,3)	
Edad, en años [media (SD)]	67,6 (17)	67,5 (17,7)	0,73
Peso, en kilogramos [media (SD)]	74,3 (15,4)	75,5 (13,5)	0,59
Talla, en metros [media (SD)]	1,63 (0,1)	1,62 (0,1)	0,9
Índice de Masa Corporal (IMC), en kg/m ² [media (SD)]	27,8 (4,7)	28,6 (4,3)	0,66
Fumador [n (%)]	12 (10,3)	5 (16,7)	0,96
Test de Mini-mental [media (SD)]	27,0 (4,0)	27,0 (3,6)	0,56
Dosis semanal de acenocumarol [media (SD)]	16,7 (7,4)	15,7 (6,0)	0,46
Nivel de estudios			0,83
Sin estudios	14 (12,2)	6 (20,0)	
Escuela primaria	55 (47,8)	14 (46,6)	
Eduación secundaria	29 (25,2)	6 (20,0)	
Estudios universitarios	17 (14,8)	4 (13,4)	
Medicación concomitante [n (%)]			
Inductores enzimáticos ⁽¹⁾	5 (4,3)	0	0,25
Inhibidores enzimáticos ⁽²⁾	63 (54,7)	16 (53,3)	1,00
Amiodarona	2 (1,7)	0	0,47
Anti-inflamatorios no esteroideos	17 (14,8)	1 (3,3)	0,12
<i>CYP2C9</i> [n (%)] ⁽³⁾			0,62
*1/*1	60 (51,7)	19 (63,3)	
*1/*2	37 (31,9)	6 (20)	
*1/*3	16 (13,8)	4 (13,3)	
*2/*2 or *2/*3 or *3/*3	3 (2,6)	1 (3,3)	
<i>VKORC1</i> [n (%)]			0,34
G/G	49 (41,9)	9 (30)	
A/G	49 (41,9)	17 (56,7)	
A/A	19 (16,2)	4 (13,3)	
<i>CYP4F2</i> [n (%)] ⁽⁴⁾			0,24
VV	46 (40,4)	15 (55,6)	
VM	54 (47,4)	8 (29,6)	
MM	14 (12,3)	4 (14,8)	
<i>ApoE</i> rs7412 [n (%)]			0,133
C/C	103 (88,0)	23 (76,7)	
C/T	12 (10,3)	7 (23,3)	
T/T	2 (1,7)	0	
<i>ApoE</i> rs429358 [n (%)]			0,551
T/T	94 (82,5)	20 (76,9)	
T/C	18 (15,8)	6 (23,1)	
C/C	2 (1,7)	0	

(1) Los inductores enzimáticos incluidos han sido fenitoína, carbamazepina and rifampicina.

(2) Los inhibidores incluidos han sido azoles, inhibidores de la bomba de protones y AINEs.

(3) Para el *CYP2C9*, se ha usado *2 y *3 para designar a los alelos rs1799853 y rs1057910)

(4) VV=homozigoto V433; VM= heterozigoto V433M; MM=homozygous M433.

Tabla 3: Variables que se retuvieron en el modelo final clínico y farmacogenético

Algoritmo farmacogenético			Algoritmo clínico		
Beta	Variable	p	Beta	Variable	p
Variables clínicas					
-0,294	Edad	<0,0001	- 0,01	Edad	0,001
0,240	IMC	<0,0001	0,016	IMC	0,053
0,119	Inductores enzimáticos	0,062	0,41	Inductores enzimáticos	0,022
-0,142	Amiodarona	0,026	- 0,45	Amiodarona	0,13
CYP2C9					
-0,257	CYP2C9 *1/*3	<0,0001			
-0,253	CYP2C9 *2/*2 or *2/*3 or *3/*3	<0,0001			
VKORC1					
-0,150	VKORC1 A/G	0,039			
-0,533	VKORC1 A/A	<0,0001			
CYP4F2					
0,199	CYP4F2 MM	0,002			
ApoE					
0,123	ApoE (rs7412)T/T	0,067			

Beta: coeficiente estandarizado de regresión, que refleja el peso relativo de cada variable incluida en el modelo.

Tabla 4: R² no ajustada para cada grupo de variables en el modelo final

Algoritmo farmacogenético		
Beta	Variable	R ² (%)
Variables clínicas		22,0%
Edad		22,0%
IMC		
Inductores enzimáticos		
Amiodarona		
CYP2C9		11,7%
CYP2C9 *1/*3		33,7%
CYP2C9 *2/*2 or *2/*3 or *3/*3		
VKORC1		22,0%
VKORC1 A/G		55,7%
VKORC1 A/A		
CYP4F2		3,6%
CYP4F2 MM		59,3%
ApoE		1,3%
ApoE (rs7412)T/T		60,6%

Tabla 5: Capacidad predictiva de ambos algoritmos

	Algoritmo farmacogenético	Algoritmo clínico	Diferencia (IC 95%)	p
Cohorte de derivación (n=117)				
R ² ‡	60,6%‡	22,0%		p<0,001
ME	-0,66 (5,01)	-1,22 (6,68)	-0,55 (-1,29 to 0,18)	0,142
MAE	3,63 (3,50)	5,08 (4,48)	1,46 (0,88 to 2,04)	<0,001
%ME	4,43 (33,59)	8,92 (50,20)	4,49 (-2,60 to 11,58)	0,212
%MAE	23,43 (24,38)	34,53 (37,38)	11,09 (5,04 to 17,16)	<0,001
Cohorte de validación (n= 30)				
R ² ‡	38,8%‡	7,0%		p<0,001
ME	0,31 (4,99)	-0,13 (5,87)	0,43 (-1,91 to 1,05)	0,554
MAE	3,75 (3,24)	4,86 (3,18)	1,11 (-0,16 to 2,37)	0,083
%ME	9,96 (34,63)	12,08 (45,76)	2,11 (-11,97 to 16,20)	0,761
%MAE	25,76 (24,81)	35,05 (31,21)	9,29 (-3,16 to 21,74)	0,138
Cohorte total (n=147)				
R ² ‡	56,8%‡	19,0%		p<0,001
ME	-0,46 (5,00)	-0,99 (6,52)	-0,53 (-1,18 to 0,13)	0,113
MAE	3,65 (3,44)	5,03 (4,23)	1,38 (0,86 to 1,91)	<0,001
%ME	5,57 (33,76)	9,57 (49,18)	4,00 (-2,26 to 10,26)	0,208
%MAE	23,9 (24,40)	34,64 (36,09)	10,72 (5,34 to 16,11)	<0,001

ME: error medio (predicho-observado); %ME: error medio expresado como porcentaje (%ME= ME/Observado*100); MAE: error medio absoluto (=SQR[(Predicho-Observado)²]); %MAE: error medio absoluto expresado como porcentaje (%MAE= MAE/Observado*100). ‡ Test de McNemar's para proporciones pareadas.

Por otro lado, la variabilidad explicada por el algoritmo clínico es menor que la obtenida para el farmacogenético en todas las cohortes: 22,0% versus 60,6% en la cohorte de derivación, 7,0% vs. 38,8% en la de validación y 19,0% vs. 56,8% en la cohorte total, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (tabla 5). También el MAE (y %MAE) es significativamente superior en el algoritmo clínico comparado con el farmacogenético en las cohortes de derivación y total, no así en la de validación ($p = 0,083$ para el MAE).

Desde un punto de vista clínico, el cálculo del porcentaje de pacientes correctamente clasificados en el $\pm 20\%$ de la dosis observada para un INR estable es un parámetro más relevante. El algoritmo farmacogenético predice correctamente el 57,1% en la cohorte total, 59,8% en la cohorte de derivación y un 46,7% en la cohorte de validación. Estos porcentajes son menores para el algoritmo clínico: 34,7%, 37,6% y 23,3%, respectivamente (tabla 6).

Tabla 6: Porcentaje de pacientes correctamente clasificados ($\pm 20\%$ de la dosis real)

	% clasificado correctamente	RAR (95% CI)	NNG (95% CI)	
	Farmacogenético	Clínico		
Cohorte de derivación (n=117)	70/117 59,8 %	44/117 37,6 %	22,0 % (10 to 35)*	4,5 (2,88 to 10,27)
Cohorte de validación (n=30)	14/30 46,7 %	7/30 23,3 %	23,3 % (0,0 to 47)	4,3 (-2,14 to 1359)
Cohorte total (n=147)	84/147 57,1 %	51/147 34,7 %	22,0 % (11 to 34)*	4,5 (2,98 to 8,81)

RAR: Reducción absoluta del riesgo. NNG: Número de pacientes necesario genotipar para evitar un paciente mal clasificado* p<0,001

Comportamiento de los algoritmos clínico y farmacogenético por grupo de dosis

La tabla 7 muestra la diferencia en la precisión entre los algoritmos clínico y farmacogenético en los tres grupos de dosis predeterminados (los datos completos se muestran en la tabla 3 del material suplementario del artículo). En la cohorte total se encuentran diferencias estadísticamente significativas en los grupos de requerimientos bajos y altos de dosis, pero no en los requerimientos medios. En el grupo de requerimientos bajos, la dosis predicha por el algoritmo clínico sobreestima un 60.60% la dosis, mientras que el algoritmo farmacogenético únicamente sobreestima un 37.38% (p = 0.005). En el grupo de requerimientos altos de dosis, ambos algoritmos infraestiman la dosis, aunque en menor grado para el algoritmo farmacogenético (22.45%, versus 31.60% en el algoritmo clínico; p<0.001). En la cohorte de validación únicamente existe una tendencia en el grupo de requerimientos altos de dosis (tabla 3 del material suplementario del artículo).

Tabla 7: Precisión de ambos modelos expresada como MAE en la cohorte total

Grupo de dosis	Farmacogenético	Clínico	Diferencia	p*
Bajo (n=46)				
MAE	3,36 (3,13)	4,95 (3,30)	1,59 (3,84) 0,44 to 2,75	0,008
% clasificado correctamente	41%	13%	29 (11 to 46)	0,0049
Medio (n=62)				
MAE	2,28 (2,04)	2,81 (2,49)	0,52 (2,43) -0,10 to 1,14	0,099
% clasificado correctamente	77%	61%	16 (0 to 32)	0,051
Alto (n=39)				
MAE	6,13 (4,18)	8,62 (4,93)	2,49 (3,08) 1,50 to 3,49	<0,001
% clasificado correctamente	44%	18%	26 (6 to 45)	0,0272

* Comparación entre grupos calculado mediante el test de "t" de Student para muestras pareadas.

La tabla 7 también muestra el porcentaje de pacientes correctamente clasificados en cada uno de los tres grupos. En aquellos pacientes con requerimientos bajos el algoritmo farmacogenético tiene una predicción mejor que el algoritmo clínico (41% vs. 13% (diferencia absoluta: 29%; IC 95%: 11–46). Ocurre algo similar en los pacientes con requerimientos altos de dosis: 44% vs. 18% (diferencias absoluta: 26%; IC 95%: 6–45). En pacientes con requerimientos medios, estas diferencias son menores, aunque rozan la significancia estadística: 77% para el algoritmo farmacogenético vs. 61% para el clínico (diferencias absoluta: 16%; IC 95%: 0–32).

Para estimar la potencial relevancia clínica del modelo, se ha calculado el NNG. El porcentaje global de pacientes correctamente clasificados es la cohorte total es del 57,1% en el algoritmo farmacogenético versus el 36,7% cuando se usa el algoritmo clínico. Esto supone una diferencia absoluta de 22% y, por tanto, un NNG de 4,5 (IC 95%: 3,0–8,8). Estos datos son similares en la cohorte de derivación y de validación (tabla 6).

6.2. Desarrollo de un método eficiente de genotipado

“A multiplex assay to detect variations in the CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 and APOE genes involved in acenocoumarol metabolism”

Ana M^a López-Parra, **Alberto M. Borobia**, Carlos Baeza, Eduardo Arroyo-Pardo y Antonio J. Carcas

Clin Biochem (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.08.005>

- Este trabajo responde al objetivo 4

ENSAYO MULTIPLEX PARA LA DETECCIÓN DE VARIANTES EN LOS GENES DEL CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 Y APOE INVOLUCRADAS EN EL METABOLISMO DE ACENOCUMAROL

Una vez descritas las variantes genéticas que influyen en la dosis estable de acenocumarol necesaria para alcanzar un INR estable y dentro de rango, es necesario el desarrollo de una técnica de genotipado que permita su implementación en la rutina asistencial y que, por tanto, sea fácil de realizar, rápida y con un coste asumible en el Sistema Nacional de Salud.

MATERIAL Y MÉTODOS

Variantes alélicas estudiadas

Se han incluido aquellas variantes genéticas descritas en el anterior artículo que influyen en la dosis estable de acenocumarol: alelos CYP2C9*2 (rs1799853; 430 C>T) y CYP2C9*3 (rs1057910; 1075 A>C), mutación V433M del CYP4F2 (rs2108622; 1347G>A), haplotipo A del VKORC1 o VKORC1*2 (rs9934438; 1173C>T) y variantes alélicas de la ApoE (rs429358 y rs7412). Aunque la variante rs429358 de la ApoE no ha sido incluida en el algoritmo farmacogenético de dosificación, se ha decidido incluir en este estudio dado que es posible que con un tamaño muestral mayor esta variable pueda ser incluida en un futuro en el algoritmo.

Muestras de DNA

Se han analizado un total de 152 muestras obtenidas de la cohorte del proyecto anteriormente descrito. Todos los pacientes habían firmado previamente el consentimiento informado. El estudio ha sido aprobado del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz de Madrid. Las muestras de DNA, extraídas mediante el kit QuickGene DNA blood kit S (Fujifilm®) se encontraban almacenadas a -20°C.

PCR multiplex

Los cebadores (“primers”) para la amplificación de la PCR se diseñaron para tener una temperatura de anillamiento (o “annealing) entre 60°C y 65°C. Se utilizó el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y AutoDimer® para evaluar posibles amplificaciones inespecíficas, potenciales horquillas (o “hairpin”) y estructuras primer-dimer. En la tabla 1 del artículo se detalla información sobre los cebadores, productos de amplificación y SNP. Estos cebadores se han combinado en una reacción simple multiplex, generando productos de PCR de distintos tamaños (191-578bp). Dada la proximidad entre los dos polimorfismos de la ApoE, se decidió amplificar en el mismo fragmento, por lo que finalmente se utilizaron únicamente 5 pares de cebadores. Las reacciones de PCR se realizaron usando 2-20ng de DNA genómico, PCR Master Mix de QIAGEN Multiplex PCR kit (Qiagen®) y 0.2μl de los cebadores. La amplificación consistió en una temperatura de 95°C durante 15 minutos, seguido de 37 ciclos de 30 segundos a 94°C, 90 segundos a 60°C y 90 segundos a 72°C, con una extensión final de 10 minutos a 72°C.

Con el objetivo de evaluar la sensibilidad del ensayo, se han realizado diluciones seriadas de DNA a una concentración de 1:2, 1:10, 1:20, 1:100, 1:500 en cinco muestras con rangos de concentración de 54.2-68ng/μl.

En la reacción de minisecuenciación, los cebadores de SNaPshot se diseñaron utilizando el mismo programa descrito para la PCR, y se realizó en 5μl de volumen usando 1.5μl de productos de PCR purificado, 0.096-0.58μM de primers y 2μl de reacción de SNaPshot. La PCR consistió en 25 ciclos durante 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C y 30 segundos a 60°C.

Detección por electroforesis

Los productos purificados de la minisecuenciación ($0.5\mu\text{l}$) se mezclaron con $9\mu\text{l}$ de HiDi™ formamida y $0.5\mu\text{l}$ de GeneScan-120 LIZ tamaño standard (Applied Biosystems©) y desnaturizados a 95°C durante 5 minutos. La separación de los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis capilar en un analizador de DNA ABI310 (Applied Biosystems©). La lectura se realizó mediante el software GeneScan 3.7 software (Applied Biosystems©) (figura 1).

Validación del método

Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos por el SNapShot, se compararon estos resultados con los obtenidos en el anterior trabajo, donde el genotipado se realizó en el Centro Nacional de Genotipado (CeGen) mediante las siguientes técnicas: tecnología KASPar® (KBiosciences©) para CYP2C9*3, CYP4F2, VKORC1 y ApoE, y sondas Taqman® (Applied Biosystems©) para la detección de CYP2C9*2.

RESULTADOS

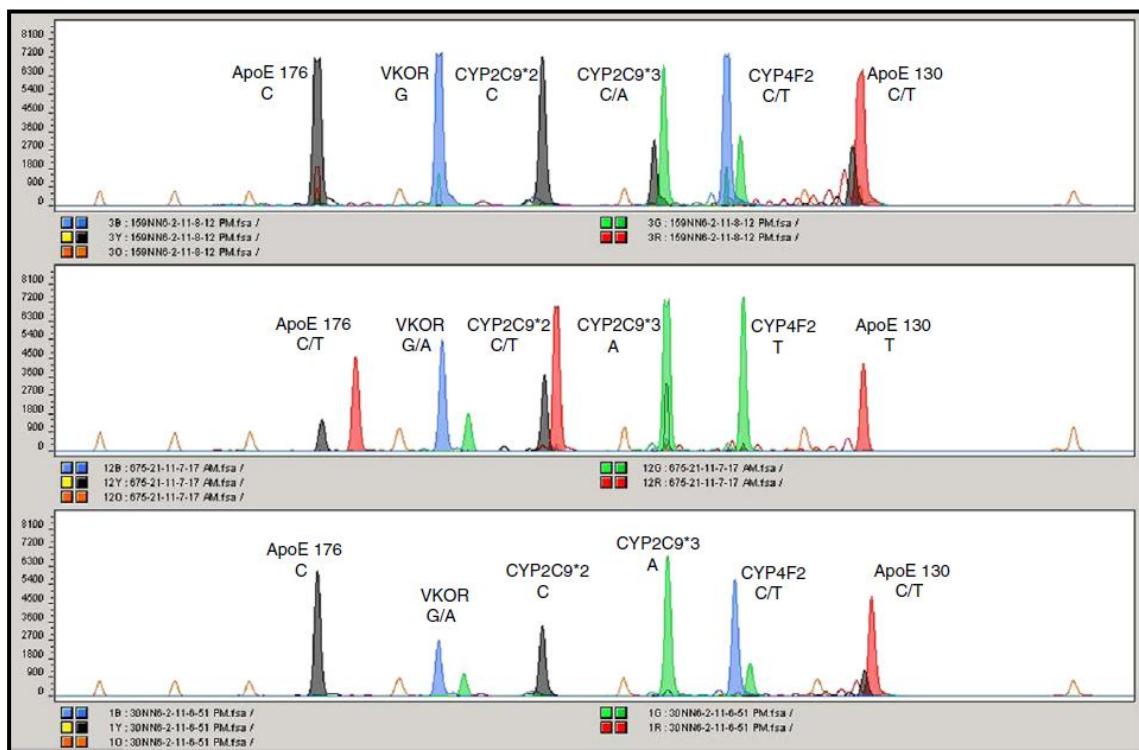
El método desarrollado se basa en un ensayo simple y robusto de minisecuenciación, que permite el genotipado simultáneo de 6 alelos implicados en la dosis estable de acenocumarol (figura 1). La duración de todo el proceso supone un tiempo de 6 horas y 30 minutos, desde la extracción del DNA.

El análisis de concordancia realizado muestra un 100% de aciertos de este método respecto a los métodos utilizados en el anterior proyecto (tabla 8). En relación a la sensibilidad del ensayo, se ha observado una alta eficiencia del método, consiguiendo la detección de los SNP en muestras con una concentración de 1 ng de DNA.

Tabla 8: Análisis de concordancia entre técnicas.

Genotipo (dbSNP reference ID)		Otro método	SNaPshot	Concordancia %
CYP2C9 430C>T (rs1799853)	CC	100	100	100%
	CT	44	44	100%
	TT	5	5	100%
	No resultado	3		
	Solo resultado SNaPshot		3	
	Total muestras	152	152	
CYP2C9 1075A>C (rs1057910)	AA	129	129	100%
	AC	18	18	100%
	CC	1	1	100%
	No resultado	4		
	Solo resultado SNaPshot		4	
	Total muestras	152	152	
CYP4F2 1347G>A (rs2108622)	GG	61	61	100%
	GA	61	61	100%
	AA	19	19	100%
	No resultado	11		
	Solo resultado SNaPshot		11	
	Total muestras	152	152	
VKORC1 1173C>T (rs9934438)	CC	58	58	100%
	CT	70	70	100%
	TT	23	23	100%
	No resultado	1		
	Solo resultado SNaPshot		1	
	Total muestras	152	152	
ApoE 388T>C (rs429358)	TT	117	117	100%
	TC	24	24	100%
	CC	2	2	100%
	No resultado	9		
	Solo resultado SNaPshot		9	
	Total muestras	152	152	
ApoE 526T>C (rs7412)	CC	131	131	100%
	CT	18	18	100%
	TT	2	2	100%
	No resultado	1		
	Solo resultado SNaPshot		1	
	Total muestras	152	152	

Otra técnica: Todos los SNPs se han genotipado utilizando la tecnología KASPar® (KBiosciences©) excepto el alelo CYP2C9*2 (rs1799853) para el que se ha utilizado sondas Taqman® (Applied Biosystems©)

Figura 1: Resultados obtenidos por el SNaPShot.

En relación al coste de este método de genotipado, se ha estimado el coste para SNaPshot y para el uso de sondas TaqMan®. El coste, excluyendo la extracción del DNA es de aproximadamente 24 euros por muestra para SNaPshot y 130 euros para sondas TaqMan®. En ambos casos se ha considerado la determinación por duplicado de las muestras, así como la inclusión de un control positivo y uno negativo. A éste hay que añadir que el método desarrollado permite el genotipado muestra por muestra, sin ser necesario la acumulación de muestras para optimizar los costes.

6.3. Protocolo de un ensayo clínico para la evaluación de la eficiencia y efectividad del algoritmo farmacogenético

“Efficiency and effectiveness of the use of an acenocoumarol pharmacogenetic dosing algorithm versus usual care in patients with venous thromboembolic disease initiating oral anticoagulation: Study protocol for a randomized controlled trial”

AJ Carcas, **AM Borobia**, M Velasco, F Abad-Santos, M Quintana, C Fernández-Capitán, N Ruiz-Giménez, O Madridano, P Llamas Sillero and PGX-ACE Spanish Investigators Group.

Trials (2012) (In press)

- Este trabajo responde al objetivo 5
- Este protocolo de ensayo clínico ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz, y por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Está registrado con el siguiente código Eudra CT: 2009-016643-18.
- Este trabajo se ha presentado en el siguiente congreso Nacionales como **Comunicación Oral:**

1. XXIV Congreso de la *Sociedad Española de Farmacología Clínica (SEFC)*.
Málaga, 2011

“Efficiency and effectiveness of the use of an acenocoumarol pharmacogenetic dosing algorithm vs. usual care en patients with venous thromboembolic disease (VTD) initiating oral anticoagulation: study protocol for a multicentric randomized controlled trial”

AM Borobia, E Ramirez, R Lubomirov, HY Tong, R Muñoz-Romo, A Campos, J Frías-Iniesta, AJ Carcas.

- Se ha **publicado en formato abstract** en la siguiente revistas Internacionales indexadas:

1. AM Borobia, E Ramirez, R Lubomirov, HY Tong, R Muñoz-Romo, A Campos, J Frías-Iniesta, AJ Carcas. Efficiency and effectiveness of the use of an acenocumarol pharmacogenetic dosing algorithm vs. usual care en patients with venous thromboembolic disease (VTD) initiating oral anticoagulation: study protocol for a multicentric randomized controlled trial. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology 2011;109 (Suppl. 3):33.

Factor de Impacto: 2.179 (Q2)

**EFICIENCIA Y EFECTIVIDAD DE LA DOSIFICACIÓN INDIVIDUALIZADA
DE ACENOCUMAROL MEDIANTE UN ALGORITMO
FARMACOGENÉTICO VERSUS AJUSTE ESTÁNDAR EN PACIENTES QUE
INICIAN ANTICOAGULACIÓN ORAL: PROTOCOLO DE UN ENSAYO
CLÍNICO RANDOMIZADO**

El último paso previo a la implementación de un algoritmo farmacogenético de dosificación es la demostración con evidencias clínicas de alto nivel su efectividad. Con este último artículo se presenta el protocolo del ensayo clínico randomizado diseñado para esta validación prospectiva, y que tiene como principal objetivo evaluar la utilidad de realizar un ajuste farmacogenético de la dosis de acenocumarol en la rutina asistencial de un hospital del sistema público de salud. El diseño del ensayo clínico comenzó a finales del año 2009, recibiendo financiación pública para su realización en la convocatoria de ese año de las “Ayudas para el fomento de la traslación de la aplicación terapéutica de medicamentos huérfanos y terapias avanzadas”, del Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Durante el año 2010 y primer trimestre del año 2011 se planificó y puso en marcha toda la estructura para el desarrollo del ensayo clínico, incluyendo el envío y centralización de muestras farmacogenéticas, el desarrollo de un CRD electrónico, planificación de la monitorización del estudio y de la farmacovigilancia. A finales del año 2010 se comenzó el reclutamiento de centros participantes e investigadores, con los que se cerró la versión final del protocolo.

El primer paciente del ensayo clínico se reclutó en el Servicio de Urgencias del Hospital Universitario La Paz en Marzo de 2011, continuando el reclutamiento en la actualidad. A día de hoy se han incluido en el estudio un total de 103 pacientes en 5 de los 6 centros participantes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño

Ensayo clínico de orientación pragmática, randomizado con dos ramas paralelas, simple ciego, de ajuste de dosis de acenocumarol mediante un algoritmo farmacogenético de dosificación individualizada *versus* ajuste estándar en pacientes que inician anticoagulación oral. El periodo de seguimiento será de 3 meses. El estudio se lleva a cabo en cinco centros hospitalarios distintos localizados en la Comunidad de Madrid (España).

Población de estudio

La población diana son pacientes con nuevo diagnóstico de tromboembolismo pulmonar (TEP) y/o trombosis venosa profunda (TVP), realizado mediante prueba objetiva de imagen (Angio-TC, ecodoppler venoso) que requieran terapia anticoagulante con acenocumarol, y que cumplan los criterios de inclusión y ninguno de exclusión.

Criterios de inclusión:

- Hombres y mujeres con diagnóstico de ETEV (TEP y/o TVP), que vayan a iniciar tratamiento anticoagulante con acenocumarol.
- INR diana entre 2 y 3.
- Edad superior a los 18 años.
- Las mujeres en edad fértil deberán tomar medidas anticonceptivas eficaces (métodos de barrera) con el fin de evitar el embarazo durante el tratamiento con acenocumarol.
- Sujetos que tras haber recibido información sobre el diseño, los fines del proyecto, los posibles riesgos de que él puedan derivarse y de que en cualquier

momento pueden denegar su colaboración, otorguen por escrito su consentimiento de participar en el estudio.

Criterios de exclusión:

- Paciente anticoagulado con acenocumarol en el momento de la inclusión (<2 dosis).
- Mujeres embarazadas o en periodo de lactancia.
- Pacientes con insuficiencia renal ($\text{CrCl} < 30 \text{ ml/min}$).
- Pacientes con insuficiencia hepática avanzada (estadío C de Child-Pugh).
- Pacientes con pronóstico vital inferior a 6 meses.

Definición de la intervención

Una vez incluido en este ensayo clínico, los pacientes son randomizados al grupo experimental o el grupo control. Inicialmente, todos los pacientes reciben tratamiento con heparinas de bajo peso molecular (HBPM) junto con la dosis de acenocumarol estándar establecida según la edad durante un máximo de 3 días (tiempo necesario para disponer del resultado del genotipado). Posteriormente:

- Los pacientes aleatorizados a la estrategia experimental reciben la pauta determinada por el algoritmo farmacogenético descrito
- Los pacientes aleatorizados a la estrategia control serán dosificados según el procedimiento estándar en la práctica clínica habitual.

Objetivos específicos

Principal: Evaluar la efectividad de un algoritmo de dosificación de acenocumarol que incorpora variables demográficas, clínicas y farmacogenéticas en pacientes con enfermedad tromboembólica venosa.

Secundarios:

- Evaluar la seguridad de la incorporación de los datos genéticos en el ajuste de dosis comparando la frecuencia de aparición de eventos clínicos relevantes en pacientes con ajuste de dosis mediante el algoritmo diseñado y la práctica clínica habitual.
- Evaluar la eficiencia de la aplicación de un algoritmo de dosificación de acenocumarol que incorpora variables farmacogenéticas. Para ello se pretende realizar un análisis económico de la incorporación de las determinaciones genotípicas en comparación con la práctica clínica habitual.

Variables de evaluación.

Variables de efectividad:

Primarias:

- Porcentaje de pacientes con INR dentro del rango terapéutico en el día 7º del inicio del tratamiento con acenocumarol.
- Tiempo entre que se inicia el tratamiento anticoagulante oral y se consigue un INR estable y en el rango terapéutico (INR en rango terapéutico en 3 determinaciones consecutivas durante al menos 2 semanas, con una diferencia máxima entre la dosis media diaria de un 10%).
- Número de INRs dentro del rango en las primeras 6 semanas de tratamiento.
- Número de INRs dentro del rango durante los tres meses de duración del estudio.

Secundarias:

- Proporción de tiempo dentro del rango terapéutico, usando un método de interpolación lineal (38).
- Número de determinaciones extraordinarias de INR (aquellas que se encuentren fuera de las determinaciones previstas en el programa de visitas establecidas en este protocolo: Días 3, 7, 15, 30, 60 y 90).

De seguridad:

- Proporción de pacientes con eventos adversos relevantes durante los 3 primeros meses tras el inicio de la anticoagulación oral, incluyendo como tales: INR>4 o inferior a 1.5, necesidad de uso de vitamina K, episodio de sangrado, evento tromboembólico, necesidad de HBPM, infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular agudo o muerte por cualquier causa.

De evaluación farmacoeconómica:

- La evaluación fármaco-económica se realizará de acuerdo a un protocolo paralelo e independiente, con consideración fundamentalmente de costes directos asociados a la asistencia sanitaria de estos pacientes

Procedimientos del estudio

Las distintas visitas del estudio se distribuirán de la siguiente manera:

Fase de pre-selección: El paciente con ETEV será identificado en el Servicio de Urgencias o en la planta de hospitalización en las primeras 48 horas del diagnóstico de ETEV (TEP y/o TVP) y se comprobará que cumple los criterios de selección. Una vez incluido el paciente se abrirá el sobre de aleatorización para determinar el grupo de estudio al que pertenece.

Fase de inclusión (días -3 ó -2): Tras anotar en el CRD que el paciente cumple con los criterios de selección se revisará la situación clínica del paciente y se anotará en el CRD la siguiente información de la historia clínica: antecedentes personales y anamnesis, incluyendo medicación concomitante con dosis y pauta actual, exploración física completa que incluirá talla y peso corporal. El inicio del tratamiento con acenocumarol se realizará en el día -3 o -2, según la práctica clínica habitual.

Recogida de muestra para farmacogenética: En el momento del reclutamiento se obtendrá del paciente una muestra de sangre (2 tubos de 5 mL EDTA K3) la cual será enviada mediante mensajero al laboratorio donde será determinado el genotipo del paciente. El resultado será enviado por correo electrónico en un máximo de 48 horas.

Fase de individualización:

Los procedimientos que se realizan cada día de visita se resumen en la tabla 1 del tercer artículo. Los ajustes de dosis se realizarán de la siguiente manera:

- Grupo control: se le determinará el INR en una muestra de sangre capilar mediante un coagulómetro portátil CoaguCheck® (Roche SA) y se le indicará la dosis de acenocumarol según la práctica clínica habitual.
- Grupo intervención: se determinará el INR de la misma manera que en el grupo control. Se pautará la dosis de acenocumarol según el algoritmo farmacogenético desarrollado.

En ambos grupos se le realizarán las determinaciones de INR y las visitas adicionales que se consideren oportunas para el buen control de la anticoagulación, reflejando en el CRD y en la historia clínica cualquier cambio de dosis que se realice, así como todas las determinaciones de INR.

Aleatorización

La estrategia de aleatorización se ha realizado mediante un esquema de aleatorización enmascarada, en proporción 1:1, por bloques y estratificada por centro. En base a este esquema se realizaron sobres de aleatorización para cada centro. En el exterior de dichos sobres se indica el código del paciente (código del centro y del paciente) y en el interior del sobre cerrado y opaco una tarjeta con el grupo de estudio al que se asigna al paciente.

Enmascaramiento

El estudio es simple ciego y el paciente en ningún caso conoce el grupo al que ha sido asignado. Los investigadores clínicos desconocen el esquema de aleatorización. Aunque existe riesgo de desenmascaramiento para el paciente y el no enmascaramiento del médico podría afectar a las variables de evaluación, se consideró que un enmascaramiento total era inviable en un estudio de aproximación pragmática como el actual.

Genotipado

Se recogerán dos tubos de 3 mL de sangre total a todos los participantes para el genotipado de CYP2C9*2 (rs1799853), CYP2C9*3 (rs1057910), VKORC1 (-1639 G→A=rs9923231), CYP4F2 (rs2108622), y ApoE (8016 C→T=rs7412), mediante la una técnica Multiplex previamente descrita. Las determinaciones se realizan de manera centralizada en el Laboratorio de Genética de Poblaciones del Departamento de Medicina Legal de la Universidad Complutense de Madrid. Serán enviados mediante un sistema de mensajería.

Acontecimientos adversos

Cualquier acontecimiento adverso (no necesariamente relacionado con el uso de acenocumarol) será recogido en el cuaderno de recogida de datos (CRD) y será definido como acontecimiento adverso serio si pusiera en peligro la vida y/o requiriera o prolongara la hospitalización (por ejemplo un evento hemorrágico mayor).

Las hemorragias serán categorizadas en hemorragia mayor o menor, según la clasificación para eventos hemorrágicos de las ISTH (International Society on Thrombosis and Haemostasis) (39). Se usará el algoritmo de Naranjo et al (40) para determinar la relación de causalidad entre el acontecimiento adverso y el tratamiento del estudio.

Cálculo del tamaño muestral

De acuerdo al cálculo del tamaño muestral, la realización y finalización del estudio de 97 pacientes por grupo permitiría detectar una diferencia absoluta del 20% en el número de pacientes que se encontrarían dentro del rango terapéutico al 7º día de iniciado el tratamiento. Para este cálculo se ha fijado el error alfa en 0.05 y el beta en 0.2 y se ha asumido que el porcentaje de pacientes que se encuentran dentro del INR deseado es del 40% y que esperamos incrementar este porcentaje al 60%. De acuerdo a Caraco et al (8) la estabilización farmacodinámica con warfarina en el grupo control estándar se produjo en 40,2+-21 días; para una reducción en 10 días en el grupo experimental y errores alfa y beta de 0,05 y 0,2 respectivamente el número de pacientes necesario por grupo sería de 70.

Análisis estadístico

Todos los pacientes reclutados se incluirán en el análisis principal, siguiendo una estrategia por intención de tratar. Además se realizará un análisis por protocolo incluyendo todos los pacientes que puedan ser seguidos durante los tres meses previstos del estudio y no hayan perdido más de una visita de seguimiento intermedia.

Para la comparación de variables de análisis entre ambos grupos se utilizará el test de contraste de hipótesis que proceda, en función de la normalidad de la muestra (test de Kolmogorov-Smirnov). Cuando sea necesario corregir para los posibles factores de confusión, se realizará un modelo de regresión (lineal o logística, según proceda). Para estimar la diferencia entre ambos grupos en la proporción de tiempo dentro del rango terapéutico, se usará el método de interpolación lineal propuesto por Rosendaal et al (38). Para terminar, se realizará un modelo de regresión estratificado por centros. Se establecerá un valor de $p<0,05$ como estadísticamente significativo, ajustando para comparaciones múltiples siempre que sea necesario.

El análisis de coste-efectividad se realizará de acuerdo a un protocolo paralelo e independiente, con consideración fundamentalmente de costes directos asociados a la asistencia sanitaria de estos pacientes

Otras consideraciones éticas y legales

Los investigadores se atendrán estrictamente a lo dispuesto en este protocolo, cumplimentando totalmente las hojas de recogida de datos. El estudio se llevará a cabo de acuerdo a las recomendaciones para Estudios Clínicos y evaluación de fármacos en el hombre, que figuran en la Declaración de Helsinki, revisada en las sucesivas asambleas mundiales, y la actual Legislación Española y Europea en materia de Estudios Clínicos y de confidencialidad de los datos de los pacientes y siguiendo los principios de la Buena Práctica Clínica.

DISCUSIÓN

7. DISCUSIÓN

El tratamiento anticoagulante con acenocumarol está asociado a una elevada incidencia de complicaciones hemorrágicas así como a fallos terapéuticos (retrombosis) (4). Estas complicaciones son derivadas de la alta variabilidad interindividual que existe en la dosis necesaria de acenocumarol para conseguir una anticoagulación estable, del tiempo necesario para alcanzar el equilibrio estacionario del fármaco, que según Caraco et al. (8), puede llegar a 40,27 días (IC 95%: 35,9-44,6 días) para la warfarina, y de la dificultad para mantener el INR dentro del rango, siendo necesario que al menos un 65% del tiempo el INR esté dentro del rango diana para obtener una anticoagulación óptima.

Un enfoque potencial para mejorar el tratamiento anticoagulante es el uso de algoritmos de dosificación que incluyan variables demográficas, clínicas y genéticas. En este momento se han publicado algunos algoritmos para warfarina (26-28, 33-35), pero sólo unos pocos para acenocumarol (20, 36, 41). La población incluida en este tipo de estudios es generalmente una población de amplio espectro que incluye, principalmente, pacientes con fibrilación auricular, prótesis valvulares y enfermedad tromboembólica. Por otra parte, la fuente de datos de estos estudios son registros de pacientes, por lo que se basan en datos retrospectivos. De los tres algoritmos publicados, los dos primeros están desarrollados en población caucásica e incluyen como factores genéticos CYP2C9 y VKORC1 (20, 36) y el tercero (41) se ha desarrollado en población del norte de la India e incluye información genética de CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 y GGCX.

El primer artículo presentado en esta memoria describe el desarrollo de un algoritmo farmacogenético de dosificación de acenocumarol en una cohorte prospectiva de pacientes con enfermedad tromboembólica, trabajo que se diseñó entre finales del año 2006 y 2007, que obtuvo financiación pública en el año 2007, y que se ha desarrollado entre 2008 y 2010. Estos pacientes, en comparación con los pacientes con fibrilación auricular o re-emplazo valvular, suelen ser más jóvenes, tienen menos comorbilidad (42) y un INR diana inferior (2-3). Un inconveniente es que la aplicación de nuestro algoritmo puede ser limitado principalmente a los pacientes con enfermedad tromboembólica, y su uso en otros pacientes requerirá una validación previa. Sin

embargo, hay que destacar que en la enfermedad tromboembólica es crucial alcanzar el INR diana tan pronto como sea posible para evitar una falta de eficacia, así como una anticoagulación excesiva.

Otra característica de nuestro trabajo es la inclusión de dos nuevos genes, CYP4F2 y ApoE, además de las variantes ya conocidas y ampliamente estudiadas de VKORC1 y CYP2C9. Estos genes fueron descritos para warfarina (19,22) en el año 2008, después de haber iniciado el reclutamiento de pacientes en nuestro estudio, por lo se decidió ampliar el número de genes que inicialmente estaba previsto genotipar e incluirlos en nuestro análisis. Posteriormente se describió su influencia también para acenocumarol en el año 2009. Todos estos factores genéticos, añadidos a los factores clínico-demográficos explican el 60,6% de la variabilidad total de la dosis de acenocumarol necesaria para obtener un INR estable en nuestro modelo. Este porcentaje es significativamente mayor en comparación con la variabilidad explicada cuando sólo se consideran los factores no genéticos. La contribución de CYP4F2 y ApoE a esta variabilidad es de 3,6% y 1,3%, respectivamente. La influencia de CYP4F2 ha sido descrita en varios estudios con warfarina y acenocumarol, aunque sólo se ha incluido en un algoritmo publicado para warfarina, posteriormente a la publicación de nuestro algoritmo (33). La apolipoproteína E (ApoE) es una proteína polimórfica definida por tres alelos, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ (definida por dos SNPs, rs429358 y rs7412). Visser et al. (24) observaron que los individuos que son homocigotos o heterocigotos para el alelo $\epsilon 4$ (rs429358) requieren dosis significativamente menores de acenocumarol para alcanzar el mismo nivel de anticoagulación que los pacientes con el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$, y los individuos $\epsilon 2/\epsilon 2$ o $\epsilon 2/\epsilon 3$ (homocigotos o heterocigotos para rs7412, respectivamente) que requieren dosis mayores (sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa). Hasta la fecha, ApoE no se ha incluido en ninguno de los algoritmos publicados. La decisión de incluir este gen en nuestro algoritmo se basa en tres hechos: a) todas o la mayoría de los análisis de regresión preliminares que hemos realizado incluyen esta variable con significancia similar y por debajo de 0,1, b) el peso del factor en el modelo final, tal como se refleja por su valor β se considera bastante alto (en el rango de la observada para VKORC1 A/G) y c) que está asociado con la necesidad de dosis más elevadas, para lo que otros algoritmos obtienen peores resultados. Por otro lado, hay varios algoritmos publicados que han incluido variables que contribuyen

menos a la variabilidad y han sido igualmente consideradas (por ejemplo, el género y el uso de amiodarona en el algoritmo EU-PACT).

En la generación de nuestro algoritmo hemos utilizando un modelo de regresión lineal múltiple, que tiene la ventaja de su simplicidad y facilidad de uso. Este enfoque es el mismo utilizado por el grupo IWPC (31) y por el de EU-PACT (36). También utilizamos una cohorte de validación seleccionada de manera aleatoria, aunque estratificada por los genotipos con mayor impacto. A pesar de que esta cohorte es pequeña y, por tanto, la R^2 también lo es (38,8% frente a 60,6%), la precisión y la exactitud son muy similares a los de la cohorte de derivación.

Cuando clasificamos a los pacientes en función de sus requerimientos de dosis, en aquellos que necesitan una dosis estándar (11-21 mg / semana) el rendimiento del algoritmo farmacogenético es ligeramente mejor que el algoritmo clínico, pero sin alcanzar la significancia estadística en la cohorte de validación, debido al bajo tamaño muestral. Sin embargo, en el grupo que requiere dosis más bajas (<11 mg/semana, lo que representa el 31,3% de la cohorte) las diferencias en el porcentaje de pacientes correctamente clasificados es clínicamente más relevantes y significativamente mayor cuando usamos el algoritmo farmacogenético (41,0% frente a 13,0% en la cohorte total, el 44,1% frente a 14,7% en la cohorte de derivación y el 33,3% frente a 8,3% en la cohorte de validación). Se observa un resultado similar en el grupo de dosis elevadas (>21 mg/semana) donde el porcentaje de pacientes correctamente clasificados por el algoritmo farmacogenético fue significativamente mayor (44,0% vs 18,0% en la cohorte total, 45,2% frente a 22,6% en la cohorte de derivación y 37,5% vs 0,0% en la cohorte de validación).

Otro aspecto importante a considerar es la sobre y subestimación de las dosis predichas en los grupos de dosis bajas y altas. En los pacientes que necesitan dosis bajas, tanto el algoritmo clínico como el farmacogenético sobreestima la dosis, pero esta sobreestimación es menor con el algoritmo farmacogenético (en la cohorte total fue de 3,36 mg/semana vs 4,95 mg/semana con el algoritmo clínico). En los pacientes con requerimientos altos de dosis ocurre el fenómeno opuesto, ambos algoritmos infraestiman la dosis, aunque en menor medida en el algoritmo farmacogenético con respecto al clínico. Este fenómeno ya se había observado en el estudio IWPG (31), y no

ha sido evaluado en el estudio de EU-PACT (36). En este aspecto nuestro algoritmo parece funcionar mejor que el algoritmo IWPG a la hora de predecir las dosis para los pacientes con requerimientos altos de dosis. De hecho, nuestro algoritmo es capaz de clasificar correctamente el 44% de los pacientes con requerimientos altos de dosis, en comparación con el 26,4% del estudio de IWPG. Estos datos sugieren que la inclusión de los genotipos CYP4F2 y ApoE puede mejorar la predicción en pacientes que necesitan dosis altas, porque estos genotipos están asociados con un mayor requerimiento de dosis de acenocumarol (y probablemente, warfarina).

Considerando los beneficios globales de la utilización de nuestro algoritmo farmacogenético, el número necesario de pacientes que hay que genotipar para evitar que un paciente sea mal clasificados (NNG) se aproxima a 5 en cualquiera de las tres cohortes. Este resultado es al menos tan clínicamente relevante como los obtenidos por estudios similares con warfarina (31).

Una limitación importante de nuestro estudio es el limitado tamaño muestral. En primer lugar, no teníamos suficientes pacientes en la cohorte de derivación para incluir los factores potencialmente importantes que podrían influir en la dosis estable de acenocumarol, tales como el consumo de tabaco u otros medicamentos concomitantes. Sin embargo, la R^2 (60,6%) de nuestro algoritmo (el porcentaje de variabilidad de la dosis explicada por el modelo) fue mayor que la de otros algoritmos para acenocumarol (y warfarina), lo que indica el buen rendimiento del modelo comparado con la utilización de variables clínicas. Otra limitación es el tamaño de la cohorte de validación, demasiado pequeña para incluir pacientes con genotipos poco frecuentes. Sin embargo, el rendimiento del algoritmo farmacogenético en esta cohorte es muy similar a la cohorte de derivación y cohorte total, en términos de precisión y exactitud. La limitación relacionada con la población restringida se ha discutido previamente, sin embargo, esta restricción de población también tiene la ventaja potencial de una mayor especificidad y robustez del modelo a pesar del tamaño muestral. Por último, hay genes recientemente descritos que no hemos analizado ni incluido en nuestro algoritmo, como es el caso de los polimorfismos de la γ -glutamil carboxilasa (GGCX) que activa varios factores de coagulación. La decisión de no analizar este gen es por su baja frecuencia en población caucásica y su baja influencia en los requerimientos de dosis de acenocumarol (41).

Por tanto, el algoritmo farmacogenético desarrollado es el primero que incluye variables clínicas e información de cuatro genes (VKORC1, CYP2C9, CYP4F2 y ApoE) y es capaz de predecir razonablemente la dosis estable de acenocumarol en pacientes con enfermedad tromboembólica, siendo especialmente útil en la práctica clínica para pacientes que requieren dosis bajas (<11 mg / semana) o altas (> 21 mg / semana) lo que representan casi el 60% de toda la cohorte.

Con el fin de facilitar su implementación en la práctica clínica, y con el objetivo de testar el algoritmo en otro tipo de poblaciones, hemos desarrollado una aplicación web que permite el cálculo on-line de la dosis, a través de la página web www.dosisacenocumarol.com (anexo IV) a la que cualquier médico interesado puede acceder de manera gratuita. Además de permitir el cálculo de la dosis, la aplicación permite el almacenamiento de todas las variables clínico-demográficas, la dosis estimada por el algoritmo, y permite introducir y almacenar la dosis real requerida, lo que nos permitirá testar el algoritmo en otras poblaciones. Asimismo nos encontramos desarrollando esta misma aplicación en formato iPhone® y Android® para poder ampliar su implementación.

Una vez desarrollado este algoritmo farmacogenético de ajuste de dosis en el que están involucrados varios genes, creímos necesario el desarrollo de una técnica de genotipado rápida, fácil y económica con dos objetivos. El primero para poder centralizar las determinaciones farmacogenéticas del ensayo clínico que se encontraba en fase de diseño y segundo, para permitir su futura implementación en la práctica clínica habitual. Existen técnicas comerciales, como las sondas TaqMan®, que permite el genotipado de determinados polimorfismos de una manera sencilla, ya que se trata de sondas predefinidas. Sin embargo, tienen la limitación del precio y de la necesidad de genotipar simultáneamente un gran número de muestras para poder optimizar los costes. Es por ello que se trata de una técnica poco eficiente para su implementación en el sistema nacional de salud. Por otro lado, existen métodos de minisecuenciación que permiten el análisis conjunto de hasta 10 SNP en una sola reacción, permitiendo la reducción de costes, por lo que es la técnica que hemos elegido en nuestro caso. Con el objetivo de validar los resultados, se ha realizado un análisis de concordancia entre los resultados obtenidos en el estudio previo por otras técnicas de genotipado (KASPar® or TaqMan®) y el SNaPshot desarrollado, obteniendo una concordancia del 100%.

Además, la técnica elegida tiene la ventaja de ser flexible, permitiendo incorporar nuevos SNP de una manera sencilla. En relación a la sensibilidad de la técnica, y esto es otra ventaja potencial, es que únicamente es necesario 1 ng de DNA, cantidad muy inferior a las requeridas por otras técnicas. En relación al coste, hemos estimado un ahorro por muestra, comparado con la utilización de sondas TaqMan® de aproximadamente 106 euros (130 vs. 24 euros) lo que lo hace perfectamente implantable en la rutina asistencial de cualquier hospital público. Actualmente es la técnica que se está utilizando de manera centralizada en el desarrollo del ensayo multicéntrico.

Por otro lado, estos algoritmos farmacogenéticos deben ser validados mediante ensayos clínicos randomizados con el fin de demostrar su eficacia y evaluar su efectividad, así como la viabilidad final de su implementación en la práctica clínica habitual. En el momento actual, hay dos ensayos clínico que se encuentra en desarrollo, el primero en USA con warfarina (ClinicalTrial.com; NCT00511173) y el segundo realizado en Europa por el grupo EU-PACT (37) y que evalúa su algoritmo de dosificación para acenocumarol, warfarina y phenprocumon.

Nuestro ensayo clínico tiene varias diferencias relevantes con estos estudios en marcha en USA (además del anticoagulante utilizado) y en Europa. Primero, nuestro algoritmo es el único en considerar los genes CYP4F2 y ApoE, además de las variables demográficas y clínicas (edad, índice de masa corporal y tratamiento concomitante con amiodarona e inductores metabólicos) y genéticas más comunes (CYP2C9 y VKORC1). Segundo, la población objetivo incluye únicamente pacientes con enfermedad tromboembólica venosa. Estos pacientes, analizados de forma global, suelen ser más jóvenes, (aunque tienen un rango de edad mucho más amplio) y tienen menos condiciones concurrentes (42). Claramente, esto implica la ventaja teórica de la mayor homogeneidad de la muestra incluida y el menor tamaño muestral necesario. En contrapartida la extrapolación de los resultados a pacientes con fibrilación auricular o reemplazos valvulares puede verse comprometida.

Otro aspecto a tener en cuenta es que la utilidad de la determinación genética puede ser más importante en los pacientes con enfermedad tromboembólica, ya que es importante alcanzar el rango terapéutico en el menor tiempo posible ya que el riesgo de

progresión, recidiva y muerte por tromboembolismo pulmonar es mayor en las primeras semanas tras el diagnóstico (43-45).

Por otro lado, el riesgo de sangrado es también mayor cuanto más próximo al diagnóstico se encuentra, ocurriendo el 62,5% de las hemorragias durante los primeros 15 días de tratamiento y el 79,2% durante el primer mes (mediana, 11 días). Además, aproximadamente el 50% de los pacientes en tratamiento con anti-vitaminas K tienen un INR > 3. (6, 46-48). Además, el mejorar las variables que reflejan un adecuado control anticoagulante (tiempo dentro del INR apropiado, el número de INR en el rango, etc) disminuye los controles y las visitas necesarias y por tanto mejora la calidad de vida del paciente y el coste de todo el proceso. Finalmente, en la enfermedad tromboembólica el tiempo que se precisa para un ajuste adecuado de la dosis del anticoagulante oral (con frecuencia superior a un mes) es una parte sustancial del tratamiento total recomendado (3 a 6 meses). Estos dos aspectos son menos relevantes en el caso de la fibrilación auricular y el reemplazo valvular, en los que el riesgo a corto plazo por ineficacia es mucho más bajo y el tiempo total de anticoagulación es de por vida.

Como objetivo primario se ha elegido el adecuado control anticoagulante, incluyendo variables como son el porcentaje de pacientes en rango terapéutico, a corto, medio y largo plazo, o el tiempo requerido para ello. Esto representa una limitación en comparación con el uso de variables clínicas duras (hemorragias, recidiva de la ETV, la progresión del TEP y/o la presencia de síndrome post-flebítico). La decisión de establecer este objetivo primario se tomó en base a razones logísticas y a su validez como objetivo subrogado. Dentro de las razones logísticas se encontraban la necesidad de que las determinaciones genotípicas debían realizarse en un laboratorio centralizado y en plazo de tiempo corto (dos días como máximo), por ello los centros de reclutamiento debían estar concentrados en la ciudad de Madrid o su zona suburbana. Esto a su vez impone limitaciones en el número de pacientes que se pueden reclutar, ya que la población atendida se limita a la de los centros. Igualmente, por razones económicas, el reclutamiento de varios miles de pacientes está fuera de nuestro alcance. Además existen datos convincentes de que el mantener un INR dentro del rango terapéutico es un objetivo válido del tratamiento anticoagulante, relacionado con los *end-points* clínicos de interés y como tal se utiliza rutinariamente como control del tratamiento (49-52). Además es importante considerar que en la aplicación de técnicas

farmacogenéticas y algoritmos de dosificación tienen gran importancia aspectos locales relacionados con diferencias en el tipo de población atendida, diferencias genéticas y diferencias en el sistema sanitario.

En definitiva, el ensayo clínico propuesto constituirá una prueba de concepto importante para demostrar la utilidad de los algoritmos de dosificación que incluyen variables farmacogenéticas en hospitales del Sistema Nacional de Salud. A día de hoy, se han reclutado más de 100 pacientes con enfermedad tromboembólica venosa, tanto tromboembolismo pulmonar como trombosis venosa profunda, y estimamos que podamos finalizar la fase de reclutamiento a mediados del año 2013.

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. Los polimorfismos de los cuatro genes estudiados (CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 y ApoE), añadidos a las variables clínico-demográficas edad, índice de masa corporal, medicación inductora enzimática y tratamiento concomitante con amiodarona contribuyen a la dosis de acenocumarol necesaria para conseguir un INR estable y dentro del rango terapéutico recomendado.
2. El algoritmo farmacogenético desarrollado, que incluye todos estos factores, explica un 60,6% a la variabilidad en los requerimientos de dosis de acenocumarol, siendo especialmente útil en aquellos pacientes con requerimientos bajos (<11 mg/semana) y altos (>21 mg/semana) de dosis.
3. Los resultados obtenidos por este algoritmo farmacogenético en la cohorte de validación confirman su utilidad en la práctica clínica habitual.
4. El método de genotipado por SNaPShot desarrollado es sensible, sencillo, rápido y económico, lo que permite su implementación en la práctica clínica habitual.
5. El ensayo clínico propuesto constituirá una prueba de concepto importante para demostrar la utilidad de los algoritmos de dosificación que incluyen variables farmacogenéticas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. McLeod HL, Evans WE. Pharmacogenomics: unlocking the human genome for better drug therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:101-21.
2. Evans WE, Relling MV. Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. *Nature.* 2004;429(6990):464-8.
3. Martindale: The Complete Drug Reference. [online] London: Pharmaceutical Press. Available: <http://www.medicinescomplete.com>. Accessed 19 January 2012.
4. Stehle S, Kirchheimer J, Lazar A, Fuhr U (2008) Pharmacogenetics of oral anticoagulants: a basis for dose individualization. *Clin Pharmacokinet.* 47(9): 565–94.
5. Jordi Fontcuberta, Juan Tamargo et al. *Terapia Anticoagulante Oral (TAO).* Scientific Communication Management, S.L. 2003.
6. Palareti G, Leali N, Coccheri S, Poggi M, Manotti C, D'Angelo A, Pengo V, Erba N, Moia M, Ciavarella N, Devoto G, Berrettini M, Musolesi S. Bleeding complications of oral anticoagulant treatment: an inception-cohort, prospective collaborative study (ISCOAT). *Italian Study on Complications of Oral Anticoagulant Therapy.* *Lancet.* 1996;348(9025):423-8.
7. van der Meer FJ, Rosendaal FR, Vandebroucke JP, Briët E. Bleeding complications in oral anticoagulant therapy. An analysis of risk factors. *Arch Intern Med.* 1993;153(13):1557-62.
8. Caraco Y, Blotnick S, Muszkat M. CYP2C9 genotype-guided warfarin prescribing enhances the efficacy and safety of anticoagulation: a prospective randomized controlled study. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83(3):460-70.
9. Van Geest-Daalderop JH, Hutten BA, Péquéraux NC, Levi M, Sturk A. Improvement in the regulation of the vitamin K antagonist acenocoumarol after a standard initial dose regimen: prospective validation of a prescription model. *J Thromb Thrombolysis.* 2009;27(2):207-14.
10. Takahashi H, Wilkinson GR, Padrini R, Echizen H. CYP2C9 and oral anticoagulation therapy with acenocoumarol and warfarin: similarities yet differences. *Clin Pharmacol Ther.* 75: 376–380.
11. Bodin L, Verstuyft C, Tregouet DA, Robert A, Dubert L, Funck-Brentano C, Jaillon P, Beaune P, Laurent-Puig P, Becquemont L, Loriot MA. Cytochrome P450 2C9

- (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood.* 2005;106(1):135-40.
12. Spreafico M, Lodigiani C, van Leeuwen Y, Pizzotti D, Rota LL, Rosendaal F, Mannucci PM, Peyvandi F. Effects of CYP2C9 and VKORC1 on INR variations and dose requirements during initial phase of anticoagulant therapy. *Pharmacogenomics.* 2008;9(9):1237-50.
13. Teichert M, van Schaik RH, Hofman A, Uitterlinden AG, de Smet PA, Stricker BH, Visser LE. Genotypes associated with reduced activity of VKORC1 and CYP2C9 and their modification of acenocoumarol anticoagulation during the initial treatment period. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;85(4):379-86.
14. Ufer M. Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists: warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(12):1227-46.
15. Xie HG, Prasad HC, Kim RB, Stein CM. CYP2C9 allelic variants: ethnic distribution and functional significance. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54(10):1257-70.
16. Bodin L, Verstuyft C, Tregouet DA, Robert A, Dubert L, Funck-Brentano C, Jaillon P, Beaune P, Laurent-Puig P, Becquemont L, Loriot MA. Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood.* 2005;106(1):135-40.
17. Pérez-Andreu V, Roldán V, López-Fernández MF, Antón AI, Alberca I, Corral J, Montes R, García-Barberá N, Ferrando F, Vicente V, González-Conejero R. Pharmacogenetics of acenocoumarol in patients with extreme dose requirements. *J Thromb Haemost.* 2010;8(5):1012-7.
18. Schalekamp T, Brasse BP, Roijers JFM, Chahid Y, van Geest-Daalderop JHH, et al. VKORC1 and CYP2C9 genotypes and acenocoumarol anticoagulation status: Interaction between both genotypes affects overanticoagulation. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;80(1): 13–22.
19. Valentin II, Vazquez J, Rivera-Miranda G, Seip RL, Velez M, Kocherla M, Bogaard K, Cruz-Gonzalez I, Cadilla CL, Renta JY, Feliu JF, Ramos AS, Alejandro-Cowan Y, Gorowski K, Ruano G, Duconge J. Prediction of warfarin dose reductions in Puerto Rican patients, based on combinatorial CYP2C9 and VKORC1 genotypes. *Ann Pharmacother.* 2012;46(2):208-18

20. Verde Z, Ruiz JR, Santiago C, Valle B, Bandrés F, Calvo E, Lucía A, Gómez Gallego F. A novel, single algorithm approach to predict acenocoumarol dose based on CYP2C9 and VKORC1 allele variants. *PLoS One.* 2010;5(6):e11210.
21. Pérez-Andreu V, Roldán V, Antón AI, García-Barberá N, Corral J, et al. Pharmacogenetic relevance of CYP4F2 V433M polymorphism on acenocoumarol therapy. *Blood.* 2009;113(20): 4977–9.
22. Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, Gage BF, Falkowski M, et al. CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose. *Blood.* 2008; 111(8): 4106–12.
23. Teichert M, Eijgelsheim M, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, van Schaik RH, et al. A genome-wide association study of acenocoumarol maintenance dosage. *Hum Mol Genet.* 2009;18(19): 3758–68.
24. Visser LE, Trienekens PH, De Smet PA, Vulto AG, Hofman A, et al. Patients with an APOE epsilon4 allele require lower doses of coumarin anticoagulants. *Pharmacogenet Genomics.* 2008;15(2): 69–74.
25. Cadamuro J, Dieplinger B, Felder T, Kedenko I, Mueller T, et al. Genetic determinants of acenocoumarol and phenprocoumon maintenance dose requirements. *Eur J Clin Pharmacol.* 2009;66(3): 253–60.
26. Anderson JL, Horne BD, Stevens SM, Grove AS, Barton S, Nicholas ZP, Kahn SF, May HT, Samuelson KM, Muhlestein JB, Carlquist JF; Couma-Gen Investigators. Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation.* 2007;116(22):2563-70.
27. Millican EA, Lenzini PA, Milligan PE, Gross L, Eby C, Deych E, Grice G, Clohisy JC, Barrack RL, Burnett RS, Voora D, Gatchel S, Tiemeier A, Gage BF. Genetic-based dosing in orthopedic patients beginning warfarin therapy. *Blood.* 2007;110(5):1511-5.
28. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, Wood P, Kesteven P, Daly AK, Kamali F. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood.* 2005;106(7):2329-33.
29. Wu AH. Use of genetic and nongenetic factors in warfarin dosing algorithms. *Pharmacogenomics.* 2007;8(7):851-61.

30. Caldwell MD, Berg RL, Zhang KQ, Glurich I, Schmelzer JR, Yale SH, Vidaillet HJ, Burmester JK. Evaluation of genetic factors for warfarin dose prediction. *Clin Med Res.* 2007;5(1):8-16.
31. International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE, Lee MT, Limdi NA, Page D, Roden DM, Wagner MJ, Caldwell MD, Johnson JA. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med.* 2009;360(8):753-64.
32. Meijer K, Kim YK, Carter D, Schulman S. A prospective study of an aggressive warfarin dosing algorithm to reach and maintain INR 2 to 3 after heart valve surgery. *Thromb Haemost.* 2011;105(2):232-8.
33. Zambon CF, Pengo V, Padrini R, Basso D, Schiavon S, Fogar P, Nisi A, Frigo AC, Moz S, Peloso M, Plebani M. VKORC1, CYP2C9 and CYP4F2 genetic based algorithm for warfarin dosing: an Italian retrospective study. *Pharmacogenomics.* 2011;12(1):15-25.
34. Moreau C, Pautas E, Gouin-Thibault I, Golmard JL, Mahé I, Mulot C, Loriot MA, Siguret V. Predicting the warfarin maintenance dose in elderly inpatients at treatment initiation: accuracy of dosing algorithms incorporating or not VKORC1/CYP2C9 genotypes. *J Thromb Haemost.* 2011;9(4):711-718.
35. Lenzini P, Wadelius M, Kimmel S, Anderson JL, Jorgensen AL, Pirmohamed M, Caldwell MD et al. Integration of genetic, clinical, and INR data to refine warfarin dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87(5):572-8.
36. van Schie RM, Wessels JA, le Cessie S, de Boer A, Schalekamp T, van der Meer FJ, Verhoeft TI, van Meegen E, Rosendaal FR, Maitland-van der Zee AH; for the EU-PACT Study Group. Loading and maintenance dose algorithms for phenprocoumon and acenocoumarol using patient characteristics and pharmacogenetic data. *Eur Heart J;* 32(15):1909-17
37. vanSchie RM, Wadelius MI, Kamali F, Daly AK, Manolopoulos VG, de Boer A, Barallon R, Verhoeft TI, Kirchheimer J, Haschke-Becher E, Briz M, Rosendaal FR, Redekop WK, Pirmohamed M, Maitland van der Zee AH. Genotype-guided dosing of coumarin derivatives: the European pharmacogenetics of anticoagulant therapy (EU-PACT) trial design. *Pharmacogenomics.* 2009;10(10):1687-95.

38. Rosendaal FR, Cannegieter SC, van der Meer FJ, Briët E. A method to determine the optimal intensity of oral anticoagulant therapy. *Thromb Haemost.* 1993;69(3):236-9.
39. Schulman S, Kearon C. Definition of major bleeding in clinical investigations of antihemostatic medicinal products in non-surgical patients. *J. Thromb.Haemost.* 2005;3:692-694.
40. Naranjo CA, Bustó U, Sellers EM, Sandor P, Ruiz I, Roberts EA, Janecek E, Domecq C, Greenblatt DJ. A method for estimating the probability of adverse drug reactions. *Clin Pharmacol Ther.* 1981;30(2):239-45.
41. Rathore SS, Agarwal SK, Pande S, Singh SK, Mittal T, Mittal B. Therapeutic dosing of acenocoumarol: proposal of a population specific pharmacogenetic dosing algorithm and its validation in north Indians. *PLoS One.* 2012;7(5):e37844.
42. Guijarro R, Montes J, Sanromán C, Monreal M. Venous thromboembolism in Spain. Comparison between an administrative database and the RIETE registry. *Eur J Intern Med.* 2008;19(6): 443–6.
43. Lobo JL, Jiménez D, Orue MT, Grau E, Naufall D, Madridano O, Monreal M and the RIETE Investigators. Recurrent venous thromboembolism during coumarin therapy. Data from the computerized registry of patients with venous thromboembolism. *Brit J Haematol* 2007; 138 (3): 400-3
44. Goldhaber SZ, Visani L, De Rosa M. Acute pulmonary embolism: clinical outcomes in the International Cooperative Pulmonary Embolism Registry (ICOPER). *Lancet* 1999;353: 1386-9.2.
45. Kearon C. Natural history of venous thromboembolism. *Circulation* 2003; 107:I-22-I-30.3
46. Nieto JA., Cámaras T, Gonzalez-Higuera E, Ruiz-Gimenez N, Guijarro R, Marchena PJ, Monreal M; for the RIETE Investigators. Clinical outcome of patients with major bleeding after venous thromboembolism. Findings from the RIETE Registry. *Thromb Haemost* 2008 Nov; 100(5): 789–96.
47. White RH, Beyth RJ, Zhou H, et al. Major bleeding after hospitalization for deep-venous thrombosis. *Am J Med.* 1999; 107: 414–424.
48. Landefeld CS, Beyth RJ. Anticoagulant-related bleeding: clinical epidemiology, prediction, and prevention. *Am J Med.* 1993; 95: 315–328.

49. Harvey D. White, DSc; Michael Gruber, MSc; Jan Feyzi, MS; Scott Kaatz, DO; Hung-Fat Tse, MD; Steen Husted, MD; Gregory W. Albers, MD. Comparison of Outcomes Among Patients Randomized to Warfarin Therapy According to Anticoagulant Control Results From SPORTIF III and V. *Arch Intern Med.* 2007;167:239-245.
50. Connolly SJ, Pogue J, Eikelboom J, Flaker G, Commerford P, Franzosi MG, Healey JS, Yusuf S; ACTIVE W Investigators. Benefit of oral anticoagulant over antiplatelet therapy in atrial fibrillation depends on the quality of international normalized ratio control achieved by centers and countries as measured by time in therapeutic range. *Circulation.* 2008 Nov 11;118(20):2029-37
51. Natalie Oake, Dean A. Fergusson, Alan J. Forster, Carl van Walraven. Frequency of adverse events in patients with poor anticoagulation: a metaanalysis. *CMAJ* 2007;176(11):1589-94.
52. van Dongen CJ, Prandoni P, Frulla M, Marchiori A, Prins MH, Hutten BA. Relation between quality of anticoagulant treatment and the development of the postthrombotic syndrome. *J Thromb Haemost.* 2005;3(5):939-42.

ANEXO I: ARTÍCULOS PUBLICADOS

An Acenocoumarol Dosing Algorithm Using Clinical and Pharmacogenetic Data in Spanish Patients with Thromboembolic Disease

Alberto M. Borobia^{1*}, Rubin Lubomirov², Elena Ramírez¹, Alicia Lorenzo³, Armando Campos⁴, Raul Muñoz-Romo⁴, Carmen Fernández-Capitán⁵, Jesús Frías¹, Antonio J. Carcas^{1*}

1 Clinical Pharmacology Service, La Paz University Hospital, Pharmacology Department, School of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, IdiPAZ, Madrid, Spain,

2 Pharmacology Department, School of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain, **3** Internal Medicine Department, La Paz University Hospital, Madrid, Spain, **4** Clinical Pharmacology Service, La Paz University Hospital, Pharmacology Department, School of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain,

5 Internal Medicine Department, La Paz University Hospital, School of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

Abstract

Appropriate dosing of coumarins is difficult to establish, due to significant inter-individual variability in the dose required to obtain stable anticoagulation. Several genetic and other clinical factors have been associated with the coumarins dose, and some pharmacogenetic-guided dosing algorithms for warfarin and acenocoumarol have been developed for mixed populations. We recruited 147 patients with thromboembolic disease who were on stable doses and with an international normalized ratio (INR) between 2 and 3. We ascertained the influence of clinical and genetic variables on the stable acenocoumarol dose by multiple linear regression analysis in a derivation cohort (DC; n = 117) and developed an algorithm for dosing that included clinical factors (age, body mass index and concomitant drugs) and genetic variations of *VKORC1*, *CYP2C9*, *CYP4F2* and *APOE*. For purposes of comparison, a model including only clinical data was created. The clinical factors explained 22% of the dose variability, which increased to 60.6% when pharmacogenetic information was included ($p < 0.001$); *CYP4F2* and *APOE* variants explained 4.9% of this variability. The mean absolute error of the predicted acenocoumarol dose (mg/week) obtained with the pharmacogenetic algorithm was 3.63 vs. 5.08 mg/week with the clinical algorithm (95% CI: 0.88 to 2.04). In the testing cohort (n = 30), clinical factors explained a mere 7% of the dose variability, compared to 39% explained by the pharmacogenetic algorithm. Considering a more clinically relevant parameter, the pharmacogenetic algorithm correctly predicted the real stable dose in 59.8% of the cases (DC) vs. only 37.6% predicted by the clinical algorithm (95% CI: 10 to 35). Therefore the number of patients needed to genotype to avoid one over- or under-dosing was estimated to be 5.

Citation: Borobia AM, Lubomirov R, Ramírez E, Lorenzo A, Campos A, et al. (2012) An Acenocoumarol Dosing Algorithm Using Clinical and Pharmacogenetic Data in Spanish Patients with Thromboembolic Disease. PLoS ONE 7(7): e41360. doi:10.1371/journal.pone.0041360

Editor: Yan Gong, College of Pharmacy, University of Florida, United States of America

Received February 23, 2012; **Accepted** June 20, 2012; **Published** July 20, 2012

Copyright: © 2012 Borobia et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by a research grant from Instituto de Salud Carlos III (FIS PI070710). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: antonio.carcas@uam.es (AJC); a.borobia@gmail.com (AMB)

Introduction

Coumarin anticoagulants, including warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon, are highly effective antithrombotic drugs for the treatment of thromboembolic diseases (such as deep venous thrombosis and pulmonary embolism), atrial fibrillation and artificial heart valves [1]. Appropriate dosing of coumarins is difficult to establish, due to widespread inter-individual variability in its pharmacokinetics and pharmacodynamic responses and its narrow therapeutic window. Numerous genetic and non-genetic factors have been associated with the inter-individual variability in warfarin and acenocoumarol dosing requirements. Although warfarin and acenocoumarol are very similar, the recommended doses are different and they have differences in their pharmacokinetics and pharmacodynamics, as well as in the influence of genetics and other factors [2]. Thus, the effect of *CYP2C9* defective variants is more pronounced for warfarin than for acenocoumarol and as a consequence the explained variability in dosing is 10–15% in the case of warfarin and about 5% in the case

of acenocoumarol [3]. Therefore, data on the influence of pharmacogenetics and other factors on warfarin dose (the most well-studied to date) to obtain stable anticoagulation are not applicable to acenocoumarol or phenprocoumon.

Acenocoumarol, a derivative of coumarin, is commonly used in Spain and other European countries (France, Ireland, UK, Netherlands, Austria, Belgium, France, Italy, Portugal, Poland, Switzerland and Hungary) and numerous countries around the world (Argentina, Chile, India, Ukraine, Israel, Mexico and Canada) [4]. Presently, the initial dosing of acenocoumarol is based mainly on demographic and clinical characteristics, and later dosing is based on INR results obtained during subsequent days and weeks. However, there is substantial variability in this approach, based on the experience and background of the attending physician. In our Autonomous Community (Madrid) there are consensus guidelines for oral anticoagulation applicable to the Regional Health System. Typically, patients start with daily doses of about 2 mg (1 mg in elderly patients), and thereafter the



dose is adjusted in accordance with INR test results. Numerous factors have been associated with the acenocoumarol dose required to obtain stable anticoagulation, including age, gender, weight, height, drug interactions and variations in the *VKORC1* and *CYP2C9* genes [5–6]. Other influential genes, such as *CYP4F2* [7–10] and *APOE* [11–12], have been identified, but their roles are controversial. Teicher et al. [9] described the minor influence of *CYP4F2* in a genome-wide association study of a prospective cohort designed to study neurological, cardiovascular, locomotor and ophthalmological diseases in a population aged 55 years or older [13]. However, Perez-Andreu et al. [10] have suggested that *CYP4F2 V433M* may play an important role in patients with high dosing requirements. In the case of *APOE*, only Visser et al. [11] observed an association between the ε4 allele and the required doses of acenocoumarol.

Given the high rate of adverse effects (including fatal hemorrhagic events [14–15]) due to incorrectly calculated doses, it is necessary to develop new strategies for determining the appropriate weekly dose of acenocoumarol. Several pharmacogenetic algorithms for predicting an appropriate warfarin dose have been proposed [16–25]. Two dosing algorithms for acenocoumarol have been published. The first [26] was based on 193 outpatients on stable anticoagulation. The authors constructed an “acenocoumarol-dose genotype score” based on the number of alleles associated with higher acenocoumarol dosage carried by each subject for each polymorphism, in order to predict those patients who would require high acenocoumarol doses to achieve stable anticoagulation. The second was published recently [27], and included patients on phenprocoumon ($n=229$) and acenocoumarol ($n=168$) treatment. The pharmacogenetic information included *VKORC1* and *CYP2C9* genotypes, in addition to clinical information (weight, height, sex, age and amiodarone). Their algorithm explained 52.6% of the variance in the acenocoumarol maintenance dose in the derivation cohort and 49% in the validation cohort. In both cases the population included patients with a wide range of indications: atrial fibrillation, cardiac valve replacement, thromboembolic disease, and other conditions.

After the development of a pharmacogenetic algorithm, the natural next step is to demonstrate its effectiveness and utility by mean of a controlled randomized trial. One such trial is being carried out with warfarin in the USA: NCT01178034 (Clinical-Trial.gov) including patients with atrial fibrillation. Another trial has been completed: NCT00511173, including patients with atrial fibrillation, pulmonary embolism and deep vein thrombosis. In Europe, a clinical trial is ongoing to test whether the dosing algorithms for coumarin anticoagulants (including acenocoumarol) improve the clinical outcomes of patients [28].

The aim of this study was to develop and validate a pharmacogenetic dosing algorithm for acenocoumarol in a well-defined cohort of patients with thromboembolic disease. We also assessed the algorithm’s performance when compared to only demographic and clinical factors, to evaluate its potential clinical relevance. This dosing algorithm is currently being tested in a randomized trial (Eudra CT: 2009-016643-18).

Materials and Methods

Design and setting

This was an observational, prospective, transversal study. Patients attending the Thromboembolic Disease Unit of the Internal Medicine Service of La Paz University Hospital (Madrid, Spain) between 04/2008 and 06/2009 and meeting the selection criteria were proposed to participate in the study. Ethical

permission for this study was obtained from the Clinical Research Ethics Committee of La Paz University Hospital of Madrid, Spain

Patients and data collection

The main inclusion criteria were as follows: patients with a diagnosis of pulmonary embolism and/or deep venous thrombosis receiving a stable dose of acenocoumarol (weekly dose variation <20% in the last three months) and an INR within the range of 2 to 3 for at least the three previous months. In order to include patients with occasional INR out of this therapeutic range of 2–3, an occasional INR in the range of 1.8 to 3.5 was allowed. These limits were chosen considering that typically, an acenocoumarol dose variation below 10% is recommended if INR values are in this wider range. Exclusion criteria included renal (calculated creatinine clearance <30 ml/min), hepatic (Child-Pugh stage C) or thyroid dysfunction and cancer.

All patient data and blood samples for *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* and *APOE* genotyping were collected during a visit to the clinic after written informed consent was obtained. Patient data collected included: age, gender, race, body weight and height (and calculated BMI), smoking status, INR results and acenocoumarol dose administered in the last 3 months, patient’s education level and concomitant medications. A mini-mental test was also performed and recorded.

Genotyping

Blood samples were collected in tubes containing EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) and stored at -20°C before extraction. DNA was isolated using the QuickGene DNA blood kit S (Fujifilm®, Düsseldorf, Germany). KASPar® technology (KBiosciences®, Hoddesdon, UK) was used to detect the *CYP2C9*3* (rs1057910), *CYP4F2* (rs2108622), *VKORC1* (−1639 G→A = rs9923231) and *APOE* (8016 C→T = rs7412 and 7878 T→C = rs429358) variant alleles. Taqman® technology (Applied Biosystems®, Foster City, USA) was used to detect *CYP2C9*2* (rs1799853). The Hardy-Weinberg equilibrium was calculated with STP-Analyzer 1.2A (Istech, INC®).

Algorithm generation and evaluation of bias and precision

We randomly chose 80% of the included patients (stratified according to *CYP2C9* genotype nested to *VKORC1 A/A* vs. *VKORC1 A/G* and *GG*) as the “derivation cohort” (DC) for developing the dose-prediction model. The remaining 20% of the patients constituted the “test cohort” (TC), which was used to test the final model selected.

After preliminary analysis using univariate and various multivariate methods and a review of methods used in the literature, multiple linear regression (MLR) was used to derive the predictive model. The dependent variable used was the dose needed to obtain a stable INR (ln-transformed), and as independent variables we included all the demographic, clinical and genotypic factors collected (see Table S1).

We performed preliminary MLR using the entire and the derivation cohorts; the analysis included the “introducing” method, the “backward” step method and the “forward” step methods available in SPSS. The results are summarized in Table S2. After this process we choose the variables to be included in the model, selecting those variables found with p-values consistently below 0.1 as shown in Table S2. After running the MLR with these variables, the final model (pharmacogenetic algorithm) was determined. For comparison, a clinical algorithm was also built, using only the clinical independent variables used in the previous

model. The p- and β values are provided, reflecting the significance and the adjusted relative weight, respectively, of each variable included in the model.

The performance of the pharmacogenetic and clinical models was evaluated initially in three cohorts: entire, derivation and test. The calculated uncorrected coefficient of determination (R^2) of each model shows the total variability explained by the model. To ascertain the contribution of each group of variables to the final model, we calculated the unadjusted R^2 , including only the clinical variables, and consecutively the rest of the variables in the model.

After back transformation of the dose predicted by the models, we calculated the mean error (ME; mean of the differences between predicted and observed acenocoumarol doses), mean absolute error (MAE; absolute difference between predicted and observed acenocoumarol doses) and the ME and MAE expressed as a percentage of the observed acenocoumarol dose (%ME and %MAE). For these parameters, standard deviation and 95% confidence intervals were also calculated. The ME reflects the bias in the prediction, and MAE is an estimation of the precision of the model [29].

All analyses were performed using SPSS 16.0 (Inc., IL, USA).

Clinical relevance

To evaluate the clinical relevance of the models built, we classified the patients into three dose groups: patients requiring a low dose (<25th percentile; ≤ 11 mg/week), those requiring a high dose (>75 th percentile; ≥ 21 mg/week) and those requiring intermediate doses (25th to 75th percentile). Next, we calculated the percentage of patients for whom the predicted dose was within $\pm 20\%$ of the real stable dose of acenocoumarol.

To evaluate the potential benefit of using the pharmacogenetic algorithm, we calculated the number needed to genotype (NNG) as used by the International Warfarin Pharmacogenetics Consortium and defined as the number needed to genotype to avoid misclassifying one patient (into one of the predefined dose groups) by the pharmacogenetic model in comparison with the clinical model [21]. The NNG was computed using the standard “number needed to treat” method [30]. The NNG is the inverse of the absolute risk reduction (ARR), calculated as the absolute difference between the event rates for the pharmacogenetic and clinical algorithms.

Results

Patient characteristics

A total of 147 Caucasian patients participated in this study (entire cohort -EC-), 117 in the “derivation cohort” (DC) and 30 in the “test cohort” (TC). The patients’ demographics, genotypes and concurrent medications are shown in Table 1. No statistical differences were observed between the derivation and test cohorts. No patients on amiodarone or enzyme inducers, or carrying *APOE* rs7412 fell in the test cohort. Each SNP was in Hardy-Weinberg equilibrium.

Clinical and pharmacogenetic acenocoumarol dose algorithms

For both the pharmacogenetic and clinical algorithms, Table 2 shows the clinical, demographic and genotypic independent variables that were ultimately included in the multiple linear regression analysis, as well as those variables that were considered the best at predicting the weekly doses of acenocoumarol needed to obtain a stable INR. β values and the significance level of each variable included in the model are also provided in this table. Table 3 shows the variability explained by clinical factors,

CYP2C9, *VKORC1*, *CYP4F2* and *APOE* in the pharmacogenetic algorithm. *CYP4F2* and *APOE* together explain 4.9% of the variability. The variability explained by the models (R^2) was 60.6% for the pharmacogenetic algorithm and 22.0% for the clinical algorithm (Table 4). This difference is statistically significant ($p < 0.001$; McNemar’s test of paired proportions).

Bias and precision of pharmacogenetic and clinical algorithms in the cohorts

Bias (ME and %ME) and Precision (MAE and %MAE) of the pharmacogenetics model was very similar in the derivation and test cohorts and therefore in the entire cohort (Table 4). Bias was very low: -0.66 (SD 5.01), 0.31 (SD 4.99) and -0.46 (SD 5.00) in the DC, TC and EC respectively. Precision is a more clinically relevant parameter that was also quite low and very similar between cohorts; thus the weekly predicted dose deviates from the actual dose by 3.63 mg (± 3.50) in the DC, by 3.75 mg (± 3.24) in the TC and by 3.65 mg (± 3.44) in the EC. These differences were not statistically significant and therefore we can conclude that the model behaves similarly in the three cohorts.

On the other hand, the performance of the clinical algorithm is clearly poorer. First, as previously stated, the variability explained by the clinical variables alone is lower than that obtained by the pharmacogenetic algorithm: 22.0% versus 60.6% in the DC, 7% vs. 38.8% in the TC, and 19.0% vs. 56.8% in the EC, with all differences being statistically significant (see Table 4). Also MAE (and %MAE) is significantly higher in the clinical algorithm when compared to the pharmacogenetic algorithm in both derivation and entire cohorts, although the difference only approaches statistical significance in the test cohort ($p = 0.083$ for MAE) due to its lower size.

From a clinical point of view, a calculation of the percentage of patients correctly classified within the $\pm 20\%$ of the real dose obtaining a stable INR would be more relevant. The pharmacogenetic algorithm correctly predicts the weekly acenocumarol dose in 57.1% of the EC patients, 59.8% of DC cases, and 46.7% in the TC cohort. The figures for the clinical algorithm are lower: 34.7%, 37.6% and 23.3%, respectively (see Table 5).

Performance of pharmacogenetic and clinical algorithms by dose group

As has been shown by other authors [5,6,10,21], most of the incorrectly dosed patients when using standard initiation doses are those needing low or high Coumadin doses, and therefore it is important to analyze the performance of the algorithm in different dose subgroups. Table 6 shows the differences in precision (in absolute terms) between the pharmacogenetic and clinical algorithms in the preformed dose groups. Complete data including bias and precision in the three cohorts are shown in Table S3. In the EC, differences in bias and precision parameters between pharmacogenetic and clinical models are statistically significant in the low and high dose groups, but do not consistently reach significance in the intermediate group. In the low dose group, the dose predicted by the clinical algorithm overestimates the actual dose by 60.60%; however the dose overestimation of the pharmacogenetic algorithm is limited to 37.38% ($p = 0.005$). In the high dose group, both algorithms underestimate the dose but to a lesser degree in the pharmacogenetic algorithm: 22.45%, versus 31.60% in the clinical algorithm ($p < 0.001$). Bias and precision in the DC is quite similar to that observed in the EC. In the TC, differences only approach statistical significance in the high dose group (see Table 6 and Table S3).

Table 1. Characteristics of study cohorts.

Variable	Derivation cohort	Testing cohort	P value
	(N = 117)	(N = 30)	
Gender [n (%)]			0.29
Male	61 (52.1)	14 (46.7)	
Female	56 (47.9)	16 (53.3)	
Age, in years [mean (SD)]	67.6 (17)	67.5 (17.7)	0.73
Weight, in kilograms [mean (SD)]	74.3 (15.4)	75.5 (13.5)	0.59
Height, in meters [mean (SD)]	1.63 (0.1)	1.62 (0.1)	0.9
Body mass index (BMI), in kg/m ² [mean (SD)]	27.8 (4.7)	28.6 (4.3)	0.66
Current smoker [n (%)]	12 (10.3)	5 (16.7)	0.96
Mini-mental test [mean (SD)]	27.0 (4.0)	27.0 (3.6)	0.56
Acenocoumarol weekly dose [mean (SD)]	16.7 (7.4)	15.7 (6.0)	0.46
Patients' education			0.83
No education	14 (12.2)	6 (20.0)	
Primary school	55 (47.8)	14 (46.6)	
Secondary school	29 (25.2)	6 (20.0)	
University degree	17 (14.8)	4 (13.4)	
Concurrent medications [n (%)]			
Enzyme inducers ⁽¹⁾	5 (4.3)	0	0.25
Enzyme inhibitors ⁽²⁾	63 (54.7)	16 (53.3)	1.00
Amiodarone	2 (1.7)	0	0.47
Non-steroidal anti-inflammatory drug	17 (14.8)	1 (3.3)	0.12
CYP2C9 genotype [n (%)] ⁽³⁾			0.62
*1/*1	60 (51.7)	19 (63.3)	
*1/*2	37 (31.9)	6 (20)	
*1/*3	16 (13.8)	4 (13.3)	
*2/*2 or *2/*3 or *3/*3	3 (2.6)	1 (3.3)	
VKORC1 genotype [n (%)]			0.34
G/G	49 (41.9)	9 (30)	
A/G	49 (41.9)	17 (56.7)	
A/A	19 (16.2)	4 (13.3)	
CYP4F2 genotype [n (%)] ⁽⁴⁾			0.24
VV	46 (40.4)	15 (55.6)	
VM	54 (47.4)	8 (29.6)	
MM	14 (12.3)	4 (14.8)	
APOE rs7412 genotype [n (%)]			0.133
C/C	103 (88.0)	23 (76.7)	
C/T	12 (10.3)	7 (23.3)	
T/T	2 (1.7)	0	
APOE rs429358 genotype [n (%)]			0.551
T/T	94 (82.5)	20 (76.9)	
T/C	18 (15.8)	6 (23.1)	
C/C	2 (1.7)	0	

⁽¹⁾CYP inducers that were considered in this analysis included phenytoin, carbamazepine and rifampin.

⁽²⁾CYP inhibitors that were considered in this analysis included azoles, proton pump inhibitors and statins.

⁽³⁾For CYP2C9 genotype, the usual * designation is used (*2 = rs1799853 and *3 = rs1057910).

⁽⁴⁾VV indicates homozygous V433 carriers; VM, heterozygous V433M carriers; MM, homozygous M433 carriers.

doi:10.1371/journal.pone.0041360.t001

Table 6 also shows a comparison of the percentage of well-classified patients in the three pre-established dose groups, as determined by both the pharmacogenetic and clinical models. The

pharmacogenetic algorithm correctly predicts the actual dose for a higher percentage of patients than the clinical algorithm. For those patients requiring a low dose, the pharmacogenetic algorithm



Table 2. Variables ultimately included in the acenocoumarol pharmacogenetic and clinical dosing algorithms, and values of Beta reflecting their relative weight in the final model.

Pharmacogenetic algorithm			Clinical algorithm		
Beta	Variable	P value	Beta	Variable	P value
Clinical variables					
-0.294	Age	<0.0001	-0.01	Age	0.001
0.240	BMI	<0.0001	0.016	BMI	0.053
0.119	Enzyme inducer status	0.062	0.41	Enzyme inducer status	0.022
-0.142	Amiodarone status	0.026	-0.45	Amiodarone status	0.13
CYP2C9					
-0.257	CYP2C9 *1/*3	<0.0001			
-0.253	CYP2C9 *2/*2 or *2/*3 or *3/*3	<0.0001			
VKORC1					
-0.150	VKORC1 A/G	0.039			
-0.533	VKORC1 A/A	<0.0001			
CYP4F2					
0.199	CYP4F2 MM	0.002			
APOE					
0.123	APOE (rs7412)T/T	0.067			

Beta: standardized regression coefficient, which reflects the relative weight of each variable included in the model.

doi:10.1371/journal.pone.0041360.t002

provides significantly better prediction of the dose than the clinical algorithm: 41% vs. 13%, (absolute difference: 29%; 95% CI: 11–46). Similarly, for patients requiring a high dose, the pharmacogenetic algorithm performs significantly better than the clinical algorithm: 44% vs. 18% (absolute difference: 26%; 95% CI: 6–45). For patients requiring an intermediate dose, the differences are less

Table 3. Unadjusted R² for each group of variables and resultant cumulative R² of the final model.

Pharmacogenetic algorithm		
Variable	Cumulative R ² (%)	R ² (%)
Clinical variables	22.0%	22.0%
Age		
BMI		
Enzyme inducers status		
Amiodarone status		
CYP2C9	11.7%	33.7%
CYP2C9 *1/*3		
CYP2C9 *2/*2 or *2/*3 or *3/*3		
VKORC1	22.0%	55.7%
VKORC1 A/G		
VKORC1 A/A		
CYP4F2	3.6%	59.3%
CYP4F2 MM		
APOE	1.3%	60.6%
APOE (rs7412)T/T		

doi:10.1371/journal.pone.0041360.t003

and statistical significance is marginal: 77% correct prediction by the pharmacogenetic algorithm vs. 61% by the clinical algorithm (absolute difference: 16%; 95% CI: 0–32).

To globally estimate the potential clinical relevance of the pharmacogenetic algorithm, we calculated the number of patients needed to genotype (NNG) to avoid over- or under-dosing (i.e., misclassifying patients). The global percentage of correctly classified doses by the pharmacogenetic algorithm in the entire cohort was 57.1% compared with 36.7% when using only clinical variables. Therefore the absolute difference is 22% and the NNG is 4.5 (95% CI: 3–8.8). The figures are similar for the derivation and test cohort. Table 5 depicts the percentage of patients misclassified by the pharmacogenetic and clinical algorithms, the absolute risk reduction (ARR) between both algorithms and the calculated NNG with their corresponding confidence intervals. In all cases, the ARR is about 20% and therefore the NNG about 5, although in the test cohort neither reached statistical significance.

Discussion

Oral anticoagulation with coumarin derivatives is associated with a high incidence of bleeding complications as well as therapeutic failures. Every year, 2–5% of patients on anticoagulant therapy experience serious bleeding, and 0.5–1% of patients have a fatal bleeding episode [1]. These complications are due to the narrow therapeutic range of the INR and to the high dose variability needed to obtain stable anticoagulation, which is reached after many INR checks and changes to the dose based on trial and error. Thus, according to Caraco et al., the time needed to obtain a pharmacodynamic steady state in warfarin-treated patients is 40.27 days (95% CI, 35.9–44.6 days) [31]. For acenocoumarol, Gadisseur et al. [32] report that patients are maintained in the therapeutic range only 30% of the time during the first 6 weeks of treatment. This lengthy method to obtain an efficacious and stable INR carries the risk of inefficacy and increases bleeding episodes in the first month of anticoagulation, as

Table 4. Predictive performance of pharmacogenetic and clinical algorithms.

	Pharmacogenetic algorithm	Clinical algorithm	Difference (95% CI)	P value
Derivation cohort (n = 117)				
R2‡	60.6%‡	22.0%		<0.001
ME	−0.66 (5.01)	−1.22 (6.68)	−0.55 (−1.29 to 0.18)	0.142
MAE	3.63 (3.50)	5.08 (4.48)	1.46 (0.88 to 2.04)	<0.001
%ME	4.43 (33.59)	8.92 (50.20)	4.49 (−2.60 to 11.58)	0.212
%MAE	23.43 (24.38)	34.53 (37.38)	11.09 (5.04 to 17.16)	<0.001
Testing cohort (n = 30)				
R2‡	38.8%‡	7.0%		<0.001
ME	0.31 (4.99)	−0.13 (5.87)	0.43 (−1.91 to 1.05)	0.554
MAE	3.75 (3.24)	4.86 (3.18)	1.11 (−0.16 to 2.37)	0.083
%ME	9.96 (34.63)	12.08 (45.76)	2.11 (−11.97 to 16.20)	0.761
%MAE	25.76 (24.81)	35.05 (31.21)	9.29 (−3.16 to 21.74)	0.138
Entire cohort (n = 147)				
R2‡	56.8%‡	19.0%		<0.001
ME	−0.46 (5.00)	−0.99 (6.52)	−0.53 (−1.18 to 0.13)	0.113
MAE	3.65 (3.44)	5.03 (4.23)	1.38 (0.86 to 1.91)	<0.001
%ME	5.57 (33.76)	9.57 (49.18)	4.00 (−2.26 to 10.26)	0.208
%MAE	23.9 (24.40)	34.64 (36.09)	10.72 (5.34 to 16.11)	<0.001

ME: mean error (predicted – observed); %ME: mean error expressed as a percentage (%ME = ME/Observed*100); MAE: mean absolute error (= $\text{SQR}[(\text{Pred}-\text{Obs})^2]$); %MAE: mean absolute error expressed as a percentage (%MAE = MAE/Obs*100).

‡McNemar's test of paired proportions.

doi:10.1371/journal.pone.0041360.t004

Table 5. Percentage of global correct classification (Predicted Dose within $\pm 20\%$ of Real Dose) by genetic and clinical algorithms in the derivation, test and entire cohorts.

	% correctly classified		ARR (95% CI)	NNG (95% CI)
	Pharmacogenetic	Clinical		
Derivation cohort (n = 117)	70/117	44/117	22.0%	4.5
	59.8%	37.6%	(10 to 35)*	(2.88 to 10.27)
Testing cohort (n = 30)	14/30	7/30	23.3%	4.3
	46.7%	23.3%	(0.0 to 47)	(−2.14 to 1359)
Entire cohort (n = 147)	84/147	51/147	22.0%	4.5
	57.1%	34.7%	(11 to 34)*	(2.98 to 8.81)

*p<0.001

doi:10.1371/journal.pone.0041360.t005



Table 6. Precision expressed as MAE (SD) of pharmacogenetic and clinical algorithms by dose group in the entire cohort.

Dose Group	PhGx algorithm	Clinical Algorithm	Difference	P value*
Low (n = 46)				
MAE	3.36 (3.13)	4.95 (3.30)	1.59 (3.84) 0.44 to 2.75	0.008
% correctly classified	41%	13%	29 (11 to 46)	0.0049
Median (n = 62)				
MAE	2.28 (2.04)	2.81 (2.49)	0.52 (2.43) −0.10 to 1.14	0.099
% correctly classified	77%	61%	16 (0 to 32)	0.051
High (n = 39)				
MAE	6.13 (4.18)	8.62 (4.93)	2.49 (3.08) 1.50 to 3.49	<0.001
% correctly classified	44%	18%	26 (6 to 45)	0.0272

*Between-group comparisons calculated by paired "t" test.

doi:10.1371/journal.pone.0041360.t006

described by Landefeld et al. [33]. Also, the time within the therapeutic range strongly correlates with bleeding and the rates of thromboembolism [34–35].

One potential approach to improving anticoagulant treatment would be to use a dosing algorithm including demographic and clinical variables and genetic testing. Some algorithms have been published for warfarin [16–18,23–25] but only a few for acenocoumarol [26,27]. Some of these algorithms are in the process of validation through clinical trials, as previously mentioned. The population included in this type of study is usually a broad-spectrum population that mainly includes patients with atrial fibrillation, prosthetic valves and thromboembolic disease. On the other hand, the sources of the patients are registries from hematology and anticoagulation clinics and therefore are based on retrospective data.

In this article, we describe the development and performance of a pharmacogenetic algorithm for acenocoumarol dosing in a prospective cohort of patients with thromboembolic disease. These patients are typically younger, have fewer concurrent conditions [36] and have a lower target INR (2 to 3). Clearly, this implies the theoretical advantage of less variability in the population characteristics and target INR. A drawback is that application of our algorithm may be limited mainly to patients with DVT and PE, and its use in other patients will require prior validation. However, it must be stressed that in thromboembolic disease it is crucial to obtain the target INR as soon as possible to avoid a lack of efficacy as well as excessive coagulation.

Another characteristic of this study is that it is the first acenocoumarol algorithm including *CYP4F2* and *APOE* in addition to the well-known *VKORC1* and *CYP2C9* gene variants, as well as clinical factors such as age, BMI and interacting drugs. All together these factors in our model explain 60.6% of the total variability in the acenocoumarol dose needed to obtain a stable INR. This percentage is significantly higher compared to the variability explained when only non-genetic factors are considered. This explained variability is similar or better than that obtained in other studies with warfarin [21,23–25] and acenocoumarol [26,27]. The contribution of *CYP4F2* and *APOE* to the explained variability in the acenocoumarol dose by our algorithm is 3.6% and 1.3%, respectively.

The influence of *CYP4F2* has been described in several studies with warfarin and acenocoumarol and has only been included in a

published algorithm for warfarin [23] and in the algorithm available at WarfarinDosing.org. The contribution of *CYP4F2* in our study is similar to the 4% described by Sagriya et al. for warfarin [37] and can be considered relevant.

Apolipoprotein E (*APOE*) mediates the uptake of vitamin K-rich lipoproteins in the liver and other tissues. It is a polymorphic protein defined by three alleles, ε2, ε3 and ε4 (defined by two SNPs, rs429358 and rs7412), at a single gene locus on chromosome 19. Visser et al. [11] observed that individuals who are homozygous or heterozygous for the ε4 allele (rs429358) require significantly lower doses of acenocoumarol to reach the same level of anticoagulation as patients with the ε3/ε3 genotype, and individuals with the ε2/ε2 or ε2/ε3 (homozygous or heterozygous for rs7412, respectively) genotypes require higher doses of acenocoumarol (however, not a statistically significant difference). Also Cavallri et al. showed that *APOE* is associated with the time to achieve a stable warfarin dose in African-American patients [38]. To date, *APOE* has not been considered in any of the algorithms available. The inclusion of *APOE* in our algorithm needs discussion, as it is based on only two patients each and the statistical significance in the model is slightly above 0.05 (p = 0.067). The inclusion of this variable was based on three facts: a) all or most of the preliminary regression analyses we performed included it; b) the weight of the factor in the final model as reflected by its β value in the model was considered quite high (in the range of that observed for *VKORC1 A/G*) and c) it is associated with the need for higher doses, for which other algorithms perform more poorly. For example, the IWPG algorithm [21] only classified 24.8% of the patients needing higher doses of warfarin correctly. On the other hand, the contribution of *APOE* (1.3%) to the total variability explained by our model is low but is still considered valuable. Several algorithms have included variables contributing less to the variability and some publications have considered contributions of this magnitude to be adequate (e.g., gender and amiodarone use in the EU-PACT algorithm).

On the other hand, the inclusion of amiodarone in the model is clearly justified as its influence in the coumarins dose is clearly established in the literature.

We generated the algorithm using linear regression, which has the advantages of simplicity and ease of use. This approach has been previously used by the International Warfarin Pharmacogenetics Consortium (IWPC) [21] and by the EU-PACT Study

Group [26]. Also we tested our algorithm in a different cohort that was randomly obtained from the entire cohort. Obviously, given that the test cohort is small, its R^2 is lower than that of the derivation cohort (38.8% vs. 60.6%), but bias and precision are very similar in the test cohort and in the derivation and entire cohorts (see Table 3). By comparison, using their algorithm, the IWPC obtained a lower R^2 for warfarin in their derivation cohort than that obtained with our algorithm (47% vs. 60.6%, respectively) and a higher R^2 in their test cohort (43% vs. 38.8%, respectively), as their test cohort was much larger. The algorithm developed by the EU-PACT Study Group for acenocoumarol shows a slightly lower R^2 value in the derivation cohort ($n = 471$): 52.6% for the genotype-guided dosing; in the validation cohort their figure was 47.3%. As shown in Table 7, we obtained similar or even better MAEs and percentages of correctly classified patients according to the actual dose than in the IWPC and EU-PACT studies. It is worth mentioning that despite the differences in the type of patients included, the sources of data and the number of patients included (in addition to the drug itself), the performance of the genetic algorithms was similar in the three studies.

When the actual required dose was classified into three groups, the potential of our algorithm to assign patients into the correct dose group was good. In those patients needing a standard dose (11–21 mg/week), the performance of the pharmacogenetic algorithm was slightly better than the clinical algorithm in the entire and derivation cohorts (77.0% vs. 61.0% in the EC and 78.9% vs. 61.5% in the DC) but did not reach statistical significance in the TC cohort due to the smaller size (70% vs. 60%). However, in the group requiring lower weekly doses (<11 mg/week, representing 31.3% of the cohort), the differences in the percentage of correctly classified patients were clinically relevant and significantly higher using the pharmacogenetic algorithm (41.0% vs. 13.0% in the EC, 44.1% vs. 14.7% in the DC and 33.3% vs. 8.3% in the TC). A similar result was found in the high dose group, where the percentage of correctly classified patients by the pharmacogenetic algorithm was significantly higher (44.0% vs. 18.0% in the EC, 45.2% vs. 22.6% in the DC and 37.5% vs. 0.0% in the TC). Complete data are detailed in Table S4.

Another important aspect to consider is the over- and underestimation of the predicted doses in the low and high-dose groups. In patients needing low doses, both the clinical and pharmacogenetic algorithms overestimated the dose, but this overestimation was lower with the pharmacogenetic algorithm (in the EC it was 3.36 mg/week vs. 4.95 mg/week in the clinical algorithm). The opposite phenomenon occurred in the patients needing the highest dose, for whom the better performance of the pharmacogenetic algorithm over the clinical algorithm was maintained (6.13 vs. 8.62 mg/week, as in the EC). See the

supplementary material for complete data. This phenomenon was also observed in the IWPG study [21] but was not evaluated in the EU-PACT study [26]. In this aspect our algorithm seems to perform better than the IWPG algorithm when predicting doses for patients who need higher doses. Across the entire cohort, our algorithm was able to correctly classify 44% of patients in need of higher doses, compared to 26.4% in the case of the IWPG algorithm. These figures were 37.5% and 24.8%, respectively, in the validation/test cohort. This data suggest that the inclusion of the *CYP4F2* and *APOE* genotypes, may improve prediction in patients needing high doses, because these genotypes are associated with a higher dose of acenocoumarol (and probably warfarin) to obtain the target INR.

Considering the global benefits of using our acenocoumarol pharmacogenetic algorithm, the number needed to genotype to avoid a misclassified patient (NNG) can be calculated to be 5 in any cohort. This result is at least as clinically relevant as those obtained by similar studies with warfarin [21]. Therefore if dose adjustment in clinical practice behaves similar to the clinical algorithm, this pharmacogenetic algorithm could better predict the needed acenocoumarol dose and prevent patients from being over- or undercoagulated.

The main limitation of our study was the limited sample size. First, we did not have enough patients in the derivation cohort to include potentially important factors that could influence the stable dose of acenocoumarol, such as smoking status or other concurrent medications. Nevertheless, the R^2 (60.6%) of our algorithm (the percentage of dose variability explained by the model) was higher than that of other acenocoumarol (and warfarin) dosing algorithms, indicating good performance when predicting actual doses and indicating more accurate dose predictions compared to the use of only clinical variables. This improved prediction was especially true for patients who need low or high doses and, therefore, have a higher risk of bleeding or re-thrombosis. Another limitation is the size of the testing cohort, which was too small to include every type of patient included in the derivation cohort and to give it enough power for most of the comparisons. Also this small size would explain the low R^2 of the clinical algorithm. However, the behavior of the pharmacogenetic algorithm in this cohort is very similar to the performance in the test or entire cohort in terms of bias and precision measures and in the percentage of correctly classified patients. The limitation due to the restricted population (and target INR) has already been discussed; however, this population restriction also has the potential advantage of higher specificity, and we can hypothesize that this could be a reason for the robust performance of our model despite the low numbers.

Table 7. Comparison of R^2 and MAE in our study and two other studies (IWPC and EU-PACT).

IWPC (20)		EU-PACT (26)		This Study	
EC	VC	DC	VC	DC/EC	VC
(n = 4043)	(n = 1009)	(n = 375)	(n = 168)	(n = 117)	(n = 30)
R^2	47%	43%	52.6%	49.0%	60.6%/56.8%
MAE	≈4.7	≈4.7	3.64	3.99	3.63/3.65
% correctly classified	≈46%	≈45.5%	NA	NA	59.8/57.1%

DC: Derivation cohort; EC: entire cohort; VC: Validation/Testing cohort; MAE: mean absolute error (mg/week). MAE for warfarin dose has been corrected considering a dose equivalence ratio of 0.57 between both drugs.

doi:10.1371/journal.pone.0041360.t007



We have not included other genes that have been described to influence coumarins dosing. Coumarins sensitivity has been also associated to polymorphisms of γ -glutamyl carboxylase (GGCX) that activates several clotting factors, and to chaperon calumenin (CALU) which inhibits GGCX, but this later polymorphism is very rare in Caucasian and its influence in acenocoumarol dosing seems to be very low [39].

In conclusion, we have developed the first pharmacogenetic dosing algorithm for acenocoumarol that includes clinical variables and information about four genes (*VKORC1*, *CYP2C9*, *CYP4F2* and *APOE*) and that is able to reasonably predict stable therapeutic doses of acenocoumarol for patients with thromboembolic disease. It would be especially useful in clinical practice for patients requiring low (<11 mg/week) or high (>21 mg/week) therapeutic acenocoumarol doses, which represent nearly 60% of the entire cohort. To test the efficiency and effectiveness of this pharmacogenetic dosing algorithm for acenocoumarol vs. usual care, a controlled, randomized, single-blind, multi-center clinical trial has been designed and is being carried out (Eudra CT:2009-016643-18). The trial is scheduled to be completed by mid-2012.

Supporting Information

Table S1 Demographic, clinical and genotype data in the model.

(DOCX)

References

1. Stehle S, Kirchheimer J, Lazar A, Fuhr U (2008) Pharmacogenetics of oral anticoagulants: a basis for dose individualization. *Clin Pharmacokinet* 47(9): 565–94.
2. Takahashi H, Wilkinson GR, Padroni R, Echizen H (2004) CYP2C9 and oral anticoagulation therapy with acenocoumarol and warfarin: similarities yet differences. *Clin Pharmacol Ther* 75: 376–380.
3. Schalekamp T, Brasser BP, Roijers JFM, Chahid Y, van Geest-Daalderop JHH, et al. (2006) VKORC1 and CYP2C9 genotypes and acenocoumarol anticoagulation status: Interaction between both genotypes affects overanticoagulation. *Clin Pharmacol Ther* 80(1): 13–22.
4. Martindale: The Complete Drug Reference. [online] London: Pharmaceutical Press. Available: <http://www.medicinescomplete.com>. Accessed 19 January 2012.
5. Spreafico M, Lodigiani C, van Leeuwen Y, Pizzotti D, Rota LL, et al. (2008) Effects of CYP2C9 and VKORC1 on INR variations and dose requirements during initial phase of anticoagulant therapy. *Pharmacogenomics* 9(9): 1237–50.
6. Teichert M, van Schaik RH, Hofman A, Uitterlinden AG, de Smet PA, et al. (2009) Genotypes associated with reduced activity of VKORC1 and CYP2C9 and their modification of acenocoumarol anticoagulation during the initial treatment period. *Clin Pharmacol Ther* 85(4): 379–86.
7. Pérez-Andreu V, Roldán V, Antón AI, García-Barberá N, Corral J, et al. (2009) Pharmacogenetic relevance of *CYP4F2* V433M polymorphism on acenocoumarol therapy. *Blood* 113(20): 4977–9.
8. Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, Gage BF, Falkowski M, et al. (2008) *CYP4F2* genetic variant alters required warfarin dose. *Blood* 111(8): 4106–12.
9. Teichert M, Eijgelsheim M, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, van Schaik RH, et al. (2009) A genome-wide association study of acenocoumarol maintenance dosage. *Hum Mol Genet* 18(19): 3758–68.
10. Pérez-Andreu V, Roldán V, López-Fernández MF, Antón AI, Alberca I, et al. (2010) Pharmacogenetics of acenocoumarol in patients with extreme dose requirements. *J Thromb Haemost* 8(5): 1012–7.
11. Visser LE, Trienekens PH, De Smet PA, Vullo AG, Hofman A, et al. (2005) Patients with an *APOE* epsilon4 allele require lower doses of coumarin anticoagulants. *Pharmacogenet Genomics* 15(2): 69–74.
12. Cadamuro J, Dieplinger B, Felder T, Kedenko I, Mueller T, et al. (2010) Genetic determinants of acenocoumarol and phenprocoumon maintenance dose requirements. *Eur J Clin Pharmacol* 66(3): 253–60.
13. Hofman A, Grobbee DE, de Jong PT, van den Ouwerland FA (1991) Determinants of disease and disability in the elderly: the Rotterdam Elderly Study. *Eur J Epidemiol* 7(4): 403–22.
14. Palareti G, Leali N, Coccheri S, Poggi M, Manotti C, et al. (1996) Bleeding complications of oral anticoagulant treatment: an inception-cohort, prospective collaborative study (ISCOAT). Italian Study on Complications of Oral Anticoagulant Therapy. *Lancet* 348(9025): 423–8.
15. van der Meer FJ, Rosendaal FR, Vandebroucke JP, Briët E (1993) Bleeding complications in oral anticoagulant therapy. An analysis of risk factors. *Arch Intern Med* 153(13): 1557–62.
16. Anderson JL, Horne BD, Stevens SM, Grove AS, Barton S, et al. (2007) Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation* 116(22): 2563–70.
17. Milligan EA, Lenzini PA, Milligan PE, Grossi L, Eby C, et al. (2007) Genetic-based dosing in orthopedic patients beginning warfarin therapy. *Blood* 110(5): 1511–5.
18. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, et al. (2005) The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 106(7): 2329–33.
19. Wu AH (2007) Use of genetic and nongenetic factors in warfarin dosing algorithms. *Pharmacogenomics* 8(7): 851–61.
20. Caldwell MD, Berg RL, Zhang KQ, Glurich I, Schmelzer JR, et al. (2007) Evaluation of genetic factors for warfarin dose prediction. *Clin Med Res* 5(1): 8–16.
21. Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE, et al. (2009) Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med* 360(8): 753–64.
22. Meijer K, Kim YK, Carter D, Schulman S (2011) A prospective study of an aggressive warfarin dosing algorithm to reach and maintain INR 2 to 3 after heart valve surgery. *Thromb Haemost* 105(2): 232–8.
23. Zambon CF, Pengo V, Padroni R, Bassi D, Schiavon S, et al. (2011) VKORC1, CYP2C9 and *CYP4F2* genetic-based algorithm for warfarin dosing: an Italian retrospective study. *Pharmacogenomics* 12(1): 15–25.
24. Moreau C, Pautas E, Gouin-Thibault I, Golmard JL, Mahé I, et al. (2011) Predicting the warfarin maintenance dose in elderly inpatients at treatment initiation: accuracy of dosing algorithms incorporating or not VKORC1/CYP2C9 genotypes. *J Thromb Haemost* 9(4): 711–718.
25. Lenzini P, Wadelius M, Kimmel S, Anderson JL, Jorgensen AL, et al. (2010) Integration of genetic, clinical, and INR data to refine warfarin dosing. *Clin Pharmacol Ther* 87(5): 572–8.
26. Verde Z, Ruiz JR, Santiago C, Bandrés F, et al. (2010) A novel, single algorithm approach to predict acenocoumarol dose based on CYP2C9 and VKORC1 allelic variants. *PLoS One* 5(6): e11210.
27. Rianne MF, van Schie RM, Wessels JA, le Cessie S, de Boer A, et al. (2011) Loading and maintenance dose algorithms for phenprocoumon and acenocoumarol using patient characteristics and pharmacogenetic data. *Eur Heart J* 32(15): 1909–17.
28. van Schie RM, Wadelius MI, Kamali F, Daly AK, Manolopoulos VG, et al. (2009) Genotype-guided dosing of coumarin derivatives: the European pharmacogenetics of anticoagulant therapy (EU-PACT) trial design. *Pharmacogenomics* 10(10): 1687–95.
29. Sheiner LB and Beal SL (1981) Some suggestions for measuring predictive performance. *Journal Pharmacokin Biopharm* 9(4): 503–512.
30. Cook RJ, Sackett DL (1995) The number needed to treat: a clinically useful measure of treatment effect. *BMJ* 310(6977): 452–4.



31. Caraco Y, Blotnick S, Muszkat M (2008) CYP2C9 genotype-guided warfarin prescribing enhances the efficacy and safety of anticoagulation: a prospective randomized controlled study. *Clin Pharmacol Ther* 83(3):460–70.
32. Gadiisseur AP, van der Meer FJ, Adriansen HJ, Fijn SD, Rosendaal FR (2002) Therapeutic quality control of oral anticoagulant therapy comparing the short-acting acenocoumarol and the long-acting phenprocoumon. *British J Haematol* 117:940–946.
33. Landefeld CS, Goldman L (1989) Major bleeding in outpatients treated with warfarin: incidence and prediction by factors known at the start of outpatient therapy. *Am J Med* 87(2): 144–52.
34. Hirsh J, Fuster V, Ansell J, Halperin JL (2003) American Heart Association/American College of Cardiology Foundation guide to warfarin therapy. *Circulation* 107: 1692–1711.
35. Ansell J, Hirsh J, Dalen J, Bussey H, Anderson D, et al. (2001) Managing oral anticoagulant therapy. *Chest* 119(1 Suppl): 22S–38S.
36. Guijarro R, Montes J, Sanromán C, Monreal M (2008) Venous thromboembolism in Spain. Comparison between an administrative database and the RIETE registry. *Eur J Intern Med* 19(6): 443–6.
37. Sagreya H, Berube C, Wen A, Ramakrishnan R, Mir A, et al. (2010) Extending and evaluating a warfarin dosing algorithm that includes *CYP4F2* and pooled rare variants of CYP2C9. *Pharmacogenet Genomics* 20(7): 407–13.
38. Cavallari LH, Butler C, Langacec TY, Wardak N, Patel SR, et al. (2011) Association of apolipoprotein E genotype with duration of time to achieve a stable warfarin dose in African-American patients. *Pharmacotherapy* 31(8): 785–92.
39. Rathore SS, Agarwal SK, Pande S, Singh SK, Mittal T, et al. (2012) Therapeutic Dosing of Acenocoumarol: Proposal of a Population Specific Pharmacogenetic Dosing Algorithm and Its Validation in North Indians. *PLoS ONE* 7(5): e37844.

Table S1. Demographic, clinical and genotype data in the model

Variable	
Gender	Male or Female
Age	In years
Body mass index (BMI)	In kg/m ²
Current smoker	Yes or No
Mini-Mental test	0-30
Patients' education	No education, Primary school, Secondary school or University degree
Enzime inducers treatment	Yes (phenytoin, carbamazepine and rifampin) or No
Enzime inhibitors	Yes (azole antifungals, proton pump inhibitors and statins) or No
Amiodarone treatment	Yes or No
Non-steroidal anti-inflammatory drug	Yes or No
<i>CYP2C9</i> genotype	
*1/*2	Yes, No or Not Known ⁽¹⁾
*1/*3	Yes, No or Not Known
*2/*2 or *2/*3 or *3/*3	Yes, No or Not Known
<i>VKORC1</i> genotype	
A/G	Yes or No
A/A	Yes or No
<i>CYP4F2</i> genotype	
VM	Yes, No or Not Known ⁽²⁾
MM	Yes, No or Not Known
<i>APOE</i> rs7412	
C/T	Yes or No
T/T	Yes or No
<i>APOE</i> rs429358	
T/C	Yes, No or Not Known ⁽³⁾
C/C	Yes, No or Not Known

(1) One not known case for *CYP2C9* genotype.

(2) Six not known cases for *CYP4F2* genotype

(3) Three not known cases for *ApoE* rs429358

Table S2. Results of Multiple Linear Regression (LR) in the Entire Cohort (EC) and Derivation Cohort (DC) following different methods for variable evaluation (Introduce, by forward steps and backward steps). After these analyses the variables to be included in the final model were selected as depicted in the last column.

	LR EC Introduce	LR DC Introduce	LR EC Backward	LR DC Backward	LR EC Forward	LR DC Forward	Variable Selected
Age	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	Yes
Gender	0.111	>0.2	>0.2	>0.2	>0.2	>0.2	No
BMI	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	0.002	<0.001	Yes
Amiodarone	0.026	0.029	0.02	.029	0.034	0.027	Yes
Statines	>0.2	>0.2	>0.2	>0.2	>0.2	>0.2	No
NSAIDs	0.097	>0.2	0.085	0.184	>0.2	>0.2	No
PPI	>0.2	>0.2	>0.2	>0.2	>0.2	>0.2	No
Drug Inducers	0.042	0.064	0.053	0.078	>0.2	0.063	Yes
Nº cigarettes/day	0.11	>0.2	0.048	>0.2	>0.2	>0.2	No
CYP2C9 1_2	>0.2	>0.2	>0.2	>0.2	>0.2	>0.2	No
CYP2C9 1_3	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	Yes
CYP2C9 2_2	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	Yes
CYP2C9 Unknown	>0.2	>0.2	>0.2	>0.2	>0.2	>0.2	No
CYP4F2 1_2	0.108	>0.2	0.089	0.158	>0.2	>0.2	No
CYP4F2 2_2	<0.001	0.001	<0.001	0.001	0.007	0.002	Yes
CYP4F2 Unknown	0.036	>0.2	0.024	>0.2	>0.2	>0.2	No
VKORC 1_2	0.003	0.036	0.003	0.053	>0.2	0.037	Yes
VKORC 2_2	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.2	<0.001	Yes
APOE 176 1_2	0.07	>0.2	>0.2	>0.2	0.001	>0.2	No
APOE 176 2_2	>0.2	0.074	0.074	0.086	<0.001	0.064	Yes
R2	0.618	0.634	0.607	0.612	0.531	0.605	

Table S3. Bias (ME and %ME) and precision (%MAE and 95CI) of pharmacogenetic and clinical algorithms by dose group in each cohort (entire, derivation and testing). Between group comparisons calculated by paired “t” test.

Dose Group	Derivation Cohort				Testing cohort				Entire cohort			
	PhGx algorithm*	Clinical Algorithm*	Difference**	P value	PhGx algorithm*	Clinical Algorithm*	Difference**	P value	PhGx algorithm*	Clinical Algorithm*	Difference**	P value
Low												
ME	2.28 (3.63)	4.81 (3.23)	2.53 (4.02) 1.10 to 3.95	0.001	3.61 (4.14)	5.31 (3.64)	1.70 (4.58) -1.21 to 4.61	0.225	2.63 (3.77)	4.94 (3.31)	2.31 (4.14) 1.06 to 3.55	0.001
MAE	3.08 (2.95)	4.82 (3.22)	1.73 (3.72) 0.41 to 3.05	0.012	4.09 (3.61)	5.31 (3.64)	1.21 (4.30) -1.52 to 3.95	0.350	3.36 (3.13)	4.95 (3.30)	1.59 (3.84) 0.44 to 2.75	0.008
%ME	28.53 (43.5)	62.57 (55.24)	34 (56.34) 14.07 to 54.03	0.002	33.69 (37.91)	54.87 (40.69)	21.19 (51.60) -11.59 to 53.97	0.183	29.90 (41.75)	60.52 (51.43)	30.62 (54.84) 14.14 to 47.09	0.001
%MAE	36.96 (36.41)	62.67 (55.13)	25.71 (54.51) (6.38 to 45.04)	0.011	38.56 (32.45)	54.87 (40.69)	16.32 (49.62) -15.21 to 47.84	0.279	37.38 (35.04)	60.60 (51.34)	23.20 (52.86) 7.32 to 39.08	0.005
Intermed.												
ME	-0.65 (3.86)	-0.12 (3.17)	-0.53 (2.86) -1.33 to 0.27	0.187	1.05 (2.49)	-1.04 (2.91)	-2.10 (3.32) -4.47 to 0.28	0.077	0.07 (3.08)	-7.72 (3.70)	-0.79 (2.97) -1.55 to -0.29	0.042
MAE	2.37 (2.07)	2.87 (2.63)	0.50 (2.29) -0.14 to 1.14	0.125	1.86 (1.90)	2.49 (1.68)	0.62 (3.18)	0.548	2.28 (2.04)	2.81 (2.49)	0.52 (2.43) -0.10 to 1.14	0.099
%ME	-0.71 (20.84)	-2.25 (24.64)	-2.96 (19.80) -8.54 to 2.61	0.291	7.87 (16.44)	-5.57 (17.64)	-13.45 (20.71) -28.26 to 1.37	0.07	1.88 (20.24)	-2.79 (23.54)	-4.68 (20.18) -9.85 to 0.49	0.075
%MAE	15.36 (13.94)	17.86 (16.93)	2.50 (15.50) -1.87 to 6.87	0.256	12.59 (12.77)	15.26 (9.33)	2.66 (19.57) -11.33 to 16.66	0.677	14.91 (13.69)	17.43 (15.91)	2.53 (16.09) -1.59 to 6.65	0.225
High												
ME	-4.69 (6.15)	-8.55 (6.13)	-3.86 (2.87) -4.92 to -2.82	<0.001	-5.58 (3.05)	-7.14 (1.75)	-1.56 (0.78) -3.4 to 0.29	0.086	-4.87 (5.63)	-8.26 (5.53)	-3.38 (2.88) -4.32 to -2.45	<0.001
MAE	6.27 (4.46)	9.00 (5.41)	2.70 (3.26) 1.54 to 3.93	<0.001	-5.58 (3.05)	-7.14 (1.75)	-1.56 (2.21) -0.29 to 3.40	0.086	6.13 (4.18)	8.62 (4.93)	2.49 (3.08) 1.50 to 3.49	<0.001
%ME	-15.12 (22.03)	-29.83 (19.48)	-14.71 (10.85) -18.69 to -10.73	<0.001	-23.02 (12.18)	-30.05 (7.76)	-7.03 (9.67) -15.12 to 1.05	0.079	-16.74 (20.51)	-29.87 (17.63)	-13.13 (10.96) -16.68 to -9.58	<0.001
%MAE	22.30 (14.40)	32.00 (15.53)	9.69 (12.45) 5.13 to 14.26	<0.001	23.02 (12.18)	30.05 (7.76)	7.03 (9.67) -1.05 to 15.12	0.079	22.45 (13.83)	31.60 (14.21)	9.14 (11.87) 5.30 to 13.00	<0.001

* Mean (standard deviation); ** Mean (standard deviation) and 95% Confidence Interval

Table S4. Number and percentage of correct classification (Predicted Dose \leq 20% of Real Dose) by genetic and clinical algorithms in the derivation, validation and entire cohorts by dose group

	Low Doses			Median Doses			High Doses		
	PhGx	Clinical	ARR	PhGx	Clinical	ARR	PhGx	Clinical	ARR
Derivation Cohort (n=117)	15/34 44.1%	5/34 14.7%	29* (9-50)	41/52 78.9%	32/52 61.5%	17* (0.0-35)	14/31 45.2%	7/31 22.6%	23* (0.0-45)
Testing cohort (n=30)	4/12 33.3%	1/12 8.3%	25 (-6 – 56)	7/10 70.0%	6/10 60.0%	10 (-31 – 52)	3/8 37.5%	0/8 0.0%	38* (4-71)
Entire Cohort (n=147)	19/46 41.0%	6/46 13.0%	29* (11-46)	48/62 77.0%	38/62 61.0%	16* (0-32)	17/39 44.0%	7/39 18.0%	26* (6-45)

* p< 0.05 for the comparison of the Pharmacogenetic vs Clinical algorithm.



A multiplex assay to detect variations in the CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 and APOE genes involved in acenocoumarol metabolism

A.M. López-Parra ^{a,*}, A.M. Borobia ^b, C. Baeza ^a, E. Arroyo-Pardo ^a, A.J. Carcas ^b

^a Laboratory of Forensic Genetics and Population Genetics, Department of Toxicology and Health Sanitary, Faculty of Medicine, Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain

^b Clinical Pharmacology Service, La Paz University Hospital, Pharmacology Department, School of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, IdiPAZ, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2012

Received in revised form 24 July 2012

Accepted 1 August 2012

Available online xxxx

Keywords:

Acenocoumarol

CYP2C9

CYP4F2

VKORC1

APOE

ABSTRACT

Objectives: We have developed a genotyping system to determine the alleles of genes related to interindividual variability in acenocoumarol dosage requirements. This genotyping system is intended for routine clinical use and therefore it is essential that it be simple, fast and inexpensive.

Design and methods: We developed a PCR multiplex SNaPshot reaction that targets 6 SNPs (single nucleotide polymorphisms) in CYP2C9, CYP4F2, VKORC1 and APOE genes, which are associated with acenocoumarol dose requirements.

Results: We tested the multiplex in 152 samples and found it to be 100% concordant with the results of other methods.

Conclusions: We successfully produced a reliable multiplex system for simultaneously typing 6 SNPs. This system may be used as a model for accurate, simple and inexpensive genotyping of SNPs related to dose requirements. This information allows the prediction of drug efficiency in patients prior to treatment with acenocoumarol and the prevention of adverse drug reactions.

© 2012 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Acenocoumarol is the most commonly used oral anticoagulant in European and Latin American countries. As a vitamin K antagonist, acenocoumarol is a highly effective antithrombotic drug for the treatment of thromboembolic disease, atrial fibrillation and artificial heart valves [1]. However, the appropriate dose of acenocoumarol is difficult to establish due to the numerous genetic and non-genetic factors associated with high interindividual variability in dose requirements, including age, gender, weight, height, drug interactions and genetic variations in the VKORC1 and CYP2C9 genes [2,3] and other genes identified with controversial roles, such as CYP4F2 and APOE [4–6].

Our research group has developed and published [7] the first algorithm for individualization of the acenocoumarol dose in patients with venous thromboembolism that includes information about these four genes as well as clinical-demographic variables (age, body mass index and use of amiodarone and enzyme inducers). Our data suggest that inclusion of the CYP4F2 and APOE genotypes in the algorithm improves prediction for patients needing high doses, because these genotypes are associated with a higher dose of acenocoumarol (and probably

warfarin). Based on this algorithm, we can explain 60.6% of the variability in the dose required to achieve a stable international normalized ratio (INR).

We therefore aimed to develop a method for simultaneously genotyping these four genes. The minisequencing technique has been shown to be a sensitive, reproducible, simple, flexible, and robust method as well as time- and cost-efficient when analyzing between two and ten SNPs [for example 8,9]. Therefore, we validated a SNaPshot system with four genes (CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 and APOE) that are related to optimal acenocoumarol dosages and included the system in the pharmacogenetic algorithm developed by our group [7].

Material and methods

Variant alleles studied

The most important variants of CYP2C9 are CYP2C9*2 and CYP2C9*3. CYP2C9*2 has a point mutation in exon 3 that is responsible for the amino acid change Arg144Cys (rs1799853; 430C>T), and CYP2C9*3 has a single base substitution in exon 7 causing an Ile359Leu substitution (rs1057910; 1075A>C). The CYP4F2 gene has a point mutation in exon 11 causing a V433M change (rs2108622; 1347G>A). In terms of the VKORC1 gene, we studied VKORC1*2 (rs9934438), which is an SNP in the first intron of this gene (C6484T or 1173C>T). APOE presents three alleles (APOE3, APOE2 and APOE4) in addition to the “normal variant” (APOE1). These allelic forms differ from each other by amino acid substitutions at position 130 (rs429358) and at position 176 (rs7412) of the

Abbreviations: CYP2C9, cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9; CYP4F2, cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 2; VKORC1, vitamin K epoxide reductase complex, subunit 1; APOE, apolipoprotein E.

* Corresponding author. Fax: +34 913941606.

E-mail addresses: amlopezparra@med.ucm.es (A.M. López-Parra), a.borobia@gmail.com (A.M. Borobia), cbaezaricher@med.ucm.es (C. Baeza), earroyop@med.ucm.es (E. Arroyo-Pardo), antonio.carcas@uam.es (A.J. Carcas).

resulting protein. The *E1* allele has an Arg at position 130 and a Cys at position 176. The *E2* allele has a Cys at positions 130 and 176. The *E3* allele is Cys-130 and Arg-176. The *APOE4* allele is Arg at both positions.

DNA samples

A total of 152 Spanish subjects were analyzed. All patients provided written consent prior to their participation in the study. Ethical permission was obtained from the Clinical Research Ethics Committee of La Paz University Hospital of Madrid, Spain. Blood was collected by venous puncture and stored at -20°C before extraction. DNA was isolated using the QuickGene DNA blood kit S (Fujifilm®, Düsseldorf, Germany).

Multiplex PCR

Primers for PCR amplification were designed to have an annealing temperature between 60°C and 65°C using Primer3. The software programs BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) and AutoDimer were used to test for possible unspecific amplifications, potential hairpins and primer-dimer structures. Detailed information about primers, probes, amplified products and the SNPs is shown in Table 1. The primers were combined into a single multiplex reaction and generated various PCR product sizes (191–578 bp). Given the proximity between the two polymorphisms in the *APOE* gene, they were amplified in the same fragment; therefore, only five pairs of primers were used. In the design of the primers for *CYP2C9*, its high homology with *CYP2C19* was taken into account.

The PCR reaction was performed using 2–20 ng of genomic DNA, PCR Master Mix from QIAGEN Multiplex PCR kit (Qiagen) and 0.2 μL of premixed primers. It was necessary to add Q solution, included in the kit, and DMSO, given the characteristics of the fragment analyzed in the *APOE* gene, which is rich in GC [10]. The amplification took place at 95°C for 15 min, followed by 37 cycles for 30 s at 94°C , 90 s at 60°C , 90 s at 72°C and a final extension for 10 min at 72°C . The PCR products were resolved on 2.5% NuSieve GTG agarose gel.

In order to evaluate the sensitivity of the assay, serial dilutions of DNA concentrations at ratios of 1:2, 1:10, 1:20, 1:100 and 1:500 were used in five samples with a range of concentration from 54.2 to 68 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Multiplex single base extension

In order to eliminate the excess primers and dNTPs, 0.7 μL of the PCR product was purified with 1 μL of Exo-SAP-IT (U.S.B. Corporation, Cleveland, OH, USA) and incubated according to the manufacturer's instructions.

In the minisequencing reaction, the SNaPshot primers were designed employing the same software programs used for the multiplex PCR. The primers present a poly-T or a poly-GACT tail at the 5' end. The size of the adjacent single base extension primers varied between 6 and 8 bases to avoid overlapping caused by differences in electrophoretic mobility

(Table 1). Multiplex PCR minisequencing was performed in a 5 μL volume using 1.5 μL of purified PCR product, 0.096–0.58 μM of primers and 2 μL of SNaPshot ready reaction mix. The PCR program consisted of 25 cycles for 10 s at 96°C , 5 s at 50°C and 30 s at 60°C . To eliminate unincorporated ddNTPs, each sample was purified by 1 μL (0.2 units/ μL) of SAP enzyme (shrimp alkaline phosphatase) and incubated according to the manufacturer's instructions.

Electrophoretic detection

The minisequencing-purified products (0.5 μL) were mixed with 9 μL of HiDi™ formamide and 0.5 μL of GeneScan-120 LIZ size standard (Applied Biosystems) and denatured at 95°C for 5 min. Separation of PCR products was performed by capillary electrophoresis on an ABI310 DNA analyzer (Applied Biosystems). After the run, the samples were analyzed using GeneScan 3.7 software (Applied Biosystems) (Fig. 1).

Validation methods

To confirm the results obtained with the SNaPshot kit, these samples were analyzed with two additional technologies in another center. KASPar® technology (KBiosciences) was used for the detection of *CYP2C9*3*, *CYP4F2*, *VKORC1*, and *APOE* variant alleles. TaqMan® technology (Applied Biosystems) was used for the detection of *CYP2C9*2*. Both procedures were performed by the CeGen (Spanish National Genotyping Centre).

Results and discussion

High-throughput techniques have recently been developed to detect human mutations related to human disease. When analyzing a small number of SNPs, the most commonly employed genotyping systems are TaqMan® assays and minisequencing. The minisequencing technique allows the analysis of up to 10 SNPs in a single reaction. In the TaqMan® assay, the genotype of a sample is determined by measuring the signal intensity of two different dyes. Given that the real-time PCR instrument normally used in this assay cannot measure more than four dyes, only one or two SNPs are genotyped in each reaction. The selection of a genotyping platform must take into consideration the needs, demands, and available resources of each laboratory.

In this study, a minisequencing assay was developed to simultaneously genotype 6 SNPs that are highly heterozygous in European population groups (see <http://www.hapmap.org/>). Once the DNA is extracted, the genotyping process takes 6 h and 30 min.

We found all possible genotypes for each of the 6 SNPs selected in the analyzed samples. The results confirmed the validity of the SNaPshot assay with 100% concordance between the replication techniques (KASPar® or TaqMan®) and the proposed minisequencing assay (Supplementary Table 1). In 21 samples, the replication techniques did not achieve the complete genotypes that were obtained with our multiplex. In addition, this new technology is flexible. It allows for the

Table 1

Primers used for PCR amplification and SNaPshot extension reactions.

Gene	SNP	SNP primer sequences 5'-3'	Fragment size	SNP code	SBE primer sequences 5'-3'	Tail	Final length
APOE176	rs7412f	GCCTACAAATCGGAACCTGGA	491	C/T	Fw—ATGCCGATGACCTGCAGAAG	(dT)2	28
	rs7412r	ACCTGCTCCTTCACCTCGT	491				
VKORC1	rs9934438f	GGGTGGAACCAAGGTAGGAC	191	G/A	Fw—ACCTCCCATCCTAGTCCAAG	(dT)4	36
	rs9934438r	GAGAGGGAGGATAGGCTCA	191				
CYP2C92	rs1799853f	ATGGAAAACAGAGACTTACAGAGC	306	C/T	Fw—GGAAGAGGAGCATTGAGGAC	(dT)22	42
	rs1799853r	GTAAGGTCACTGATATGGAGTAGGG	306				
CYP2C93	rs1057910f	GAACGTGTATTGGCAGAAA	286	A/C	Fw—CACGAGGTCCAGAGATAC	(dT)8	50
	rs1057910r	TGCCATACATATGAGTTATCCACTT	286				
CYP4F2	rs2108622f	GAATGGACAAAAACAGAGAGG	206	C/T	Rw—GAACCCATCACAACCCAGCT	(dT)9	56
	rs2108622r	GTCATCCCCAACAGGTGCTC	206				
APOE130	rs429358f	GCCTACAAATCGGAACCTGGA	491	C/T	Fw—CGCGGACATGGAGGACGTG	(dT)11	63
	rs429358r	ACCTGCTCCTTCACCTCGT	491				

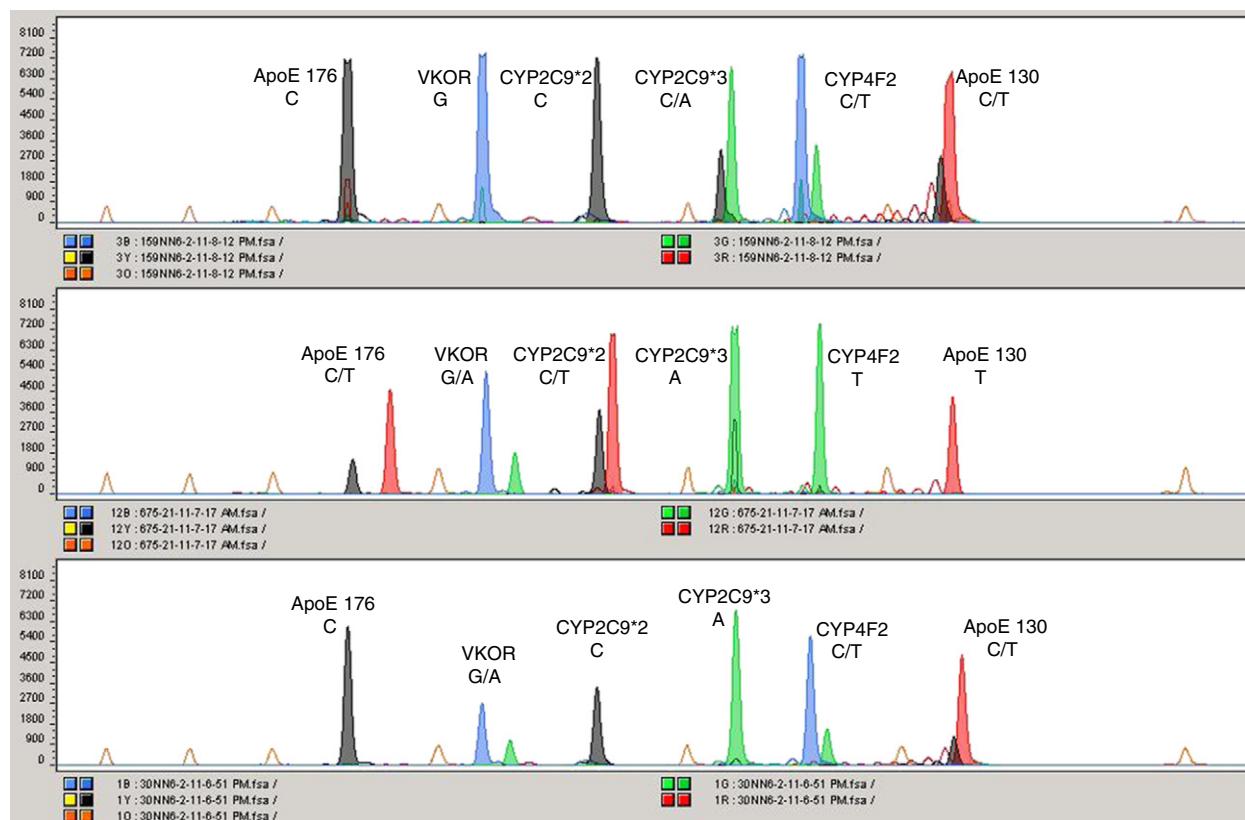


Fig. 1. Results obtained from the SNaPshot. Orange peaks represent LIZ. In the first electropherogram *CYP2C9*3*, *CYP4F2* and *APOE130* are heterozygous. In the second electropherogram *APOE176*, *VKORC1* and *CYP2C9*3* are heterozygous. In the third electropherogram *VKORC1*, *CYP4F2* and *APOE130* are heterozygous. In this figure only *CYP4F2*, in the second electropherogram, presents a homozygous mutant. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

incorporation of new SNPs by simply adding new pairs of primers and probes with sizes compatible with those already present in the mixture, with a little optimization.

In relation to the sensitivity assays, a complete SNP profile was obtained with 1 ng of DNA. However, it is rare to find such low concentrations of DNA in clinical samples. Given the high rate of adverse effects, including fatal hemorrhagic events due to incorrectly calculated dosages of acenocoumarol, it is important to genotype patients before the initiation of therapy.

In relation to costs, we estimated those of SNaPshot and TaqMan (without including DNA extraction). The cost of the SNaPshot method was approximately €24 per sample and the TaqMan® was approximately €130 per sample. In both cases, we considered duplicate genotyped samples and included one positive control and one negative control in each assay. In addition, the use of the minisequencing methodology allows the analysis of samples as they are received in the laboratory, without the need to accumulate them, as is usually necessary with other techniques.

Our SNaPshot system may be useful for helping achieve a stable dose when used as a stand-alone test or when combined with a pharmacogenetic algorithm. For this last purpose, a controlled, randomized, single-blind, multicenter clinical trial is being performed (Eudra CT: 2009-016643-18) to test the efficiency and effectiveness of our pharmacogenetic dosing algorithm [7] for acenocoumarol vs. usual care using this SNaPshot assay as the genotyping method. In conclusion, this method is a sensitive, simple, rapid and low cost assay that could be included in routine clinical practice prior to treatment with vitamin K antagonist anticoagulants.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.08.005>.

Acknowledgments

This study was supported by a research grant from Instituto de Salud Carlos III (FIS PI070710).

References

- [1] Stehle S, Kirchheimer J, Lazar A, Fuhr U. Pharmacogenetics of oral anticoagulants: a basis for dose individualization. *Clin Pharmacokinet* 2008;47(9):565-94.
- [2] Spreafico M, Lodigiani C, van Leeuwen Y, Pizzotti D, Rota LL, Rosendaal F, et al. Effects of *CYP2C9* and *VKORC1* on INR variations and dose requirements during initial phase of anticoagulant therapy. *Pharmacogenomics* 2008;9(9):1237-50.
- [3] Teichert M, Van Schaik RHN, Hofman A, Uitterlinden AG, de Smet PAGM, Stricker BHCH, et al. Genotypes associated with reduced activity of *VKORC1* and *CYP2C9* and their modification of acenocoumarol anticoagulation during the initial treatment period. *Clin Pharmacol Ther* 2009;85(4):379-86.
- [4] Teichert M, Eijgelshem M, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, van Schaik RH, Hofman A, et al. A genome-wide association study of acenocoumarol maintenance dosage. *Hum Mol Genet* 2009;18(19):3758-68.
- [5] Visser LE, Trienekens PH, De Smet PA, Vulto AG, Hofman A, van Duijn CM, et al. Patients with an ApoE epsilon4 allele require lower doses of coumarin anticoagulants. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15(2):69-74.
- [6] Cadamuro J, Dieplinger B, Felder T, Kedenko I, Mueller T, Halmayer M, et al. Genetic determinants of acenocoumarol and phenprocoumon maintenance dose requirements. *Eur J Clin Pharmacol* 2010;66(3):253-60.
- [7] Borobia AM, Lubomirov R, Ramírez E, Lorenzo A, Campos A, Muñoz-Romo R, et al. An acenocoumarol dosing algorithm using clinical and pharmacogenetic data in Spanish patients with thromboembolic disease. *PLoS One* 2012;7(7):e41360 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041360>.
- [8] Pati N, Schowinsky V, Kokanovic O, Magnuson V, Ghosh S. A comparison between SNaPshot, pyrosequencing, and bplex invader SNP genotyping methods: accuracy, cost, and throughput. *J Biochem Biophys Methods* 2004;60(1):1-12.
- [9] Wei W, Luo HB, Yan J, Hou YP. Exploring of new Y-chromosome SNP loci using Pyrosequencing and the SNaPshot methods. *Int J Leg Med* 2011.
- [10] Musso M, Bocciardi R, Parodi S, Ravazzolo R, Ceccherini I. Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. *J Mol Diagn* 2006;8(5):544-50.

Supplementary Table. Comparison of genotyping results of SNaPshot and replication techniques. Additional assay: All SNPs were genotyped with KASPar® technology (KBiosciences©) except CYP2C9*2 (rs1799853), which was genotyped using TaqMan® technology (Applied Biosystems©). No result: Samples did not achieve genotyping. Result-Snapshot-only: Samples that did not obtain results with Kaspar or TaqMan and were genotyped with SNaPshot.

Genotype (dbSNP reference ID)		Other assay	SNaPshot	Accuracy %
CYP2C9 430C>T (rs1799853)	CC	100	100	100%
	CT	44	44	100%
	TT	5	5	100%
	No result	3		
	Result-SNaPshot-only		3	
	Total tested samples	152	152	
CYP2C9 1075A>C (rs1057910)	AA	129	129	100%
	AC	18	18	100%
	CC	1	1	100%
	No result	4		
	Result-SNaPshot-only		4	
	Total tested samples	152	152	
CYP4F2 1347G>A (rs2108622)	GG	61	61	100%
	GA	61	61	100%
	AA	19	19	100%
	No result	11		
	Result-SNaPshot-only		11	
	Total tested samples	152	152	
VKORC1 1173C>T (rs9934438)	CC	58	58	100%
	CT	70	70	100%
	TT	23	23	100%
	No result	1		
	Result-SNaPshot-only		1	
	Total tested samples	152	152	
APOE 388T>C (rs429358)	TT	117	117	100%
	TC	24	24	100%
	CC	2	2	100%
	No result	9		
	Result-SNaPshot-only		9	
	Total tested samples	152	152	
APOE 526T>C (rs7412)	CC	131	131	100%
	CT	18	18	100%
	TT	2	2	100%
	No result	1		
	Result-SNaPshot-only		1	
	Total tested samples	152	152	

My manuscripts

▼ As an author

▼ Manuscripts editorially accepted

Efficiency and effectiveness of the use of an acenocoumarol pharmacogenetic dosing algorithm versus usual care in patients with venous thromboembolic disease initiating oral anticoagulation: Study protocol for a randomized controlled trial

Journal: Trials
Manuscript ID: 1593775268745004
Submitted: 21 June 2012
Last updated: 7 November 2012 [View PDF](#)
Peer review status: Editorialy accepted

TITLE: EFFICIENCY AND EFFECTIVENESS OF THE USE OF AN ACENOCOUMAROL PHARMACOGENETIC DOSING ALGORITHM VERSUS USUAL CARE IN PATIENTS WITH VENOUS THROMBOEMBOLIC DISEASE INITIATING ORAL ANTICOAGULATION: STUDY PROTOCOL FOR A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL.

AUTHORS

A. J. Carcas

Clinical Pharmacology Department. La Paz University Hospital. Pharmacology Department. School of Medicine. Universidad Autónoma de Madrid. IdiPAZ
antonio.carcas@uam.es

A. M. Borobia

Clinical Pharmacology Department. La Paz University Hospital. Pharmacology Department. School of Medicine. Universidad Autónoma de Madrid. IdiPAZ
a.borobia@gmail.com

M. Velasco

Pharmacology Department. School of Medicine. Universidad Autónoma de Madrid
mvelascogo@hotmail.com

F. Abad-Santos

Clinical Pharmacology Service. La Princesa University Hospital. Pharmacology Department. School of Medicine. Universidad Autónoma de Madrid. Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IP), Madrid, Spain

fabad.hlpr@salud.madrid.org

M. Quintana Díaz

Emergency Department. La Paz University Hospital. School of Medicine. Universidad Autónoma de Madrid. IdiPAZ

mquintana.hulp@salud.madrid.org

C. Fernández-Capitán

Internal Medicine Department. La Paz University Hospital. School of Medicine. Universidad Autónoma de Madrid

cfdezcapitan@hotmail.com

N. Ruiz-Giménez.

Internal Medicine Department. La Princesa University Hospital. Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IP), Madrid, Spain

airunruizg@hotmail.com

O. Madridano

Internal Medicine Department. Infanta Sofía Hospital.

olgamadridano@hotmail.com

P. Llamas Sillero

Department of Hematology. Fundación Jiménez Díaz Hospital.

pllamas@fjd.es

and the PGX-ACE Spanish Investigators Group (APPENDIX)

ADDRESS FOR CORRESPONDENCE:

Dr. A. J. Carcas, Dr. A. M. Borobia
Clinical Pharmacology Department.
La Paz University Hospital. IdiPAZ
Paseo de la Castellana, 261. 28046-Madrid (Spain)
Telephone: +34-917277559
FAX: +34-914975334
e-mail: antonio.carcas@uam.es; a.borobia@gmail.com

KEY WORDS: pharmacogenetic, acenocoumarol, hematology

LIST OF ABBREVIATIONS

ApoE: apolipoprotein E
CAIBER: spanish platform for clinical trials
CRF: case report form
CYP2C9: cytochrome P450 2C9
CYP4F2: cytochrome P450 4F2
DVT: deep venous thrombosis
EU-PACT: european pharmacogenetics of anticoagulant therapy
INR: international normalized ratio
ISTH: international society on thrombosis and haemostasis
LMWH: low molecular weight heparins
PTE: pulmonary thromboembolism
VKORC1: complex 1 of the vitamin K epoxide reductase
VTE: venous thromboembolic

FINANCIAL DISCLOSURE: This ClinicalTrial is possible thanks to a grant from Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (TRA-010) del Gobierno de España and the technical and financial suport of CAIBER (Plataforma Española de Ensayos Clínicos) and IdiPAZ (Instituto de Investigación del Hospital Universitario La Paz).

CONFLICT OF INTEREST DECLARATIONS: The authors have no conflicts of interest relevant to this article to disclose.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

AJC conceptualized and designed the clinical trial, drafted the initial manuscript, and approved the final manuscript as submitted. AJC is the Trial Coordinator.

AMB conceptualized and designed the clinical trial, drafted the initial manuscript, and approved the final manuscript as submitted.

MV contributed to the design of the clinical trial, has reviewed the manuscript, and approved the final manuscript as submitted.

FAS contributed to the design of the clinical trial, reviewed the manuscript, and approved the final manuscript as submitted. FAS is the Principal Investigator of the Clinical Pharmacology Department of La Princesa Hospital.

MQD has reviewed the manuscript, and approved the final manuscript as submitted. MQD is the Principal Investigator of the Emergency Department of La Paz University Hospital.

CFC contributed to the design of the clinical trial, reviewed the manuscript, and approved the final manuscript as submitted. CFC is the Principal Investigator of the Internal Medicine Department of La Paz University Hospital.

NRG contributed in the design of the clinical trial, reviewed the manuscript, and approved the final manuscript as submitted.

OM contributed to the design of the clinical trial, reviewed the manuscript, and approved the final manuscript as submitted.

PLS has reviewed the manuscript, and approved the final manuscript as submitted. PLS is the Principal Investigator of the Hematology Department of Fundacion Jimenez Diaz Hospital.

ABSTRACT

BACKGROUND: Hemorrhagic events are frequent in patients in treatment with antivitamin-K oral anticoagulant, due to their narrow therapeutic margin. Studies performed with acenocoumarol have shown the relationship between demographic, clinical and genotypic variants and the response to these drugs. Once the influence of these genetic and clinical factors on the dose of acenocoumarol needed to maintain a stable INR has been demonstrated, new strategies need to be developed to predict the appropriate doses of this drug. Several pharmacogenetic algorithms have been developed for warfarin, but only three have been developed for acenocoumarol. After the development of a pharmacogenetic algorithm, the obvious next step is to demonstrate its effectiveness and utility by means of a controlled randomized trial. The aim of this study is to evaluate the effectiveness and efficiency of acenocoumarol dosing algorithm developed by our group, and that include demographic, clinical and pharmacogenetic variables (VKORC1, CYP2C9, CYP4F2 and ApoE) in patients with venous thromboembolism (VTE). **METHODS AND DESIGN:** This is a multicenter, single-blinded, randomized controlled clinical trial. The protocol has been approved by La Paz University Hospital Research Ethics Committee and by the Spanish Drug Agency. Two hundred and forty patients with VTE in which oral anticoagulant therapy is indicated will be included. Randomization (case/control 1:1) will be stratified by center. Acenocoumarol dose in the control group will be scheduled and adjusted following common clinical practice; in the experimental arm dosing will be following an individualized algorithm developed and validated by our group. Patients will be followed for 3 months. The main endpoints are: 1)Percentage of patients with INR within the therapeutic range on day 7 after initiation of oral anticoagulant therapy; 2)Time from the start of oral anticoagulant treatment to achievement of a stable INR within the therapeutic range; 3)Number of INR determinations within the therapeutic range in the first 6 weeks of treatment. **DISCUSSION:** To date there are no clinical trials comparing pharmacogenetic acenocoumarol dosing algorithm vs. routine clinical practice in VTE. Implementation of this pharmacogenetic algorithm in the clinical practice routine could reduce side effects and improve patient safety.

Trial registration: Eudra CT. Identifier: 2009-016643-18.

INTRODUCTION

Antivitamin-K oral anticoagulants, which include acenocoumarol, are highly effective drugs for the treatment of venous thromboembolism (Deep Venous Thrombosis -DVT- and Pulmonary Thromboembolism –PTE-), atrial fibrillation and patients with mechanical heart valves (1). However, hemorrhagic events are frequent (2,3) due to the narrow therapeutic margin of these drugs and the considerable interindividual variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of these drugs.

Studies performed with warfarin and acenocoumarol have shown that the relationship between the genotypic variants CYP2C9 and VKORC1 account for approximately 30%-40% of the variability in the response to these drugs (4-6) while various clinical factors explain between 15% and 20% of the variability. Other polymorphisms have been more recently identified that influence the doses of warfarin and acenocoumarol necessary to maintain a stable international normalized ratio (INR). The CYP4F2 will hydroxylate the side chain as the first step in the inactivation of vitamin E, although its role in the vitamin K/acenocoumarol pathway is not yet known (7-10). Apolipoprotein E (ApoE), in turn, mediates the uptake of lipoproteins rich in vitamin K by the liver and other tissues (11-12).

Once the influence of these genetic and clinical factors on the dose of acenocoumarol needed to maintain a stable INR has been demonstrated, new strategies need to be developed to predict the appropriate doses of this drug. Several pharmacogenetic algorithms have been developed for warfarin (13-22); and three have been developed for acenocoumarol. The first algorithm for acenocoumarol (23) is based on a score generated with genetic variants of CYP2C9 and VKORC1. The second algorithm was published by the EU-PACT group (24) and includes clinical (age, gender, weight, height and use of amiodarone) and genetic variables (CYP2C9 and VKORC1). Our research group has developed a third algorithm of individualization of the acenocoumarol dose in patients with venous thromboembolism (VTE) using a multiple linear regression analysis in a derivation cohort ($n=117$) that includes clinical-demographic variables (age, body mass index, use of amiodarone and enzyme inducers) and polymorphisms of the VKORC1, CYP2C9, CYP4F2 and ApoE genes (25). The clinical factors explained 22% of the dose variability, which increased to 60.6% when pharmacogenetic information was included ($p<0.001$); In the testing cohort ($n = 30$),

clinical factors explained a 7% of the dose variability, compared to 39% explained by the pharmacogenetic algorithm. The pharmacogenetic algorithm correctly predicted the real stable dose in 59.8% of the cases (DC) vs. only 37.6% predicted by the clinical algorithm (95% CI: 10 to 35). We have implemented this algorithm in a public web page (www.acenocoumaroldosing.com).

After the development of a pharmacogenetic algorithm, the obvious next step is to demonstrate its effectiveness and utility by means of a controlled randomized trial. One such trial in the USA is being performed with warfarin: NCT01178034 (ClinicalTrials.gov), which includes patients with atrial fibrillation. Another trial has been completed: NCT00511173, which included patients with atrial fibrillation, pulmonary embolism and deep vein thrombosis. In Europe, there is an ongoing clinical trial to test whether the dosing algorithms for coumarin anticoagulants (including acenocoumarol) improves the clinical outcomes of patients (26).

Our group proposes this randomized clinical trial that compares the standard dosing of acenocoumarol with the adjustment based on the developed acenocoumarol dosage algorithm (Eudra CT:2009-016643-18).

PATIENTS AND METHODS

Design and setting

The clinical trial was designed as a pragmatic, randomized, parallel two-arm, single blind trial to compare the individualized adjustment of acenocoumarol dosage using a pharmacogenetic algorithm versus the standard adjustment, in patients initiating oral anticoagulation for the treatment of venous thromboembolism. The follow-up period will be 3 months (Figure 1). The study will be performed in five separate hospital centers in the Community of Madrid (Spain). The recruitment period started in March 2011 and is scheduled to end in the fourth quarter of 2012.

Study population

The target population is patients with new diagnoses of pulmonary thromboembolism and/or deep vein thrombosis performed using objective imaging tests (CT angiography, venous Doppler ultrasound) who require anticoagulant therapy with acenocoumarol and who meet the following inclusion criteria and none of the exclusion criteria.

Inclusion criteria:

- Male and female patients who are diagnosed with VTE (PTE and/or DVT) who will start anticoagulant therapy with acenocoumarol.
- Target INR between 2 and 3.
- Over 18 years of age.
- Women of childbearing age should take effective contraceptive measures (barrier methods) to avoid pregnancy during the treatment with acenocoumarol.
- Subjects may give their written consent to participate in the study once they have received information on the design, goals and possible risks of the study and are made aware that they can withdraw from the study at any time.

Exclusion criteria:

- Patients anticoagulated with acenocoumarol at the time of inclusion (≥ 2 doses).
- Pregnant or breastfeeding women.
- Patients with renal failure ($\text{CrCl} \leq 30 \text{ ml/min}$).
- Patients with advanced liver failure (stage C of Child-Pugh).
- Patients with a life expectancy of less than 6 months.

Definition of the intervention

Once included in the clinical trial, patients will be randomly assigned to the experimental or control groups. Initially, all patients will receive treatment with low molecular weight heparins (LMWH) along with the standard acenocoumarol dose established according to age for a maximum of three days (the time required to obtain

the genotyping result). Subsequently, dose adjustment will be different in the two groups:

- Patients assigned to the experimental strategy will receive the regimen determined by the pharmacogenetic algorithm, which includes demographic (age, gender, weight and height), clinical (concomitant medication) and pharmacogenetic (polymorphisms of CYP2C9, VKORC1, ApoE and CYP4F2) variables (25). Also INR is taken into account.
- Patients assigned to the control strategy will receive doses according to the standard procedure in routine clinical practice.

As a guide for handling and adjusting the acenocoumarol dosages, the researchers will be referred to the local guidelines developed in “Area 5” for the management of patients treated with acenocoumarol.

Objectives.

Primary: Evaluate the effectiveness of an acenocoumarol dosing algorithm that incorporates demographic, clinical and pharmacogenetic variables of patients with venous thromboembolism.

Secondary:

- Evaluate the safety of the incorporation of genetic data in the dose adjustment, comparing the frequency of appearance of relevant clinical events in patients whose dosage is adjusted by means of the designed algorithm vs. standard clinical practice.
- Evaluate the efficiency of implementing an acenocoumarol dosing algorithm that incorporates pharmacogenetic variables. To accomplish this, we intend to perform an economic analysis of the incorporation of the genotypic determinations compared with standard clinical practice.

Assessment variable

Effectiveness variables

Primary:

- Percentage of patients with an INR within the therapeutic range (INR between 2 and 3) on day 7 after the initiation of treatment with acenocoumarol.
- Time from the start of the oral anticoagulant therapy to get a stable INR within the therapeutic range (INR within the therapeutic range for 3 consecutive measurements for at least 2 weeks, with a maximum difference between the daily average doses of 10%).
- Number of INRs within the range in the first 6 weeks of treatment.
- Number of INRs within the range during the three months of the study.

Secondary:

- Proportion of time within the therapeutic range, using a linear interpolation method (27).
- Number of special INR measurements (those that are performed in addition to the scheduled measurements in the program of visits established in this protocol: days 0, 3, 7, 15, 30, 60 and 90).

Safety:

- Proportion of patients with relevant adverse events during the first 3 months following the start of oral anticoagulation. These events include the following: INR>4 or <1.5, need for vitamin K, bleeding episode, thromboembolic event, need for LMWH, acute myocardial infarction, acute stroke and death from any cause.

Pharmacoeconomic evaluation:

- The pharmacoeconomic evaluation will be performed according to a parallel and independent protocol with special consideration of the direct costs associated with the health care of these patients.

Study procedures.

The various study visits will be distributed as shown in Table 1:

Preselection phase: The patient with VTE will be identified in the emergency department or hospital ward within the first 48 hours of the VTE diagnosis (PTE and/or DVT) and they will be checked to ensure they meet the selection criteria.

Before any specific study procedure is performed, the patient will receive the information verbally and in writing through the patient information sheet. The patient must consent to participation in the study in writing (two copies). The patient will keep a copy of the information sheet and the informed consent once they have been signed. Once patients have been included in the study, the medical monitor will be informed of their inclusion and the randomization envelope will be opened to determine the study group to which they will belong.

Patients who were considered for inclusion but were not admitted to the study will be registered in a patient-log along with the cause for their non-inclusion (lack of informed consent, selection criteria, practical issues, etc.).

Inclusion phase (days -3 or -2): After recording in the CRF that the patient meets the selection criteria, the patient's clinical situation will be reviewed, and the following information about the medical history will be recorded in the CRF: personal history and anamnesis, including concomitant medication with current dosage and regimen, and complete physical examination, which will include height and weight. The patient will also be provided with a card listing basic information about the trial, what to do in the event of severe adverse events and the research team's telephone numbers. The start of the treatment with acenocoumarol will occur on day -3 or -2, according to standard clinical practice. The following dosages will be provided to the researcher as a guideline for the local recommendations: 2 mg a day for patients under 65 years of age and 1 mg a day for older patients or risk factors.

Pharmacogenetic specimen collection: During recruitment, a blood sample will be taken from the patient (2 tubes of 5 mL EDTA K3), which will be sent by messenger to the laboratory where the patient's genotype will be determined.

The samples do not require special conservation or transportation conditions. In the event that the pickup of the sample by the messenger occurs the next day after extraction, it is recommended that the blood sample be stored in a refrigerator.

The results will be sent by email within 48 hours. The medical monitor will ensure compliance with these deadlines and will solve any logistical problems that may arise.

Individualization phase:

DAY 0:

- Control group: The INR will be determined in a capillary blood sample by means of a CoaguCheck® portable coagulometer (Roche® SA), and the acenocoumarol dosage will be determined according to standard clinical practice.
- Intervention group: At this time, the results of the genotyping will have returned and the acenocoumarol dose will be calculated according to the developed algorithm.

DAYS 3 AND 7 ±1:

The INR will be determined (capillary blood sample analyzed with a portable coagulometer) in both groups, and the acenocoumarol dosage will be adjusted, if necessary. Control group patients will follow the dosage indications according to the standard clinical practice and visits will be scheduled for day 3, day 7±1 and day 15±3, depending on the length of the hospital stay. Patients included in the intervention group will have their acenocoumarol regimen readjusted according to the developed algorithm and will be scheduled for visits on day 3, 7±1 and 15±3, depending on the length of the hospital stay.

INR measurements will be performed on both groups, and additional visits deemed appropriate for good control of the anticoagulation will be held. Any changes made to the dosage and all INR measurements will be recorded in the CRF and the medical records.

VISIT DAYS 15±3, 30±5, 60±7 AND 90±7:

During each visit and after determining the INR (capillary blood sample analyzed with a portable coagulometer), the dosage will be adjusted. The patient's next scheduled visit will be arranged, and an additional visit will be scheduled if necessary. Adverse events will be recorded during all visits, as contained in section 9 of this protocol. During the final visit, a complete physical examination will also be performed.

Concomitant medication

- After the diagnosis, as recommended by international guidelines on the treatment of VTE, all patients (both the control and experimental groups) will receive low molecular weight heparins (LMWH) for at least 7 days.
- All other medication that the patient is taking will be recorded in their medical history and CRF, as well as any changes they present during the course of the study. We will record the brand name of the medication, the active ingredient, dosage schedule, start or change in treatment, end of treatment and whether there has been any resolution of the problem that caused the start or change of treatment.

As is standard practice, the study's medical researchers will take into account this change in medication when adjusting the acenocoumarol dosage for both the experimental and control group.

Randomization

The randomization was performed using a masked randomization scheme, in a 1:1 ratio, by blocks of four patients and stratified by center. Based on this scheme, randomization envelopes were created for each center. The patient's code was written on the outside of these envelopes (center and patient codes), and inside the opaque sealed envelope was a card indicating to which study group the patient was assigned. The envelopes and card are stored in the investigator file.

Masking

The study is single blind, and the patient under no circumstance knows the group to which they have been assigned. The medical researchers are unaware of the randomization scheme. Although there is a risk of unmasking the patient, and the lack of masking for the physician may affect the evaluation variables, we believed that total masking was not feasible in a study using a pragmatic approach.

Genotyping

In recruitment visit, two 3-ml tubes of blood will be collected from all participants for genotyping of CYP2C9*2 (rs1799853), CYP2C9*3 (rs1057910), VKORC1 (-1639 G→A=rs9923231), CYP4F2 (rs2108622), and ApoE (8016 C→T=rs7412), using a previously developed multiplex technique (28). Measurements will be performed in a

centralized manner at the Laboratory of Population Genetics of the Department of Forensics at the Universidad Complutense de Madrid.

Safety procedures and monitoring of adverse events

Anticoagulation monitoring:

The INR (International Normalized Ratio) will be determined using a portable coagulometer (CoaguCheck®, Roche® SA) during the visits on days 0, 3, 7, 15, 30, 60 and 90 to verify that the patients are properly anticoagulated and to make the necessary dose adjustments. Dosing adjustments will be performed according to standard clinical practice. For the experimental group, the genetic results will also be taken into account.

If clinically necessary, additional INR measurements and visits will be performed according to standard clinical practice.

Safety laboratory determinations:

A laboratory analysis including hemogram, biochemistry and coagulation will be performed on the 2nd visit (day 0) and on the 8th visit or the final visit (day 90±7). A hard copy of the results must be signed and dated by the applicant researcher. Results with values outside the normal range will be evaluated by the researching physician who will indicate whether they are clinically relevant or not. Only clinically relevant results will be recorded in the CRF.

Any additional analysis during any of the study visits, requested either by the researcher or other patient physician, will be recorded in the medical history and CRF, along with the reason for the request. A copy of the analysis will be attached to the patient's medical record.

Adverse events

Any adverse event (not necessarily related to the use of acenocoumarol) will be recorded in the case report form (CRF) and will be defined as a serious adverse event if it places the patient's life in danger and/or requires or prolongs hospitalization (for example, a major hemorrhagic event).

Hemorrhages will be categorized as major or minor, according to the classification for hemorrhagic events of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) (29). We will use the Naranjo et al. algorithm (30) to determine the causal relationship between the adverse event and the study treatment.

Withdrawal criteria

The patient can discontinue their participation in the study at any time. The research doctor, in his or her opinion or judgment, may also withdraw a patient from the study if it is required by the patient's clinical situation or if the patient does not comply with the protocol. The onset of chronic disease during the study will result in exclusion of the subject. The continuation of the patient in the study after the onset of acute disease will be at the discretion of the researcher, taking into account the patient's safety and the influence of the disease and/or its treatment on the evaluation variables.

Sample size calculation

We need 97 subjects per group completing the study to detect an absolute difference of 20% in the number of patients who are within the therapeutic range on the 7th day after starting the treatment. For this calculation, we have set an alpha error of 0.05 and a beta error of 0.2, we assume that 40% of the patients will be within the desired INR, and we expect to increase this to 60% in the experimental group. Given the risk of drop-outs, the number of patients per group will increase by 20%, placing the recruitment objective at 120 patients per group.

According to Caraco et al. (31), pharmacodynamic stabilization with warfarin in the standard control group was achieved in 40.2 ± 21 days. For a reduction in 10 days in the experimental group and alpha and beta errors of 0.05 and 0.2, respectively, the required number of patients per group will be 70.

Statistical analysis

All recruited patients will be included in the main analysis, following an intention to treat strategy. For the ITT analysis patients lost to follow up will be accounted for considering the worse scenario: 1) patients lost before the 7th day will be considered as not in the therapeutic range; 2) patients lost before the last visit and that have not

reached the stable INR will be considered in such condition in the three months visit; 3) for the number of INRs within the range in the first 6 weeks and the three months period all lost visits will be considered as INR out of the range in all patients lost to follow-up. In addition, we will perform a per protocol analysis on all patients who can be monitored for the three months planned for the study and who have not missed more than one intermediate follow-up visit.

To compare the analysis variables between both groups, we will use the contrast test of the hypothesis as appropriate, based on the normality of the sample (Kolmogorov-Smirnov test), for example, a Cox regression for dichotomous variables or Kaplan-Meier curves for representing results, whenever possible. A regression model (linear or logistic, as appropriate) will be performed when necessary to correct for possible confounding factors. To determine the difference between the two groups in the proportion of time within the therapeutic range, we will use the linear interpolation method proposed by Rosendaal et al. (27). Finally, we will perform a regression model stratified by center. The value $p<0.05$ will be established as statistically significant, adjusting for multiple comparisons whenever necessary.

The cost-effectiveness analysis will be performed according to a parallel and independent protocol, with special consideration of the direct costs associated with the health care of these patients.

Other ethical and legal considerations

The researchers will adhere strictly to the provisions of this protocol and will completely fill out the case report forms. The study will be performed according to the recommendations for clinical studies and the evaluation of drugs in humans, as contained in the Declaration of Helsinki (revised in successive world assemblies) and in the current Spanish and European legislation on clinical studies and patient data confidentiality. The study will follow the principles of Good Clinical Practice. This study has been approved by the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Universitario La Paz (Madrid, Spain) and by the Spanish Agency of Medication and Health Products and has been registered in Eudra CT (Eudra CT: 2009-016643-18).

DISCUSSION

Anticoagulant therapy with acenocoumarol is associated with a high incidence of hemorrhagic complications, as well as therapeutic failure (new thrombosis) (1). These complications are the result of the high interindividual variability in the doses of acenocoumarol required to achieve stable anticoagulation and the time required to reach the steady state of the drug, which according to Caraco et al. (31), may require 40.27 days (95% CI, 35.9-44.6 days) for warfarin.

One of the strategies for reducing this time and thereby increasing both the efficacy and safety of these drugs is the use of dosing algorithms that include demographic, clinical and genetic variables. These algorithms, several of which have been published for warfarin (13-22) and only three of which have been published for acenocoumarol (23-25), must be validated through randomized clinical trials in order to demonstrate their efficacy and evaluate their effectiveness, as well as the feasibility of their implementation in standard clinical practice. There are two on-going clinical trials, one in the USA using warfarin and another in Europe (EU-PACT) evaluating algorithms for acenocoumarol, phenprocoumon and warfarin (26).

Our clinical trial has several relevant differences with the studies underway in the USA (in addition to the anticoagulant used) and in Europe. First, our algorithm is the only one to consider the CYP4F2 and ApoE genes, in addition to the more common demographic, clinical (age, BMI and concomitant treatment with amiodarone and metabolic inducers) and genetic (CYP2C9 and VKORC1) variables. Second, the study population only includes patients with VTE. These patients, analyzed as a whole, tend to be younger (although they have a wider age range) and have fewer concurrent conditions (32). Clearly, this implies the theoretical advantages of greater homogeneity of the included sample and a smaller sample size required. In contrast, the extrapolation of results to patients with atrial fibrillation or valve replacements may be compromised.

Another aspect to consider is that the usefulness of the genetic determination may be more important for patients with VTE, given that it is important to achieve a therapeutic range in the shortest time possible because the risk of progression, recurrence and death due to PTE is greater in the first weeks after the diagnosis (33-35). Furthermore, the risk of bleeding is also greater at the beginning of treatment; 62.5% of hemorrhages occur during the first 15 days of treatment and 79.2% occur during the first month (median, 11 days). In addition, approximately 50% of patients in therapy with anti-vitamin K have

an INR >3 (36).

In addition, the improved variables that are a reflection of appropriate anticoagulant control (time within the appropriate INR, the number of INRs in the range, etc.) could decrease the necessary controls and visits and therefore improve the patient's quality of life and the cost of the entire process. Finally, the time required in VTE to properly adjust the oral anticoagulant dose (with a frequency greater than one month) is a substantial part of the total recommended treatment (3 to 6 months). These two aspects are less relevant in the case of AF and valve replacement, in which the short-term risk of ineffectiveness is much lower and the total time of anticoagulation is lifelong.

We selected appropriate anticoagulant control as the primary objective, including variables such as the percentage of patients within the therapeutic range in the short, medium and long-term or the time required to achieve control. This represents a limitation compared with the use of hard clinical variables (hemorrhages, recurrence of VTE, the progression of PTE and/or the presence of post-phlebitic syndrome). The decision to establish this primary objective was made based on logistical reasons and due to its validity as a subrogated endpoint. One of the logistical reasons was the need to perform the genotypic determinations in a centralized laboratory and within a short period of time (at most two days). Therefore, the recruitment centers had to be concentrated in the city of Madrid or its suburbs. This in turn places limitations on the number of patients who could be recruited, given that the study population is limited to that of the centers. Similarly, for financial reasons, the recruitment of several thousand patients was out of our reach. There is compelling evidence that maintaining an INR within the therapeutic range is a valid objective of anticoagulant therapy and is linked with clinical end-points of interest, and as such it is used routinely as a control treatment (37-40). When implementing pharmacogenetic techniques and dosing algorithms, it is important to consider that local issues related to the differences in the type of study population, genetic differences and differences in the healthcare system are of great importance.

In short, the proposed clinical trial will constitute an important proof of concept for demonstrating the usefulness of dosing algorithms that include pharmacogenetic variables.

Trial status

This protocol was authorized on 18-03-2010 by the Spanish Medicine Agency in its initial version, with subsequent changes. The protocol described here corresponds to version 5. The Ministry of Health granted partial support for the implementation of the trial (project TRA-010), and CAIBER (Spanish Platform for Clinical Trials) was responsible for the monitoring and coordination of the trial and also partially financed the implementation of the trial. The first patient was recruited in 21-03-2011 and currently, a total of 85 patients have been included. We plan to continue recruitment until December 2012.

REFERENCES

1. Stehle S, Kirchheimer J, Lazar A, Fuhr U. Pharmacogenetics of oral anticoagulants: a basis for dose individualization. *Clin Pharmacokinet.* 2008;47(9):565-94.
2. Palareti G, Leali N, Coccheri S, Poggi M, Manotti C, D'Angelo A, Pengo V, Erba N, Moia M, Ciavarella N, Devoto G, Berrettini M, Musolesi S. Bleeding complications of oral anticoagulant treatment: an inception-cohort, prospective collaborative study (ISCOAT). Italian Study on Complications of Oral Anticoagulant Therapy. *Lancet.* 1996 Aug 17;348(9025):423-8.
3. van der Meer FJ, Rosendaal FR, Vandebroucke JP, Briët E. Bleeding complications in oral anticoagulant therapy. An analysis of risk factors. *Arch Intern Med.* 1993 Jul 12;153(13):1557-62.
4. Bodin L, Verstuyft C, Tregouet DA, Robert A, Dubert L, Funck-Brentano C, Jaillon P, Beaune P, Laurent-Puig P, Becquemont L, Loriot MA. Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood.* 2005 Jul 1;106(1):135-40.
5. Spreafico M, Lodigiani C, van Leeuwen Y, Pizzotti D, Rota LL, Rosendaal F, Mannucci PM, Peyvandi F. Effects of CYP2C9 and VKORC1 on INR variations and dose requirements during initial phase of anticoagulant therapy. *Pharmacogenomics.* 2008 Sep;9(9):1237-50.
6. Teichert M, van Schaik RH, Hofman A, Uitterlinden AG, de Smet PA, Stricker BH, Visser LE. Genotypes associated with reduced activity of VKORC1 and CYP2C9 and their modification of acenocoumarol anticoagulation during the initial treatment period. *Clin Pharmacol Ther.* 2009 Apr;85(4):379-86.

7. Pérez-Andreu V, Roldán V, Antón AI, García-Barberá N, Corral J, Vicente V, González-Conejero R. Pharmacogenetic relevance of *CYP4F2* V433M polymorphism on acenocoumarol therapy. *Blood*. 2009 May 14;113(20):4977-9.
8. Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, Gage BF, Falkowski M, Gardina P, Hubbard J, Turpaz Y, Langae TY, Eby C, King CR, Brower A, Schmelzer JR, Glurich I, Vidaillet HJ, Yale SH, Qi Zhang K, Berg RL, Burmester JK. *CYP4F2* genetic variant alters required warfarin dose. *Blood*. 2008 Apr 15;111(8):4106-12.
9. Teichert M, Eijgelsheim M, Rivadeneira F, Uitterlinden AG, van Schaik RH, Hofman A, De Smet PA, van Gelder T, Visser LE, Stricker BH. A genome-wide association study of acenocoumarol maintenance dosage. *Hum Mol Genet*. 2009 Oct 1;18(19):3758-68.
10. Pérez-Andreu V, Roldán V, López-Fernández MF, Antón AI, Alberca I, Corral J, Montes R, García-Barberá N, Ferrando F, Vicente V, González-Conejero R. Pharmacogenetics of acenocoumarol in patients with extreme dose requirements. *J Thromb Haemost*. 2010 May;8(5):1012-7.
11. Visser LE, Trienekens PH, De Smet PA, Vulsto AG, Hofman A, van Duijn CM, Stricker BH. Patients with an *APOE* epsilon4 allele require lower doses of coumarin anticoagulants. *Pharmacogenet Genomics*. 2005 Feb;15(2):69-74.
12. Cadamuro J, Dieplinger B, Felder T, Kedenko I, Mueller T, Halmayer M, Patsch W, Oberkofler H. Genetic determinants of acenocoumarol and phenprocoumon maintenance dose requirements. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010 Mar;66(3):253-60. Epub 2009 Dec 18.
13. Anderson JL, Horne BD, Stevens SM, Grove AS, Barton S, Nicholas ZP, Kahn SF, May HT, Samuelson KM, Muhlestein JB, Carlquist JF; Couma-Gen

- Investigators. Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation*. 2007 Nov 27;116(22):2563-70.
14. Millican EA, Lenzini PA, Milligan PE, Grosso L, Eby C, Deych E, Grice G, Clohisy JC, Barrack RL, Burnett RS, Voora D, Gatchel S, Tiemeier A, Gage BF. Genetic-based dosing in orthopedic patients beginning warfarin therapy. *Blood*. 2007 Sep 1;110(5):1511-5.
15. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, Wood P, Kesteven P, Daly AK, Kamali F. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood*. 2005 Oct 1;106(7):2329-33.
16. Wu AH. Use of genetic and nongenetic factors in warfarin dosing algorithms. *Pharmacogenomics*. 2007 Jul;8(7):851-61.
17. Caldwell MD, Berg RL, Zhang KQ, Glurich I, Schmelzer JR, Yale SH, Vidaillet HJ, Burmester JK. Evaluation of genetic factors for warfarin dose prediction. *Clin Med Res*. 2007 Mar;5(1):8-16.
18. International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE, Lee MT, Limdi NA, Page D, Roden DM, Wagner MJ, Caldwell MD, Johnson JA. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med*. 2009 Feb 19;360(8):753-64.
19. Meijer K, Kim YK, Carter D, Schulman S. A prospective study of an aggressive warfarin dosing algorithm to reach and maintain INR 2 to 3 after heart valve surgery. *Thromb Haemost*. 2011 Feb 1;105(2):232-8. Epub 2010 Dec 21.
20. Zambon CF, Pengo V, Padrini R, Basso D, Schiavon S, Fogar P, Nisi A, Frigo AC, Moz S, Peloso M, Plebani M. VKORC1, CYP2C9 and *CYP4F2* genetic-

- based algorithm for warfarin dosing: an Italian retrospective study. *Pharmacogenomics*. 2011 Jan;12(1):15-25.
21. Moreau C, Pautas E, Gouin-Thibault I, Golmard JL, Mahé I, Mulot C, Loriot MA, Siguret V. Predicting the warfarin maintenance dose in elderly inpatients at treatment initiation: accuracy of dosing algorithms incorporating or not VKORC1/CYP2C9 genotypes. *J ThrombHaemost*. 2011 Apr;9(4):711-718.
22. Lenzini P, Wadelius M, Kimmel S, Anderson JL, Jorgensen AL, Pirmohamed M, Caldwell MD, Limdi N, Burmester JK, Dowd MB, Angchaisuksiri P, Bass AR, Chen J, Eriksson N, Rane A, Lindh JD, Carlquist JF, Horne BD, Grice G, Milligan PE, Eby C, Shin J, Kim H, Kurnik D, Stein CM, McMillin G, Pendleton RC, Berg RL, Deloukas P, Gage BF. Integration of genetic, clinical, and INR data to refine warfarin dosing. *ClinPharmacolTher*. 2010 May;87(5):572-8.
23. Verde Z, Ruiz JR, Santiago C, Valle B, Bandrés F, Calvo E, Lucía A, Gómez Gallego F. A novel, single algorithm approach to predict acenocoumarol dose based on CYP2C9 and VKORC1 allele variants. *PLoS One*. 2010 Jun 18;5(6):e11210.
24. van Schie RM, Wessels JA, le Cessie S, de Boer A, Schalekamp T, van der Meer FJ, Verhoef TI, van Meegen E, Rosendaal FR, Maitland-van der Zee AH; for the EU-PACT Study Group. Loading and maintenance dose algorithms for phenprocoumon and acenocoumarol using patient characteristics and pharmacogenetic data. *Eur Heart J*; 32(15):1909-17
25. Borobia AM, Lubomirov R, Ramírez E, Lorenzo A, Campos A, et al. (2012) An Acenocoumarol Dosing Algorithm Using Clinical and Pharmacogenetic Data in

- Spanish Patients with Thromboembolic Disease. PLoS ONE 7(7): e41360. doi:10.1371/journal.pone.0041360
26. vanSchie RM, Wadelius MI, Kamali F, Daly AK, Manolopoulos VG, de Boer A, Barallon R, Verhoeft TI, Kirchheimer J, Haschke-Becher E, Briz M, Rosendaal FR, Redekop WK, Pirmohamed M, Maitland van der Zee AH. Genotype-guided dosing of coumarin derivatives: the European pharmacogenetics of anticoagulant therapy (EU-PACT) trial design. *Pharmacogenomics*. 2009 Oct;10(10):1687-95.
27. Rosendaal FR, Cannegieter SC, van der Meer FJ, Briët E. A method to determine the optimal intensity of oral anticoagulant therapy. *Thromb Haemost*. 1993 Mar 1;69(3):236-9.
28. López-Parra AM, Borobia AM, Baeza C, Arroyo-Pardo E, Carcas AJ. A multiplex assay to detect variations in the CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 and APOE genes involved in acenocoumarol metabolism. *Clin Biochem*. 2012. pii: S0009-9120(12)00463-8. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.08.005
29. Schulman S, Kearon C. Definition of major bleeding in clinical investigations of antihemostatic medicinal products in non-surgical patients. *J. Thromb. Haemost.* 3(4), 692-694.
30. Naranjo CA, Busto U, Sellers EM, Sandor P, Ruiz I, Roberts EA, Janecek E, Domecq C, Greenblatt DJ. A method for estimating the probability of adverse drug reactions. *Clin Pharmacol Ther*. 1981 Aug;30(2):239-45.
31. Caraco Y, Blotnick S, Muszkat M. CYP2C9 genotype-guided warfarin prescribing enhances the efficacy and safety of anticoagulation: a prospective randomized controlled study. *Clin Pharmacol Ther*. 2008 Mar;83(3):460-70.

32. Guijarro R, Montes J, Sanromán C, Monreal M; RIETE Investigators. Venous thromboembolism in Spain. Comparison between an administrative database and the RIETE registry. *Eur J Intern Med.* 2008 Oct;19(6):443-6
33. Lobo JL, Jiménez D, Orue MT, Grau E, Naufall D, Madridano O, Monreal M and the RIETE Investigators. Recurrent venous thromboembolism during coumarin therapy. Data from the computerized registry of patients with venous thromboembolism. *Brit J Haematol* 2007; 138 (3): 400-3
34. Goldhaber SZ, Visani L, De Rosa M. Acute pulmonary embolism: clinical outcomes in the International Cooperative Pulmonary Embolism Registry (ICOPER). *Lancet* 1999;353: 1386-9.2.
35. Kearon C. Natural history of venous thromboembolism. *Circulation* 2003; 107:I-22-I-30.3
36. Nieto JA., Cámara T, Gonzalez-Higuera E, Ruiz-Gimenez N, Guijarro R, Marchena PJ, Monreal M; for the RIETE Investigators. Clinical outcome of patients with major bleeding after venous thromboembolism. Findings from the RIETE Registry. *Thromb Haemost* 2008 Nov; 100(5): 789–96.
37. Harvey D. White, DSc; Michael Gruber, MSc; Jan Feyzi, MS; Scott Kaatz, DO; Hung-Fat Tse, MD; Steen Husted, MD; Gregory W. Albers, MD. Comparison of Outcomes Among Patients Randomized to Warfarin Therapy According to Anticoagulant Control Results From SPORTIF III and V. *Arch Intern Med.* 2007;167:239-245.
38. Connolly SJ, Pogue J, Eikelboom J, Flaker G, Commerford P, Franzosi MG, Healey JS, Yusuf S; ACTIVE W Investigators. Benefit of oral anticoagulant over antiplatelet therapy in atrial fibrillation depends on the quality of international normalized ratio control achieved by centers and countries as

measured by time in therapeutic range. Circulation. 2008 Nov 11;118(20):2029-37

39. Natalie Oake, Dean A. Fergusson, Alan J. Forster, Carl van Walraven. Frequency of adverse events in patients with poor anticoagulation: a meta-analysis. CMAJ 2007;176(11):1589-94.
40. van Dongen CJ, Prandoni P, Frulla M, Marchiori A, Prins MH, Hutten BA. Relation between quality of anticoagulant treatment and the development of the postthrombotic syndrome. J Thromb Haemost. 2005 May;3(5):939-42.

Figure 1

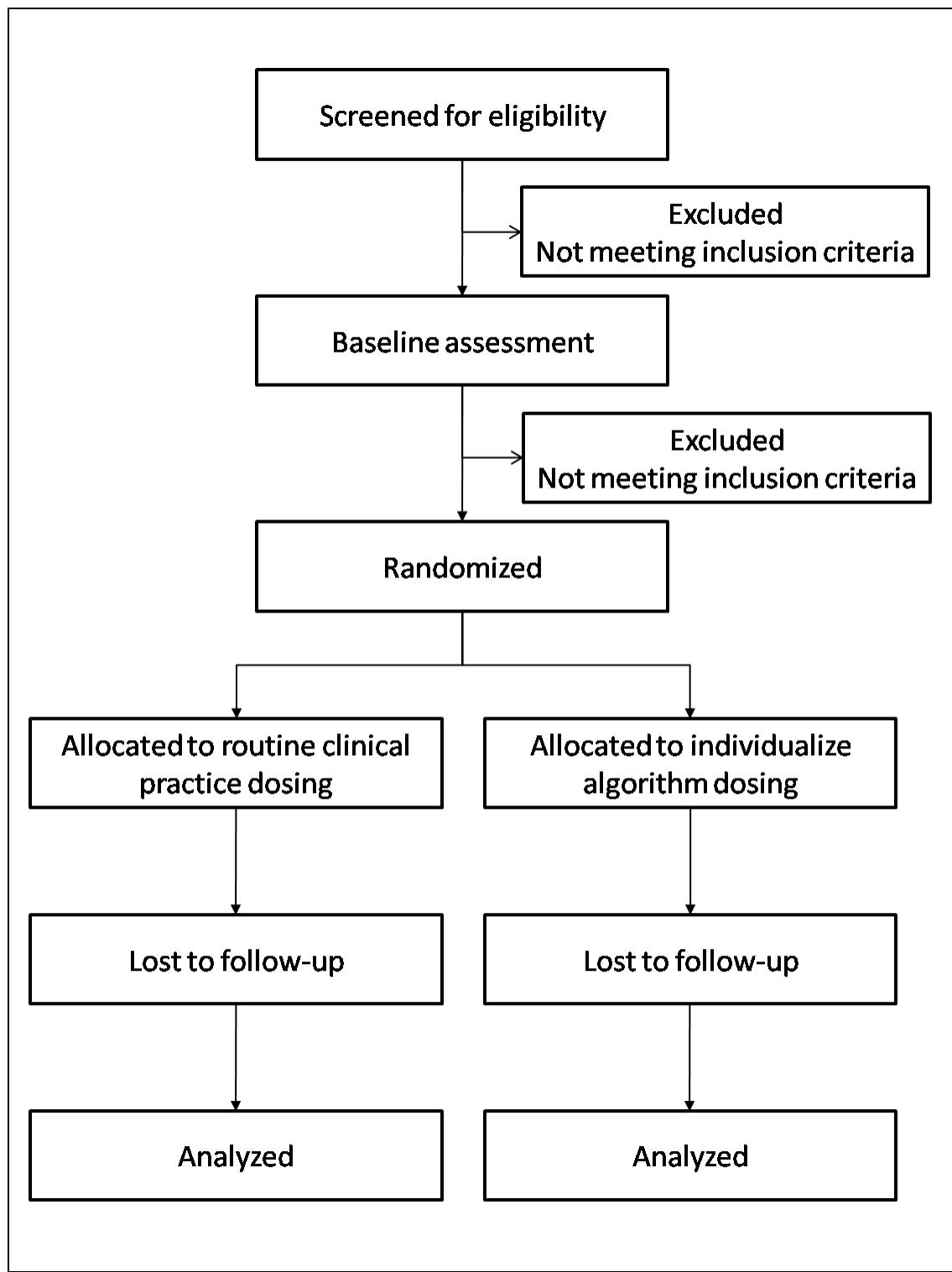


Table 1. Study Timeline

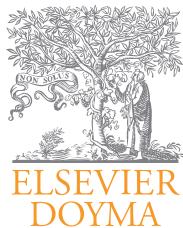
Day #	-3 or -2	0	3	7 (±1)	15 (±3)	30 (±5)	60 (±7)	90 (±7)
Recruitment	✓							
Informed consent	✓							
Selection criteria	✓							
Medical history	✓							
Physical examination	✓							✓
Blood samples for	✓							
Randomization	✓							
Acenocoumarol dosing		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
INR determination		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Evaluation of side effects		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

In order to perform appropriate dose adjustments, additional visits can be scheduled as needed, at the discretion of the clinical researcher.

APPENDIX: Trial Investigation Group.

- **Trial Coordination:** Carcas Sansuán, Antonio J
- **Clinical Researchers:**
 - Hospital Universitario La Paz:
 - **Department of Clinical Pharmacology:** Alberto M. Borobia, Jesús Frías Iniesta, Elena Ramírez García, Marta Velasco, Hoi Y. Tong
 - **Emergency Department:** Manuel Quintana Díaz, Ana Martínez Virto, Sara Fabra Cadenas, Manuel González Viñolis.
 - **Department of Internal Medicine:** Carmen Fernández Capitán, Alicia Lorenzo, María Ángeles Rodríguez Dávila
 - Hospital Universitario La Princesa:
 - **Department of Clinical Pharmacology:** Francisco Abad Santos, Dolores Ochoa, Igone Marrodon, Isabel Moreno, Manuel Román, Carmen Verge.
 - **Department of Internal Medicine:** Carmen Suárez Fernández, Nuria Ruiz-Giménez
 - Hospital Infanta Sofía:
 - **Department of Internal Medicine:** Jorge Gómez Cerezo, Olga Madridano, Mar Martín del Pozo.
 - Fundación Jiménez Díaz:
 - **Department of Hematology:** Pilar Llamas Sillero.
 - Hospital 12 de Octubre:
 - **Department of Internal Medicine:** Agustín Blanco Echevarría.
- **Pharmacogenetic determinations:**
 - Universidad Complutense de Madrid: Eduardo Arroyo Pardo, Ana María López Parra, Carlos Baeza.
- **Study monitoring:**
 - CAIBER: Spanish Platform for Clinical Trials.

ANEXO II: ABSTRACTS PUBLICADOS



COMUNICACIONES PÓSTERS

ENFERMEDADES INFECCIOSAS

A-1

PALUDISMO: ¿UNA PATOLOGÍA DE INMIGRANTE O DE TURISTA?

L. Mérida Rodrigo, J. De la Torre Lima, A. Del Arco Jiménez, J. Olalla Sierra, J. Prada Pardal, M. Noureddine López, M. Villena Ruiz y A. Aguilar López

Servicio de Medicina Interna. Hospital Costa del Sol. Marbella (Málaga).

Objetivos. Conocer las características terapéuticas y evolutivas de pacientes ingresados con el diagnóstico principal de paludismo, en un Hospital general de la costa del Sol, donde hay un elevado número de inmigrantes procedentes de zonas endémicas de paludismo.

Material y métodos. Tipo de estudio: descriptivo retrospectivo. Criterios de inclusión: todos los pacientes con el diagnóstico de paludismo ingresados en un hospital general. Número de camas 350. Período de inclusión: desde 1-1-1992 hasta 31-12-2008. Variables del estudio: demográficas, clínicas, analíticas, microbiológicas, terapéuticas y evolutivas.

Resultados. Se incluyeron un total de 20 casos, de los que el 80% eran varones. La edad media fue de 35,7 años (21,9-49,5, DS). Procedencia: 35% Europa, 15% Sudamérica, 5% Asia, 45% África (77,7% África subsahariana, 22,3% África no subsahariana). Viajes previos: 68,4% realizó algún viaje el mes previo al diagnóstico, siendo África el destino más visitado en el 65,1% de los casos, Centroamérica en el 15,4% y a otras regiones en el 23,5%. Ningún paciente realizó profilaxis para malaria. Manifestaciones clínicas: 95% fiebre, astenia 15%, 5% polialgias, 5% diarrea, 10% vómitos. Laboratorio: creatinina 1,61 mg/dl (\pm 1,27 DS), GOT 75,39 UI/l (\pm 72,6 DS), GPT 85,2 UI/l (\pm 96,6), Hb 11,2 g/dl (\pm 2,3), plaquetas 67550 (\pm 40526)/mm³, Frotis 95% positivo. Tipo *Plasmodium*: 80% *falciparum*, 20% ovale. Tratamiento: 42,1% Sulfato quinina, 57,9% mefloquina. 60% Doxiciclina. Analítica alta. GOT 33,2 UI/l (\pm 27 DS), GPT 41,4 UI/l (\pm 42,2 DS), Hb 12,09 g/dl (\pm 2,07 DS), Creatinina 0,76 mg/dl (\pm 0,21 DS), plaquetas 151090/mm³ (\pm 85426). Estancia media: 5,32 días (\pm 4,12 DS). Solo un paciente falleció a causa de la malaria durante nuestro período de estudio.

Conclusiones. En nuestro medio la malaria sigue siendo una patología principalmente del inmigrante, aunque está incrementándose la tasa de malaria en pacientes que realizan viajes a lugares exóticos. *Plasmodium falciparum* es el parásito más frecuentemente visualizado, siendo el tratamiento con mefloquina y doxiciclina el más usado. Llama la atención la ausencia de quimioterapia en los pacientes europeos.

A-2

EVALUACIÓN DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL ACTUAL. SEGUIMIENTO DURANTE UN AÑO

L. Mérida Rodrigo, J. De la Torre Lima, J. Prada Pardal, A. Del Arco Jiménez, J. Olalla Sierra, M. Noureddine López y A. Aguilar López y M. Villena Ruiz

Servicio de Medicina Interna. Hospital Costa del Sol. Marbella (Málaga).

Objetivos. Conocer la evolución de la terapia HAART durante un año, en una cohorte de pacientes de un hospital de segundo nivel. Conocer adversos más frecuentes y los cambios asociados a ellos.

Material y métodos. Estudio de observacional prospectivo de los pacientes infectados por el VIH en nuestra área sanitaria. Se incluyeron 369 pacientes. Seguimiento desde julio de 2007 a julio de 2008. Se realizó un análisis descriptivo de la situación de la TARGA al final del año. Analizamos los efectos adversos más frecuentes secundaria a TARGA y su asociación con determinados antirretrovirales.

Resultados. Se incluyeron un total de 369 pacientes en el estudio con una edad media de 42,3 años y basalmente la mediana de CD4 era 606 con solo un 4% por debajo de 200 cel/mm³ y CV < 50 copias/mL en el 75% de los casos. Los factores de riesgo de VIH fueron en el 30,5% de los casos ser ADVP, en el 35,1 ser heterosexual, en el 24,2% homosexual y en el 10,3% de los casos no se conocía factores de riesgo. El 5% de nuestros pacientes estaban coinfectados por VHB y el 39% por VHC. Un 85% (313 pacientes) recibía TARGA en el momento del inicio del estudio. De los 56 sin TARGA 5 pacientes lo iniciaron durante el año. Al año continuaba con el mismo TARGA 302 pacientes (81,8%). Cambiaron por fracaso virológico 29 pacientes (9,2% del total de pacientes con TARGA), de los cuales 14 era el primer fracaso, 7 el segundo y 8 multirfracasos, y cambiaron algún fármaco del TARGA que venían realizando por efectos secundarios precoces o tardíos un total de 37 pacientes (11%) (15 pacientes eran a la primera TARGA, 15 la segunda, 6 la tercera y 1 la cuarta). Los efectos adversos más frecuentes fueron lipotrofia en 15 pacientes asociada fundamentalmente a AZT y a DDI, deterioro de la función renal en 4 pacientes en relación con TDF, alteración gastrointestinal en 4, fundamentalmente por IPs, rash en 3 y polineuropatía en 2, implicando todos cambio en la TARGA. En 2 pacientes se simplificó el TARGA (Se pasó de Sust+Truv a Atripla). En global al año continuaban con CV < 50 copias/mL el 77% de pacientes con TARGA.

Conclusiones. Las nuevas combinaciones de TARGA permiten en el momento actual que las cohortes de pacientes VIH en la vida real, al año de seguimiento, aproximadamente el 81% continúa con la misma TARGA. El 77% de pacientes con TARGA mantiene la CV indetectable y solo requieren cambio por toxicidad algo más de un 10%. La lipotrofia, el deterioro de la función renal, las alteraciones gastrointestinales y el rash cutáneo son las reacciones adversas causa de cambio de medicación más frecuentes al año de seguimiento. Generalmente la TARGA que más se ha asociado a RAM ha sido aquella basada en terapias con combo AZT+3TC.

A-3

FIEBRE Q: 54 CASOS EN LA ZONA NORTE DE LA COMUNIDAD DE MADRID

M. Ruiz Seco¹, M. López², M. Estébanez¹, F. Zamora² y F. Barbado³

¹Residente de Medicina Interna, ²Adjunto de Medicina Interna, ³Jefe de Sección Medicina Interna. Hospital Universitario la Paz. Madrid.

Objetivos. Describir las características epidemiológicas y clínicas de la Fiebre Q en la zona Norte de la Comunidad de Madrid y analizar el adecuado diagnóstico, seguimiento y tratamiento.

Material y métodos. Estudio observational de cohorte histórica de los casos de Fiebre Q en el Hospital La Paz desde Enero 2001 hasta Diciembre 2008. Se recogieron parámetros demográficos, clínicos, analíticos, microbiológicos, pruebas complementarias realizadas, tratamiento y evolución. El diagnóstico de fiebre Q aguda se realizó mediante la detección de anticuerpos frente a antígenos fase II por técnica de ELISA e IFI

T-21

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EVOLUTIVAS DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA EN EL ÁREA SUR DE GALICIA
M. Vázquez Triñanes, A. Rivera Gallego, I. Villaverde, I. Vaqueiro, M. Pérez Rodríguez, R. Longueira, L. González González y C. Martínez Vázquez
Servicio de Medicina Interna. Hospital Xeral de Vigo. Vigo (Pontevedra).

Objetivos. Deánir las características clínico-evolutivas de los pacientes con enfermedad tromboembólica en nuestro medio.

Material y métodos. Se analizaron retrospectivamente 50 historias clínicas seleccionadas aleatoriamente de entre los 178 pacientes vistos en consulta externa de Medicina Interna durante 2008 con los diagnósticos de trombosis venosa de cualquier localización o embolismo pulmonar.

Resultados. Un 55% fueron mujeres y la edad media al diagnóstico del primer evento tromboembólico fue 58,7 años, con un rango entre 25 y 89. El 48% fueron TVP, el 32%, TVP y TEP, el 10% TEP aislado y solo 2 fueron tromboébitis de miembros inferiores y 3 trombosis de localización abdominal. Entre los antecedentes destacaron un 15,7% de fumadores y un 25,5% de exfumadores. Un 39,2% eran hipertensos. Ninguno presentó insuficiencia cardiaca, ni arteriopatía periférica. Un 25,5% tenían varices. En el mes previo, un 13,7% habían recibido cirugía mayor y un 3,9%, cirugía menor. Sólo 3 mujeres estaban con anticoagulación oral. Un caso ocurrió durante el embarazo y dos en el puerperio (dos TVP y una tromboébitis séptica ovárica con trombosis de vena cava). El 21,4% presentaron algún aborto. Durante el seguimiento, en el estudio de trombólisis, 3 presentaron mutación en el gen de protrombina, 2, en el factor V Leiden y 1, déicit de proteína S. Un 14% asociaron síndrome antifosfolípido (4 mujeres y 3 varones). En la búsqueda activa de neoplasias, se encontraron en un 12%. Dos previamente al evento tromboembólico (carcinoma prostático y carcinoma endometrioides) y 4, todas mujeres, en el seguimiento (carcinoma renal, cistoadenoma papilar seroso ovárico, teratoma quístico maduro y carcinoma mamario). En cuanto a la terapia anticoagulante, el 42% fueron tratados a medio-largo plazo con acenocumarol, el 24%, con enoxaparina, el 20%, con bempiparina y el 14%, con fraxiparina. Se vió en la evolución que un 26% de las trombosis en miembros inferiores desarrollaron síndrome posttrombótico. El 26% sufrieron una retrombosis. Dos de las 13 recibían tratamiento en ese momento (uno, acenocumarol y otro, enoxaparina). No hubo ningún episodio de hemorragia que precisara de la suspensión del tratamiento. En 2 casos se registraron sangrados leves (hematuria con acenocumarol y retorragia con bempiparina).

Discusión. Las trombosis venosas de cualquier localización y la embolia pulmonar comparten un sustrato etiopatogénico. Sin embargo, la mayoría de series publicadas se limitan al estudio de TVP-TEP. Además, en nuestro medio, casi todos los estudios epidemiológicos provienen de registros informatizados con pacientes que han precisado ingreso hospitalario. Nuestro estudio recoge una población más heterogénea, con pacientes remitidos a consulta desde Urgencias (práctica cada vez más frecuente en las TVP y tromboébitis) y revisiones posthospitalización. Nos encontramos una población con una edad media similar a la de las grandes series. Llama la atención la frecuencia de hipertensos y de pacientes con varices, sin embargo, fue poco frecuente la toma de anticonceptivos orales, probablemente debido a la edad avanzada de nuestra población. Un porcentaje elevado asoció síndrome antifosfolípido, casi tantos pacientes como postoperados. En la búsqueda activa de neoplasia oculta aparecieron 4 casos (8%) y en el estudio de trombólisis, un 36% presentó al menos una alteración. Destaca que más de la mitad se trataron con heparinas de bajo peso molecular, siendo todavía de primera elección la anticoagulación oral. Esto se debió a múltiples factores, entre ellos, la preferencia del propio paciente.

Conclusiones. Se debe seguir a estos pacientes, buscando activamente trombólisis o neoplasia oculta, que se asocian con frecuencia a la enfermedad tromboembólica, aunque exista un factor desencadenante aparente. No pueden sacarse conclusiones en cuanto a la aparición de nuevos eventos o de hemorragias con este tipo de estudio, pero sería de gran interés seguir la evolución de estos pacientes para comparar los resultados de los diferentes tratamientos en la práctica clínica.

T-22

INFLUENCIA DE FACTORES DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS Y FARMACOGENÉTICOS EN LA DOSIS ESTABLE DE ACENOCUMAROL EN PACIENTES CON ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA

A. Lorenzo Hernández¹, A. Borobia Pérez², C. Navarro San Francisco¹, A. Martín Quirós¹, N. Iniesta Arandia¹, S. Lei², A. Carcas Sansuán² y C. Fernández Capitán¹

¹Servicio de Medicina Interna, ²Farmacología Clínica. Hospital Universitario la Paz. Madrid.

Objetivos. El tratamiento con anticoagulantes orales ha mejorado el pronóstico de los pacientes con enfermedad tromboembólica (tromboembolismo pulmonar [TEP] y trombosis venosa profunda [TVP]). El control óptimo del

tratamiento se ve dificultado por la amplia variabilidad interindividual que existe en la dosis requerida para alcanzar el INR deseado. El objetivo de nuestro estudio fue determinar la influencia que tienen ciertas variables socio-demográficas, clínicas y farmacogenéticas en la variabilidad de la dosis de acenocumarol.

Material y métodos. Se han incluido 76 pacientes (55% varones; edad media: 68 ± 15 años) con enfermedad tromboembólica (85% con TEP y 15% con TVP) y anticoagulados con acenocumarol con un INR estable entre 2-3. Se recogieron las siguientes variables socio-demográficas (edad, peso, talla, género y test de Mini Mental) y clínicas (medicación concomitante). Asimismo se determinaron los polimorfismos *2 y *3 de la isoforma 2C9 del citocromo P450 (CYP2C9) y el haplotipo A de la vitamina K epóxido reducasa (VKORC1). Los métodos utilizados para el genotipado fueron la plataforma Sequenom® (CeGen, Santiago de Compostela) y Kaspas® (CeGen, Madrid). Todas estas variables se incluyeron en un modelo multivariante (regresión lineal por pasos), siendo la variable dependiente la dosis semanal de acenocumarol (mg/semana).

Resultados. El mejor modelo de regresión explica un 47,3% de la variabilidad ($p < 0,001$), e incluye el genotipo, la edad, el índice de masa corporal (IMC) y la medicación concomitante (tratamiento inductor del CYP2C9). El genotipo (VKORC1 + CYP2C9) explica el 24,2% de la variabilidad de la dosis ($p < 0,001$) necesaria para un INR estable, la medicación concomitante (tratamiento inductor del CYP2C9) el 8,9% ($p = 0,01$), la edad el 9% ($p = 0,008$), y el IMC el 5,2% ($p = 0,038$). El género y el test de Mini-Mental no entraron en el modelo.

Discusión. La variabilidad interindividual en la dosificación de acenocumarol que es atribuida a los factores clínico-demográficos en nuestro estudio es del 23,1%, lo cual está en concordancia con otros estudios publicados. Si añadimos los factores genéticos (en nuestro caso 3 polimorfismos), este porcentaje se duplica, llegando a explicar conjuntamente casi la mitad de la variabilidad que existe en la dosis de acenocumarol.

Conclusiones. 1. Los polimorfismos del CYP2C9 y VKORC1, junto con la edad, el IMC y la medicación concomitante, determinan en buena medida la variabilidad interindividual en la dosis estable de acenocumarol. 2. Estos factores podrían ser utilizados para el desarrollo de un algoritmo de cálculo de dosis con el fin de mejorar la eficacia y seguridad del tratamiento anticoagulante en pacientes con enfermedad tromboembólica.

T-23

DETERMINACIÓN DEL VALOR DEL D-DÍMERO EN EL DIAGNÓSTICO DE ETV

G. Tornel, J. Trujillo, S. Herrera, M. Artero, A. Rodríguez, E. Peñalver, J. Vega y N. Cobos
Servicio de Medicina Interna. Hospital General de Área Santa María del Rosell. Cartagena (Murcia).

Objetivos. La determinación de D-dímero ayuda al diagnóstico de la enfermedad tromboembólica venosa (ETV), sobre todo gracias a su alto valor predictivo negativo, si bien el nivel de su cuantificación erróneamente se suele considerar un parámetro que apoya el diagnóstico en comparación con valores relativamente bajos. Nos propusimos estudiar qué parámetros son los que se relacionan por un lado con la positividad del D-dímero y con el nivel del mismo.

Material y métodos. Estudiamos todos los pacientes diagnosticados de ETV en nuestro hospital durante dos años consecutivos y recogimos los parámetros demográficos, la comorbilidad asociada, los factores de riesgo asociados a la ETV y las características clínicas de la misma. La determinación de D-dímero se realizaba en el momento de la realización de la ecografía venosa diagnóstica mediante IL-test D-dimer, considerándose valores positivos aquellos superiores a 500 ng/mL. Se consideraron valores muy elevados aquellos superiores a 5 veces el límite superior de la normalidad (> 2500 ng/mL) y levemente elevados los positivos inferiores a esta cifra (500-2.499 ng/mL). Realizamos un análisis univariante en el que se compararon dichas características basales de los pacientes (coincidentes con la determinación de D-dímero o previos y potencialmente relacionados con su positividad y/o sus niveles plasmáticos). Las comparaciones se realizaron mediante test de χ^2 para comparación de proporciones y mediante t-Student para poblaciones independientes o ANOVA para variables cuantitativas continuas. Posteriormente realizamos un análisis de regresión logística con introducción de variables paso a paso, hacia delante, en el que se intentó determinar los parámetros que independientemente se relacionaban en primer lugar con la positividad del D-dímero y en un segundo análisis, con el nivel plasmático de D-dímero. Se consideraron significativas las $p < 0,05$ para el análisis bivariado y $p < 0,10$ y $p > 0,15$ como criterios de entrada y salida en el análisis multivariante. El análisis estadístico se realizó con los programas SPSS 15,0 y Epidat 3,1.

Resultados. Estudiamos un total de 173 pacientes de los que en 38 no se había solicitado la determinación de D-dímero. Del resto (143 pacientes) el

SEFC2011 ORAL COMMUNICATIONS

PHARMACOKINETICS AND PHARMACOGENETICS

01

ASSOCIATION OF TNFALPHA AND IL23R POLYMORPHISMS TO ANTI-TNF RESPONSE IN PSORIASIS

F. Abad-Santos¹, M. Román¹, D. Ochoa¹, E. Gallo², E. Dauden², T. Cabaleiro-Ocampo¹

¹Service of Clinical Pharmacology, Hospital Univ de la Princesa, ITH IIS Princesa, Madrid, Spain, ²Service of Dermatology, Hospital Univ de la Princesa, IIS Princesa, Madrid, Spain

Anti-TNFalpha drugs are used for treatment of psoriasis and other inflammatory diseases. Some studies have shown an association between polymorphisms in genes codifying TNF and response to anti-TNF agents in some inflammatory pathologies but it has not been studied in psoriasis. The aim of this study is to evaluate the effect of polymorphisms in TNF, IL12B and IL23R on anti-TNF response in psoriatic patients. We genotyped 132 patients treated with anti-TNF (32 infliximab, 60 etanercept and 41 adalimumab) for single nucleotide polymorphisms (SNPs) on TNFalpha gene by PCR and sequencing (TNFalpha-238, -308, -857, and -1031), and on IL12B and IL23R genes by real time PCR. We also evaluated treatment efficacy at 3 and 6 months, determining PASI50, PASI75, PASI90, and percentage of PASI and BSA improvement. At 6 months, patients with TNF-238GG genotype more frequently reached PASI50 and PASI75, and showed better PASI and BSA improvement respect to allele *A carriers ($P < 0.05$). TNF-857*T patients more frequently reached PASI75 at 6 months than patients with GG genotype ($P < 0.05$). There was also an association between TNF-1031 genotype and PASI50 and percentage of PASI improvement at 3 and 6 months, and PASI75 at 6 months. Patients with IL23GA genotype showed lower probability of reaching PASI50 at 3 months ($P < 0.001$) and PASI90 at 6 months ($P < 0.05$), respect to GG genotype. There was no relationship with TNF-308 or IL12B. Some polymorphisms on TNFalpha and IL23R genes are associated to a better response to anti-TNF therapy in psoriatic patients, but it must be confirmed in other studies.

02

INFLUENCE OF MORBID OBESITY ON THE PHARMACOKINETICS OF PARACETAMOL AND DRUG METABOLISM

J. Ortiz-Alcantara¹, M. Farre², C. Pérez-Mañá², E. Menoyo², M. Pérez², S. Martín², C. Gibert², E. Papaseit², C. Mustata², R. Pardo-Lozano², C. Llonch², E. Civit¹, A. Goday³, J. M. Ramón³, R. de la Torre¹

¹Human Pharmacology, Hospital del Mar Research Institute-IMIM, Parc de Salut Mar, Universitat Pompeu Fabra-UPF, Barcelona, Spain, ²Human Pharmacology, Hospital del Mar Research Institute-IMIM, Parc de Salut Mar, Universitat Autònoma de Barcelona-UAB, Barcelona, Spain, ³Endocrinology and Surgery Departments, Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, Universitat Autònoma de Barcelona-UAB, Barcelona, Spain

Morbid obesity (MO) is a health problem worldwide. Patients with MO may show alterations in the bioavailability and metabolism of drugs, but their impact is not fully understood because there are limited studies available. Some suggest an alteration in the activity of cytochrome P-450 (CYP450) isoenzymes and drug distribution. This study was designed to assess the changes induced by MO on the pharmacokinetics of paracetamol and its influence on drug metabolism. Subjects included were MO (body mass index, BMI > 40, n = 25; 22 women), normal weight (BMI 18.5–24.9, n = 14, 12 women) and overweight healthy subjects (BMI 25–29.9, n = 14, 14 women). A modification of the Karolinska cocktail and paracetamol (500 mg)

were given orally. The cocktail contained losartan 25 mg, omeprazole 20 mg, dextromethorphan 30 mg, and caffeine 65 mg that are metabolic substrates of CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 and CYP1A2 respectively. Urine, blood and saliva samples were collected at different times to determine the concentrations of the drugs and their metabolites. Metabolic indices of the probes and pharmacokinetic parameters of paracetamol were calculated. Vital signs and adverse events were monitored. Preliminary results on paracetamol pharmacokinetics showed a statistically significant difference in C_{max} , AUCo-t, half-life, kel, CL and Vd between MO and both control groups. In addition greater hypotensive effects were observed in controls in relation to MO. MO produce significant changes in absorption, distribution and metabolism of paracetamol. Acknowledgments: founded in part by grants ISCIII-FIS-FEDER PI08/090638, ISCIII-FIS-CAIBER CAI08/01/0024 and ISCIII-FIS-Rio Hortega CM08/00051.

03

PHARMACOKINETICS OF THE TWO TACROLIMUS FORMULATIONS IN OLDER PATIENTS WHO RECEIVE A CADAVERIC KIDNEY GRAFT FROM AN EXPANDED CRITERIA DONOR. RANDOMIZED SINGLE-CENTRE STUDY

M. Cabello-Díaz¹, E. Gutiérrez-Vilchez¹, M. González-Molina¹, P. Hidalgo-Guzman¹, M. J. Díez -de los Rios¹, M. García-Saiz², C. Gutiérrez-de la Fuente¹, V. López-Jiménez¹, E. Sola- Moyano¹, D. Burgos-Rodríguez¹, D. Hernández-Marrero¹

¹Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga, Spain, ²Hospital Clínico Universitario de Canarias, Tenerife, Spain

A single-centre randomised study comparing the pharmacokinetics (PK) of the new prolonged-release tacrolimus (TAC) formulation, ADVAGRAF® (AD), with the classic PROGRAF® (PR) b.i.d., in cadaveric kidney transplant (CKT) recipients from expanded-criteria donors (ECD). Parameters included blood levels (C_{min}), acute rejection (AR), kidney function, and short-term (12 months) graft and patient survival. Forty patients randomised to late introduction (3rd day post-CKT) of AD (n = 20; 63.9 ± 5.4 years) or PR (n = 20; 63.9 ± 5.9 years), dose 0.1 mg/kg/day, to reach 5–8 ng/ml (C_{min}), plus MMF, prednisone and basiliximab. Donor age: 63.9 ± 6.1 vs. 64.7 ± 6.4 years. PK was analysed on days 3 and 21 after first TAC dose in 9 AD and 11 PR blood samples. At 24 h, C_{min} was 4.43 ± 2.26 vs. 5.37 ± 3.33 ng/ml ($P = 0.539$). No significant differences in AUCo-24 (ng.h/ml) of TAC at 3 (279.45 ± 69.61 vs. 289.31 ± 100.43) or 21 days (305.06 ± 88.66 vs. 288.96 ± 88.98), TAC dose (mg/kg/day) at 1 (0.08 ± 0.03 vs. 0.08 ± 0.04), 3 (0.06 ± 0.03 vs. 0.05 ± 0.03) or 12 (0.04 ± 0.02 vs. 0.04 ± 0.02) months, or C_{min} (8.76 ± 2.27 vs. 9.15 ± 1.94 , 7.49 ± 1.56 vs. 7.67 ± 2.09 and 6.12 ± 0.90 vs. 6.30 ± 1.45 , respectively). A good correlation existed between AUC0-24 and C_{min} with both formulations (day 3, $r = 0.89$ vs. $r = 0.92$; day 21, $r = 0.77$ vs. $r = 0.88$). At 12 months, incidence of biopsy-confirmed AR was 0% vs. 15% ($P = 0.036$), and serum creatinine was 1.49 ± 0.43 vs. 1.34 ± 0.48 mg/dl ($P = 0.240$). Survival: graft, 100% vs. 90% ($P = 0.152$) and patient, 100% vs. 94.7% ($P = 0.305$). The PK profile of both TAC formulations is similar in older CKT patients from an ECD. A single dose of AD is safe and effective, encouraging therapeutic compliance in this population.

04

A MODEL-BASED COST-EFFECTIVENESS ANALYSIS OF CLOPIDOGREL PHARMACOGENOMIC TESTING

R. Lubomirov, A. M. Borobia, A. J. Carcas

Clinical Pharmacology Service, La Paz University Hospital, School of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, IdiPAZ, Madrid, Spain

Emerging data suggest the implementation of pharmacogenomic-guided clopidogrel prescription in standard clinical practice, but clinical benefits, risks and costs of that strategy have not been evaluated. This study aims to develop a model to evaluate its cost-effectiveness. A decision-analytic tree model was developed to compare pharmacogenomic-guided clopidogrel prescription with standard care oral anti-aggregation practice with a time horizon of 15 months. The use of clopidogrel or prasugrel in reference branch was assumed. In the intervention branch, CYP2C19*2 allele noncarriers were allowed to receive clopidogrel and carriers were allowed to receive prasugrel or higher clopidogrel dose when prasugrel was contraindicated. The model was based on absolute risk reduction (ARR) of cardiovascular or bleeding events and noncardiovascular death. Estimates of effects were derived from literature. Direct costs according to Spanish Diagnostic-Related Groups (€, year 2009 values) and the cost of drug therapy were used. Two-way sensitivity analyses were performed assuming fluctuations in prasugrel prescription percentage in reference branch (0–100%) and different genotyping cost (10 to 200€). Pharmacogenomic-guided therapy provided a relevant ARR in cardiovascular events (3.85% to 7.67%) with similar bleeding and noncardiovascular death rates. It was the dominant strategy when the genotyping cost where <180€ with an incremental cost-effectiveness ratio (ICER) ranged from -153 to -0.53€/ARR. The cost to avoid one cardiovascular event ranged from 13,793 to 30,469€. Our simulation model suggests that pharmacogenomic-guided clopidogrel therapy may provide a relevant clinical benefit at lower cost. Given the uncertainty of model-based pharmacoeconomic analyses, further prospective cost-effectiveness analyses are required.

CLINICAL TRIALS AND REGULATORY AFFAIRS

05

WHAT ABOUT CLINICAL RESEARCH IN HOSPITAL CLINIC OF BARCELONA (HCB) OVER THE PAST THREE YEARS? – A RESEARCH ETHICS COMMITTEE POINT OF VIEW

V. Domínguez-Trobo¹, N. Riba-García¹, J. Ríos-Guillermo², B. Gómez-Pérez³, X. Carné-Cladellas¹

¹Department of Clinical Pharmacology, Hospital Clinic Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain, ²Statistics & Methodology Support Unit, Hospital Clinic Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain,

³Department of Pharmacy, Hospital Clinic Barcelona, Villarroel 170, 08036 Barcelona, Spain

The Clinical Research Ethics Committee (CREC) of HCB meets fortnightly and develops an intense activity, assessing ethical and methodological aspects of more than 200 clinical trials (CTs) per year. Recently, the development of biological, biotechnological drugs and advanced therapies turned this task even more complex and difficult. Objectives: to describe clinical trials reviewed by the CREC of HCB over the past 3 years. We analysed the protocols of CTs submitted from 1/2008 to 1/2011, excluding medical devices. Analysis included: funding, fields of medicine, design and methodology and experimental interventions. We applied standard descriptive statistics. Our analyzed sample comprised a total of 630 CTs protocols. 83% were commercially funded. They were mainly conducted in oncology (26%), neurology (12%), pulmonary medicine (8%), gastroenterology (7%) and infectious diseases (6%), followed by the rest of specialties. Of the 176(28%) referral submissions, 14 (2%) were not approved. As regards to the type of intervention, 474 (75%) were synthetic drugs, 110(17%) monoclonal antibodies (mAbs), 38 (6%) vaccines and others biological products and 8(1%) involved somatic stem cell therapies (SCT). 49% were phase III and 14% phase IV. As main objective the studies describe efficacy (76%), safety (17%) or

pharmacokinetics (5%). 78% were randomized and controlled trials. 57% used blinding techniques. 40% included sub-studies, mainly focused on pharmacogenetic or evaluation of biomarkers. CTs submitted in HCB were mainly designed in late phases of drug development, with an efficacy objective, mostly in oncology. mAbs lead research, and SCT seem to be increasing.

06

EFFICIENCY AND EFFECTIVENESS OF THE USE OF AN ACENOCUMAROL PHARMACOGENETIC DOSING ALGORITHM VS. USUAL CARE EN PATIENTS WITH VENOUS THROMBOEMBOLIC DISEASE (VTD) INITIATING ORAL ANTICOAGULATION: STUDY PROTOCOL FOR A MULTICENTRIC RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL

A. M. Borobia, E. Ramirez, R. Lubomirov, H. Y. Tong, R. Muñoz-Romo, A. Campos, J. Frías-Iniesta, A. J. Carcas

Servicio de Farmacología Clínica, Hospital Universitario La Paz, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

The aim of this study is to evaluate the effectiveness and efficiency of acenocoumarol dosing algorithm incorporating demographic, clinical and pharmacogenetic variables in patients with VTD. This is a multicentric (three centers), single-blinded, randomized controlled trial. The protocol has been approved by La Paz University Hospital Ethics Committee and by the Spanish Drug Agency (EUDRA-CT 2009-016643-18). Two hundred and forty patients with VTD in which oral anticoagulant therapy is indicated will be included. Randomization will be stratified by center. Acenocoumarol dose in the control group will be scheduled and adjusted following common clinical practice; in the experimental arm dosing will follow an individualized algorithm that includes demographic, clinical and genetic variables (polymorphisms of CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 and ApoE). This algorithm has been developed and validated by our group in a previous study. Patients will be followed for 3 months. The main endpoints are: (i) percentage of patients with INR within the therapeutic range on day 7; (ii) time from the start of oral anticoagulant treatment to achievement of a stable INR; (iii) number of INR determinations within the therapeutic range in the first 6 weeks of treatment. After 2 months of initiating this clinical trial, twenty patients in two of the three centres have been included. The trial is scheduled to be completed by mid-2012. To date there are no clinical trials comparing pharmacogenetic acenocoumarol dosing algorithm vs. routine clinical practice in VTD. Implementation of this algorithm in the clinical practice could reduce side effects and improve patient safety.

07

CLINICAL TRIALS (CT) WITH PUBLIC FUNDING: A CASE STUDY

E. Rubio-Gomis¹, I. Martínez-Mir², F. Morales-Olivas³, A. Martorell-Aragones⁴, V. Palop-Larrea⁵, I. Febrero⁶, A. Bernalte-Sesé⁷, J. C. Cerdá-Mir⁴, P. Polo-Martín⁸, L. Aranda-Grau⁹, I. Llosa-Cortés¹⁰, M. J. Tejedor-Sanz¹¹, J. C. Julia-Benito¹², T. Alvarez de Laviada⁸, M. V. Planelles-Cantarino¹³, E. Apolinar-Valiente¹⁴, M. M. Loriente-Tur¹⁵, I. Alvarez-Gonzalez¹⁶, C. Morales-Carpi¹⁷, M. E. Burches-Greú¹⁸

¹Unidad de Farmacología Clínica, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia (CHGUV), Valencia, Spain, ²Dirección Médica-Fundación HGU, CHGUV, Valencia, Spain, ³Departamento Farmacología, Universitat de València, Valencia, Spain, ⁴Unidad de Alergía Pediátrica, CHGUV, Valencia, Spain, ⁵Subdirección Médica Asistencial, Departamento de Salud La Ribera, Valencia, Spain, ⁶Servicio Dermatología, CHGUV, Valencia, Spain, ⁷Servicio de Farmacia, CHGUV, Valencia, Spain, ⁸Centro de Salud Barrio de la Luz, Xirivella, Valencia, Spain, ⁹Centro de Atención Primaria de Pobla de Vallbona, Valencia, Spain, ¹⁰Centro de Salud Monserrat, Valencia, Spain, ¹¹Centro de Salud Torrente II, Valencia, Spain, ¹²Centro de Salud Alzira, Valencia, Spain, ¹³Centro de Salud Paiporta, Valencia, Spain, ¹⁴Centro de Salud Torrente

ORAL COMMUNICATIONS

O1

EXAMINING THE INTERSECTION BETWEEN NETWORK PHARMACOLOGY AND PERSONALIZING MEDICINES

Watkins J.^{1,2}, Marsh A.¹, Taylor P. C.¹, Singer D. R. J.^{2,3}

¹Department of Chemistry, University of Warwick, Coventry, UK; ²Warwick Medical School, University of Warwick, Coventry, UK; ³University

A personalized approach to medicines aims to improve safety and effectiveness of prescribing, however this presents major challenges for drug discovery. Network pharmacology may help by seeking to describe therapeutically beneficial and adverse drug reaction (ADR) outcomes of medicines in terms of the molecular interaction of drugs with inter-related proteins or networks. Knowing through a network pharmacology approach which targets are responsible for a disease or for adverse effects in a particular individual will better allow physicians to combat diseases by improving drug efficacy on a personalized level. We examine the opportunities presented to the discoverers, formulators and prescribers of therapeutic drugs by the confluence of these ideas. There has been increasing urgency within drug discovery to simplify insight into the interactions between a small drug molecule and a single target. Embracing a new integrative network approach will allow chemists a better understanding of complex biological systems. *In vivo* small-molecule discovery is facilitated by revealing a genetic/phenotypic disease network. Individual variability leads to differences in network nodes and edges through genetic polymorphism, deletions and copy number variants. The goal of polypharmacology is to find/develop compounds that can modulate two or more targets known to play a key role in altering the disease state. Current drug design involves approaching dysregulation of a disease-causing cellular process by antagonizing a molecular target central to that dysregulation. Network pharmacology aims to gain a greater understanding of dysregulation and the target(s) that are central in comparison to the healthy state, in order to uncover those to modulate for optimal therapeutic benefit. Patients with the same phenotypic disease may in fact have different altered networks that might account for differences between people in success or failure of treatment. Drugs affect individuals differently, and may interact with multiple targets in each individual. Pleiotropic effects of small molecules necessitate a move away from the single-target drug discovery approach. Chemists will play a role in discovering and formulating personalized medicines in order to ensure their bioavailability, and altering dose titration based on network pharmacology of different subsets of the population. Acceptance of interdisciplinary approaches will allow more rapid access to the advances brought by combining network pharmacology and personalized medicine.

O2

XANTHINE OXIDASE AND N-ACETYLTRANSFERASE-2 ENZYME ACTIVITIES IN SWEDES AND KOREANS: AN INTER-ETHNIC COMPARISON

Djordjevic N.^{1,2}, Carrillo J. A.³, Gervasini G.³, Ueda N.¹, Roh H.-K.⁴, Akilli E.¹

¹Division of Clinical Pharmacology, Department of Laboratory Medicine, Karolinska University Hospital, Huddinge, Karolinska Institute, Kragujevac, Serbia

Introduction: Xanthine oxidase (XO) and N-acetyltransferase-2 (NAT2) are enzymes involved in the metabolism of many clinically important drugs. The aim of this study was to compare XO and NAT2 activities in Swedes and Koreans, controlling for the effect of sex and genotype, as well as to investigate the effect of sex, cigarette smoking and oral contraceptive use on enzyme activities.

Methods: Two hundred sixty three unrelated healthy volunteers (113 Swedes and 150 Koreans) participated in the study. XO and NAT2 activities were estimated *in vivo* by the $1U/(1U + 1X)$ and $AFMU/(AFMU + 1X + 1U)$ urinary ratios, respectively, after oral administration of 100 mg caffeine as a probe. All subjects were genotyped for 191G>A, 341T>C, 590G>A, and 857G>A NAT2 polymorphisms.

Results: The $1U/(1U + 1X)$ values ranged from 0.01 to 0.98 (median = 0.46) in Swedes and from 0.00 to 0.98 (median = 0.48) in Koreans. Approximately 6.4% of Swedes and 9.5% of Koreans were classified as poor metabolizers. In Swedes, higher XO activity was observed in women ($P = 0.003$). No significant effect of ethnicity on $1U/(1U + 1X)$ ratio was detected in the whole group ($P = 0.40$), as well as when controlling for the influence of sex ($P \geq 0.05$). The $AFMU/(AFMU + 1X + 1U)$ ratios ranged from 0.00 to 0.53 (median = 0.02) in Swedes and from 0.00 to 0.44 (median = 0.06) in Koreans. Rapid acetylator phenotype was observed in 25.9% of Koreans. Oral contraceptive use significantly increased NAT2 activity in Swedish women ($P = 0.007$). Significantly higher NAT2 activity is observed in Koreans compared to Swedes ($P < 0.0001$), and the difference remained significant when controlling for the influence of cigarette smoking, gender, oral contraceptive use ($P < 0.0001$) and genotype ($P = 0.016$).

Conclusion: Controlling for the effect of cigarette smoking, gender, oral contraceptive use and genotype, Koreans display higher NAT2 activity compared to Swedes. No effect of ethnicity on XO activity was detected. In Swedes, higher XO activity was observed in women, while oral contraceptive users displayed higher NAT2 activity.

O3

PROGRAMMED CELL DEATH AND THE CONSCIOUSNESS OF CELL POPULATIONS

Grigore A. D.

Department of Clinical Pharmacology, Toxicology and Psychopharmacology, Floreasca Clinical Emergency Hospital, Bucharest, Romania

For a very long time, we have been taught to take bacteria as unicellular beings, built from a small amount of pieces unified in a system with automatic reactions to the environmental stimuli. This simple organization deserves nothing more than the indulgence of our *Homo sapiens* sophisticated mind. Bacteria have been considered to be the bottom step of the evolution, separating biology from physics, life from non-living things. In the last two decades, the simplicity of bacteria has been questioned. In their natural environment, bacteria behave like truly multicellular organisms.

One detail which, at the beginning, had at least a weird significance, is the existence of bacterial programmed cell death. What advantages could there be for a unicellular organism to kill itself? None, of course, but if we take bacterial multicellularity for granted, everything makes sense. Theories suggest that programmed cell death within bacterial populations has an altruistic reason. Very recent studies confirm the robustness of altruistic behaviors in natural environment; i.e. altruistic suicide is very likely to appear and persist in a population that evolves by natural selection. Programmed death within bacterial populations has a masterful timing and perfect elegance. My point is that bacterial populations behave as if they had a unique, emergent, collective consciousness, a certain degree of self-awareness.

However, the natural-selective power of science is the master switch of creating and destroying scientific truth. Science has a stability that mustn't allow easily changing of the paradigms: therefore, my statement seems prone to collapse. Nevertheless, cognitive functions seem to be more wide-spread in nature than our snobbish anthropocentric glasses have allowed us to see. Evidence of the existence of pieces of consciousness have begun to accumulate in invertebrates, plants, amoebae, bacteria, and even beyond the realm of Life – that is, at the fundamental quantum level. By presenting these facts, I will try to show that the idea of a collective consciousness isn't as unusual as it might appear at first sight. Secondly, the same idea can be reached by taking a different path: a refined Israeli scientist has come to a similar collective consciousness conclusion by studying the organization of bacterial colonies.

group) algorithm of warfarin dose initiation. The significant genetic variants of CYP2C9 (CYP2C9*2, CYP2C9*3), VKORC1 (VKORC1*2) were detected with multiplex one-tube real time polymerase chain reaction. In the 1st group genotype was detected before starting of warfarin therapy, in the 2nd group – after the final follow-up visit. Clinical outcomes, direct and indirect costs (year 2010 values, calculated in Russian rubles and converted to Euros) of resources, resulting from warfarin use (INR/physician visits, medications, transportation, missed days of work) were recorded.

Results: A total of 61 patients (30 in the 1st and 31 in the 2nd group) with mean age 59.8 (+8.1) years, 34/61 (56%) males, were enrolled. 30/61 patients (49.2%) had no any genetic mutations. Patients in groups were similar in principal characteristics. INR stabilization was achieved in average in 28.7 + 20.4 days in the 1st and 26.3 + 25.5 days in the 2nd group ($P > 0.05$). During period of INR stabilization the number of patients with overanticoagulation was numerically higher in the 2nd group (14/31 (23%) vs. 11/30 (18%) in the 1st group although the differences was not statistically significant. Mean direct medical costs, Euro, were 37.35 + 16.4 in the 1st group vs. 38.1 + 21.3 in the 2nd group, direct transport costs – 4.4 + 5.4 vs. 5.6 + 8.8, indirect costs – 15.2 + 31.4 vs. 26.4 + 53.7 and total costs – 49.9 + 27.9 vs. 54.3 + 44.9 ($P > 0.05$) in the 1st and 2nd group, respectively. After 3 and 6 months the same tendency in resources utilization was kept.

Conclusions: In spite of the fact that significant genetic variants of CYP2C9 and VKORC1 were widespread in the study population, clinical and economical efficacy of the pharmacogenetic-based warfarin dosing was not approved.

O16

ACENOCOUMAROL DOSING ALGORITHM INCLUDING CLINICAL, DEMOGRAPHIC AND PHARMACOGENETIC DATA (CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 AND APOE) FOR USE IN PATIENTS WITH THE THROMBOEMBOLIC DISEASE

Borobia A. M.¹, Lubomirov R.¹, Ramírez E.¹, Lorenzo A.², Campos A.¹, Fernández-Capitán C.², Frias J.¹, Carcas A. J.¹

¹Clinical Pharmacology Service, La Paz University Hospital, School of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, Idipaz, Spain; ²Internal Medicine Service, La Paz University Hospital, Madrid, Spain

Introduction: We developed a pharmacogenetic dosing algorithm for acenocoumarol, including demographic, clinical and genetic factors (VKORC1, CYP2C9, CYP4F2 and ApoE) in a well-defined sample of patients with thromboembolic disease (VTD) and retrospectively validate.

Material and Methods: Patients with VTD were recruited. Blood samples were taken for genotyping. Demographics of sex, age, weight, height, smoker status, Mini-Mental test and patients' education as well as acenocoumarol stable dose, INR and concurrent medications were also recorded.

We randomly chose 80% of the patients as the 'derivation cohort' and the remaining 20% constituted the 'validation cohort'. A linear regression was used to perform the predictive model. A clinical model was also built and compared with the pharmacogenetic one using the mean absolute error (MAE) and adjusted R-squared (R²-adj).

Results: A total of 147 caucasian patients were included (derivation cohort = 117; validation cohort = 30). The final algorithm included age, BMI, enzyme inducers, amiodarone treatment, CYP2C9 *1/*3, CYP2C9 mut/mut, VKORC1 A/G, VKORC1 A/A, CYP4F2 MM and ApoE T/T genotypes. The clinical model included age, BMI and enzyme inducers and amiodarone co-treatment. The pharmacogenetic algorithm was significantly better than the clinical one, as evidence by the lower MAE (3.46 mg/week [95 CI: 2.8–4.13] vs. 5.08 [95 CI: 4.24–5.91]) and the higher R²-adj (57.0% vs. 19.2%), with a $P < 0.001$. In the validation cohort, the pharmacogenetic algorithm maintain a similar MAE (3.74 [95 CI: 2.52–4.95] vs. 5.79 [95 CI: 4.89–6.70] in the clinical model and a lower but acceptable R²-adj (33.8%).

Conclusion: The use of this pharmacogenetic algorithm could reduce side effects and improve patient safety. This algorithm should be validated by mean of a prospective study.

O17

DRUG BURDEN INDEX, PHYSICAL FUNCTION AND ADVERSE OUTCOMES IN OLDER HOSPITALISED PATIENTS

Lowry E.¹, Woodman R. J.², Soiza R. L.^{1,3}, Mangoni A. A.^{1,3}

¹Division of Applied Medicine, University of Aberdeen, Aberdeen, UK;

²Discipline of General Practice, School of Medicine, Flinders University, Adelaide, SA, Australia; ³Department of Medicine for the Elderly, Woodend Hospital, NHS Grampian, Aberdeen, UK

Background: Anticholinergic and sedative drug prescribing scoring systems might better predict specific untoward effects and enhance risk stratification. The recently introduced Drug Burden Index (DBI), a measure of the exposure to medications with anticholinergic and/or sedative effects, has been shown to be associated with poorer physical function in medically stable, community-dwelling, older patients. We speculated that a higher DBI is associated with reduced physical function (Barthel Index, primary outcome) and predicts adverse outcomes (length of stay, LOS, and in-hospital mortality, secondary outcomes) in a cohort of frail, acutely ill, older hospitalised patients.

Methods: Clinical and demographic characteristics, Barthel Index, DBI, and full medication exposure were recorded on admission in 362 consecutive patients (age 83.6 ± 6.6 years) admitted to two acute geriatric units (Aberdeen, NHS Grampian) between February 1, 2010 and June 30, 2010. Data on LOS and in-hospital mortality were obtained from electronic records.

Results: After adjusting for age, gender, dementia, institutionalisation, Charlson Co-morbidity Index, hospital site, and number of non-anticholinergic/sedative drugs, a unit increase in the DBI was associated with a 29% reduction in the odds of being in a higher Barthel Index quartile than a lower quartile (OR 0.71, 95% CI 0.55–0.91, $P = 0.007$). The Barthel Index components mostly affected were bathing ($P < 0.001$), grooming ($P < 0.001$), dressing ($P = 0.001$), bladder function ($P < 0.001$), transfers ($P = 0.001$), mobility ($P < 0.001$), and stairs ($P < 0.001$). A higher DBI independently predicted LOS (HR 1.23, 95% CI 1.06–1.42, $P = 0.005$) but not in-hospital mortality (HR 1.17, 95% CI 0.72–1.90, $P = 0.52$).

Conclusions: These results suggest that higher DBI scores on admission are independently associated with lower scores in various domains of the Barthel Index and predict LOS amongst older hospitalised patients. The DBI may be useful in the acute setting to improve risk stratification.

O18

POTENTIALLY INAPPROPRIATE MEDICATION, POLYPHARMACY AND DRUG-RELATED PROBLEMS IN A GERMAN ELDERLY COHORT

Thürmann P. A.^{1,2}, Holt S.^{1,2}, Szymanski J.^{1,2}, Klaassen-Mielke R.^{1,2}, Thiem U.^{1,2}

¹Philipp Klee-Institute for Clinical Pharmacology, HELIOS Clinic Wuppertal, University Witten/Herdecke, Wuppertal, Germany; ²Department of Medical Informatics, Biometry and Epidemiology, Ruhr-University Bochum, Bochum, Germany

Introduction: Elderly patients receive the highest share of all drugs in western countries. Several of these drugs are classified as potentially inappropriate medication (PIM) for elderly people due to their increased risk for causing adverse drug reactions (ADR). Based on the German PRISCUS-PIM-list (Holt et al. Dtsch Arztbl Int 2010; 107: 543–51), we aimed to analyze PIM utilisation in the getABI-cohort of elderly outpatients (Diehm et al. Circulation 2009; 120: 2053–61).

Patients and Methods: The getABI-study is a prospective observational cohort study. During the 7-year follow-up, we cross-sectionally collected demographic data, medical history, current medication and self-reported ADR from 1937 patients (78 ± 4 years, 53% females) in telephone interviews. Medication use was evaluated with regard to polypharmacy (≥5 drugs), frequency of PIM and their relationship to ADR. Data were analysed by univariate and multivariate logistic regression analysis via SAS (version 9.1).

ANEXO III: PREMIO LILLY

XXV

Congreso de la SEFC

27 - 29 septiembre 2012, Alicante



**Alberto M. Borobia, Rubin Lubomirov, Elena Ramírez,
Alicia Lorenzo, Armando Campos, Raúl Muñoz-Romo,
Carmen Fernández-Capitán, Jesus Frías, Antonio J. Carcas**

Ha sido galardonado con el premio Lilly a la mejor publicación de investigación en Farmacología Clínica por su trabajo

An Acenocoumarol Dosing Algorithm Using Clinical and Pharmacogenetic Data in Spanish Patients with Thromboembolic Disease

y para que así conste se le hace entrega de este certificado durante la celebración **XXV Congreso de la SEFC**, celebrado del 27 - 29 de septiembre de 2012, en la ciudad de Alicante.

Lilly

ANEXO IV: APLICACIÓN WEB AJUSTE FARMACOGENÉTICO



Farmacología Clínica

ACENOCUMAROL

ALGORITMO FARMACOGENÉTICO DE AJUSTE DE DOSIS

Acceso público

Acceso usuarios registrados

Bienvenidos a esta página web gratuita destinada a optimizar el ajuste de la dosis de acenocumarol mediante un algoritmo clínico-farmacogenético. Las recomendaciones de esta página se basan en un estudio realizado en una cohorte de pacientes con enfermedad tromboembólica venosa que incluye tanto factores clínicos (edad, sexo, IMC, tratamiento con inductores enzimáticos y amiodarona) como información de cuatro genes (CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 y APOE). Este algoritmo explica el 60,6% de la variabilidad en los requerimientos de dosis estable de acenocumarol (Borobia et al. PLoS One, 2012*). Esta herramienta pretende ser una ayuda para el ajuste de dosis de este fármaco, no sustituyendo en ningún caso las recomendaciones de un médico experto.

Información inicial

¿Qué operación desea realizar ?

Calcular dosis estimada de acenocumarol

Introducir dosis estable
(requiere identificador de paciente)

*Borobia AM, Lubomirov R, Ramirez E, Lorenzo A, Campos A, Muñoz-Romo R, Fernández-Capitán C, Frias J, Carcas AJ. Anacenocoumarol dosing algorithm using clinical and pharmacogenetic data in spanish patients with thromboembolic disease. PLoS One. 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0041360



Copyright © 2012 - Servicio de Farmacología Clínica. Hospital Universitario La Paz.

Powered by MARANÚ



Clinical Pharmacology

ACENOCOUMAROL

PHARMACOGENETIC DOSING ALGORITHM

Public access

Registered users

Welcome to this free website designed to optimize acenocoumarol treatment by mean of a clinical and pharmacogenetic algorithm. Recommendations of this web are based on data of a cohort of patients with thromboembolic disease, including clinical factors (age, sex, BMI, treatment with enzyme inducers and amiodarone) and information from four genes (CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 and APOE). This algorithm explains 60.6% of the variability in dose required to achieve a stable INR (Borobia et al. Plos One, 2012*). This web site is not intended to substitute for care by a expert healthcare professional.

Initial Information

Choose your operation:

Acenocoumarol stable dose estimation

Enter stable dose
(requires patient identifier)

*Borobia AM, Lubomirov R, Ramirez E, Lorenzo A, Campos A, Muñoz-Romo R, Fernández-Capitán C, Frias J, Carcas AJ. Anacenocoumarol dosing algorithm using clinical and pharmacogenetic data in spanish patients with thromboembolic disease. PLoS One. 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0041360



Copyright © 2012 - Servicio de Farmacología Clínica. Hospital Universitario La Paz.

Powered by MARANÚ

Farmacología Clínica

ACENOCUMAROL
ALGORITMO FARMACOGENÉTICO DE AJUSTE DE DOSIS

Acceso público

Acceso usuarios registrados

Información del paciente
Edad añosPeso KgsTalla (ej. 1.70) metrosSexo Hombre Raza Caucásico Fumador SI NONº cigarrillos al día INR Diana: Valor inferior Valor superior
Indicación

- Tromboembolismo pulmonar
- Trombosis venosa profunda
- Fibrilación auricular
- Válvula cardíaca

Enfermedad hepática

 SI NO

Tratamiento con estatinas

 SI NO

Tratamiento con azoles

 SI NO

Tratamiento con inductores

 SI NO

Tratamiento con amiodarona

 SI NO

Tratamiento con otros inhibidores

 SI NO
Genotipos
CYP2C9 *1/*1 VKORC1 *1/*1 CYP4F2 wt/wt ApoE wt/wt

Condiciones de uso: Estas recomendaciones de dosis se basan en un algoritmo de ajuste de dosis farmacogenético desarrollado en pacientes con enfermedad tromboembólica (Borbolla et al. PloS One, 2012) y que explica un 80,6% de la variabilidad en los requerimientos de dosis estandar de acenocumarol. Esta herramienta no sustituye las recomendaciones de un médico experto.



Comunidad de Madrid

Hospital Universitario
La Paz

Farmacología Clínica

Servicio Madrileño de Salud
Consejería de Sanidad



ACENOCUMAROL

ALGORITMO FARMACOGENÉTICO DE AJUSTE DE DOSIS

Acceso público

Dosis semanal estimada: 10.8

Si desea almacenar los valores, puede entrar en nuestra [zona registrada](#)
Gracias

Acceso usuarios registrados

Condiciones de uso: Estas recomendaciones de dosis se basan en un algoritmo de ajuste de dosis farmacogenético desarrollado en pacientes con enfermedad tromboembólica (Borobia et al. PloS One, 2012) y que explica un 60,6% de la variabilidad en los requerimientos de dosis estable de acenocumarol. Esta herramienta no sustituye las recomendaciones de un médico experto



Copyright © 2012 - Servicio de Farmacología Clínica. Hospital Universitario la Paz.

[Powered by MARANÚ](#)



Comunidad de Madrid

Hospital Universitario
La Paz

Farmacología Clínica

Servicio Madrileño de Salud
Consejería de Sanidad



ACENOCUMAROL

ALGORITMO FARMACOGENÉTICO DE AJUSTE DE DOSIS

Acceso público

Añadir paciente

Acceso usuarios registrados

#ID Paciente	Dosis ESTIMADA	Fecha dosis estimada	Dosis ESTABLE	Fecha dosis estable
17	5.9	06/11/2012	8	06/11/2012
4	16.2	26/09/2012	15	03/11/2012
3	10.3	26/09/2012	12	26/09/2012

SALIR (Alberto Borobia)

Condiciones de uso: Estas recomendaciones de dosis se basan en un algoritmo de ajuste de dosis farmacogenético desarrollado en pacientes con enfermedad tromboembólica (Borobia et al. PloS One, 2012) y que explica un 60,6% de la variabilidad en los requerimientos de dosis estable de acenocumarol. Esta herramienta no sustituye las recomendaciones de un médico experto



Copyright © 2012 - Servicio de Farmacología Clínica. Hospital Universitario la Paz.

[Powered by MARANÚ](#)

