

Programa de doctorado en Biociencias Moleculares

**LA FARMACOGENÉTICA COMO HERRAMIENTA DE LA MEDICINA
PERSONALIZADA: DESARROLLO DE ESTRATEGIAS PARA SU
IMPLEMENTACIÓN EN LA PRÁCTICA CLÍNICA E IDENTIFICACIÓN DE
NUEVAS ASOCIACIONES**

TESIS DOCTORAL

Irene Dapía García

Madrid, 2019

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

**LA FARMACOGENÉTICA COMO HERRAMIENTA DE LA MEDICINA
PERSONALIZADA: DESARROLLO DE ESTRATEGIAS PARA SU
IMPLEMENTACIÓN EN LA PRÁCTICA CLÍNICA E IDENTIFICACIÓN DE
NUEVAS ASOCIACIONES**

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

Irene Dapía García

Graduada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid

DIRECTORES DE LA TESIS:

Dr. Pablo Lapunzina Badía

Dr. Alberto M. Borobia Pérez

**Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM) y Servicio de Farmacología Clínica
Hospital Universitario La Paz**

Madrid, 2019

Dr. Pablo Lapunzina Badía, director científico del CIBERER y responsable del laboratorio de Farmacogenética del Instituto de Genética Médica y Molecular del Hospital Universitario La Paz (INGEMM)

CERTIFICA:

Que Doña Irene Dapía García, Graduada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado la presente Tesis Doctoral “LA FARMACOGENÉTICA COMO HERRAMIENTA DE LA MEDICINA PERSONALIZADA: DESARROLLO DE ESTRATEGIAS PARA SU IMPLEMENTACIÓN EN LA PRÁCTICA CLÍNICA E IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS ASOCIACIONES” y que a su juicio reúne plenamente todos los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor en Biociencias Moleculares, a cuyos efectos será presentada en la Universidad Autónoma de Madrid. El trabajo ha sido realizado bajo mi dirección autorizando su presentación ante el tribunal calificador.

Y para que conste, se extiende el presente certificado.

Madrid, 26 de Diciembre de 2018

Fdo: Director de Tesis

Dr. Pablo Lapunzina Badía

Dr. Alberto M. Borobia Pérez, responsable de la Unidad de Ensayos Clínicos (UCICEC) y de la Unidad de Farmacogenética Clínica del Hospital Universitario La Paz

CERTIFICA:

Que Doña Irene Dapía García, Graduada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado la presente Tesis Doctoral “LA FARMACOGENÉTICA COMO HERRAMIENTA DE LA MEDICINA PERSONALIZADA: DESARROLLO DE ESTRATEGIAS PARA SU IMPLEMENTACIÓN EN LA PRÁCTICA CLÍNICA E IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS ASOCIACIONES” y que a su juicio reúne plenamente todos los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor en Biociencias Moleculares, a cuyos efectos será presentada en la Universidad Autónoma de Madrid. El trabajo ha sido realizado bajo mi dirección autorizando su presentación ante el tribunal calificador.

Y para que conste, se extiende el presente certificado.

Madrid, 26 de Diciembre de 2018

Fdo: Director de Tesis

Dr. Alberto M. Borobia Pérez

A mis padres y a mi hermano Iñigo,

Agradecimientos

Tengo que admitir que enfrentarme a una página en blanco en los momentos finales de presentación de mi tesis doctoral para escribir este apartado ha resultado una tarea extremadamente complicada. Sin embargo, considero que dedicar un momento a pensar y dar las gracias a todas aquellas personas que, de un modo u otro, han contribuido a la realización y presentación de este trabajo es un ejercicio y una conclusión casi tan importante como las enumeradas al final de esta tesis. Con este ejercicio me he dado cuenta de que el desarrollo de mi tesis doctoral ha representado, además de un paso importante en mi carrera profesional, un período de gran evolución personal a lo largo del cual me han acompañado y guiado numerosas personas. Amigos, familiares y compañeros incondicionales gracias a los cuales hoy puedo presentar este trabajo.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis directores, el doctor Pablo Lapunzina y el doctor Alberto Borobia por su amplia experiencia y su trabajo previo, sin los cuales no habría sido posible el desarrollo de esta tesis doctoral. Muchas gracias por todos vuestros consejos e ideas que han guiado la elaboración de este trabajo. También me gustaría agradecer al doctor Antonio Carcas porque sus aportaciones y correcciones han resultado fundamentales para la realización de este trabajo.

El INGEMM ha sido mi segunda casa desde mi llegada en el año 2013. Por ello, en este ejercicio de reflexión, me doy cuenta de que todas las personas que trabajan o han trabajado en el INGEMM durante mi estancia han jugado un importante papel en mi crecimiento a nivel científico y/o personal. Debo hacer sin embargo una mención especial a aquellas personas que se han volcado más (o me han sufrido más, según se mire) a lo largo de todos estos años, porque al igual que en las familias, son precisamente las personas a las que menos se lo he agradecido en el día a día. A los ya doctores Gema Gordo y Jair Tenorio por vuestras primeras enseñanzas, vuestra paciencia en mis malos días y por estar siempre disponibles para ayudarme en cualquier problema, científico y personal. A la Dr. Eva Barroso, por sus consejos e historias de “madre del laboratorio”, y por explicarme siempre con una sonrisa de oreja a oreja (y con acento canario) cualquier duda, hasta esas que te da vergüenza preguntar. A mi compañero de laboratorio, la persona con la que más horas he pasado en los últimos años, Pedro Arias, por escuchar siempre todas las ideas locas que se me pasan por la cabeza, por sus sabios consejos y ayuda en prácticamente cualquier problema que se me ha planteado en este tiempo y sobre todo por atreverte a hacerme un hueco en tu “zulo”. A Rubén de Sancho, Rubén Martín, Héctor González-Pecellín y Carolina de la Torre por vuestras visitas y por animarme siempre a primera hora de la mañana (incluso los lunes). A mis compañeros del laboratorio del fondo, la casi casi doctora Lucía Trilla y los doctores Ángelo Gámez y Juan Ángel Fresno por acogerme siempre en su laboratorio. Gracias también a nuestros vecinos de laboratorio de Endocrinología Molecular, a las secretarías, a las compañeras de preanalítica, al supervisor y a los compañeros de bioinformática, del GEF y el resto de compañeros del INGEMM. Gracias también a los residentes de farmacología clínica (en especial a Mario e Irene) y a José Carlos Martínez por ayudarme con los análisis estadísticos.

A mi familia. En especial a mis padres, por animarme siempre a centrarme en las cosas importantes de la vida. Vuestros consejos son siempre los más valiosos, aunque a veces me lleve tiempo darme cuenta. Gracias a mi hermano Iñigo por traer a casi cualquier momento de la vida una sonrisa. Sin vuestro apoyo nunca habría conseguido finalizar este proyecto. Gracias también a esos amigos que son casi familia, ellos saben quiénes son, por escucharme y apoyarme siempre y por ayudarme a desconectar siempre que lo necesito.

Gracias a Darifé por regalarme un poco de su arte para la portada de esta tesis.

Por último, gracias a los participantes, pacientes y voluntarios sanos, sin cuya colaboración no habría sido posible la realización de este trabajo.

Resumen

La Farmacogenética (PGx) representa en la actualidad una de las herramientas más importantes del paradigma de la medicina personalizada permitiendo evitar Reacciones Adversas a Medicamentos (RAM) así como maximizar la eficacia de los tratamientos farmacológicos y, en definitiva, optimizar el proceso de selección de la mejor pauta terapéutica para cada paciente.

El primer objetivo de esta tesis doctoral, fue el desarrollo de una estrategia para la implementación de la PGx en la rutina clínica de un hospital de primer nivel asistencial adscrito al Sistema Nacional de Salud (SNS). Esta estrategia está basada en una plataforma de *microarray* de SNPs que permite el genotipado simultáneo de 180 polimorfismos de respuesta a fármacos. A lo largo de este período (2013-2018) se han realizado un total de 3532 estudios PGx para distintos fármacos y en pacientes de distintas patologías dentro de la rutina clínica del hospital.

Por otro lado, se evaluó la utilidad de un protocolo multidisciplinar para la implementación del genotipado anticipado de *CYP2C19* en una cohorte de pacientes hematológicos previo al trasplante de progenitores hematopoyéticos, definida como población de riesgo para el tratamiento o profilaxis con Voriconazol. Esta estrategia permitió aumentar notablemente el porcentaje de pacientes que alcanzaban el rango terapéutico diana así como reducir el tiempo necesario para alcanzarlo, mejorando de este modo el éxito del tratamiento.

El último objetivo de este trabajo fue la identificación de nuevas asociaciones PGx que permitiesen mejorar los algoritmos monogénicos existentes para la optimización del tratamiento con Tacrolimus y Voriconazol, mediante la incorporación de nuevos biomarcadores asociados a la variabilidad en su farmacocinética. A lo largo de esta tesis doctoral se proponen nuevos biomarcadores no incluidos hasta la fecha en los algoritmos clínicos que podrían resultar de interés para la individualización del tratamiento con estos fármacos.

En definitiva, en este trabajo se ha desarrollado una estrategia que ha permitido la implementación de la PGx en la práctica clínica de nuestro centro. Además, se ha demostrado la utilidad en la práctica clínica de un protocolo de genotipado anticipado en una cohorte de pacientes hematológicos previo al trasplante de progenitores hematopoyéticos definida como población de riesgo para el tratamiento o profilaxis con Voriconazol. Finalmente, se proponen modelos poligénicos de predicción del perfil farmacocinético de dos fármacos de uso clínico frecuente, Voriconazol y Tacrolimus, que parecen mejorar los algoritmos clínicos monogénicos desarrollados hasta la fecha.

Summary

Pharmacogenetics (PGx) constitutes an essential tool for personalized medicine. It minimizes Adverse Drug Reactions (RAM) and maximizes treatment efficacy; and ultimately optimizes treatment selection for each patient.

The first goal of this doctoral thesis was the development of a strategy for the implementation of PGx in the clinical routine of a third-level care hospital of the Spanish National Health Service. This strategy was based on a SNP-array platform allowing simultaneous genotyping of 180 SNPs related to drug response. During this period (2013-2018) we have performed 3532 PGx tests for different drugs and diseases in the clinical routine of our center.

We have also evaluated the utility of a multidisciplinary protocol for the implementation of preemptive genotyping of *CYP2C19* in a cohort of haematological patients, defined as risk population for treatment or prophylaxis with Voriconazole. This strategy resulted in a significant increase in the percentage of patients achieving Voriconazole goal therapeutic range and reduced the time window required to achieve it, and therefore improved treatment success.

The last aim of this work was the identification of new PGx associations that improved the existing monogenic algorithms for Tacrolimus and Voriconazole treatment optimization, by the incorporation of new biomarkers related to their PGx interindividual variability. During this doctoral thesis we propose new biomarkers, not previously included in clinical prediction algorithms that may be of interest for treatment individualization with these drugs in the clinical practice.

In summary, we have developed a strategy that allowed the implementation of PGx in the clinical routine of our center. In addition, we have demonstrated the clinical utility of a preemptive genotyping protocol in a cohort of haematological patients before allogenic hematopoietic cell transplantation defined as a risk population for treatment or prophylaxis with Voriconazole. Finally, we here propose two polygenic predictive models of the pharmacokinetic profile of Tacrolimus and Voriconazole that seem to improve the existing monogenic predictive algorithms.

Índice

Resumen	13
Summary	15
Abreviaturas	21
1. Introducción	25
1.1. La farmacogenética como herramienta de la Medicina Personalizada	27
1.2. Implementación de la farmacogenética en la práctica clínica	30
1.2.1. Barreras para la implementación de la farmacogenética en la práctica clínica ...	32
1.2.2. Estrategias para la implementación de la farmacogenética en la práctica clínica: Programas de implementación en Europa y EEUU	33
1.3. Empleo de algoritmos de dosificación como estrategia de individualización terapéutica en el paciente trasplantado.....	35
1.3.1. Modelos predictivos del perfil farmacocinético de Voriconazol basados en la farmacogenética.	36
1.3.2. Modelos predictivos del perfil farmacocinético de Tacrolimus basados en la farmacogenética	41
2. Objetivos	45
3. Material y métodos.....	49
3.1. Bloque I. Estrategias para la implementación de la farmacogenética en la práctica clínica asistencial del HULP: Unidad de Farmacogenética Clínica del HULP	51
3.1.1. Barreras identificadas para la implementación.....	51
3.1.2. Desarrollo de un método de genotipado coste y tiempo eficiente: PharmArray® y CliniPharmArray®	51
3.1.3. Otros métodos de genotipado.....	57
3.1.4. Estructura y funcionamiento de la Unidad de Farmacogenética Clínica del HULP.	57
3.1.5. Evaluación del índice de satisfacción (IS) de los pacientes y especialistas de la estrategia de implementación de la farmacogenética en la práctica clínica asistencial desarrollada en el HULP.	62
3.1.6. Estimación de los costes asociados con la estrategia de implementación.....	62
3.2. Bloque II. Implementación en la rutina clínica de una estrategia para la individualización del tratamiento con Voriconazol basada en el genotipado anticipado de <i>CYP2C19</i> y monitorización de niveles plasmáticos.....	63
3.2.1. Desarrollo de una estrategia para la individualización terapéutica de Voriconazol en el HULP.	63
3.2.2. Pacientes incluidos y desarrollo del estudio.....	63
3.2.3. Estudio Farmacogenético.	64

3.2.4. Modificación de la dosis de inicio estándar de Voriconazol en base a los resultados PGx.....	64
3.2.5. Estudio Farmacocinético.....	65
3.3. Bloque III. Identificación de nuevas asociaciones farmacogenéticas que permitan mejorar los algoritmos clínicos monogénicos existentes.....	68
3.3.1. Modelos predictivos de la farmacocinética de Voriconazol basados en farmacogenética: Estudio observacional anidado a 3 ensayos de bioequivalencia de dos formulaciones de Voriconazol 200 mg en población española.....	68
3.3.2. Influencia de <i>ABCBI</i> y <i>POR</i> en la FC de Tacrolimus oral en pacientes pediátricos estables post-trasplante renal.....	72
4. Resultados.....	75
4.1. Bloque I. Estrategias para la implementación de la farmacogenética en la práctica clínica asistencial: Unidad de PGx Clínica del HULP.....	77
4.1.1. Actividad de la Unidad de Farmacogenética del HULP de 2014 a 2018.....	77
4.1.2. Evaluación del índice de satisfacción (IS) de los pacientes y especialistas de la estrategia de implementación de la farmacogenética en la práctica clínica asistencial desarrollada en el HULP.....	78
4.1.3. Estimación de los costes asociados con la actividad de la Unidad de Farmacogenética del HULP.....	78
4.2. Bloque II: Implementación en la rutina clínica de una estrategia para la individualización del tratamiento con Voriconazol basada en el genotipado anticipado de <i>CYP2C19</i> y monitorización de niveles plasmáticos.....	81
4.2.1. Características de la cohorte de estudio.....	81
4.2.2. Evaluación farmacocinética de una estrategia para individualización del tratamiento con VCZ basada en PGx y TDM.....	81
4.3. Bloque III: Identificación de nuevas asociaciones farmacogenéticas que permitan mejorar los algoritmos clínicos monogénicos existentes específicos de fármaco y patología.....	87
4.3.1. Modelos predictivos de la Farmacocinética de Voriconazol basados en farmacogenética: Estudio exploratorio anidado a tres estudios de bioequivalencia de dos formulaciones de Voriconazol 200mg en población española.....	87
4.3.2. Influencia de <i>ABCBI</i> y <i>POR</i> en la farmacocinética de Tacrolimus oral en pacientes pediátricos estables post-trasplante renal.....	92
5. Discusión.....	101
5.1. Bloque I. Estrategias para la implementación de la farmacogenética en la práctica clínica asistencial: Unidad de PGx Clínica del HULP.....	103
5.2. Bloque II. Implementación en la rutina clínica de una estrategia para la individualización del tratamiento con Voriconazol basada en el genotipado anticipado de <i>CYP2C19</i> y monitorización de niveles plasmáticos.....	107
5.3. Bloque III. Identificación de nuevas asociaciones farmacogenéticas que permitan mejorar los algoritmos clínicos monogénicos existentes específicos de fármaco y patología.....	111

5.3.1. Modelos predictivos de la farmacocinética de Voriconazol basados en farmacogenética: Estudio exploratorio anidado a estudios de bioequivalencia de dos formulaciones de Voriconazol 200mg en población española.	111
5.3.2. Influencia de <i>ABCB1</i> y <i>POR</i> en la farmacocinética de Tacrolimus oral en pacientes pediátricos estables post-trasplante renal	113
6. Conclusiones	117
7. Bibliografía	121
ANEXO I. Aprobaciones del Comité Ético de Investigación con medicamentos (CEIm) del Hospital Universitario La Paz	133
ANEXO II. Influencia de <i>ABCB1</i> y <i>POR</i> en la FC de Tacrolimus oral en pacientes pediátricos estables post-trasplante renal: Resultados de la cohorte con Prograf.....	139
ANEXO III. Publicaciones científicas.	145
Publicación 1: “Clinical Implementation of Pharmacogenetic Testing in a Hospital of the Spanish National Health System: Strategy and Experience Over 3 years”.....	147
Publicación 2: “Evaluation of Multifactorial Pharmacogenetics Predictive Models for Voriconazole Pharmacokinetics: An Exploratory Study Nested to three Bioequivalence Trials of Two Voriconazole Formulations of 200 mg in Spanish population”. En revisión en Clinical Pharmacology and Therapeutics.	147
Publicación 3: “Weight of <i>ABCB1</i> and <i>POR</i> genes on oral tacrolimus exposure in <i>CYP3A5</i> nonexpressor pediatric patients with stable kidney transplant”.	147
Publicación 4: “Effect of the <i>CYP3A5</i> , <i>CYP3A4</i> , <i>CYP3A7</i> , <i>ABCB1</i> , <i>POR</i> and <i>NR1I2</i> genes in the pharmacokineticsof tacrolimus in a pediatric cohort with stable serum concentrations after renal transplantation: study protocol”	147

Abreviaturas

ADME Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción

ASC Área de Superficie Corporal

AUC *Area Under the Curve* o Área Bajo la Curva

BM Biomarcadores

CNV *Copy Number Variant* o Variaciones del Número de Copias

CPIC *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*

CYP450 Citocromo P450

C_{max} Concentración máxima detectada

C_{min} Concentración mínima detectada

DE Desviación Estándar

DL Desequilibrio de ligamiento

EII Enfermedad Inflamatoria Intestinal

EMA *European Medicines Agency*

FC Farmacocinética

FD Farmacodinámica

FDA *Food and Drug Administration Agency*

FMO Monooxigenasas dependientes de flavina

HapFreq *Haplotype Frequency* o Frecuencia del haplotipo

HCE Historia Clínica Electrónica

HTA Health Technology Assesment

IFI Infección Fúngica Invasiva

IM Metabolizador Intermedio

IMC Índice de Masa Corporal

IS Índice de Satisfacción

MAE *Mean Absolute Error* o Error Medio Absoluto

MAF *Minor Allele Frequency*

NAT N-acetiltransferasas

NGS *Next Generation Sequencing*

NM Metabolizador Normal

NR1I2 *Nuclear Receptor Subfamily 1 Group I Member 2*

OMS Organización Mundial de la Salud

P-gp Glicoproteína-P

PGRN *NIH Pharmacogenomics Research Network*

PGx Farmacogenética

PM Metabolizador Pobre

PMP *Health Personalized Medicine Program*

POR *CYP450 Oxidoreductase*

PREPARE *Preemptive Pharmacogenomic Testing for Prevention of Adverse Drug Reactions*

PXR *Pragnane X Receptor*

RAM Reacciones Adversas a Medicamentos

RM Metabolizador Rápido

RMSEP Raíz Media del Error Estándar de Predicción

RT-PCR *Real Time PCR* o PCR en Tiempo Real

SJS *Stevens-Johnson Syndrome* o Síndrome de Steven Johnson

SNP *Single Nucleotide Polymorphism* o Polimorfismos de Nucleótido Simple

SNS Sistema Nacional de Salud

TAC Tacrolimus

TEN *Toxic Epidermal Necrolysis* o Necrólisis Epidérmica Tóxica

TDM *Therapeutic Drug Monitoring* o Monitorización de Niveles Plasmáticos

TPH Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos

TPMT Tiopurinas-S-metiltransferasas

TPP *Translational Pharmacogenetics Program*

UGTs UDP glucosiltransferasas

UM Metabolizador Ultrarápido

U-PGx *Ubiquitous Pharmacogenetics Consortium*

VCZ Voriconazol

1. Introducción

1.1. La farmacogenética como herramienta de la Medicina Personalizada

La gran variabilidad interindividual en la respuesta a fármacos ha sido una de las grandes preocupaciones de los profesionales sanitarios en los últimos años. Las Reacciones Adversas a Medicamentos (RAM) representan en la actualidad una causa importante de morbimortalidad. Se estima que alrededor del 3-5% de los ingresos hospitalarios en Europa están causados por RAM y que entre un 5-10% de los pacientes hospitalizados experimentarán al menos una RAM durante su ingreso hospitalario (1, 2). Además, se calcula que las RAM son causantes de 197.000 muertes anuales en Europa (1, 2). Se estima que hasta un 70% de las RAM serían evitables mediante la optimización de la pauta terapéutica seleccionada (3, 4). Por otro lado, un elevado porcentaje de los pacientes que siguen un tratamiento farmacológico sufrirá fracaso terapéutico debido a errores en la selección del tratamiento más adecuado o en el ajuste de dosis. Esto tendrá como consecuencia aumentos del período de hospitalización y de duración de la enfermedad (3). Además del enorme impacto social, la elevada frecuencia de estos eventos implicó, según un estudio realizado en el año 2008, un gasto sanitario de alrededor de 79.000 millones de euros en toda Europa (4).

La enorme heterogeneidad en la respuesta a fármacos se debe a diversos factores: fisiológicos (p.e. edad), ambientales (p.e. medicaciones concomitantes), patológicos (p.e. enfermedad hepática) y genéticos. Se estima que entre el 20-30% de esta variabilidad fenotípica se debe a factores genéticos, llegando en algunos casos a explicar más del 90% de la misma (5). El término Farmacogenética (PGx), surgió en el año 1959 y es la disciplina que estudia cómo afecta el genotipo individual a los distintos fenotipos de respuesta a fármacos (6-9). En la actualidad la PGx representa una de las herramientas más importantes del paradigma de la medicina personalizada ya que permite evitar RAM así como maximizar la eficacia de los tratamientos farmacológicos y, en definitiva, optimizar el proceso de selección de la mejor pauta terapéutica para cada paciente (8).

Podemos dividir la PGx en dos ramas de estudio principalmente. La rama tradicional consiste en la identificación y evaluación de efecto de la variabilidad genética en la Farmacocinética (FC) de los fármacos, es decir en los procesos de Absorción, Distribución, Metabolismo y Eliminación (ADME). Por otro lado, la variabilidad genética también puede tener un efecto en la Farmacodinámica (FD), mediante la modificación de las dianas o alteración de las rutas biológicas implicadas en el mecanismo de acción de los fármacos, dando lugar por tanto a diferencias interindividuales en la sensibilidad de los pacientes al tratamiento farmacológico (7). En los últimos años, la mayoría de estudios en PGx se han centrado en la identificación de polimorfismos genéticos en genes que codifican las enzimas implicadas en la FC, demostrando su importante papel en la respuesta al tratamiento farmacológico así como en la determinación del riesgo de RAM(10).

En el hepatocito tienen lugar dos tipos de reacciones metabólicas, Fase I y Fase II, catalizadas por dos sistemas enzimáticos distintos e implicadas en la conversión de los fármacos y sus metabolitos en sustancias hidrofílicas, que serán más eficazmente eliminadas (11). En las reacciones de Fase I el compuesto es biotransformado generalmente mediante la adición de uno o más grupos polares por el complejo del citocromo P450 (CYP450). Se conocen 57 genes en humanos que codifican proteínas CYP entre las que destacan tres familias: CYP1, CYP2 y CYP3 encargadas de las reacciones metabólicas de fase I de la mayoría de fármacos de uso clínico frecuente (12) (Figura 1). Aunque menos frecuentes, existe un pequeño porcentaje de reacciones metabólicas oxidativas que tienen lugar independientemente de enzimas CYP y en las que intervienen otras enzimas, como por ejemplo la familia de las monooxigenasas dependientes de flavina (FMO) (13).

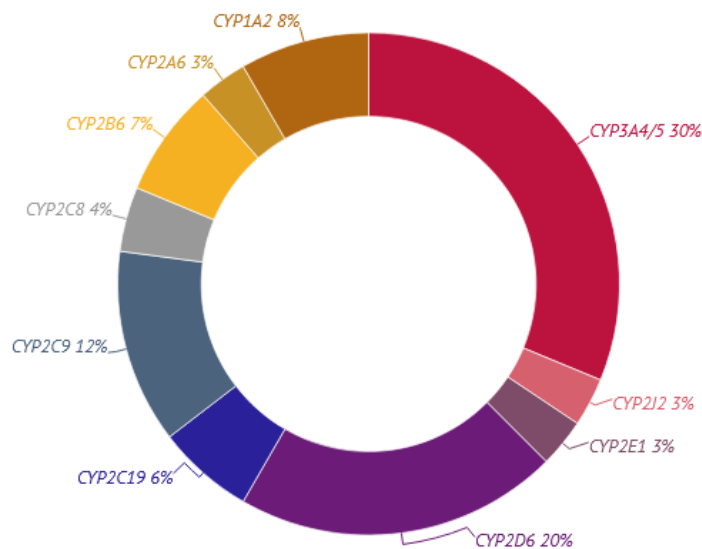


Figura 1. Isoformas de CYP450 más relevantes en el metabolismo de fármacos de uso clínico frecuente. En la figura se muestra la contribución en forma de porcentaje, de cada una de las isoformas de CYP450 en el metabolismo de los fármacos de uso clínico más frecuente (12). Para las isoformas CYP3A4 y CYP3A5 se añadió el porcentaje acumulado. Estas isoformas junto con el CYP2D6 representan el 50% de la contribución total.

Las enzimas metabólicas de Fase II conjugan los metabolitos originados en las reacciones de Fase I, otros intermediarios o incluso el compuesto original para su excreción. Las principales enzimas de Fase II son las tiopurinas-S-metiltransferasas (TPMT), UDP glucosiltransferasas (UGT) y N-acetiltransferasas (NAT) responsables del metabolismo secundario de muchos fármacos de uso clínico frecuente como las tioguaninas, la Isoniazida o los agentes quimioterápicos.

Además de las enzimas metabólicas, existen otras proteínas transportadoras, proteínas reductasas del citocromo y receptores nucleares que participan en los procesos de ADME. La funcionalidad de estas proteínas, en combinación con las enzimas metabolizadoras de Fase I y Fase II, jugará un papel importante en la determinación del perfil FC de muchos fármacos (14).

Existe una gran variabilidad genética asociada a los genes que codifican estas entidades (Figura 2) y que implica, en muchos casos variaciones en la funcionalidad de las proteínas codificadas. En este contexto, la presencia de polimorfismos en los genes involucrados en la ADME jugará un papel fundamental en la FC del fármaco que se reflejará en la heterogeneidad fenotípica de respuesta al tratamiento (15). La enorme importancia de estos genes se ve reflejada en que la gran mayoría de los biomarcadores (BM) aprobados por la *European Medicines Agency* (EMA) y la *Food and Drug Administration Agency* (FDA) codifican proteínas involucradas en la FC (16, 17).

Algunos estudios poblacionales describen que las tasas de variabilidad genética en genes implicados en la ADME de fármacos son superiores a las observadas en otros genes-no ADME, lo que supone mayores diferencias interindividuales e interpoblacionales (15, 18). El tipo de variabilidad observada en estos genes es diversa encontrando variantes sinónimas, no sinónimas, variantes sin sentido, polimorfismos de nucleótido simple o *single nucleotide polymorphisms* (SNPs), pequeñas inserciones o deleciones (*indels*) así como grandes reordenamientos genómicos o *Copy Number Variants* (CNVs) (18).

Con el objetivo de simplificar el abordaje de esta enorme variabilidad genética la estrategia seguida en los últimos años en el área de la PGx ha consistido en la organización de estas variantes en bloques de haplotipos, grupos de variantes en genes que se han heredado de forma conjunta del mismo progenitor. Para la definición de estos bloques de haplotipos se integrarán datos de desequilibrio de ligamiento (DL) entre variantes en la población de estudio, definiéndose el DL como la asociación no aleatoria entre alelos en distintos loci en una población determinada. Posteriormente, estos haplotipos son codificados empleando una nomenclatura estandarizada, la *Star (*) Allele Nomenclature*. Esta estrategia permite que la correlación genotipo-fenotipo sea más abordable, facilitando su aplicación en la práctica clínica. En la actualidad, existen varios consorcios y bases de datos que se encargan de organizar y actualizar esta información (19-22). La Figura 2 muestra el número de haplotipos consenso descritos hasta la fecha en los genes más relevantes del CYP450 así como en los genes que codifican las enzimas de metabolismo de Fase II más relevantes.

Con todo ello, el estudio de la variabilidad genética heredable en los genes que participan en la FC de fármacos de uso clínico frecuente brinda la oportunidad de predecir la respuesta a determinados tratamientos, evitar morbimortalidades asociadas al uso frecuente de estos fármacos y, con todo ello, optimizar la estrategia terapéutica de cada individuo. Gracias a los avances en los últimos años en el desarrollo de técnicas moleculares de alto rendimiento el número de biomarcadores PGx descritos crece exponencialmente. Sin embargo, la validación e integración de estos en la práctica clínica es un proceso complejo para el que es fundamental su

correlación con los fenotipos de respuesta a fármacos así como la comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes (23).

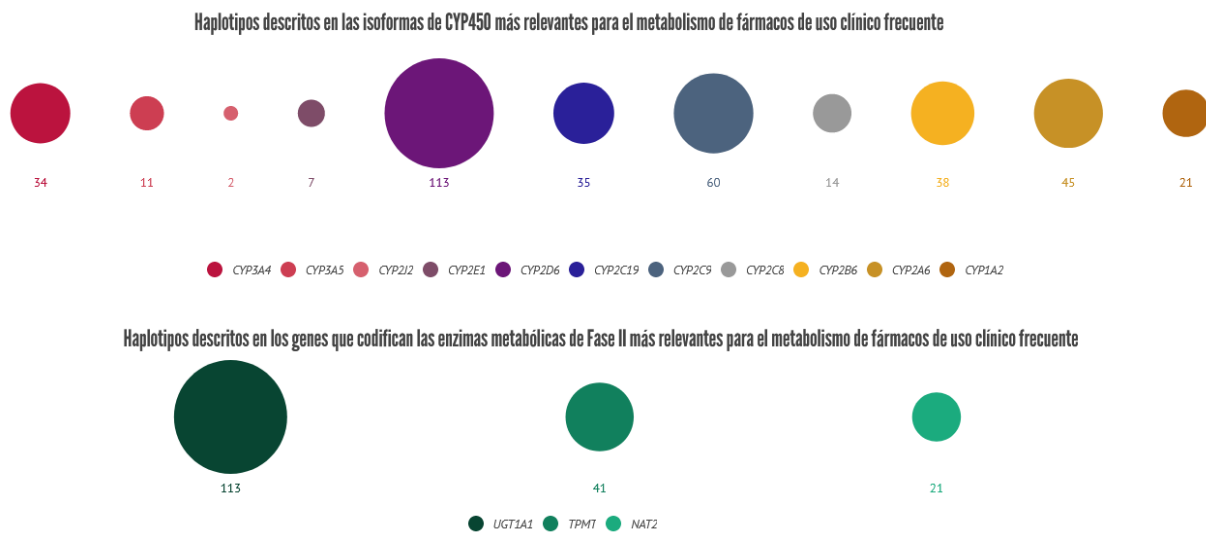


Figura 2. Número de haplotipos descritos en los genes que codifican las isoformas de CYP450 y las enzimas metabólicas de Fase II más relevantes para el metabolismo de fármacos de uso clínico frecuente. Fuente: Pharmacogenetic Variation (PharmVar) Database(19), TPMT Nomenclature Committee Linköping University (Li.U)(20), UGT Alleles Nomenclature Home Page(21), PharmGKB(22) (Julio 2018).

1.2. Implementación de la farmacogenética en la práctica clínica

En los últimos años tanto la FDA como la EMA han incorporado información sobre biomarcadores PGx en sus etiquetas, haciéndola más accesible para pacientes y profesionales de la salud (16, 17). En la actualidad, alrededor del 12% y del 10% de los principios activos aprobados por la EMA y la FDA respectivamente contienen recomendaciones asociadas a PGx con distintos grados de evidencia (Figura 3).

Según la Evaluación de Tecnologías Sanitarias (*Health Technology Assessment*; HTA) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) un biomarcador es útil en la práctica clínica cuando proporciona suficiente información predictiva de confianza para recomendar un tratamiento alternativo siguiendo una estrategia coste-eficiente (24). De este modo, a pesar de la creciente evidencia de la utilidad de los biomarcadores PGx en la personalización de los tratamientos farmacológicos, la integración de estas recomendaciones mediante la realización de estudios PGx rutinarios en la práctica clínica habitual está resultando un proceso lento y complejo, con una gran desigualdad entre instituciones y países (6, 16, 25, 26).

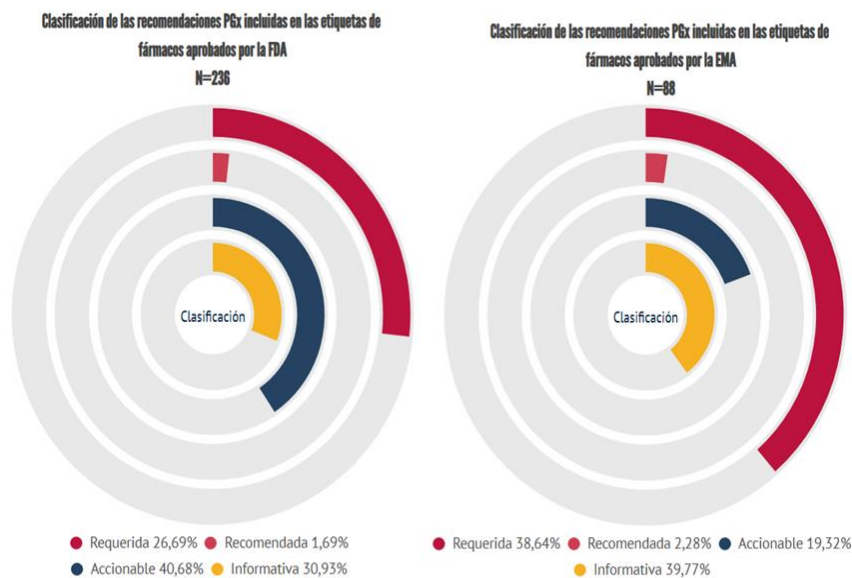
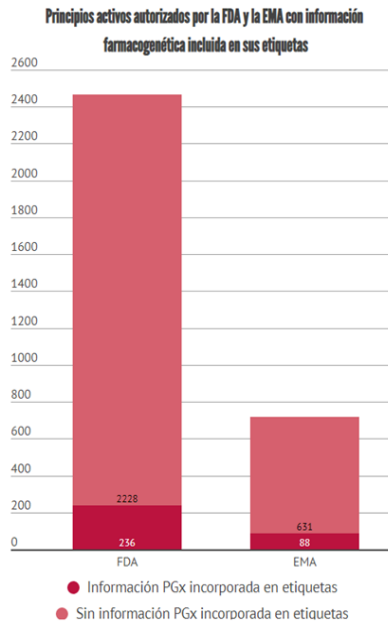


Figura 3. Fármacos aprobados por la EMA y la FDA con información farmacogenética (PGx) incluida en sus etiquetas. Clasificación de las recomendaciones PGx: (a) Requeridas, cuando en la etiqueta se indica que la realización del estudio PGx previa a la administración del fármaco es necesaria; (b) Recomendadas, cuando la realización del estudio está recomendada en las etiquetas; (c) Accionables, cuando la etiqueta incluye información sobre cambios en la eficacia o toxicidad asociados a PGx pero no incluye recomendaciones para la realización del estudio genético previo a la administración del fármaco; y (d) Informativas, cuando la etiqueta menciona que una proteína está implicada en la FC o FD del fármaco, pero no existen asociaciones PGx descritas. Fuente: EMA, FDA, PharmGKB(22) (Julio 2018).

1.2.1. Barreras para la implementación de la farmacogenética en la práctica clínica

A pesar de que en la actualidad la desigualdad en el proceso de implementación entre instituciones y países es notable debido a diferencias en la estructura y planificación de los sistemas sanitarios, encontramos que las barreras percibidas para la implementación de la PGx en la práctica clínica asistencial resultan muy homogéneas. Haciendo una recopilación de las limitaciones percibidas en EEUU, Europa, y más concretamente en España podríamos obtener una clasificación en 4 grandes grupos de barreras: **(a)** Aquellas relacionadas con falta de apoyo a *nivel institucional*, **(b)** limitaciones para la integración a *nivel del sistema sanitario*, **(c)** limitaciones a *nivel de la investigación científica preclínica* y **(d)** limitaciones a *nivel económico* (24, 27, 28).

En primer lugar tenemos aquellas barreras relacionadas con la falta de apoyo a *nivel institucional*. El primer problema que sale a la luz es la falta de políticas y legislación unificada al respecto que permitan armonizar los protocolos de tratamiento basados en biomarcadores PGx y promover la investigación y ensayos preclínicos dentro de este ámbito. Por otro lado, la falta de infraestructura para el manejo de datos genómicos representa en la actualidad un grave problema. La integración de la información PGx en la historia clínica electrónica (HCE) de modo que esté rápidamente disponible y sea fácilmente accesible desde cualquier centro hospitalario parece un paso fundamental para su aplicación en la práctica clínica. Finalmente, la mayoría de estudios remarcan la necesidad de estandarizar la información disponible y los sistemas de implementación mediante la elaboración de guías clínicas que permitan la unificación de las recomendaciones de ajuste de dosis y selección de tratamiento. Desde su creación en el año 2009, el *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* (CPIC), ha trabajado para superar este problema mediante la elaboración de estos materiales de referencia que han permitido facilitar la interpretación de los resultados PGx y su integración en el diseño de las pautas terapéuticas. En la actualidad existen 35 Guías Clínicas CPIC para fármacos con una elevada variabilidad interindividual de fenotipos de respuesta (29).

A continuación encontramos un segundo grupo de barreras para la integración a *nivel de los sistemas sanitarios* principalmente debido a cierto escepticismo por parte de los especialistas de la salud. Esto es debido generalmente a una falta de concienciación sobre los beneficios añadidos de la implementación de este tipo de estrategias en la práctica clínica. Por otro lado, este escepticismo se traslada también al paciente haciendo aún más complejo la realización de este tipo de estudios de forma rutinaria. La creación de más equipos multidisciplinares para facilitar la puesta en común de las evidencias PGx así como de las necesidades específicas de la práctica clínica resulta una buena estrategia para superar estas barreras. Además, la promoción de campañas educativas, así como talleres y sesiones clínicas parece fundamental para facilitar la interpretación de estas pruebas y comprender sus beneficios, tanto por parte los

profesionales sanitarios como a nivel del paciente. Por otro lado, la integración de la información genética en el proceso de selección de tratamiento requiere que los resultados moleculares estén disponibles en el momento de la prescripción. De este modo resulta fundamental que las técnicas empleadas para los estudios permitan ajustarse a los cortos tiempos de respuesta característicos de la práctica clínica asistencial.

El tercer grupo de barreras incluye aquellas limitaciones a *nivel de la investigación científica preclínica* debido a que muchas de las evidencias descritas no son suficientemente consistentes para su integración en la práctica clínica, debido al pequeño tamaño muestral de los estudios, la falta de estudios funcionales, etc. En este contexto la creación de equipos multidisciplinares para mejorar los procesos de recogida de datos y de colaboraciones interhospitalarias para aumentar el tamaño muestral de los ensayos y aumentar el nivel de las evidencias PGx parecen fundamentales para su correcta implementación en la rutina clínica.

Finalmente, encontramos un cuarto grupo de barreras a *nivel económico*, principalmente debido a la falta de estudios de coste-eficiencia que puedan respaldar la integración de una estrategia de selección de tratamiento integrando información PGx. Este grupo de limitaciones es quizás el que presenta más variabilidad entre países debido a diferencias en los sistemas sanitarios. Sin embargo, a medida que el coste de las pruebas genéticas disminuye, el estudio de biomarcadores implicados en respuesta a fármacos no supondrá un coste añadido importante en comparación con el coste de las pruebas y tratamientos derivados de una RAM o fallos terapéuticos.

1.2.2. Estrategias para la implementación de la farmacogenética en la práctica clínica: Programas de implementación en Europa y EEUU

Existen dos tipos de aproximaciones para la implementación de la PGx en la práctica clínica: **(a)** El *modelo caso-a-caso o reactivo* y **(b)** el *modelo de genotipado anticipado* (30).

En el **(a)** *modelo caso-a-caso o reactivo*, la decisión de realizar la prueba PGx es individualizada y está siempre vinculada a la prescripción de un fármaco determinado. El resultado se utiliza como una covariable junto a otras características clínicas del paciente para guiar el manejo del tratamiento. Sin embargo, el estudio individualizado de los pacientes y BM tendrá costes más elevados a largo plazo. Por otro lado, la realización e interpretación de los estudios genéticos requiere unos tiempos de respuesta más elevados que otro tipo de pruebas, por lo que en la mayoría de los casos el resultado no estaría disponible para un comienzo rápido del tratamiento. Estas limitaciones hacen que este modelo sea poco útil en la práctica clínica. Sin embargo, es el modelo más aplicado hasta la fecha en la mayoría de instituciones principalmente debido a razones económicas.

En el **(b)** modelo de *genotipado anticipado*, la información genética se obtendría “*ad initio*” en todos los pacientes que entran al sistema sanitario o en un entorno clínico determinado, de modo que estaría disponible en el momento de la prescripción, utilizándose como covariable junto con otras características clínicas del paciente. En este modelo el paciente puede o no requerir tratamiento farmacológico, por lo que al contrario que en el modelo caso-a-caso la realización del estudio PGx no está siempre vinculada a la prescripción. Debido a la expansión de las técnicas moleculares que permiten el genotipado simultáneo de varios BM con costes cada vez más bajos, la tendencia general parece dirigirse hacia el diseño de este tipo de estrategias dejando atrás el modelo tradicional caso-a-caso.

En los últimos años han surgido distintas iniciativas para el diseño, implementación y evaluación de estrategias de implementación que permitiesen superar los principales obstáculos descritos en el apartado anterior. El *Translational Pharmacogenetics Program* (TPP) del *NIH Pharmacogenomics Research Network* (PGRN), fue una iniciativa creada en el año 2011 en la que participaron 8 centros sanitarios de EEUU mediante la implementación de estrategias para la optimización de la pauta terapéutica incorporando información PGx. El número total de pacientes incluidos en el estudio fue de 20.258. Aunque cada institución desarrolló una estrategia y flujo de trabajo distinto todas ellas estaban basadas en las Guías Clínicas CPIC permitiendo mantener consistencia entre las distintas instituciones (31-33).

En el año 2016 se puso en marcha una iniciativa similar a nivel Europeo por el *Ubiquitous Pharmacogenomics Consortium* (U-PGx), el *Preemptive Pharmacogenomic Testing for Prevention of Adverse Drug Reactions* (PREPARE) *study*, con una duración estimada de 5 años y en el que participarán alrededor de 8.100 pacientes pertenecientes a 7 países europeos entre los que se encuentra España (34). Sin embargo, la implementación de la PGx en el ámbito clínico en España es aún muy limitada (30). A pesar de trabajar de manera individualizada con algunos BM en asociación con fármacos concretos (parejas gen/fármaco) (27), no existen hasta la fecha unidades multidisciplinares especializadas en los principales centros hospitalarios o ambulatorios como las que existen en algunas de las principales instituciones sanitarias de EEUU como el St. Jude Children’s Research Hospital (PG4KDS protocol) (35), la Universidad de Florida (*Health Personalized Medicine Program*; PMP) (36) o la Universidad de Vanderbilt (PREDICT) (37) entre otros (31).

1.3. Empleo de algoritmos de dosificación como estrategia de individualización terapéutica en el paciente trasplantado

Como se ha mencionado previamente, gran parte de la heterogeneidad en la respuesta a fármacos puede explicarse por la variabilidad interindividual en su perfil FC, en el que influye a su vez la gran variabilidad descrita en los genes de ADME (10, 15, 18). De este modo, el diseño de algoritmos para predecir parámetros FC básicos permitirá ajustar las dosis estándar establecidas para cada fármaco y patología, y optimizar así los tratamientos.

La variable FC más empleada en este tipo de estudios es generalmente el área bajo la curva o *area under the curve* (AUC) que representa el área bajo la curva de concentración plasmática del fármaco en función del tiempo. El AUC es una medida cuantitativa de la exposición del organismo a un principio activo y representa una buena herramienta de comparación de los perfiles farmacocinéticos. Además, el AUC se relaciona con la eficacia terapéutica y toxicidad a muchos fármacos. El punto en el que se alcanza la concentración máxima del principio activo se denomina T_{max} y la concentración máxima detectada C_{max} . El $T_{1/2}$ es el tiempo necesario para reducir la concentración plasmática inicial a la mitad de su valor inicial. Típicamente el AUC puede calcularse de dos maneras: Desde el tiempo de administración a un punto temporal concreto (AUC_{0-t}) o bien el AUC a lo largo del tiempo, $AUC_{0-\infty}$, que representa una medida de la exposición sistémica total al fármaco (38).

La mayoría de algoritmos PGx implementados en la práctica clínica hasta la fecha son monogénicos (Figura 4). Sin embargo, el desarrollo de algoritmos de predicción poligénicos así como la combinación de la información farmacogenética con estrategias de monitorización terapéutica (*Therapeutic Drug Monitoring*; TDM) de los niveles del fármaco permitirá aumentar su valor predictivo facilitando así su aplicación en la práctica clínica (39, 40).

Durante el desarrollo de esta tesis se han realizado dos estudios exploratorios para la identificación de nuevas asociaciones PGx que permitan mejorar los algoritmos de predicción monogénicos implementados en la práctica clínica en dos fármacos de uso frecuente en pacientes trasplantados, Tacrolimus y Voriconazol. Las dos líneas de investigación principales han sido en la búsqueda de algoritmos poligénicos para: **(1.3.1)** la predicción del perfil FC de **Voriconazol** (VCZ) para la individualización del tratamiento/profilaxis de pacientes inmunodeprimidos pre-Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos (TPH) con riesgo elevado de sufrir Infecciones Fúngicas Invasivas (IFIs) tras la intervención y **(1.3.2)** la predicción del perfil FC de **Tacrolimus** (TAC) en pacientes pediátricos estables post trasplante renal.

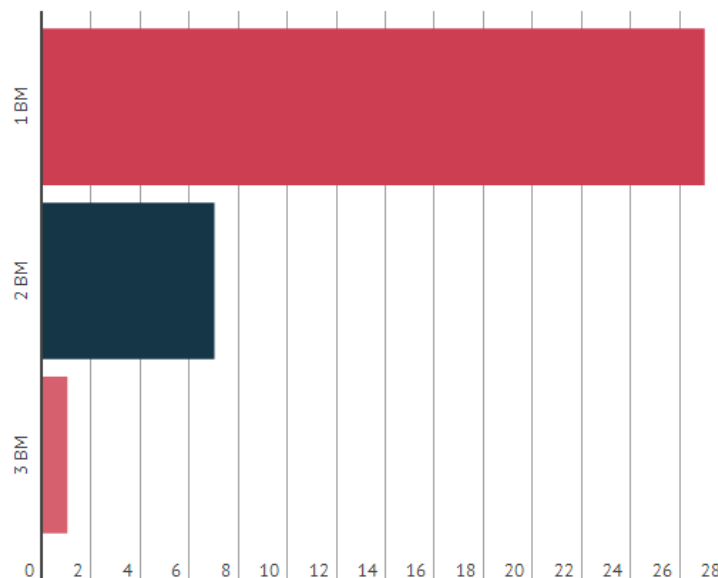


Figura 4. Distribución de los algoritmos PGx incluidos hasta la fecha en guías clínicas CPIC en función del número de BM predictivos incorporados en el protocolo de estudio. 1 BM; 2BM; 3BM: Uno, dos o tres biomarcadores incluidos en el protocolo de estudio. Fuente: PharmGKB (22) (Julio 2018).

1.3.1. Modelos predictivos del perfil farmacocinético de Voriconazol basados en la farmacogenética.

El Voriconazol (VCZ) es un antifúngico triazólico de segunda generación generalmente empleado como primera línea de tratamiento de la aspergilosis invasiva e indicado para el tratamiento y profilaxis de una gran variedad de IFIs. Sin embargo, su uso está limitado por su estrecho margen terapéutico y su gran variabilidad interindividual en las concentraciones plasmáticas que están directamente relacionadas con la eficacia del tratamiento así como en el riesgo de RAM como fototoxicidad, neurotoxicidad o hepatotoxicidad (41).

Los principales grupos de riesgo de desarrollar IFIs son los pacientes con neutropenia profunda y prolongada inducida por quimioterapia, leucemias agudas y pacientes que reciben TPH. La alta incidencia y mortalidad asociada a estas complicaciones infecciosas representa un grave problema clínico. Los estudios epidemiológicos más recientemente publicados muestran una incidencia de aspergilosis invasiva probable o confirmada en pacientes con enfermedad hematológica de alto riesgo de entre el 6 y el 11% de los pacientes (42, 43). Además, se ha descrito que la mortalidad atribuible a esta complicación infecciosa es de hasta el 40% en este tipo de pacientes (42, 44).

En este contexto, la individualización de la estrategia terapéutica de VCZ es fundamental para la optimización del tratamiento. La variabilidad en la FC de VCZ depende de diversas covariables clínicas como la edad, la función hepática, medicaciones concomitantes, inflamación y factores genéticos (41, 45). De este modo, la implementación de una aproximación multidisciplinar en la

práctica clínica, basada en la combinación de TDM (46, 47) y estudios PGx previos a la administración del VCZ (48), presenta un gran potencial para mejorar la eficacia del fármaco y disminuir la incidencia de RAM.

VCZ presenta un metabolismo hepático extensivo con menos del 2% de la dosis original excretada en forma no modificada. El metabolito circulante principal es el VCZ N-óxido que presenta una actividad antifúngica reducida (49). Se estima que entre el 70-75% del metabolismo total de VCZ está mediado por enzimas del CYP450, principalmente CYP3A4 y CYP2C19. El 25-30% restante estaría mediado por las FMO (22, 49-51). VCZ también es sustrato e inhibidor de CYP2C19, CYP3A4 y CYP2C9 (52). De este modo, polimorfismos en los genes que codifican estas enzimas parecen tener una gran influencia en la variabilidad interindividual en la FC de VCZ.

CYP2C19 es el BM más estudiado en relación con la FC de VCZ. Hasta la fecha, las guías clínicas de ajuste de dosis y selección de tratamiento basadas en PGx incluyen únicamente *CYP2C19* como BM de interés para el genotipado anticipado previo a la administración de VCZ (41, 45, 53) (Figura 5). Un estudio realizado en el año 2015 por Hicks et al. (48) en pacientes inmunodeprimidos con cáncer en profilaxis/tratamiento con VCZ propuso que las modificaciones de la pauta terapéutica basadas en el genotipo de *CYP2C19* permitirían aumentar el porcentaje de pacientes que alcanzaban niveles terapéuticos de fármaco en los primeros días.

Se ha descrito que polimorfismos en *CYP2C19* explican entre el 50-55% de la variabilidad en el metabolismo de VCZ (50, 51, 53). Hasta la fecha existen 35 haplotipos descritos según la nomenclatura de *Star* (*) *Alleles* a lo largo del gen *CYP2C19* (19) asociados a actividades enzimáticas incrementadas, reducidas o nulas de CYP2C19. La Tabla 1 muestra algunas de las variantes más relevantes asociadas a alteraciones en la actividad enzimática de CYP2C19 en población europea. Según la distribución de estas variantes es posible la inferencia del diplotipo y fenotipo metabolizador de CYP2C19. Los Metabolizadores Ultrarápidos o Rápidos (UM o RM) de CYP2C19 se han asociado a concentraciones más bajas de VCZ que los Metabolizadores Normales (NM); y los Metabolizadores Intermedios o Pobres (IM o PM) a concentraciones más elevadas (Figura 5) (48).

Existen también estudios *in vivo* e *in vitro* que sugieren que alrededor del 20-30% del metabolismo de VCZ podría estar catalizado por CYP3A4 (50-52). Además, el efecto de CYP3A4 en el metabolismo de VCZ parece más relevante en los PM para CYP2C19 (51). Algunos de los polimorfismos más relevantes descritos en asociación con la actividad de CYP3A4 se muestran en la Tabla 1 (54-56). Si bien los trabajos que estudian la influencia de CYP3A5 en la FC de VCZ describen resultados contradictorios, un estudio *in vitro* sugiere que

parte de las diferencias interindividuales en el metabolismo de antifúngicos triazólicos, incluyendo VCZ, pueden explicarse por polimorfismos en *CYP3A5* (57). Las variantes más relevantes en población europea se recogen en la Tabla 1.

Otros estudios in vitro demuestran además que el VCZ es metabolizado en menor medida por *CYP2C9* (52, 58). Los polimorfismos más relevantes descritos en asociación con la actividad de *CYP2C9* se muestran en la Tabla 1. Ambas variantes dan lugar a fenotipos de PM para *CYP2C9* (59, 60).

Además, dado que las enzimas CYP están controladas por una gran variedad de proteínas, las alteraciones en la actividad de estas proteínas parecen tener un efecto aditivo en la FC de los fármacos metabolizados por la ruta CYP. Así por ejemplo, polimorfismos en el gen que codifica la citocromo *P450* oxidoreductasa (*POR*) están asociados con alteraciones en la modulación de la actividad enzimática de *CYP3A* (61-64) (Tabla 1). Por otro lado, el *Nuclear Receptor Subfamily 1 Group 1 Member 2* (*NR1I2*), que codifica el receptor X de pregnano (PXR), es responsable de la regulación *upstream* de las enzimas *CYP3A*. De este modo, polimorfismos en el gen *NR1I2* están asociados con alteraciones en la actividad metabólica de CYP que podría alterar la FC de fármacos con un metabolismo dependiente de CYP (65) (Tabla 1).

Por otra parte, se ha descrito un papel importante de las FMO en el metabolismo de VCZ, especialmente en población pediátrica. Un estudio in vitro sugiere una contribución de alrededor del 20% de las FMO, principalmente de la enzima *FMO3*, en la N-oxidación de VCZ (51, 66). Hasta la fecha, la asociación entre polimorfismos en *FMO3* y la FC de VCZ no está bien establecida. Sin embargo un estudio realizado en pacientes pediátricos post-trasplante hepático con tratamiento inmunosupresor con Tacrolimus (TAC) describe asociaciones entre SNPs en *FMO3* y la actividad enzimática así como la tasa de eliminación de TAC. En este contexto, estos polimorfismos podrían estar también asociados a la variabilidad FC de VCZ (67) (Tabla 1).

Finalmente, la glicoproteína-P (P-gp) codificada por el gen *ABCB1* se ha asociado también con la FC de VCZ (68). La Tabla 1 recoge algunos de los polimorfismos más relevantes asociados a alteraciones en la actividad transportadora de P-gp (69, 70).

Con todo esto, parece fundamental evaluar la contribución de la variabilidad PGx en otros BM descritos en asociación con el perfil FC de VCZ con el fin de optimizar las pautas de tratamiento existentes basadas únicamente en el genotipo de *CYP2C19* (Figura 5) mediante la incorporación de BM adicionales en los algoritmos de individualización del tratamiento.

Gen	#rs (dbSNP)	ADNc	Proteína	MAF	Codificación Star (*) Allele	Actividad Enzimática
<i>CYP2C19</i>	rs4244285	c.681G>A	p.P227P	0.22 A	CYP2C19*2	Reducida o nula
	rs4986893	c.636G>A	p.W212X	0.01 A	CYP2C19*3	Reducida o nula
	rs28399504	c.1A>G	p.M1L	<0.01 G	CYP2C19*4	Reducida
	rs12248560	c.-806C>T	-	0.15 T	CYP2C19*17	Incrementada
<i>CYP3A4</i>	rs2740574	c.-392C>A	-	0.23 C	CYP3A4*1B	Incrementada
	rs35599367	c.522-191 C>T	-	0.01 A	CYP3A4*22	Reducida
	rs4646438	c.827_828insA	p.B277Efs	<0.01	CYP3A4*6	Reducida
	rs55785340	c.664T>C	p.S222P	<0.01 G	CYP3A4*2	Reducida
<i>CYP3A5</i>	rs776746	c.219-237A>G	-	0.38 T	CYP3A5*3	Reducida
	rs55965422	c.432+2T>C	-	<0.01 G	CYP3A5*5	Incierto
	rs10264272	c.624G>A	-	0.04 T	CYP3A5*6	Nula
	rs41303343	c.1035_1036insT	p.T346Y	0.03 A	CYP3A5*7	Nula
	rs41279854	c.1337T>C	p.F333S	<0.01 G	-	Incierto
<i>CYP2C9</i>	rs1799853	c.430C>T	p.R144C	0.05 T	CYP2C9*2	Reducida
	rs1057910	c.1075A>C	p.I359L	0.05 C	CYP2C9*3	Reducida
<i>POR</i>	rs1057868	c.1508C>T	p.A503V	0.29 T	POR*28	CYP3A incrementada
	rs2868177	c.188+6405A>G	-	0.40 G	-	Incierto
<i>NR1I2</i>	rs3814055	c.-1570C>T	-	0.32 T	-	CYP3A reducida
<i>FMO3</i>	rs1800822	c.441C>T	p.S147=	0.14 T	-	Incrementada
	rs909530	c.855C>T	p.N285=	0.33 T	-	Incrementada
<i>ABCB1</i>	rs2032582	c.2677T>G	p.S893A	0.33 A	-	-
	rs1045642	c.3435T>C	p.I1145=	0.40 A	-	-

Tabla 1. Biomarcadores PGx más relevantes y estudiados hasta la fecha en relación con la variabilidad FC de VCZ. NCBI RefSeq: *CYP2C19* (NM_000769; NP_000760); *CYP3A4* (NM_017460; NP_059488); *CYP3A5* (NM_000777; NP_000768); *CYP2C9* (NM_000771; NP_000762); *POR* (NM_000941; NP_000932); *NR1I2* (NM_022002; NP_071285); *FMO3* (NM_001002294; NP_001002294); *ABCB1* (NM_000927; NP_000918). MAF: Minor Allele Frequency.

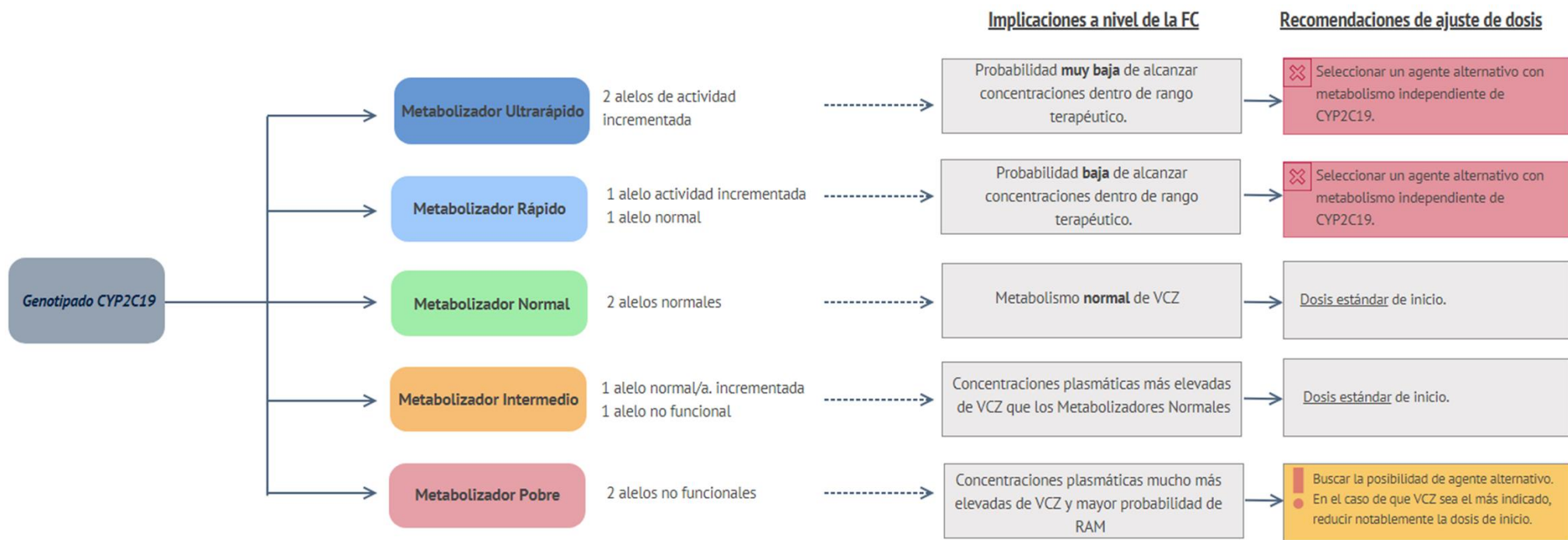


Figura 5. Representación esquemática de las recomendaciones de la guía clínica CPIC para el genotipado de CYP2C19 previo a la administración de VCZ. Las frecuencias descritas en población caucásica para cada fenotipo metabolizador de CYP2C19 son las siguientes: 4,6% Metabolizadores Ultrarápidos (UM); 26,9% Metabolizadores Rápidos (RM); 39,2% Metabolizadores Normales (NM); 26,8% Metabolizadores Intermedios (IM) y 2,5% Metabolizadores Pobres (PM)(22). Modificado de: Guía CPIC para CYP2C19 y el tratamiento con Voriconazol(41). Abreviaturas: VCZ (Voriconazol), RAM (Reacciones adversas a medicamentos).

1.3.2. Modelos predictivos del perfil farmacocinético de Tacrolimus basados en la farmacogenética

Tacrolimus (FK506, TAC) es el inhibidor de la calcineurina más empleado como agente inmunosupresor en trasplante sólido (40). A pesar de ser muy efectivo en la prevención del rechazo post-trasplante (71, 72) su administración está limitada por su estrecho margen terapéutico y la elevada variabilidad interindividual en su perfil FC que hace obligatorio el empleo de estrategias de TDM para evitar la pérdida del injerto y los efectos adversos asociados: neurotoxicidad, nefrotoxicidad, alteraciones gastrointestinales, aumento en el riesgo de infecciones, hipertensión o alteraciones del metabolismo de la glucosa (72-75). Estas diferencias son aún más marcadas en población pediátrica debido a la maduración gradual de los sistemas enzimáticos. Esto, junto con otras diferencias fisiológicas entre adultos y niños, hace que los requerimientos de dosis sean más elevados en pacientes pediátricos para alcanzar concentraciones plasmáticas similares (76).

En este contexto, a pesar de las estrategias de TDM, muchos pacientes trasplantados experimentan concentraciones de TAC fuera del rango terapéutico y por tanto presentan un mayor riesgo de toxicidad (concentraciones supraterapéuticas) o rechazo agudo (concentraciones subterapéuticas). La variabilidad interindividual del perfil FC de TAC depende de distintas covariables clínicas, principalmente los niveles de albúmina, el hematocrito y la hemoglobina, fármacos concomitantes, tiempo post-operatorio y factores genéticos (40, 77-80).

TAC presenta un metabolismo hepático extensivo por el citocromo P450, principalmente a través de la enzima CYP3A5 (con una pequeña contribución del CYP3A4). De este modo, diferencias en la actividad enzimática de CYP3A5 son las principales determinantes de la variabilidad interindividual en el perfil FC de TAC; encontrando que entre un 40-50% de esta variabilidad puede explicarse por polimorfismos genéticos en el gen *CYP3A5* (69, 72, 81-83). En la actualidad existen 11 haplotipos descritos en el gen *CYP3A5* (Figura 2), siendo el más relevante y frecuente el haplotipo *3 definido por el SNP rs776746 (c.219-237A>G) que codifica una proteína truncada con una menor actividad que el haplotipo nativo o *wild type* (CYP3A5*1). Así, aquellos individuos que presentan un genotipo CYP3A5*3/*3 se denominan CYP3A5-“no expresadores” o Metabolizadores Pobres en contraste con los CYP3A5*1/*3 o CYP3A5*1/*1 que se denominarían CYP3A5-“expresadores” y tendrían una actividad enzimática normal o intermedia y, por tanto, concentraciones plasmáticas más bajas de TAC relacionadas con tasas metabólicas más elevadas (78, 84). Sin embargo, se estima que entre el 80-85% de la población caucásica presenta un genotipo CYP3A5*3/*3 “no-expresador” (85) y se ha demostrado que la optimización de la pauta terapéutica de TAC en base al genotipo de

CYP3A5 permite alcanzar concentraciones plasmáticas dentro del rango terapéutico de forma más efectiva (68, 83, 86, 87).

En la actualidad, los algoritmos clínicos de ajuste de dosis basados en PGx para TAC están basadas exclusivamente en el *CYP3A5* como biomarcador de interés (88) (Figura 6); sin embargo existen otras proteínas implicadas en la FC del TAC, entre las que encontramos el transportador de membrana *ABCB1* y la proteína *POR*, que podrían también colaborar en la predicción de las concentraciones plasmáticas de fármaco y mejorar las tasas de predicción mediante la elaboración de algoritmos poligénicos (40, 69).

Variantes en *ABCB1* se han asociado a la baja biodisponibilidad oral de TAC además de estar implicado en la distribución de este a través del cuerpo y su excreción en bilis u orina (69, 89, 90). El rs1045642 (c.3435T>C) es el polimorfismo más estudiado en asociación con una mayor expresión de glicoproteína-P (P-gp; *MDR1*) en el intestino. Sin embargo, las asociaciones entre SNPs en *ABCB1* y la variabilidad en el perfil FC de TAC no están aún bien definidas, existiendo notables discrepancias entre estudios (68, 91-95).

Por otro lado, polimorfismos en el gen que codifica la citocromo P450 oxidoreductasa (*POR*) se han relacionado con la modulación de la actividad de las enzimas P450 por oxidación. *POR* es un gen muy polimórfico con 48 haplotipos descritos hasta la fecha (19). El rs1057868 (c.1508C>T; *POR**28) es el polimorfismo más estudiado hasta la fecha y está asociado a una reducción de la actividad *in vitro* (96). Un estudio realizado en pacientes pediátricos post-trasplante renal muestra que los pacientes homocigotos *POR**28/*28 presentan concentraciones plasmáticas de TAC un 20% más bajas que los individuos homocigotos nativos (*POR**1/*1) (61). También se ha descrito una asociación entre el polimorfismo rs2868177 (c.3188+6405A>G) y la actividad de CYP en relación con las variaciones de dosis de warfarina. Sin embargo, el efecto de esta variante en la actividad enzimática de los CYP no está bien definido mediante estudios *in vitro*, pudiendo existir diferencias entre las enzimas CYP implicadas y el substrato estudiado (64).

En conclusión, TAC presenta una gran variabilidad en cuanto a eficacia y toxicidad tanto en población pediátrica como adulta. Una gran parte de esta variabilidad puede explicarse por variantes genéticas por lo que la línea de investigación principal en esta área ha sido la identificación de la influencia de las variantes genéticas más relevantes y estudiadas hasta la fecha en *CYP3A5*, *ABCB1* y *POR* (Tabla 2) en la FC de TAC con el fin de evaluar si la incorporación de BM adicionales podría mejorar los algoritmos clínicos monogénicos existentes.

Gen	#rs (dbSNP)	ADNc	Proteína	MAF (EUR)	Codificación Star (*) Allele	Actividad enzimática
<i>CYP3A5</i>	rs776746	c.219-237A>G	-	0,06 (T)	CYP3A5*3	Reducida
<i>ABCB1</i>	rs1045642	c.3435T>C	p.Ile1145=	0,48 (G)	-	-
<i>POR</i>	rs1057868	c.1508C>T	p.Ala503Val	0,30 (T)	POR*28	Actividad incrementada de CYP3A
	rs2868177	c.3188+6405A>G	-	0,34 (G)		Incierto

Tabla 2. Biomarcadores PGx más relevantes y estudiados hasta la fecha en relación con la variabilidad FC de TAC. NCB1 RefSeq: *CYP3A5* (NM_000777), *ABCB1* (NM_001348944), *POR* (NM_000941). MAF: *Minor Allele Frequency*.

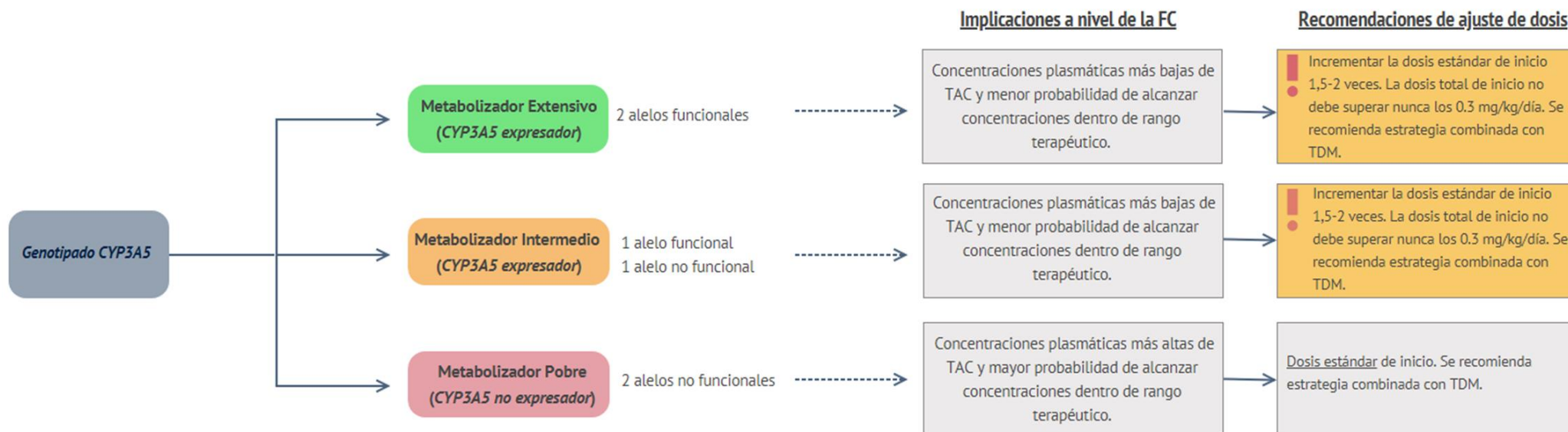


Figura 6. Representación esquemática de las recomendaciones de la guía clínica CPIC para el genotipado de CYP3A5 previo a la administración de TAC. Estas recomendaciones son válidas para la inmunosupresión con TAC en pacientes post-trasplante renal, cardíaco, pulmonar y hematopoyético. También es válido en pacientes post-trasplante hepático cuando el genotipo del donante y del receptor es el mismo. El fenotipo de Metabolizador Pobre asociado a CYP3A5 es el más frecuente en población caucásica, con una frecuencia entre el 80-85%(85). Modificado de: Guía CPIC para el genotipado de CYP3A5 previo a la administración de TAC (88). Abreviaturas: TAC (Tacrolimus), TDM (Therapeutic Drug Monitoring).

2. Objetivos

Los objetivos de esta tesis doctoral son:

1. Desarrollar y evaluar una estrategia para implementar la farmacogenética en la práctica clínica asistencial en el contexto de un hospital adscrito al Sistema Nacional de Salud (SNS).
2. Evaluar la utilidad de un protocolo para la implementación del genotipado anticipado de *CYP2C19* en una cohorte de pacientes hematológicos previo al trasplante de progenitores hematopoyéticos definida como población de riesgo para el tratamiento o profilaxis con Voriconazol.
3. Identificar nuevas asociaciones farmacogenéticas que permitan mejorar los algoritmos clínicos monogénicos existentes, para fármacos utilizados en pacientes trasplantados, mediante la incorporación de nuevos biomarcadores asociados a la variabilidad en la Farmacocinética:
 - 3.2. Evaluar si la creación de modelos predictivos poligénicos del perfil farmacocinético de Voriconazol contribuye a mejorar el algoritmo clínico establecido basado únicamente en *CYP2C19*.
 - 3.3. Analizar la influencia de *ABCBI* y *POR* en la Farmacocinética de Tacrolimus oral en pacientes pediátricos estables post-trasplante renal.

3. Material y métodos

3.1. Bloque I. Estrategias para la implementación de la farmacogenética en la práctica clínica asistencial del HULP: Unidad de Farmacogenética Clínica del HULP

En la primera parte de esta tesis doctoral se describirán las estrategias empleadas para la implementación de la PGx en la rutina clínica asistencial del Hospital Universitario La Paz (HULP) mediante la creación de una Unidad de PGx clínica. El HULP es un hospital de tercer nivel asistencial perteneciente al Sistema Nacional de Salud (SNS). Se encuentra en Madrid y da asistencia a unos 600,000 habitantes. La Unidad de PGx clínica del HULP es una unidad multidisciplinar integrada por el Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM) y el Servicio de Farmacología Clínica de este mismo hospital y que fue creada en el año 2014.

3.1.1. Barreras identificadas para la implementación

El proceso de implementación de la PGx en la rutina clínica de nuestro hospital se centró en la resolución de 3 problemáticas principales identificadas previamente mediante la revisión de la literatura previa (24, 27, 28) y la realización de encuestas y reuniones clínicas con los diferentes servicios del hospital. Las 3 problemáticas identificadas fueron:

- La necesidad de una infraestructura para el desarrollo de esta actividad, incluyendo una consulta de PGx clínica así como el desarrollo de estrategias de genotipado coste y tiempo-efectivas.
- La necesidad de aumentar el conocimiento y aceptación de la PGx entre los distintos especialistas del centro hospitalario.
- La necesidad del apoyo institucional tanto a nivel del propio hospital como del SNS, demostrando coste-eficiencia y utilidad de la aplicación de este tipo de estrategias para la optimización de las pautas terapéuticas en distintos ámbitos.

3.1.2. Desarrollo de un método de genotipado coste y tiempo eficiente: PharmArray® y CliniPharmArray®

En los años 2013 y 2016 nuestro grupo diseñó y patentó las herramientas PharmArray® (EUR: 011608403; USA: 86.004.412) y CliniPharmArray® (EUR: 015489511; USA: 87.054.978), respectivamente, para el genotipado simultáneo de polimorfismos asociados a la respuesta a fármacos mediante un formato de *microarray* de SNPs. El diseño original de PharmArray® se revisó y actualizó en 2016 a una segunda versión (PharmArray®v2) más optimizada, que es la que se describirá en este trabajo. Estas plataformas constituyen la herramienta principal de genotipado en la que se basa la estrategia de implementación de la PGx en la rutina clínica del HULP.

3.1.2.1. Muestras

El ADN genómico para la realización de los estudios PGx se extrae de manera automática generalmente a partir de linfocitos de sangre periférica empleando la tecnología Chemagen (Perkin-Elmer, Boston, MA). Sin embargo, en determinados pacientes el ADN puede extraerse de otras muestras biológicas como saliva o tejido. Es necesario que todos los pacientes den su consentimiento informado previo a la realización del estudio PGx. Los ADN se cuantifican mediante la plataforma TECAN Infinite® 200 PRO (Tecan Trading AG, Switzerland) y se almacenan en el banco de ADN del INGEMM. Para el análisis de estos datos se solicitó la aprobación del Comité Ético de Investigación con medicamentos (CEIm) del Hospital Universitario La Paz (PI 2915; ANEXO I)

3.1.2.2. Tecnología TaqMan OpenArray®

Tras la evaluación de distintas técnicas de genotipado seleccionamos la tecnología TaqMan OpenArray® (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, Massachusetts, EEUU). La tecnología OpenArray® consiste en una plataforma de *microarray* organizado en 48 subarrays, cada uno de ellos con 64 pocillos (un total de 3072 pocillos capaces de retener 33nL de mezcla de reacción que incluye *Master Mix* para la reacción de PCR y ADN). Estos pocillos son hidrofílicos en su interior e hidrofóbicos en sus bordes, permitiendo así retener la mezcla de reacción por tensión superficial. El módulo de genotipado está basado en la tecnología TaqMan® de PCR en tiempo real (*Real-Time PCR*; *RT-PCR*). De este modo, cada uno de los pocillos está pre-cargado con las sondas TaqMan® necesarias para la realización de la reacción de RT-PCR individual siguiendo el diseño indicado. En este caso, hemos trabajado con diseños personalizados ya que ninguna de las plataformas inventariadas se ajustaba a nuestras necesidades. La mayoría de las sondas ya contaban con un diseño validado y optimizado por el fabricante (Catalog of PreDesigned and DME SNP Genotyping Assays, Thermo Fisher Scientific®; Pub no: MAN0009593). Aquellas sondas que no tenían un diseño previo fueron diseñadas mediante la herramienta Custom TaqMan SNP Genotyping Assays proporcionada por el fabricante.

La carga de la mezcla de reacción en los microarrays es automática mediante el sistema QuanStudio 12K Flex OpenArray AccuFill (Thermo Fisher Scientific®) siguiendo el protocolo marcado por el fabricante. En la actualidad, tanto la RT-PCR como la lectura de las fluorescencias emitidas por las sondas se realizan en el sistema QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific®).

La determinación de los genotipos para cada ensayo individualizado se realiza mediante el programa informático TaqMan Genotyper (Thermo Fisher Scientific®) y el análisis e interpretación de los resultados moleculares mediante un script de diseño propio en Microsoft

Excel (PharmHulp v1). Con este *script* se automatizaba la extracción de los genotipos de las muestras analizadas.

3.1.2.3. Diseño *in silico* de las plataformas de genotipado: *PhamArray*® y *CliniPharmArray*®.

El diseño de las plataformas de genotipado se realizó a través de un equipo multidisciplinar formado por especialistas en Farmacología Clínica, genetistas moleculares y técnicos con el fin de lograr una buena cobertura de los BM PGx más relevantes de uso clínico.

La selección de los BM y SNPs a incluir en las plataformas de genotipado se realizó en base a 3 criterios principalmente:

- Revisión de la literatura previa y de las bases de datos PharmGKB (22) y Comparative Toxicogenomics Database (CTD) (97) para la selección de los BM y variantes más relevantes. Se seleccionaron principalmente variantes clasificadas dentro de los niveles 1 a 2 de las anotaciones clínicas de PharmGKB (22). Por otro lado, también se incluyeron algunas variantes más recientemente descritas o menos frecuentes, y por tanto clasificadas con un menor nivel de evidencia, pero que resultaban de interés local tras el filtrado de la literatura.
- Que los BM seleccionados ayudasen a explicar la variabilidad interindividual de fármacos aprobados por las agencias reguladoras europea y española (EMA y AEMPS), ajustándose así a la población de interés de nuestra unidad, principalmente residente en España. Además, que se tratase de fármacos empleados para el tratamiento de patologías de interés en nuestro hospital.
- Las frecuencias poblacionales de las variantes en población Europea y el efecto funcional de estas mediante las bases de datos 1000 genomas (98) y GenomAD (99). Se incluyeron principalmente variantes cuyo efecto funcional estaba demostrado en estudios *in vitro* o ampliamente descrito en la literatura. Además, se revisaron las frecuencias poblacionales de estas variantes con el fin de abarcar aquellas más frecuentes y relevantes en la población diana. En el caso de variantes multialélicas se seleccionaron los alelos más relevantes y frecuentes en población Europea. Esta técnica no permite la detección de CNVs específica de alelo.

Teniendo todo esto en cuenta se seleccionaron dos formatos de TaqMan® OpenArray® para la aplicación de dos diseños customizados en función de la estimación del volumen semanal de pacientes que podrían beneficiarse en nuestro hospital de este tipo de estudio: (a) **PharmArray®v2**, que permite el genotipado de 180 SNPs de 38 genes en 14 pacientes de manera simultánea y (b) el **CliniPharmArray®**, un formato más pequeño que incluye los SNPs

más relevantes incluidos en guías clínicas y que contaban con un protocolo clínico acordado con los servicios de referencia del hospital, para agilizar la práctica clínica en nuestro hospital ya que permite el genotipado simultáneo de 60 SNPs en 48 pacientes de manera simultánea. La información detallada de estos diseños se describe en las Tablas 3 y 4. La decisión del formato más adecuado con el que genotipar a cada paciente se realiza en función del protocolo PGx específico a aplicar.

Gen	Rs#	Nº de SNPs
<i>ABCB1</i>	rs2032582; rs1045642; rs3213619; rs1128503	4
<i>ABCC2</i>	rs717620; rs56296335; rs3740066; rs56199535 rs56220353	5
<i>ABCG2</i>	rs2231142*; rs2273697; rs72552713*	3
<i>APOE</i>	rs7412*	1
<i>COMT</i>	rs4680	1
<i>CFTR</i>	rs75527207; rs113993960; rs199826652; rs267606723; rs193922525; rs80282562; rs121909013; rs74503330; rs121909041; rs121908755; rs121909005; rs121908757	12
<i>CYP2C19</i>	rs4244285*; rs4986893*; rs12248560*; rs28399504*; rs56337013*; rs72552267*; rs72558186*; rs41291556*	8
<i>CYP2C8</i>	rs11572080; rs10509681; rs1058930; rs11572103	4
<i>CYP2C9</i>	rs1799853; rs1057910	2
<i>CYP2D6</i>	rs1080985; rs28371725; rs35742686; rs3892097; rs5030655; rs5030865; rs5030867; rs5030656; rs1065852; rs1058164; rs1135840; rs16947; rs28371706; rs61736512; rs769258	15
<i>CYP3A4</i>	rs55785340; rs4646438	2
<i>CYP3A5</i>	rs776746; rs55965422; rs10264272; rs41303343; rs41279854	5
<i>CYP4F2</i>	rs2108622*	1
<i>DPYD</i>	rs3918290*; rs55886062*; rs55886062*; rs67376798*; rs1801159*; rs1801265*	6
<i>ERCC1</i>	rs11615*; rs3212986*	2
<i>EPHX1</i>	rs1051740*	1
<i>FCGR2A</i>	rs1801274	1
<i>HTR2A</i>	rs6311	1
<i>IL10</i>	rs1800896*; rs1800872*; rs1800871*	3
<i>IL23R</i>	rs7517847; rs10489629; rs11465804; rs1343151	4
<i>KCNJ6</i>	rs2070995	1
<i>MTHFR</i>	rs1801133*; rs4846051*; rs1801131*	3

<i>POR</i>	rs1057868; rs2868177	2
<i>SLC15A2</i>	rs2293616; rs2257212; rs1143671; rs1143672	4
<i>SLC22A1</i>	rs72552763; rs55918055; rs36103319; rs34059508; rs628031; rs4646277; rs2282143; rs4646278; rs12208357	9
<i>SLC22A2</i>	rs316019; rs8177516; rs8177517; rs8177507; rs8177504	5
<i>SLC22A6</i>	rs11568626	1
<i>SLCO1B1</i>	rs4149056; rs2306283; rs56101265; rs72559745; rs56061388; rs55901008; rs59502379; rs56199088; rs55737008; rs4149015	10
<i>TLR2</i>	rs4696480; rs11938228	2
<i>TLR9</i>	rs352139	1
<i>TNF</i>	rs1800629*	1
<i>TP53</i>	rs1042522	1
<i>TPMT</i>	rs1800460*; rs1800462*; rs1142345*; rs1800584*	4
<i>UGT1A1</i>	rs887829*; rs4148323; rs34993780; rs35350960; rs55750087; rs4124874	6
<i>UGT2B7</i>	rs7438135	1
<i>VKORC1</i>	rs9934438*	1
<i>XPC</i>	rs2228001*	1
<i>XRCC1</i>	rs25487*	1

Tabla 3. Diseño del PharmArray® v2. La tabla muestra los genes y SNPs incluidos en el diseño (dbSNP versión built 146). Este formato permite el genotipado simultáneo de 180 SNPs en 14 pacientes. Se incluyeron dos SNPs para control de sexo que sirven de control interno de calidad del proceso de genotipado. También algunas sondas se incluyeron por duplicado (*).

Gen	Rs#	Nº de SNPs
<i>ABCB1</i>	rs2032582; rs1045642	2
<i>ABCC2</i>	rs717620	1
<i>APOE</i>	rs7412	1
<i>CYP2C19</i>	rs4244285*; rs4986893*; rs12248560*	3
<i>CYP2C8</i>	rs11572080; rs10509681; rs1058930; rs11572103	4
<i>CYP2C9</i>	rs1799853; rs1057910	2
<i>CYP2D6</i>	rs1080985; rs35742686; rs3892097; rs5030655; rs5030865; rs5030867; rs5030656; rs1065852; rs1135840; rs28371706	10
<i>CYP3A4</i>	rs55785340; rs4646438	2
<i>CYP3A5</i>	rs776746; rs55965422; rs10264272; rs41303343; rs41279854	5
<i>CYP4F2</i>	rs2108622	1
<i>DPYD</i>	rs3918290*; rs55886062; rs67376798	3
<i>IL10</i>	rs1800896	1
<i>MTHFR</i>	rs1801133*; rs4846051*	2
<i>POR</i>	rs1057868; rs2868177	2
<i>SLCO1B1</i>	rs4149056; rs2306283	2
<i>TNF</i>	rs1800629	1
<i>TPMT</i>	rs1800460*; rs1800462*; rs1142345*	3
<i>UGT1A1</i>	rs887829*	1
<i>VKORC1</i>	rs9934438*	1

Tabla 4. Diseño del CliniPharmArray®. Este formato “filtrado” y más pequeño permite el genotipado simultáneo de 60 SNPs en 48 pacientes. La tabla muestra los genes y SNPs incluidos en el diseño (dbSNP versión built 146). Algunas sondas se incluyeron por duplicado (*).

3.1.2.4. Validación de las plataformas PharmArray® y CliniPharmArray®

Para la validación de ambas plataformas se seleccionaron 20 muestras con genotipos conocidos para los genes *CYP2D6*, *CYP2C19* y *CYP2C9* obtenidas a través del biorepositorio Coriell (Camdem, NJ, USA) con el fin de evaluar la especificidad y exactitud de genotipado de las sondas incluidas. Todas las muestras se testaron de forma anónima. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5. Se consiguió determinar el 95% de los genotipos, sin embargo debido a limitaciones de la técnica encontramos algunas discrepancias, especialmente en muestras que presentaban CNVs en *CYP2D6* (tanto la delección *5, como la multiplicación xN del gen) y aquellas que presentaban haplotipos muy poco frecuentes en nuestra población diana y que no estaban incluidos en el diseño (*CYP2C19**10 y *CYP2C19**9). Estas determinaciones no están incluidas en la cartera de servicios de nuestra unidad. Por otro lado, de forma periódica se incluyen algunos controles internos de genotipo conocido intercalados con las muestras asistenciales con el fin de descartar pérdidas de eficiencia de la técnica.

CORIELL #ID	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6
<u>NA12273</u>	*1/*2	*1/*2	*1/*1
<u>NA17075</u>	*1/*1	*2/*2	*1/*2
<u>NA17214</u>	*1/*2	*1/*1	*2/*2
<u>NA17280</u>	*1/*8	*1/*2	*4/*41
<u>NA17289</u>	*2/*2	*1/*1	*2/*4
<u>NA17252</u>	*1/*1	*2/*3	*4/*4 (*4/*5)
<u>NA17248</u>	*17/*17	*1/*1	*4/*10
<u>NA16688</u>	*2/*3	*1/*1	*2/*10
<u>NA17114</u>	*1/*1	*1/*1	*1/*1 (*1/*5)
<u>NA17300</u>	*1/*17	*1/*1	*1/*6
<u>NA17039</u>	*1/*1	*1/*1 (*1/*9)	*2/*17
<u>NA17073</u>	*1/*1	*1/*1	*1/*17
<u>NA17279</u>	*17/*17	*1/*1	*4/*41
<u>NA17208</u>	*1/*1	*1/*1	*2/*41
<u>NA17204</u>	*1/*1	*1/*3	*1/*2
<u>NA17298</u>	*1/*1	*1/*1	*1/*1 (*1xN/*1)
<u>NA17221</u>	*1/*1	*2/*3	*1/*2 (*1xN/*2)
<u>NA17232</u>	*2/*17	*1/*1	*2/*2 (*2xN/*2)
<u>NA02016</u>	*1/*2	*1/*1	*2/*17 (*2X2/*17)
<u>NA07439</u>	*2/*2 (*2/*10)	*1/*1 (*1/*9)	*4/*41 (*4xN/*41)

Tabla 5. Resultados del genotipado de las 20 muestras CORIELL incluidas en el proceso de validación de los microarrays (PharmArray® y CliniPharmArray®). Los genotipos representados entre paréntesis muestran el genotipo consenso esperado en aquellas muestras en las que se encontraron discrepancias. Los diplotipos están codificados utilizando la nomenclatura Star Allele (*).

3.1.3. Otros métodos de genotipado

El genotipado del *Major Histocompatibility Complex, Class I, B* o *HLA-B* previo a la administración de Abacavir se realizó por secuenciación Sanger y tiras reactivas INNO-LiPA® HLA-B Update Plus (Fujirebio, Malvern, PA) para una correcta discriminación de los alelos siguiendo los protocolos estándar marcados por los fabricantes.

3.1.4. Estructura y funcionamiento de la Unidad de Farmacogenética Clínica del HULP.

La estrategia de implementación que se ha desarrollado en el hospital a través de la Unidad de Farmacogenética Clínica se centró en dos objetivos principales: **(a)** Por un lado en la transición de los modelos tradicionales de genotipado caso-a-caso a un modelo de genotipado anticipado en poblaciones de riesgo de forma que la información molecular esté disponible en el momento de la prescripción para todos aquellos pacientes susceptibles de recibir un tratamiento farmacológico determinado. Para ello, nuestra estrategia consistió en el desarrollo de protocolos clínicos en colaboración con los distintos servicios peticionarios para el genotipado de BM asociados a la respuesta a determinados fármacos empleados para el tratamiento de patologías específicas. Los protocolos clínicos desarrollados hasta la fecha en la Unidad de PGx Clínica del HULP se muestran en la Tabla 6. **(b)** El segundo punto clave de nuestra estrategia consistió

en la puesta en práctica del concepto de Medicina Personalizada en el que es fundamental una interpretación individualizada de los resultados PGx. De este modo, al contrario que en estrategias basadas en alertas incluidas en sistemas de prescripción es necesario tener en cuenta la historia clínica y antecedentes específicos de cada, las interacciones individuales y otros factores además de la información genética a la hora de desarrollar recomendaciones personalizadas.

Fármaco/BM	Patologías	Servicio de referencia
Tiopurinas/ <i>TPMT</i>	Leucemia, EII, psoriasis	Hemato-oncología, digestivo, dermatología
Inmunosupresores/ <i>CYP3A5, CYP3A4, ABCB1, POR</i>	Trasplante renal en pacientes pediátricos, psoriasis	Nefrología pediátrica, dermatología
Voriconazol/ <i>CYP2C19</i>	Aspergillosis en pacientes inmunodeprimidos post-TPH	Hemato-oncología pediátrica
Anticoagulantes/ <i>CYP2C9, VKORC, CYP4F2, APOE</i>	Enfermedad tromboembólica y fibrilación atrial	Medicina interna, hematología
Simvastatina/ <i>SLCO1B1, ABCG2</i>	Riesgo cardiovascular elevado	Cardiología
Metotrexate/ <i>MTHFR</i>	Leucemia, psoriasis	Hemato-oncología pediátrica, reumatología, dermatología
Irinotecan/ <i>UGT1A1</i>	Cancer colorectal	Oncología
Fluoropirimidinas/ <i>DPYD, TP53</i>	Cancer colorectal	Oncología
Abacavir/HLA-B:*57:01	VIH	Medicina interna
PEG-interferón- α / <i>IL28B</i>	Hepatitis C	Medicina interna

Tabla 6. Protocolos definidos en el HULP para el genotipado anticipado de BM PGx en patologías concretas. EII: Enfermedad Inflamatoria Intestinal; TPH: Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos. Se describen los fármacos y biomarcadores asociados a cada uno de ellos para las patologías específicas y el servicio de referencia del HULP que remite los pacientes de cada grupo.

3.1.4.1. Gestión de muestras y clasificación de los estudios farmacogenéticos

La Unidad de PGx Clínica evalúa todas las peticiones para las que la realización de un estudio PGx podría estar indicada para: (a) la predicción de la respuesta a fármacos, (b) la optimización de la pauta terapéutica y (c) la identificación anticipada del fallo terapéutico, reacciones adversas o interacciones relacionadas con la variabilidad genética. Con el fin de administrar todas las peticiones recibidas, nuestro grupo ha desarrollado la siguiente clasificación de los estudios PGx (Figura 7A):

- Genotipado anticipado de biomarcadores PGx requeridos para la selección de tratamiento según las agencias reguladoras (“actionable BMs”): *HLA-B*57:01/Abacavir/VIH* y *IL28B/PEG-interferón- α /Hepatitis C*). En este tipo de estudios no se considera necesario el asesoramiento genético especializado ya que las recomendaciones clínicas están estandarizadas para todos los pacientes. De este modo el resultado molecular se envía directamente al especialista solicitante del estudio para la toma de decisión. En los últimos años, el número de estudios de *IL28B* previo a la administración de interferón en pacientes con Hepatitis C ha disminuido notablemente debido a la implementación de nuevos

tratamientos farmacológicos preferentes en los que el genotipado del gen *IL28B* no está indicado.

- Fármacos con un protocolo clínico bien definido para guiar la pauta terapéutica en el tratamiento de patologías concretas. En este grupo incluimos aquellos casos en los que la selección de tratamiento basado en la información PGx ha sido acordada y definida con los servicios clínicos de referencia e incluido en protocolos clínicos (Tabla 6). En este caso, la solicitud del estudio PGx se realiza en etapas iniciales del diagnóstico o tratamiento junto con otras pruebas diagnósticas complementarias.
- Un tercer grupo de fármacos sin un protocolo clínico bien definido. El genotipado *ad hoc* de BM PGx está disponible pero no incluido en protocolos clínicos. En estos casos, es necesaria una consulta en la unidad para evaluar un problema terapéutico específico y determinar si la realización del estudio está indicada.

Es importante tener en cuenta que esta distribución no es estática. Es decir, un fármaco puede pertenecer a dos grupos distintos en función de su indicación clínica y el protocolo establecido. Además, un mismo fármaco puede cambiar de un grupo a otro, por ejemplo del grupo 3 al grupo 2, una vez se haya establecido un nuevo protocolo coordinado con el servicio clínico peticionario. De este modo, este proceso es dinámico y continuamente en proceso de actualización.

3.1.4.2. Flujo de trabajo en la Unidad de Farmacogenética del HULP

La Figura 7B muestra la organización y estructura desarrollada para la implementación en nuestra Unidad de PGx Clínica. El flujo de análisis seguido hasta la elaboración de la recomendación terapéutica final es multidisciplinar y consta de 6 pasos (Figura 8). Los servicios peticionarios realizan la solicitud para la realización del estudio farmacogenético, incluyendo toda la información clínica del paciente, a la Unidad de PGx Clínica del HULP:

- Para estudios pertenecientes al primer grupo de nuestra clasificación, las muestras se envían directamente al departamento de genética (INGEMM) para la realización del estudio molecular. Posteriormente se realiza un único informe molecular que recoge una interpretación estandarizada de los resultados y que se envía directamente al servicio peticionario a través de la Historia Clínica Electrónica (HCE).
- En aquellos casos en los que se haya pre-establecido un protocolo clínico con los servicios peticionarios para una indicación concreta, al enviar las muestras a la unidad se crea de manera automática una consulta. Tras el análisis genético, un genetista molecular especializado en PGx elabora un informe molecular que es remitido a un

especialista en farmacología clínica para la elaboración de un informe clínico que incluye las recomendaciones terapéuticas individualizadas, teniendo en cuenta la historia clínica del paciente. Este informe clínico es enviado generalmente al especialista peticionario a través de la HCE, sin embargo en el caso de considerarse necesaria es posible concertar una entrevista con el paciente para el asesoramiento genético.

- En el caso de que no se haya desarrollado un protocolo pre-establecido con los servicios de referencia el paciente es referido a la Unidad de PGx para decidir si la realización del estudio PGx está indicada teniendo en cuenta el historial clínico del paciente. En el caso de que el estudio PGx esté indicado, el proceso es el mismo que el que hemos descrito en el segundo punto de este apartado.

A) Clasificación de los estudios PGx propuesta en el HULP

(1) Genotipado anticipado de BM PGx requeridos para la selección de tratamiento según las agencias reguladoras.

HLA-B*57:01/Abacavir/VIH
 ILE28B/PEG-interferón-α/Hepatitis C

(2) Fármacos con un protocolo clínico bien definido para guiar la pauta terapéutica en el tratamiento de patologías concretas.

Azatioprina/TPMT/EII
 Voriconazol/CYP2C19/Aspergillosis en pacientes inmunodeprimidos post-TPH
 Anticoagulantes/CYP2C9, VKORC, CYP4F2, APOE /Riesgo cardiovascular elevado
 etc.

(3) Fármacos sin un protocolo clínico bien definido.

Isotretinoína
 Terapias Biológicas
 Voriconazol/CYP2C19/Otras infecciones fúngicas
 etc.

B) Organización y flujo de trabajo de la Unidad de PGx del HULP

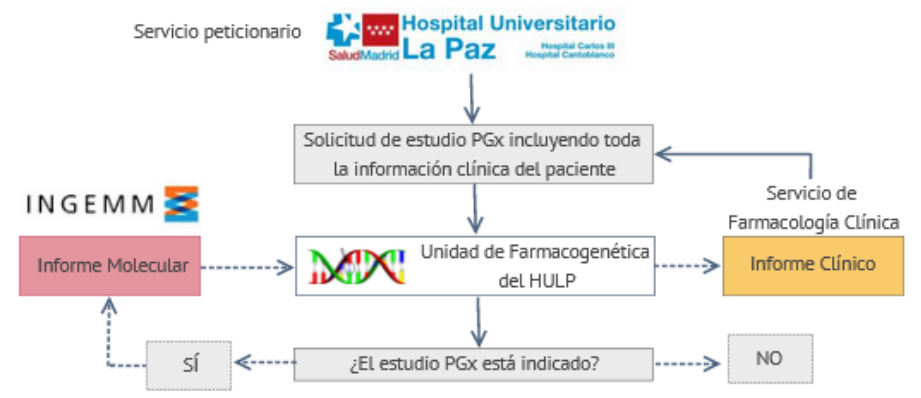


Figura 7. Clasificación de los estudios PGx y flujo de trabajo de la Unidad de Farmacogenética del HULP. Proponemos la siguiente clasificación de los estudios farmacogenéticos para facilitar la gestión y recepción de las muestras: Para los fármacos pertenecientes al grupo (1) en los que el estudio PGx es necesario para la selección de la pauta terapéutica las peticiones se envían directamente al departamento de genética (INGEMM) para la realización del estudio genético. En este caso, se elabora un informe molecular final que se enviará directamente al servicio solicitante para la toma de decisión. En el caso de los grupos (b) y (c) el flujo de trabajo es distinto: Los distintos servicios peticionarios envían su solicitud incluyendo toda la información clínica a la unidad que llevará a cabo la toma de decisión de si está indicada o no la realización del estudio PGx para cada paciente. En el caso de que el estudio PGx esté indicado, se realiza el análisis molecular en el INGEMM y se genera un informe molecular. Teniendo en cuenta los resultados moleculares y la información clínica del paciente se elabora un informe clínico final que incluye las recomendaciones clínicas para cada paciente que se envía a los servicios peticionarios a través de la Historia Clínica Electrónica (HCE). Las recomendaciones clínicas son individualizadas y multifactoriales. Es importante tener en cuenta que los grupos (2) y (3) pueden compartir algunos de los fármacos (p.e., Voriconazol) ya que estos pueden tener un protocolo pre-establecido para una patología concreta pero no para otra.

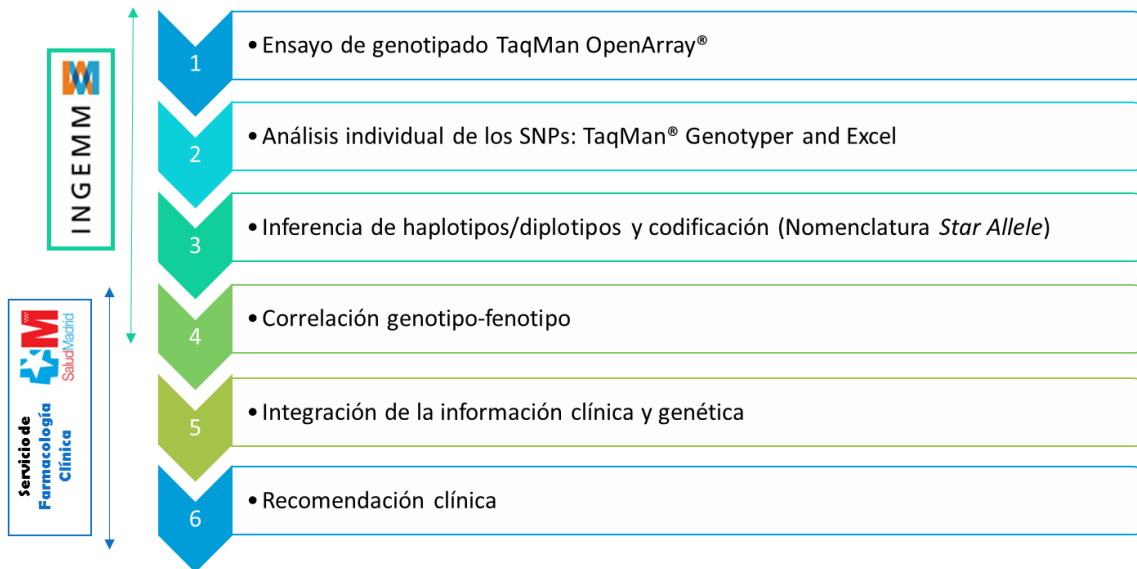


Figura 8. Flujo de análisis seguido en la Unidad de Farmacogenética del HULP. El flujo de análisis desarrollado en nuestra unidad incluye 6 pasos principales realizados por el Servicio de Farmacología Clínica y genetistas moleculares en el INGEMM.

3.1.5. Evaluación del índice de satisfacción (IS) de los pacientes y especialistas de la estrategia de implementación de la farmacogenética en la práctica clínica asistencial desarrollada en el HULP.

La estrategia de implementación desarrollada a lo largo de esta tesis doctoral fue certificada en el año 2015 con el certificado ISO9001:2008. Además, se evaluó el índice de satisfacción (IS) de los pacientes y los especialistas que solicitaban los estudios a través de encuestas que incluían preguntas dicotómicas (sí/no), multi-respuesta y numéricas. El IS se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$GS (\%) = ((n1 * 1 + n2 * 2 + n3 * 3 + n4 * 4 + n5 * 5) / N_{\text{total}} * 5) * 100$$

1. Muy pobre; 2. Pobre; 3. Aceptable; 4. Bueno; 5. Muy bueno.

3.1.6. Estimación de los costes asociados con la estrategia de implementación.

Realizamos también una estimación de los costes asociados a nuestra actividad para el SNS por paciente. Para ello se tomaron los precios públicos publicados en la ORDEN 727/2017, del 7 de Agosto, del Consejero de Sanidad por la que se fijan los precios públicos por la prestación de los servicios y actividades de naturaleza sanitaria de la red de centros de la Comunidad de Madrid.

3.2. Bloque II. Implementación en la rutina clínica de una estrategia para la individualización del tratamiento con Voriconazol basada en el genotipado anticipado de CYP2C19 y monitorización de niveles plasmáticos.

En la segunda parte de esta tesis doctoral se evaluarán los resultados obtenidos tras la aplicación de un protocolo desarrollado en el año 2017 por la Unidad de PGx del HULP para la individualización del tratamiento/profilaxis con VCZ en pacientes hematológicos pre-TPH.

3.2.1. Desarrollo de una estrategia para la individualización terapéutica de Voriconazol en el HULP.

La Figura 9 muestra el protocolo clínico desarrollado en colaboración con los servicios de hemato-oncología infantil y hemato-oncología del HULP ya que se define como población de riesgo pacientes hematológicos que van a ser sometidos a TPH y con un riesgo elevado de desarrollar IFIs y que con alta probabilidad recibirán tratamiento/profilaxis con VCZ.

Nuestra estrategia está basada en la combinación de la PGx y TDM: Por un lado en el genotipado anticipado de *CYP2C19* para la optimización de la dosis de inicio y posteriormente TDM con medidas rutinarias con el fin de (a) aumentar el porcentaje de pacientes en rango terapéutico en los primeros días de tratamiento y (b) reducir el tiempo necesario para alcanzar concentraciones terapéuticas durante el tratamiento/profilaxis con VCZ.

3.2.2. Pacientes incluidos y desarrollo del estudio.

Este protocolo se aplicó en una cohorte de 28 pacientes inmunodeprimidos con patologías hematológicas que iban a ser sometidos a un TPH y que posteriormente recibieron tratamiento/profilaxis con VCZ (Figura 9). Todos los pacientes eran pediátricos, entre 1 y 18 años de edad. Todos los participantes proporcionaron consentimiento informado a través de sus tutores legales. Para el análisis de estos datos se solicitó la aprobación del Comité Ético de Investigación con medicamentos (CEIm) del Hospital Universitario La Paz (PI 2915; ANEXO D)

En las etapas iniciales previas al TPH se solicita el estudio PGx para el genotipado de *CYP2C19* de forma que los resultados moleculares estén disponibles a través de la historia clínica electrónica en el momento de la prescripción. En el estudio se incluyeron únicamente los pacientes que recibieron finalmente VCZ, tanto como profilaxis como en tratamiento. El primer nivel de concentración plasmática de VCZ se obtiene en los primeros 5 días desde la administración del fármaco siguiendo las recomendaciones de la *British Society for Medical Mycology* (100). Posteriormente, se irán determinando concentraciones plasmáticas de VCZ hasta alcanzar concentraciones estables dentro del rango terapéutico establecido (1-5,5 µg/ml) o

hasta el fin del tratamiento o la profilaxis. La duración estimada de la profilaxis es de 100-180 días y la del tratamiento hasta la remisión completa de la IFI.

3.2.3. Estudio Farmacogenético.

En los 28 pacientes incluidos en el estudio se realizó el análisis molecular para los siguientes SNPs de CYP2C19: rs4244285 (c.681G>A), rs4986893 (c.636G>A), rs12248560 (c.-806C>T), rs28399504 (c.1A>G), rs56337013 (c.1297C>T), rs72552267 (c.395G>A), rs72558186 (c.819+2T>A) and rs41291556 (c.358T>C) mediante la plataforma de diseño propio PharmArray® (Tabla 3). Posteriormente se realizó la inferencia de los diplotipos y la codificación utilizando la nomenclatura *Star Allele* (*) empleando los Haplotype Set IDs proporcionados por PharmGKB (22) y PharmVar (PA166128323) (19). La inferencia de los fenotipos se realizó empleando las tablas de funcionalidad CPIC (PA166124411) así como las guías clínicas específicas (41). El informe molecular final se integró en la HCE de cada paciente.

3.2.4. Modificación de la dosis de inicio estándar de Voriconazol en base a los resultados PGx.

En el año 2015, Hicks et al. realizaron una revisión retrospectiva en pacientes inmunodeprimidos con cáncer en tratamiento/profilaxis con VCZ en el hospital St.Jude Children's Research en la que propusieron que la modificación de la pauta terapéutica estándar de inicio de VCZ en base al genotipo de *CYP2C19* permite aumentar el porcentaje de pacientes que alcanzan concentraciones terapéuticas de VCZ en los primeros días (48).

Hicks et al. realizaron una primera aproximación en la que calcularon el porcentaje de pacientes de su cohorte que alcanzaba concentraciones terapéuticas de VCZ empleando dosis estándar (Tabla 7A); en el grupo de pacientes portadores de al menos un alelo CYP2C19*17 (RM o UM), relacionado con un aumento de la actividad enzimática, el porcentaje de pacientes que alcanzaba concentraciones terapéuticas de VCZ era más bajo que en otros grupos fenotípicos. Por otro lado, las concentraciones plasmáticas de VCZ en pacientes portadores de un alelo CYP2C19*2, asociado a una disminución de la actividad enzimática, eran generalmente más elevadas. Teniendo en cuenta estas observaciones este grupo desarrolló entonces una segunda aproximación que consistió en una simulación informática en la que estimaron una dosis diaria extrapolada de VCZ para cada grupo fenotípico de CYP2C19 que permitiese aumentar el número de pacientes dentro de rango terapéutico (Tabla 7B). Los resultados obtenidos en este estudio con el protocolo de dosificación estándar (sin PGx) así como los resultados obtenidos en la simulación (con dosis extrapoladas basadas en PGx) fueron empleados como comparadores para evaluar la eficacia de nuestra estrategia combinada.

Las recomendaciones para la modificación de la dosis estándar de inicio en nuestro protocolo se muestran en la Figura 9 y están basadas principalmente en las dosis extrapoladas calculadas por Hicks et al. (48) así como en las recomendaciones proporcionadas por las guías clínicas CPIC (41). Sin embargo, en base a nuestra propia experiencia en estudios previos, nuestro protocolo incluye una modificación adicional en pacientes CYP2C19*1/*17 ≥ 12 años. En estos pacientes, en la simulación realizada por Hicks et al. se propone administrar la dosis estándar (14mg/kg/día), sin embargo en nuestro protocolo recomendamos una dosis de inicio de 26mg/kg/día. En pacientes CYP2C19*1/*2, al igual que en los CYP2C19*1/*1 y *2/*17 (IM), se recomendó la administración de la dosis estándar de inicio en ambos grupos de edad tal y como indican las guías CPIC.

3.2.5. Estudio Farmacocinético.

Las determinaciones séricas de VCZ se realizaron en el laboratorio de monitorización terapéutica de fármacos del Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario La Paz mediante una técnica de inmunoensayo enzimático en la plataforma DIMENSION® EXL 200 (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). Los límites de cuantificación de la técnica son 0,7 y 16 $\mu\text{g/ml}$ (límite inferior y límite superior, respectivamente). Las muestras de sangre periférica se enviaron siguiendo el procedimiento clínico habitual para muestras del hospital. La primera determinación se tomó en los primeros 5 días tras el inicio del tratamiento. En aquellos pacientes que no alcanzaron niveles terapéuticos en los primeros 5 días se tomaron medidas periódicas hasta conseguir niveles. El rango terapéutico diana se estableció en 1-5,5 $\mu\text{g/ml}$. Siguiendo la práctica clínica habitual las extracciones sanguíneas (concentraciones valle) se realizaron 5 minutos antes de la dosis de la mañana.

Diplotipo <i>CYP2C19</i>	(A) % de pacientes en rango <i>Resultados del estudio con dosis estándar</i>	(B) % de pacientes en rango <i>Simulación con dosis extrapoladas</i>
Todos los pacientes	42%	60%
CYP2C19*17/*17	<12 años; 14mg/kg/día 0%	<12 años; 36mg/kg/día 50%
	≥ 12 años; 400mg/día 0%	≥ 12 años; 28mg/kg/día 100%
CYP2C19*1/*17	<12 años; 14mg/kg/día 21%	<12 años; 30mg/kg/día 52%
	≥ 12 años; 400mg/día 57%	≥ 12 años; 14mg/kg/día * ¹ 57%
CYP2C19*1/*1	<12 años; 14mg/kg/día 51%	<12 años; 20mg/kg/día 54%
	≥ 12 años; 400mg/día 36%	≥ 12 años; 14mg/kg/día 36%
CYP2C19*1/*2	<12 años; 14mg/kg/día 65%	<12 años; 18mg/kg/día* ² 88%
	≥ 12 años; 400mg/día 63%	≥ 12 años; 10mg/kg/día* ² 63%
CYP2C19*2/*2	<12 años; 14mg/kg/día NA	<12 años; 30mg/kg/día NA
	≥ 12 años; 400mg/día 100%	≥ 12 años; 14mg/kg/día 100%

Tabla 7. Porcentaje de pacientes que alcanza el rango terapéutico diana de VCZ reportados en el estudio de Hicks et al. (48) (A) Muestra los resultados obtenidos en su cohorte de estudio con dosis estándar de VCZ (14mg/kg/día en pacientes <12 años y 400mg/día en pacientes ≥ 12 years old); (B) muestra los resultados de la simulación informática con dosis extrapoladas. El rango terapéutico se estableció con concentraciones de 1-5,5 µg/ml tras 5 días de tratamiento/profilaxis con VCZ. ND: No disponible. *^{1,2}: A pesar de que las recomendaciones clínicas de ajuste de dosis de inicio de VCZ de nuestro protocolo están basadas principalmente en estos resultados, en base a nuestra experiencia recomendamos también una dosis estándar de inicio de 26mg/kg/día (en lugar de 14mg/kg/día) en RM adultos. En los pacientes CYP2C19*1/*2 se recomienda la dosis estándar de inicio en ambos grupos de edad.

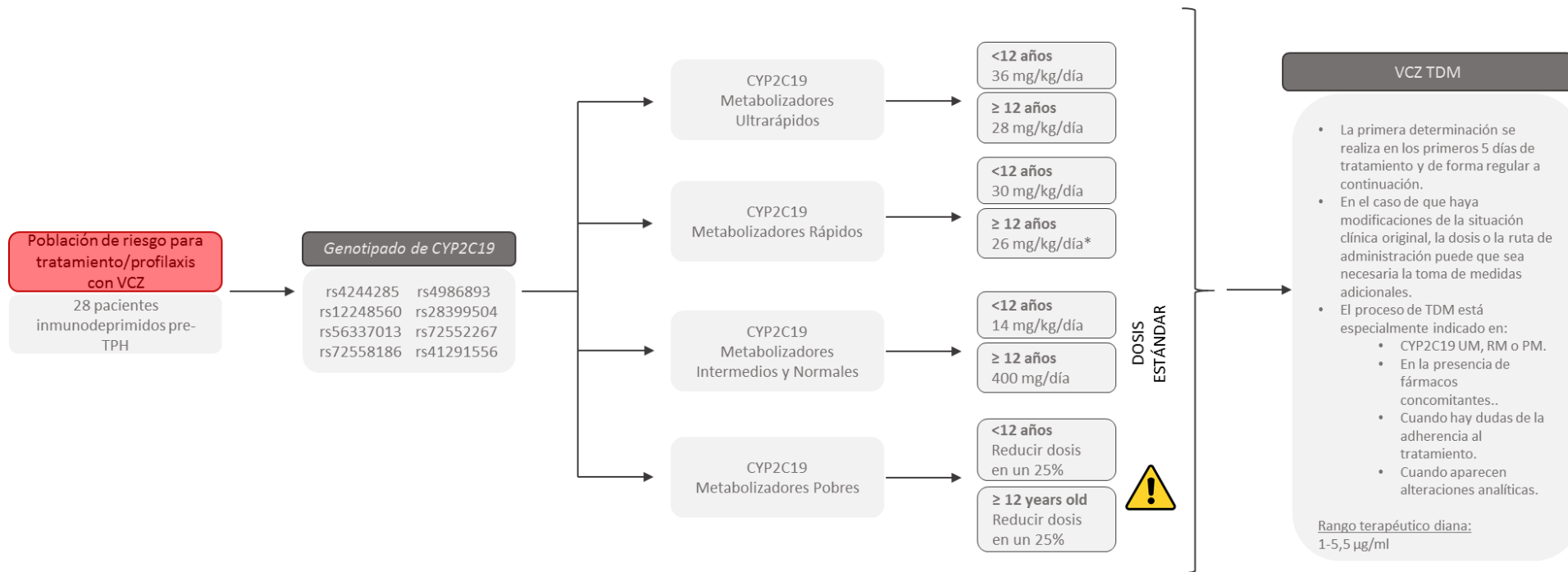


Figura 9. Estrategia implementada en la Unidad de PGx Clínica del HULP para la individualización del tratamiento con VCZ en 2017. Los ajustes de dosis basados en la información PGx están basados en las dosis extrapoladas obtenidas en el estudio de Hicks et al. (48) así como la guía clínica CPIC (41) excepto el ajuste de dosis de RM ≥12 años (*), basados en observaciones realizadas en nuestro hospital (Hicks et al. (48) proponen dosis estándar en estos pacientes). En PM se recomiendan controles estrictos cada 24 h, ya que el riesgo de toxicidad es elevado. Si se detectan RAM, seleccionar un agente alternativo. Las recomendaciones de la técnica de TDM están basadas en las guías de la *British Society for Medical Mycology* (100).

3.3. Bloque III. Identificación de nuevas asociaciones farmacogenéticas que permitan mejorar los algoritmos clínicos monogénicos existentes.

3.3.1. Modelos predictivos de la farmacocinética de Voriconazol basados en farmacogenética: Estudio observacional anidado a 3 ensayos de bioequivalencia de dos formulaciones de Voriconazol 200 mg en población española.

En este apartado se describirán los resultados de un estudio observacional anidado a 3 ensayos de bioequivalencia de dos formulaciones de VCZ en 106 individuos de población española realizado en el Hospital Universitario La Paz y La Princesa en Madrid (EUDRA-CT: 2012-004029-26; 2014-001964-36, 2014-005342-22), con el fin de: (1) Evaluar la contribución adicional de la variabilidad PGx en otros biomarcadores distintos a CYP2C19 en el perfil FC de VCZ; y (2) Estudiar si la creación de algoritmos de predicción poligénicos puede ayudar en la optimización de las recomendaciones de tratamiento con VCZ basadas en el genotipo de CYP2C19.

3.3.1.1. Pacientes

Estudio observacional anidado a 3 ensayos clínicos aleatorizados cruzados para evaluar la bioequivalencia de 2 formulaciones de VCZ 200 mg. Se incluyeron 106 voluntarios sanos de población española. Todos los participantes proporcionaron su consentimiento por escrito previo al inicio del estudio y tras recibir información oral y escrita de los objetivos, características, procedimientos, riesgos y derechos relacionados con su participación en el estudio. Los ensayos clínicos han sido aprobados por los CEIC del Hospital Universitario La Paz (2012-004029-26) y del Hospital Universitario La Princesa (2014-001964-36, 2014-005342-22; ANEXO I). La bioequivalencia de las dos formulaciones se demostró en todos los estudios para AUC, siguiendo los criterios aceptados por las agencias reguladoras europeas. De este modo, ambas formulaciones fueron incluidas en los análisis.

3.3.1.2. Estudio Farmacocinético

Se recogieron muestras de sangre venosa (3ml) en tubos EDTA a tiempo 0, 0.33 h, 0.67 h, 1 h, 1.33 h, 1.67 h, 2 h, 2.33 h, 2.67 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 24 h (± 1 h) and 32 h (± 1 h) (o 36h en función del estudio) tras la administración del fármaco. La medición de VCZ y de un control interno se realizó por HPLC en fase reversa acoplada a un detector de espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS) en un laboratorio certificado acorde siguiendo los criterios aceptados por la EMA para estudios de bioequivalencia y biodisponibilidad. El límite mínimo de detección fue 5,03ng/ml. El análisis FC se realizó empleando el programa informático WinNonlin 6.3 software (Pharsight Corporation, Cary, NC, USA) siguiendo un análisis no compartimental.

La concentración máxima (C_{\max}) y el tiempo en alcanzarla (T_{\max}) se obtuvieron directamente de los resultados de concentración plasmática. El $AUC_{0-\infty}$ (área total bajo la curva de concentración-tiempo; ng/ml*h) se calculó mediante la suma de dos AUCs parciales: (a) El AUC_{last} , área entre el tiempo de dosificación y el último momento con concentraciones plasmáticas detectables, calculada por la regla trapezoidal; y (b) $AUC_{t-\infty}$, calculada como el ratio C/k , en el cual C es la última concentración detectable y k la pendiente obtenida en la recta de regresión lineal calculada entre los puntos correspondientes a la fase de eliminación del fármaco. Los datos FC se transformaron logarítmicamente; C_{\max} y el AUC fueron ajustados según el peso y dosis administrada en cada paciente.

3.3.1.3. Estudio Farmacogenético

En los 106 pacientes incluidos en el estudio se llevó a cabo el genotipado de los siguientes SNPs (Tabla 8): rs4244285, rs4986893, rs12248560 y rs28399504 en *CYP2C19*; rs2032582 y rs1045642 en *ABCB1*; rs55785340, rs4646438, rs2740574 y rs35599367 en *CYP3A4*; rs776746, rs55965422, rs10264272, rs41303343 y rs41279854 en *CYP3A5*, rs1799853 y rs1057910 en *CYP2C9*; rs1057868 y rs2868177 en *POR*; rs3814055 en *NR1I2* y rs1800822, rs2266782 y rs909530 en *FMO3*, mediante la plataforma de diseño propio PharmArray® descrita en el apartado anterior (Tabla 3). Aquellos SNPs no incluidos en el diseño del *array* (rs2740574, rs35599367, rs3814055 y los SNPs de *FMO3* rs2266782 y rs909530) se genotiparon mediante secuenciación Sanger. Tras la inferencia de los diplotipos se llevó a cabo la codificación siguiendo la nomenclatura *Star* (*) *Allele* utilizando los *Haplotype Set ID* proporcionados por PharmGKB (22) y PharmVar (19): *CYP3A5* (PA165980507), *CYP3A4* (PA165980506), *CYP2C19* (PA166128323) y *CYP2C9*. Los fenotipos enzimáticos de *CYP2C19* fueron inferidos empleando las tablas de funcionalidad CPIC (PA166124411) y las guías clínicas específicas (41).

3.3.1.4. Estudio Estadístico

Los estadísticos descriptivos de las variables continuas se presentan como mínimo, máximo, desviación estándar (DE) y media. Se evaluó el efecto de distintos factores en estas variables con un test no paramétrico. Las variables cualitativas y los factores se presentan en términos de frecuencia y tablas de contingencia. Se empleó la prueba exacta de Fisher para determinar la asociación entre los factores. Los análisis estadísticos se centraron en el $AUC_{0\infty}$, transformado mediante un logaritmo decimal tras su corrección por dosis y peso.

La primera aproximación consistió en el diseño de un modelo predictivo basado en la literatura previa y las guías clínicas para el ajuste de dosis de VCZ en base al genotipo de *CYP2C19*. Para ello, ajustamos un modelo lineal de medidas repetidas (101), en el que cada individuo es

considerado como aleatorio bajo criterios de información Akaike (AIC) mínimos (102), mediante la eliminación automática hacia atrás de todos los efectos (edad, sexo, altura, peso, BMI y fenotipo de CYP2C19) de un modelo de efecto lineal mixto incluyendo exclusivamente el fenotipo de CYP2C19. Este modelo monogénico representa el modelo establecido en las guías clínicas (que basan sus recomendaciones únicamente en el genotipo de *CYP2C19*) y será utilizado como referencia para su comparación con otros modelos desarrollados a lo largo de este trabajo.

Posteriormente se calculó el coeficiente de determinación (R^2 o Rsq) mediante las aproximaciones de Edwards y Jaeger con el programa informático *R package r2glmm* (103, 104). Este dato nos proporciona información de la bondad de ajuste del modelo. Además, calculamos la raíz media del error estándar de predicción (RMSEP) (105), como una medida de la capacidad de predicción del modelo:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_1^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}}$$

Donde y_i es el valor observado, \hat{y}_i el valor predicho, y n , el número de observaciones.

A continuación se realizó una validación cruzada del modelo de referencia en dos sets, donde los 4 UM para CYP2C19 fueron asignados aleatoriamente en los sets. Se realizaron 100 réplicas con ambos sets. No se incluyeron los PM en la validación ya que sólo encontramos dos individuos con este fenotipo en nuestra cohorte.

Con el fin de detectar otras posibles variables de interés para la predicción de VCZ $AUC_{0\infty}$ desarrollamos un modelo basado en SNPs y otras variables demográficas (en lugar de los fenotipos de CYP2C19) mediante la selección de las variables bajo criterios de AIC mínimo. El modelo desarrollado se denominó “Modelo basado en SNPs”. Se calculó el R^2 general del modelo así como la contribución parcial de cada variable. También se obtuvo el RMSEP.

Las computaciones estadísticas se realizaron empleando los programas informáticos R y RStudio. El paquete de R lme4 se empleó para los modelos de medidas repetidas y el cálculo del desequilibrio de Hardy-Weinberg. Se consideraron significativos valores de p menores a 0,05. Por la tasa de falsos descubrimientos se consideran significativos valores de p menores a 0.0316.

Gen	#rs	cDNA	Proteína	MAF	Codificación Star (*) Allele	Actividad Enzimática
<i>CYP2C19</i>	rs4244285	c.681G>A	p.P227P	0.22 A	CYP2C19*2	Reducida o ausente
	rs4986893	c.636G>A	p.W212X	0.01 A	CYP2C19*3	Reducida o ausente
	rs28399504	c.1A>G	p.M1L	<0.01 G	CYP2C19*4	Reducida o ausente
	rs12248560	c.-806C>T	-	0.15 T	CYP2C19*17	Reducida Incrementada
<i>CYP3A4</i>	rs2740574	c.-392C>A	-	0.23 C	CYP3A4*1B	Incrementada
	rs35599367	c.522-191 C>T	-	0.01 A	CYP3A4*22	Reducida
	rs4646438	c.827_828insA	p.B277Efs	<0.01	CYP3A4*6	Reducida
	rs55785340	c.664T>C	p.S222P	<0.01 G	CYP3A4*2	Reducida
<i>CYP3A5</i>	rs776746	c.219-237A>G	-	0.38 T	CYP3A5*3	Reducida
	rs55965422	c.432+2T>C	-	<0.01 G	CYP3A5*5	Indeterminada
	rs10264272	c.624G>A	Splicing	0.04 T	CYP3A5*6	Ausente
	rs41303343	c.1035_1036insT	p.T346Y	0.03 A	CYP3A5*7	Ausente
	rs41279854	c.1337T>C	p.F333S	<0.01 G	-	Indeterminada
<i>CYP2C9</i>	rs1799853	c.430C>T	p.R144C	0.05 T	CYP2C9*2	Reducida
	rs1057910	c.1075A>C	p.I359L	0.05 C	CYP2C9*3	Reducida
<i>POR</i>	rs1057868	c.1508C>T	p.A503V	0.29 T	POR*28	CYP3A incrementado
	rs2868177	c.188+6405A>G	-	0.40 G	-	Indeterminada
<i>NR1I2</i>	rs3814055	c.-1570C>T	-	0.32 T	-	CYP3A4 reducido
<i>FMO3</i>	rs1800822	c.441C>T	p.S147=	0.14 T	-	Incrementada
	rs909530	c.855C>T	p.N285=	0.33 T	-	Incrementada
<i>ABCB1</i>	rs2032582	c.2677T>G	p.S893A	0.33 A	-	-
	rs1045642	c.3435T>C	p.I1145=	0.40 A	-	-

Tabla 8. Revisión de los BM más relevantes en asociación con la FC de VCZ. *NCBI RefSeq*: *CYP2C19* (NM_000769; NP_000760); *CYP3A4* (NM_017460; NP_059488); *CYP3A5* (NM_000777; NP_000768); *CYP2C9* (NM_000771; NP_000762); *POR* (NM_000941; NP_000932); *NR1I2* (NM_022002; NP_071285); *FMO3* (NM_001002294; NP_001002294); *ABCB1* (NM_000927; NP_000918). Abreviaturas: MAF (*Minor Allele Frequency*).

3.3.2. Influencia de *ABCB1* y *POR* en la FC de Tacrolimus oral en pacientes pediátricos estables post-trasplante renal.

En este apartado se describirán los resultados de un estudio observacional anidado a un ensayo clínico de bioequivalencia de conversión de Prograf a Advagraf (dos formulaciones de TAC oral) en pacientes pediátricos en el Hospital Universitario La Paz (EUDRA-CT: 2009-017600-89) (106) para analizar la influencia de SNPs en *CYP3A5*, *ABCB1* y *POR* en la FC de TAC oral y tratar de describir un método poligénico sencillo de predicción de su perfil FC.

3.3.2.1. Pacientes

Se incluyeron 21 pacientes pediátricos que habían sido sometidos a trasplante renal y con tratamiento inmunosupresor basado en TAC estable. Todos los pacientes fueron trasplantados en el Hospital Universitario La Paz en Madrid. Todos los tutores legales proporcionaron su consentimiento informado específico para el estudio. El ensayo clínico fue aprobado por el CEIC del Hospital Universitario La Paz (ANEXO I).

Los pacientes continuaron normalmente con sus dosis establecidas de TAC y se les realizó el cambio de Prograf a Advagraf siguiendo una relación diaria de dosis 1:1 (mg:mg). Se obtuvieron los perfiles FC a las 24 horas de Prograf y Advagraf 7 días después de la administración. En los primeros 7 días los pacientes recibieron Prograf y posteriormente cambiaron a Advagraf.

Todos los pacientes incluidos en el estudio tenían una función renal estable, habían seguido dosis estables de TAC en los últimos 30 días y ninguno de ellos había tenido cambio en medicaciones concomitantes que podrían modificar el perfil FC de TAC.

3.3.2.2. Estudio Farmacocinético

Se recogieron muestras de sangre venosa (3ml) antes del inicio del tratamiento con Advagraf y 0.5h, 1h, 1.5h, 2h, 2.5h, 3h, 4h, 6h, 8h, 12h, 15h y 24h tras la ingesta. La medición de niveles de TAC se realizó por la técnica de inmunoensayo enzimático en la plataforma DIMENSION® EXL 200 (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). Los límites inferior y superior de cuantificación fueron 2 y 30 ng/ml respectivamente. El análisis FC se realizó empleando el programa informático WinNonlin 6.3 software (Pharsight Corporation, Cary, NC, USA) siguiendo un análisis no compartimental. Se obtuvieron los valores de AUC_{0-24h} , C_{max} y C_{min} .

3.3.2.3. Estudio Farmacogenético

En los 21 pacientes incluidos en este estudio se llevó a cabo el genotipado de los siguientes SNPs: rs776746 (c.219-237A>G; *CYP3A5**3) en *CYP3A5*, rs1045642 (c.343C>T) en *ABCB1* y rs1057868 (c.1508C>T; *POR**28) y rs2868177 (c.188+6405A>G) en *POR*. El genotipado se

realizó mediante RT-PCR utilizando sondas TaqMan comerciales individuales siguiendo las especificaciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). En estos pacientes la extracción del ADN de las muestras se realizó empleando el kit comercial QuickGene DNA Whole Blood Kit S en un extractor semiautomático QuickGene-810 (Fijifilm Corporation, Tokyo, Japan).

3.3.2.4. Estudio Estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa informático IBM SPSS Statistics 19.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Las diferencias entre grupos de genotipos para cada variante se analizaron mediante la prueba no-paramétrica de Jonckheere-Terpstra. Se consideraron significativos valores de p menores a 0,05. No se realizaron ajustes para comparaciones múltiples.

Posteriormente se llevó a cabo regresión lineal multivariante para analizar el impacto de las variables clínicas, demográficas, medicación concomitante además de los genotipos para los SNPs analizados en la variabilidad interindividual en los parámetros FC de Advagraf. El AUC_{0-24h} , C_{max} y C_{min} se ajustaron al peso y dosis de cada paciente.

3.3.2.5. Puntuación o “Score” Genético

Tras la inferencia del diplotipo y fenotipo de cada BM, y con el fin de simplificar el análisis, se construyó un “score” genético basado en los fenotipos obtenidos para cada BM. Con el fin de evaluar el impacto de SNPs en *CYP3A5* en los distintos parámetros FC se subdividió la población de estudio en 2 grupos según el fenotipo inferido de *CYP3A5*, tal y como está establecido en las guías clínicas: *CYP3A5*-expresadores (N=4), incluyendo aquellos individuos portadores de al menos un alelo que codifica una proteína de actividad normal (*CYP3A5**1/*3 o *CYP3A5**1/*1) y *CYP3A5*-no expresadores (N=17), incluyendo individuos portadores de dos alelos no funcionales (*CYP3A5**3/*3). Debido al pequeño tamaño muestral, la contribución de variantes en *ABCB1* y *POR* en la FC de TAC se pudo evaluar exclusivamente en el grupo de *CYP3A5*-no expresadores (N=17).

Para evaluar el efecto adicional de otros BM no incluidos hasta la fecha en los algoritmos clínicos, se generó un score genético aditivo basado en los genotipos de los SNPs analizados en *ABCB1* (rs1045642) y *POR* (rs1057868 y rs2868177). Se delimitaron 3 grupos genéticos para la construcción del “score”: Un grupo incluyendo individuos en los que todos los SNPs presentaban un genotipo *wild type* (se les asignó el valor 0, referencia), un segundo grupo incluyendo individuos con uno o dos variantes en *POR* y *ABCB1* *wild type* (se les asignó el valor 1) y un tercer grupo con 3 variantes en *POR* y *ABCB1* (se les asignó el valor 2). Las diferencias entre grupos se asignaron con la prueba no-paramétrica de Jonckheere-Terpstra.

3.3.2.6. Construcción de modelos

Se construyeron dos modelos de regresión lineal. Un modelo incluyendo todos los pacientes (N=21) y un segundo modelo incluyendo exclusivamente al grupo de CYP3A5-no expresadores (CYP3A5*3/*3; N=17). Se fueron incluyendo por pasos variables genéticas y no genéticas (etnia, peso, altura, edad, sexo, índice de masa corporal (IMC), área de superficie corporal (ASC), hemoglobina, hematocrito, albúmina y medicación concomitante). También se realizó el análisis por pasos hacia atrás. Con el fin de evaluar la precisión del modelo se calculó el AUC_{0-24} y C_{min} ajustado al peso y dosis en cada paciente y se compararon con los reales determinando el error medio, el error medio absoluto y el error medio absoluto como porcentaje del valor real. Todos los modelos se construyeron utilizando el AUC_{0-24} , C_{max} y C_{min} ajustados al peso y dosis con transformación logarítmica de los datos con el fin de asegurar una distribución normal de las variables dependientes. Estos mismos procedimientos se realizaron con Prograf previo a la conversión a Advagraf.

4. Resultados

4.1. Bloque I. Estrategias para la implementación de la farmacogenética en la práctica clínica asistencial: Unidad de PGx Clínica del HULP.

Estos resultados fueron publicados en el año 2017 (ANEXO III): “*Clinical Implementation of Pharmacogenetic Testing in a Hospital of the Spanish National Health System: Strategy and Experience Over 3 years*” Alberto M. Borobia, Irene Dapía, Hoi Y. Tong, Pedro Arias, Mario Muñoz, Jair Tenorio, Rafael Hernández, Irene García, Gema Gordo, Elena Ramírez, Jesús Frías, Pablo Lapunzina and Antonio J. Carcas. *Clin Transl Sci* (2017) 00, 1–10. doi:10.1111/cts.12526. PMID: 29193749

4.1.1. Actividad de la Unidad de Farmacogenética del HULP de 2014 a 2018.

En el año 2017 se publicaron los datos de actividad de nuestra unidad en el primer período (2013-2016; ANEXO III). En este apartado, se presentan los datos actualizados hasta 2018.

La Figura 10 muestra los resultados de la actividad de nuestra unidad en el período 2013-2018. Se han realizado un total de 3532 estudios; 2639 fueron para el genotipado anticipado de BM PGx requeridos para la selección del tratamiento según las agencias reguladoras, Grupo (1) de estudios PGx (Figura 7): 77,98% para HLA-B:57*01 y 22,02% para *ILE28B*. En estos casos se realizó el estudio molecular directamente ya que no era necesaria una evaluación clínica previa. Aproximadamente el 6% de los pacientes analizados para HLA-B*57:01 presentaba un perfil molecular asociado a un riesgo elevado de desarrollar reacciones cutáneas de hipersensibilidad (Síndrome de Steven Johnson o Necrólisis Epidérmica Tóxica; SJS/TEN) tras el tratamiento con Abacavir; y por tanto la selección de un tratamiento farmacológico alternativo estaba recomendada. Además, alrededor del 60% de los pacientes analizados para el rs12979860 en el gen *IL28B* previo a la administración de PEG-interferón- α mostraba un perfil molecular asociado a baja respuesta a este tipo de regímenes de tratamiento. Debido a la aparición de tratamientos alternativos para la Hepatitis C más eficaces y seguros, el número de estudios PGx para el gen *IL28B* ha ido disminuyendo progresivamente.

Por otro lado se han realizado un total de 893 estudios PGx pertenecientes a los grupos (2) y (3) de nuestra clasificación (Figura 7) mediante las plataformas de genotipado PharmArray® y CliniPharmArray®. Los protocolos de genotipado de *TPMT* y *MTHFR* previos a la administración de Tiopurinas y Metotrexate son los más solicitados, generalmente en combinación (60,25%). En nuestra cohorte de población española encontramos que alrededor de un 13% de los pacientes presentan un perfil molecular en el gen *TPMT* para el cual está recomendada la modificación de la pauta terapéutica estándar y un 58% presentaron un perfil molecular en *MTHFR* asociado con un elevado riesgo de toxicidad a Metotrexate y por tanto la revisión de las pautas terapéuticas estándar estaban también indicadas.

Por otro lado, en los últimos años ha aumentado notablemente el número de estudios PGx previos a la administración de Inmunosupresores (16,35% frente a 6,7% en 2016) o Voriconazol

(8,73% frente a 2,3% en 2016). En nuestra cohorte, un 21% y un 24% de los pacientes genotipados previo a la administración de Inmunosupresores y Voriconazol respectivamente mostraban un perfil molecular asociado a modificaciones de las pautas terapéuticas estándar para cada fármaco. También se aplicaron los protocolos para los estudios PGx de Fluoropirimidinas y Acenocumarol, aunque de forma menos frecuente (2,24% y 2,58% respectivamente).

Finalmente, alrededor del 9% de los estudios realizados fueron para fármacos del grupo (3), sin un protocolo clínico pre-establecido con los servicios de referencia generalmente para antiepilépticos, antipsicóticos y antidepresivos entre otros. En estos casos, se evaluó cada caso de manera individualizada para la elaboración de un protocolo de genotipado específico teniendo en cuenta el protocolo de tratamiento y la historia clínica de cada paciente.

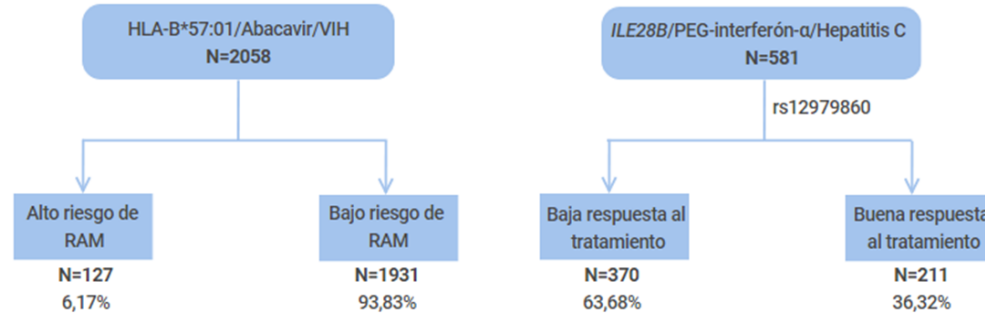
4.1.2. Evaluación del índice de satisfacción (IS) de los pacientes y especialistas de la estrategia de implementación de la farmacogenética en la práctica clínica asistencial desarrollada en el HULP.

En el período de 2015 a 2016 se evaluó el IS de alrededor del 12% de los pacientes atendidos en la Unidad de PGx Clínica del HULP desde su creación. Además, se evaluó la opinión de especialistas de diversas especialidades (19 médicos de 9 especialidades) sobre la PGx y su potencial utilidad en la rutina clínica de su especialidad. Las preguntas y resultados de ambas encuestas se muestran en la Tabla 9.

4.1.3. Estimación de los costes asociados con la actividad de la Unidad de Farmacogenética del HULP.

El coste estimado de cada paciente estudiado en la Unidad de Farmacogenética Clínica del HULP para el SNS varía en función del proceso aplicado. El coste en aquellos pacientes que asisten a una primera consulta con un farmacólogo clínico especializado en PGx y en los que se decide que la realización del estudio PGx no está indicada es de 115 euros. El genotipado del alelo HLA-B*57:01 y del rs12979860 en *ILE28B* incluyendo el informe molecular (Grupo 1 de estudios PGx; Figura 7) tiene un coste de 50 y 80 euros respectivamente. Por otro lado, en aquellos pacientes para los que exista un protocolo clínico bien definido con los servicios clínicos de referencia, y que por tanto son remitidos directamente para la realización del estudio PGx (Grupo 2; Figura 7), el coste del estudio incluyendo el genotipado y los informes clínico y molecular es de 101 euros (SNP-array-30 euros e informe-71 euros). Finalmente, el coste del proceso completo incluyendo la primera consulta, el ensayo de genotipado, la realización de los informes clínico y molecular así como una consulta sucesiva para la entrega de resultados es de 216 euros.

(1) Genotipado anticipado de BM PGx requeridos para la selección de tratamiento según las agencias reguladoras.



(2) Fármacos con un protocolo clínico bien definido para guiar la pauta terapéutica en el tratamiento de patologías concretas.

(3) Fármacos sin un protocolo clínico bien definido.

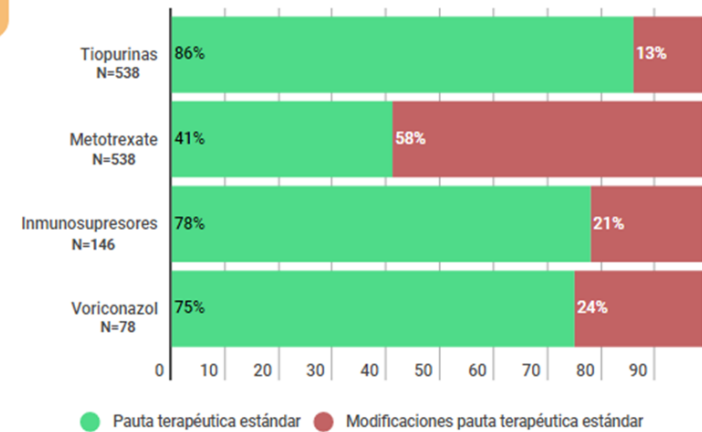
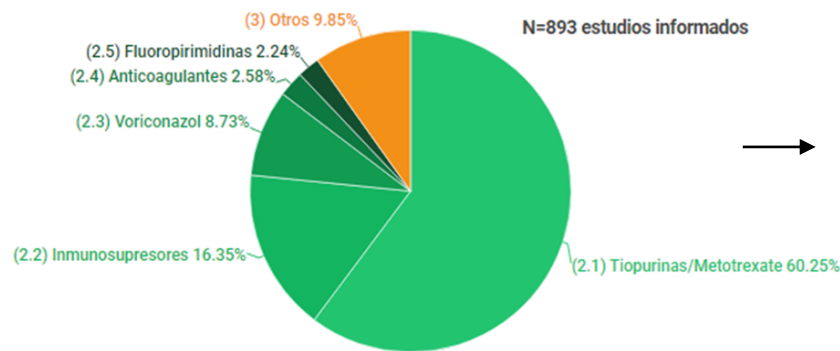


Figura 10. Distribución de los 3532 estudios PGx realizados e informados en la Unidad de Farmacogenética del HULP (2013-2018) según el tipo de estudio PGx. Se muestra el porcentaje de pacientes en los que la modificación de la pauta terapéutica estándar estaba recomendada según los resultados moleculares para los estudios más frecuentes: Tiopurinas, Metotrexate, Inmunosupresores y Voriconazol.

(a) Encuesta realizada a los pacientes (n=51)	Sí (%)
¿Considera que las instalaciones están en buenas condiciones, limpias y en concordancia con lo que usted espera de una consulta de asesoramiento genético?	100,00%
El experto que le ha atendido en la consulta, ¿Se ha tomado el tiempo suficiente para explicarle todos los detalles necesarios para comprender sus resultados farmacogenéticos?	100,00%
Si se solicitaron estudios farmacogenéticos, ¿Ha comprendido el motivo de la solicitud del estudio, qué información se espera obtener del resultado y cuánto tiempo aproximado será necesario para la realización del estudio?	100,00%
¿Considera la información completa?	100,00%
¿Se ha sentido con la confianza y privacidad suficientes en la consulta para comentar con los especialistas todas sus dudas y preocupaciones?	100,00%
	IS (%)
Transparencia de la información proporcionada por los especialistas	89,57%
Tiempo de respuesta en relación con sus necesidades	79,13%
Grado de confianza en los resultados proporcionados en su visita a la Unidad de Farmacogenética Clínica del HULP	80,43%
Posibilidad de consultas sucesivas en el caso de que fuese necesario	83,48%
Servicio telefónico y atención en secretaría para solicitar o cambiar alguna cita o aclarar dudas	87,78%
	IS GLOBAL 83,47%

(b) Encuesta realizada a los especialistas (n=19)	N (%)
Servicio	
Medicina Interna	4 (21,1)
Dermatología	3 (15,8)
Nefrología pediátrica	3 (15,8)
Digestivo	2 (10,5)
Hemato-oncología pediátrica	2 (10,5)
Psiquiatría	2 (10,5)
Oncología	1 (5,3)
Inmunología	1 (5,3)
Unidad tromboembólica	1 (5,3)
¿Cree que sus conocimientos sobre la utilidad de la PGx en la práctica clínica han mejorado en los últimos 3 años?	
Sí	19 (100)
Si han mejorado, ¿qué factores han contribuido?*	
• El contacto con la Unidad de PGx del HULP	17 (89,5)
• El desarrollo de protocolos y guías de ajuste y selección de tratamiento	4 (21,1)
• El desarrollo de proyectos de investigación relacionados con la PGx	11 (57,9)
• La asistencia a sesiones educativas y cursos específicos	8 (42,1)
Usted utiliza la información PGx basándose en*:	
• Protocolos clínicos establecidos en la Unidad de PGx del HULP	8 (42,1)
• Estudios individualizados no incluidos en protocolos clínicos	14 (73,7)
En el caso de que la Unidad de PGx realice alguna recomendación para la modificación de la pauta terapéutica estándar para mi paciente:	
• Sigo estas recomendaciones	16 (84,2)
• No sigo exactamente estas recomendaciones pero tengo en cuenta el resultado genético para la selección del tratamiento	3 (15,8)
• No sigo ni tengo en consideración la información genética	0 (0)
	IS (%)
¿Considera apropiado el proceso para la solicitud de un estudio PGx o una consulta en la unidad?	79,0%
¿Considera los tiempos de respuesta apropiados?	76,8%
¿Considera de utilidad la información PGx proporcionada?	94,7%
¿Considera que el empleo de la información PGx tiene un impacto en el manejo del paciente?	85,3%
¿Considera que en los próximos años aumentará la aplicación de la PGx en la práctica clínica de su especialidad?	91,6%
	N (%)
¿Qué aspectos considera que podrían contribuir a mejorar la implementación de la PGx clínica en su especialidad?*	
• Guías clínicas más claras y específicas	11 (57,9)
• Mayor nivel de evidencia de su utilidad clínica	11 (57,9)
• Evaluación de su coste-efectividad	10 (52,6)
• Tiempos de respuesta más cortos	5 (26,3)

Tabla 9. Resultados de las encuestas realizadas a los (a) pacientes y (b) especialistas. IS: Índice de satisfacción; *: Puede seleccionarse más de una respuesta.

4.2. **Bloque II: Implementación en la rutina clínica de una estrategia para la individualización del tratamiento con Voriconazol basada en el genotipado anticipado de CYP2C19 y monitorización de niveles plasmáticos.**

4.2.1. Características de la cohorte de estudio.

La Tabla 10 muestra las características demográficas así como la distribución de diplotipos de CYP2C19 obtenida en nuestra cohorte. Nuestra población de estudio consistió en 28 pacientes inmunodeprimidos con patologías hematológicas que iban a ser sometidos a un TPH y que posteriormente recibieron tratamiento/profilaxis con VCZ. El 79% de los pacientes eran menores de 12 años y el 21% de los pacientes mayores de 12 años. En la Tabla 10 se muestra una comparación de la distribución de diplotipos de CYP2C19 obtenida en nuestra cohorte y en la cohorte de Hicks et al (48). Tras el análisis molecular, se recomendaron dosis de inicio distintas en función de la clasificación fenotípica de CYP2C19. En base a los criterios mencionados previamente (Figura 7) encontramos que en alrededor del 29% de los pacientes estaba recomendada la modificación de la dosis estándar de inicio de VCZ. A los pacientes CYP2C19*1/*1, *1/*2 y *2/*17 (CYP2C19 NM e IM) se les asignaron dosis estándar de inicio, mientras que en pacientes CYP2C19*1/*17 y *17/*17 (CYP2C19 RM y UM) se recomendaron dosis estándar de inicio más elevadas (Figura 7). El tiempo medio de respuesta fue de 18 días. En todos los casos el informe clínico final estaba disponible en el momento de la prescripción.

		Nuestro estudio N=28	Hicks et al. N=33
Edad	<12 años	22 (78,57%)	19 (58,58%)
	≥12 años	6 (21,43%)	14 (42,42%)
Género	Femenino	16 (57,14%)	14 (42,42%)
	Masculino	12 (42,86%)	19 (58,58%)
Diplo tipo CYP2C19	CYP2C19*17/*17	2 (7,14%)	4 (12,12%)
	CYP2C19*1/*17	6 (21,43%)	8 (24,24%)
	CYP2C19*2/*17	3 (10,71%)	0 (0%)
	CYP2C19*1/*1	13 (46,43%)	11 (33,33%)
	CYP2C19*1/*2	4 (14,29%)	9 (27,27%)
	CYP2C19*2/*2	0 (0%)	1 (3,03%)
Diagnóstico primario	Síndromes mielodisplásicos	3 (10,71%)	-
	Leucemias	9 (32,14%)	25 (75,76%)
	Aplasia medular	7 (25%)	-
	Inmunodeficiencia	6 (21,43%)	-
	Otros	3 (10,71%)	8 (24,24%)

Tabla 10. Características de la cohorte de estudio (N=28). Se comparan las características de nuestros pacientes de población Española con las características de los pacientes incluidos en el estudio de Hicks et al. (N=33).

4.2.2. Evaluación farmacocinética de una estrategia para individualización del tratamiento con VCZ basada en PGx y TDM.

La estrategia desarrollada en la Unidad de Farmacogenética Clínica del HULP para la individualización terapéutica de VCZ está basada en la combinación de PGx y TDM y se

resume en la Figura 7. Tal y como se ha explicado en el apartado anterior, los ajustes de la dosis de inicio se realizaron en base al diplo tipo de *CYP2C19*, a continuación se midieron los niveles plasmáticos de VCZ en los primeros 5 días y de posteriormente forma regular desde este momento hasta alcanzar el rango terapéutico diana (1-5,5 µg/ml).

En nuestra población de estudio incluyendo pacientes pediátricos de 1 a 18 años (N=28) encontramos que el 57,14% de los pacientes alcanzaron concentraciones terapéuticas de VCZ en los primeros 5 días de tratamiento/profilaxis. Al subdividir la población de estudio por grupo fenotípico de *CYP2C19* observamos que el 65% de los *CYP2C19* NM e IM (a los que se asignaron dosis estándar), el 33,33% de los RM y el 50% de los UM (a los que se recomendaron modificaciones de la dosis estándar de inicio) alcanzaron concentraciones terapéuticas en los primeros 5 días (Tabla 11.1A; Figura 11A). La Figura 12 muestra las concentraciones plasmáticas de VCZ obtenidas en la primera medida tras el ajuste de la dosis de inicio en base a los resultados genéticos. La concentración plasmática media fue de $2,28 \pm 2,60 \mu\text{g/ml}$ para todos los grupos de *CYP2C19*. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

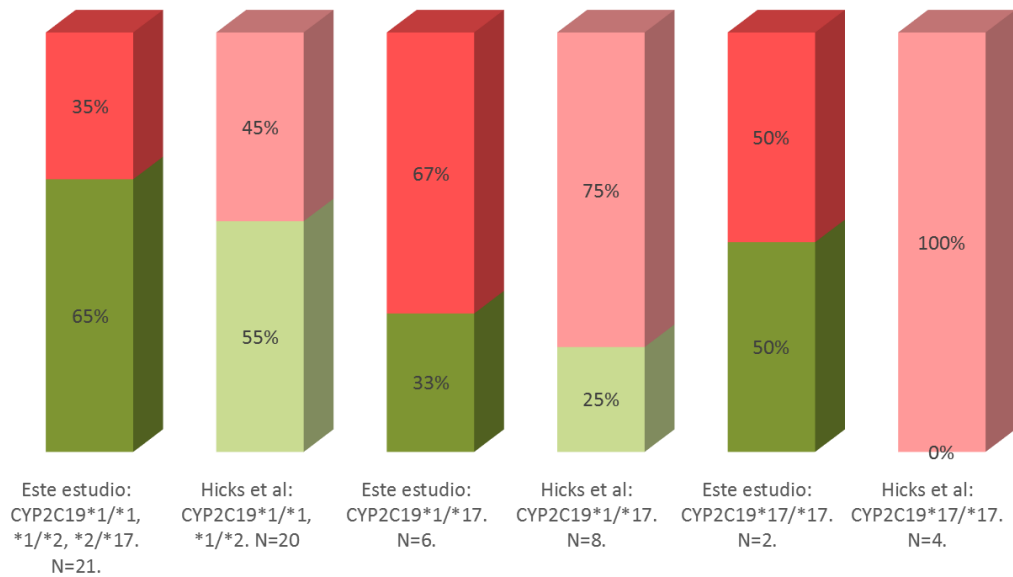
Para una mejor comparación de nuestros resultados con los del estudio de Hicks et al., subdividimos nuestra población de estudio por grupos de edad y analizamos los pacientes <12 años (N=22). Encontramos que el 62,50% de los *CYP2C19* NM e IM, el 25% de los RM y el 50% de los UM alcanzaron concentraciones de VCZ dentro del rango terapéutico en los primeros 5 días de tratamiento/profilaxis (Tabla 11.2A). Debido al pequeño número de pacientes ≥ 12 años (N=6) no pudimos analizar todos los grupos fenotípicos de *CYP2C19* en esta cohorte.

En aquellos pacientes en los que no se alcanzó el rango terapéutico diana en los primeros 5 días de tratamiento, se fueron midiendo regularmente las concentraciones plasmáticas con el fin de guiar las modificaciones de dosis y conseguir concentraciones terapéuticas en el menor tiempo posible. En nuestro estudio incluyendo pacientes de todos los grupos de edad, encontramos que el 90% de los *CYP2C19* NM e IM y el 100% de los *CYP2C19* RM y UM conseguían concentraciones terapéuticas de VCZ durante el tratamiento/profilaxis (Tabla 11.1B). Los tiempos requeridos para alcanzar concentraciones terapéuticas en cada paciente se representan en la Figura 13; el 82,14% de los pacientes consiguieron concentraciones terapéuticas diana en los primeros 20 días de tratamiento. Los resultados cuando analizamos de forma aislada los pacientes <12 años se muestran en la Tabla 11.2B.

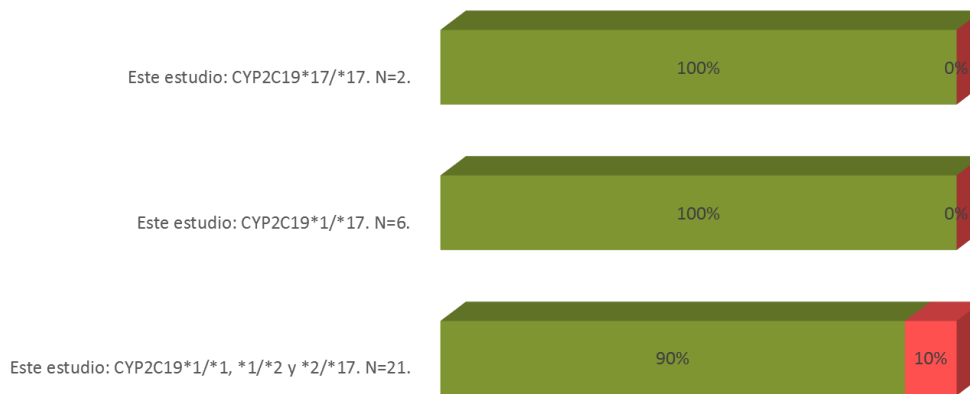
		1. NUESTRO ESTUDIO: Todos los grupos de edad (N=28)		Hicks et al.(48) (N=33)	
Clasificación según el diplotipo de <i>CYP2C19</i>	Fenotipo inferido de <i>CYP2C19</i>	(A) % de pacientes en rango terapéutico: Días 1-5	(B) % de pacientes en rango terapéutico: >5 días	(C) % de pacientes en rango terapéutico: Día 5 (Hicks et al. estándar, sin PGx ni TDM)	(D) % de pacientes en rango terapéutico: Día 5 (Hicks et al. simulación con dosis extrapoladas)
TODOS LOS PACIENTES		57,14%	92,59%	42%	57%
CYP2C19*1/*1, *1/*2 y *2/*17	CYP2C19 Metabolizadores Normales e Intermedios (NM e IM)	65,00%	89,47%	55%	55%
CYP2C19*1/*17	CYP2C19 Metabolizadores Rápidos (RM)	33,33%	100%	25%	50%
CYP2C19*17/*17	CYP2C19 Metabolizadores Ultrarápidos (UM)	50,00%	100%	0%	75%
		2. Pacientes <12 años (N=22)		Hicks et al.(48) (N=33)	
Clasificación según el diplotipo de <i>CYP2C19</i>	Fenotipo inferido de <i>CYP2C19</i>	(A) % de pacientes en rango terapéutico: Días 1-5	(B) % de pacientes en rango terapéutico: >5 días	(C) % de pacientes en rango terapéutico: Día 5 (Hicks et al. estándar, sin PGx ni TDM)	(D) % de pacientes en rango terapéutico: Día 5 (Hicks et al. simulación con dosis extrapoladas)
CYP2C19*1/*1, *1/*2 and *2/*17	CYP2C19 Metabolizadores Normales e Intermedios (NM e IM)	62,50%	86,67%	54%	54%
CYP2C19*1/*17	CYP2C19 Metabolizadores Rápidos (RM)	25,00%	100%	21%	52%
CYP2C19*17/*17	CYP2C19 Metabolizadores Ultrarápidos (UM)	50,00%	100%	0%	50%

Tabla 11. Porcentaje de pacientes en rango terapéutico de VCZ (1-5,5µg/ml) según el diplotipo de *CYP2C19* en (1) nuestra cohorte de estudio incluyendo pacientes pediátricos 1-18 años y (2) incluyendo exclusivamente pacientes <12 años. (A) Días 1-5 desde la administración de VCZ; (B) 5 días después de la administración de VCZ. Nuestros resultados fueron comparados con los reportados en el estudio de Hicks et al. (C) con un proceso de selección de pauta terapéutica estándar (sin PGx ni TDM) y (D) con los resultados de su simulación con dosis extrapoladas basadas en el genotipo. Se incluyeron pacientes de todos los grupos de edad. A los pacientes CYP2C19*1/*1, *1/*2 y *2/*17 (IM) se les asignaron dosis estándar de inicio. En el resto de pacientes se aplicaron las modificaciones de pauta terapéutica indicadas en la Figura 8.

A) Porcentaje de pacientes en rango terapéutico de VCZ en los primeros 5 días de tratamiento/profilaxis.



B) Porcentaje de pacientes en rango terapéutico de VCZ antes de finalizar el tratamiento/profilaxis.



Verde: Dentro de rango terapéutico
 Rojo: Fuera de rango terapéutico

Figura 11. Porcentaje de pacientes en rango terapéutico de VCZ (1-5,5µg/ml) con la estrategia de individualización aplicada en la Unidad de Farmacogenética Clínica del HULP. (A) Muestra el porcentaje de pacientes que alcanzan concentraciones terapéuticas de VCZ en los primeros 5 días de tratamiento con nuestra estrategia (tras el ajuste de dosis de inicio basada en la información PGx), frente al proceso de selección de pauta terapéutica tradicional (Sin PGx; Hicks et al.(48)); (B) muestra el porcentaje de pacientes que alcanzan concentraciones terapéuticas antes de finalizar el tratamiento/profilaxis con nuestra estrategia combinada de PGx+TDM. Nuestra cohorte de estudio incluyó 28 pacientes y el estudio de Hicks et al.(48) 33 pacientes. El porcentaje en verde representa todos los pacientes que entraron en rango terapéutico con VCZ frente a los que no (en rojo).

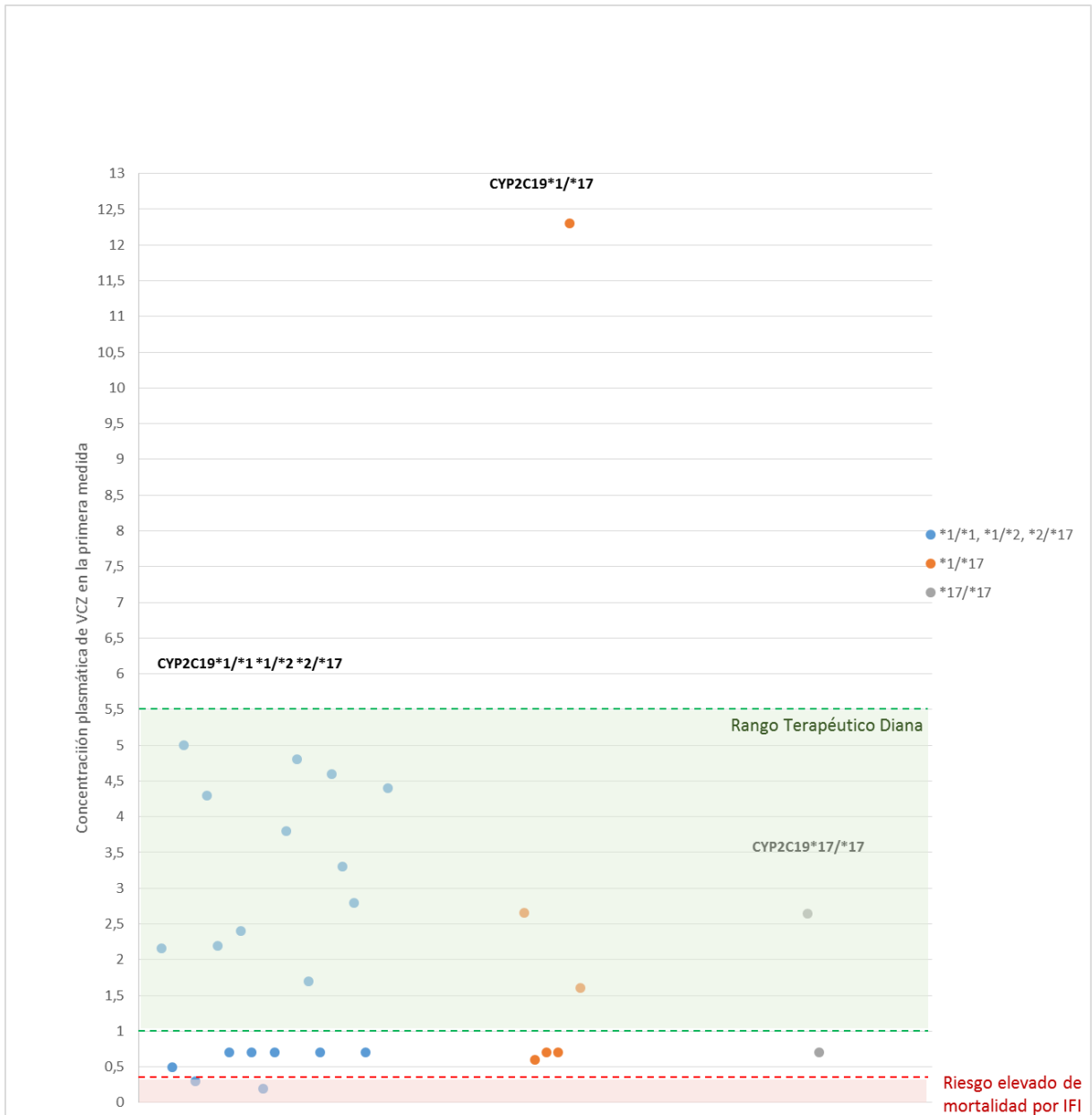


Figura 12. Concentraciones plasmáticas de VCZ obtenidas en la primera medida tras el ajuste de dosis inicial en base a la PGx (días 1-5). El área verde representa el rango terapéutico diana (1-5,5µg/ml). El área roja (<0,35 µg/ml) representa el área de alto riesgo de mortalidad asociada a IFI. N=28 pacientes.

4.3. Bloque III: Identificación de nuevas asociaciones farmacogenéticas que permitan mejorar los algoritmos clínicos monogénicos existentes específicos de fármaco y patología.

4.3.1. Modelos predictivos de la Farmacocinética de Voriconazol basados en farmacogenética: Estudio exploratorio anidado a tres estudios de bioequivalencia de dos formulaciones de Voriconazol 200mg en población española.

Estos resultados han sido enviados para su publicación y están en fase de revisión en la revista *Clinical Pharmacology and Therapeutics* (ANEXO III): “Evaluation of Multifactorial Pharmacogenetics Predictive Models for Voriconazole Pharmacokinetics: An Exploratory Study Nested to three Bioequivalence Trials of Two Voriconazole Formulations of 200 mg in Spanish population” Irene Dapía; Irene García; Jose Carlos Martinez; Pedro Arias; Pedro Guerra; Lucía Díaz; Alberto García; Jair Tenorio; Elena Ramírez; Gema Gordo; Jesús Frías; Pablo Lapunzina; Antonio J Carcas; Alberto M Borobia

4.3.1.1. Características de la cohorte de estudio.

La Tabla 12 muestra las características demográficas así como las frecuencias genotípicas de nuestra población. La cohorte de estudio estaba formada por 106 voluntarios sanos: 4 Metabolizadores Ultrarápidos (UM), 34 Metabolizadores Rápidos (RM), 38 Metabolizadores Normales (NM), 28 Metabolizadores Intermedios (IM) y 2 Metabolizadores Pobres (PM) según el diplotipo de *CYP2C19*.

Características demográficas					
Sex (male/female %)			57/49		
Age (years \pm s.d)			23.8 \pm 4.3		
Weight (Kg \pm s.d)			67.9 \pm 12.2		
Height (cm \pm s.d)			170.2 \pm 9.6		
BMI (Kg/m ²)			23.3 \pm 2.9		
Información genética					
Gen	Genotipo codificado	Fenotipo codificado	N cohorte de estudio	Frecuencia cohorte de estudio (N=106)	Frecuencia poblacional (Europea)
<i>CYP2C19</i>	*2/*2	PM	2	0.02	*1 HapFreq= 0.621 *2 HapFreq= 0.146 *4A HapFreq= 0.003 *17 HapFreq= 0.213
	*1/*1	NM	38	0.36	
	*1/*2	IM	26	0.24	
	*1/*4a				
	*1/*17	RM	34	0.32	
	*17/*17	UM	4	0.04	
<i>CYP3A5</i>	*3/*3	PM	90	0.85	*1 HapFreq= 0.078 *3 HapFreq = 0.921 *6 HapFreq=0.100
	*3/*6				
	*1/*3	IM	16	0.15	
<i>CYP2C9</i>	*2/*2	PM	3	0.03	*1 HapFreq= 0.80 *2
	*2/*3				

	*1/*2	IM	37	0.35	HapFreq= 0.12 *3 HapFreq= 0.07
	*1/*3				
	*1/*1	EM	66	0.62	
CYP3A4	*1/*1		91	0.86	*1 HapFreq= 0.92
	*1/*1B		7	0.07	*1B HapFreq= 0.02
	*1/*22		8	0.08	*22 HapFreq= 0.04
FMO3	rs1800822		97	0.92	MAF= 0.60 (T)
	CC		8	0,08	
	CT		1	0.01	
	rs2266782		48	0.45	MAF= 0.37 (A)
	GG		43	0.41	
	GA		15	0.14	
rs909530		73	0.69	MAF= 0.24 (T)	
CC		28	0.26		
CT		5	0.05		
POR	rs1057868		59	0.56	MAF= 0.30 (T)
	CC		39	0.37	
	CT		8	0.08	
	rs2868177		54	0.51	MAF= 0.34 (G)
	AA		38	0.36	
	AG		14	0.13	
NR1I2	rs3814055		34	0.32	MAF= 0.37 (T)
	CC		54	0.51	
	CT		18	0.17	
ABCB1	rs2032582		41	0.39	MAF= 0.41 (A)/0.02 (T)
	CC		56	0.53	
	CA		6	0.06	
	AA		2	0.02	
	CT		1	0.01	
	TA				
	rs1045642		26	0.24	MAF= 0.52 (A)
	GG		68	0.64	
GA	12		0.11		

Tabla 12. Características de la cohorte de estudio (N=106). PM: Metabolizador Pobre; NM: Metabolizador Normal; IM: Metabolizador Intermedio; RM: Metabolizador Rápido; UM: Metabolizador Ultrarápido; HapFreq: Haplotype Frequency; MAF: Minor Allele Frequency o frecuencia del alelo menos frecuente; Rs: Código de identificación de polimorfismos en la base de datos dbSNP.

4.3.1.2. Modelo predictivo de referencia basado en CYP2C19

La primera aproximación que llevamos a cabo fue el desarrollo de un modelo predictivo monogénico de VCZ AUC_{0-∞} basado exclusivamente en CYP2C19 como BM PGx. Este modelo representa el modelo de referencia, basado en las guías clínicas y recomendaciones para la individualización del tratamiento con VCZ empleando información molecular. Se trata de un modelo lineal de medidas repetidas bajo criterios de mínimo AIC que incluye únicamente el

fenotipo de CYP2C19 como covariable. El modelo predictivo resultante se muestra en la Tabla 13 y Figura 14. El R^2 (o Rsq) global para este modelo fue 0,438 y el RMSEP 0,18 (Tabla 15; Figura 15). Se llevó a cabo la validación cruzada de este modelo en 2 grupos, A y B, ya que sólo encontramos 4 pacientes UM en nuestra cohorte. Se realizaron 100 simulaciones para la validación. Este modelo se empleará como modelo de referencia para su comparación con el modelo poligénico propuesto en este estudio exploratorio que incluye BM adicionales relacionados previamente con VCZ AUC_{0-6} .

	Estimado	Error Estándar	Pr(> t)	R^2
<i>(Intercept)</i>	3.038	0.089	0.000	
CYP2C19 RM	0.074	0.095	0.437	0.010
CYP2C19 NM	0.129	0.094	0.172	0.030
CYP2C19 IM	0.325	0.096	0.001	0.157
CYP2C19 PM	0.657	0.156	0.000	0.203

Tabla 13. Modelo predictivo basado en el fenotipo de CYP2C19: Modelo de Referencia. Al grupo de UM se le asignó un valor de estimado de 0. El R^2 global del modelo propuesto es 0,438 y el RMSEP 0,180. UM: Metabolizador Ultrarápido; RM: Metabolizador Rápido; NM: Metabolizador Lento; IM: Metabolizador Intermedio; PM: Metabolizador Pobre.

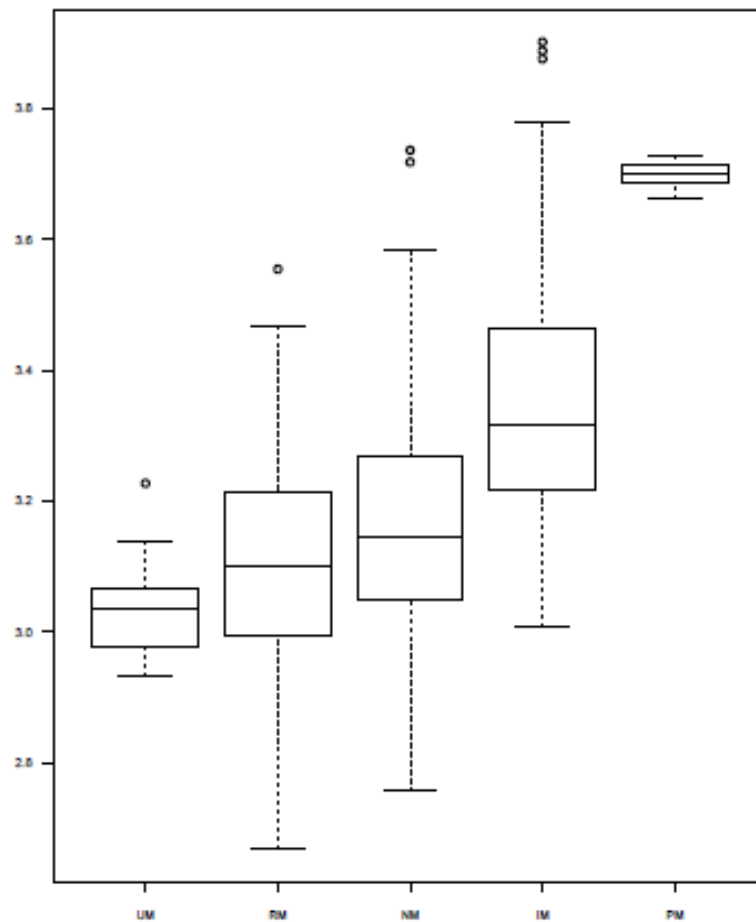


Figura 14. Efecto del fenotipo de CYP2C19 en el $AUC_{0-\infty}$ tras la administración de una dosis única de VCZ 200 mg. UM: Metabolizador Ultrarápido; RM: Metabolizador Rápido; NM: Metabolizador Lento; IM: Metabolizador Intermedio; PM: Metabolizador Pobre.

4.3.1.3. Identificación de biomarcadores candidatos adicionales relacionados con la FC de VCZ: Diseño de un modelo predictivo multifactorial para $AUC_{0-\infty}$.

A continuación llevamos a cabo un estudio exploratorio para la identificación de BM candidatos asociados a la variabilidad FC de VCZ en nuestra cohorte de estudio. La Tabla 14 muestra el mejor modelo estimado bajo criterios de mínimo AIC tras la inclusión de todos los BM genotipados en este estudio (Tabla 7). Para este análisis, se sustituyó el fenotipo de CYP2C19 por información demográfica y los resultados del genotipado de otros BM. Los resultados del genotipado de SNPs en los genes *CYP3A5*, *CYP2C19* y *CYP2C9* fueron codificados empleando la nomenclatura *Star* (*) *Allele*. El mejor modelo obtenido selecciona SNPs en los genes *CYP2C9*, *CYP3A4*, *POR*, *NR1I2* y *FMO3* (además del *CYP2C19*) como variables de interés para la predicción del $AUC_{0-\infty}$ de VCZ (Tabla 14). El género y el BM también se seleccionaron como variables de interés. La inclusión de BM adicionales en el modelo predictivo de referencia basado únicamente en el fenotipo de CYP2C19 mejora el valor de R^2 y disminuye el valor de RMSEP ($R^2=0,587$; RMSEP=0,165; Tabla 15; Figura 15).

Al evaluar la contribución y significación de cada una de las variables seleccionadas, encontramos que *POR* contribuye en un 18% al R^2 total del modelo, seguido de *CYP2C9* (8%), *BMI* (10%), *NR1I2* (4%), *FMO3* (4%), *CYP3A4* (4%), y el género (2%), además de *CYP2C19* (39%) que sigue siendo la variable principal para explicar la variabilidad interindividual de VCZ.

	Variable	Estimado	Error estándar	Pr ($> t $)	R^2 / % del R^2 total explicado por cada BM	
Gen asociado	(Intercept)	2.687	0.093	0.000		
	GéneroM	-0.045	0.020	0.024	0.018 (-2%)	
	IMC	0.023	0.004	0.000	0.103 (-10%)	
<i>CYP2C19</i>	*1/*1	-0.026	0.032	0.429	0.002	39%
	*1/*17	-0.0136	0.034	0.000	0.058	
	*1/*2	0.234	0.035	0.000	0.150	
	*17/*17	-0.170	0.058	0.004	0.031	
	*2/*17	-0.064	0.076	0.404	0.002	
	*2/*2	0.547	0.077	0.000	0.142	
<i>CYP2C9</i>	*1/*2	0.097	0.025	0.000	0.052	8%
	*1/*3	0.037	0.028	0.188	0.006	
	*2/*2	0.137	0.102	0.182	0.007	
	*2/*3	0.137	0.071	0.055	0.014	
<i>FMO3</i>	rs1800822CT	-0.087	0.041	0.033	0.018	4%
	rs1800822TT	0.248	0.089	0.006	0.023	
<i>NR1I2</i>	rs3814055CT	-0.010	0.022	0.661	0.001	4%
	rs3814055TT	-0.090	0.026	0.001	0.037	
<i>POR</i>	rs1057868CT	-0.062	0.027	0.021	0.023	18%
	rs1057868TT	0.222	0.046	0.000	0.114	
	rs2868177AG	0.045	0.024	0.060	0.015	
	rs2868177GG	-0.078	0.033	0.017	0.023	
<i>CYP3A4</i>	rs2740574AG	-0.128	0.045	0.005	0.032	3%

Tabla 14. Variables de importancia para $AUC_{0.5}$ en el modelo poligénico basado en SNPs. El R^2 total para el mejor modelo propuesto es 0,587 y el RMSEP es 0,165.

RMSEP			R ²		
Modelo de referencia basado en CYP2C19	Modelo Propuesto	% de cambio	Modelo de referencia basado en CYP2C19	Modelo Propuesto	% de cambio
0.180	0.165	-8.33	0.438	0.587	34.02

Tabla 15. Comparativa de los valores de RMSEP y R² obtenidos del modelo de referencia basado en CYP2C19 y del modelo predictivo multifactorial propuesto.

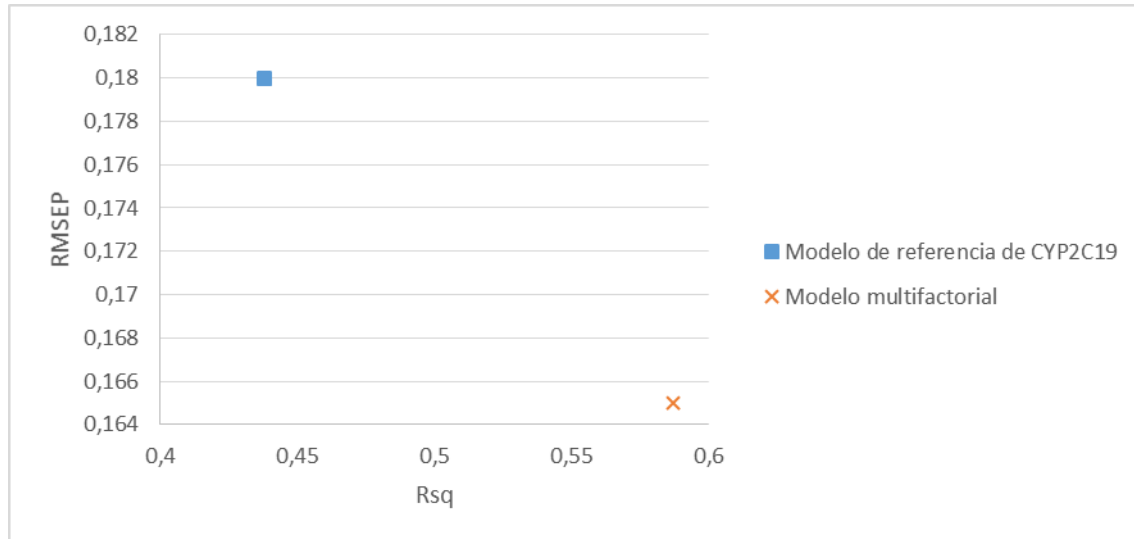


Figura 15. RMSEP vs. R² (Rsq) de los modelos predictivos propuestos para el AUC_{0-∞} de VCZ en nuestra población de estudio.

4.3.2. Influencia de *ABCB1* y *POR* en la farmacocinética de Tacrolimus oral en pacientes pediátricos estables post-trasplante renal.

Estos resultados fueron publicados en el año 2018 (ANEXO III): “*Weight of ABCB1 and POR genes on oral tacrolimus exposure in CYP3A5 nonexpressor pediatric patients with stable kidney transplant*”. GN Almeida-Paulo, I Dapía García, R Lubomirov, AM Borobia, NL Alonso-Sánchez, L Espinosa and AJ Carcas-Sansuán. *Pharmacogenomics J* (2018). Jan;18(1):180-186. doi: 10.1038/tpj.2016.93. PMID: 28094348.

Por otro lado, el protocolo para la ampliación de este estudio fue publicado el año 2016 (ANEXO III): “*Effect of the CYP3A5, CYP3A4, CYP3A7, ABCB1, POR and NR1I2 genes in the pharmacokinetics of tacrolimus in a pediatric cohort with stable serum concentrations after renal transplantation: study protocol*” Irene Dapia, Aleksandra Tabakov, Laura Espinosa Román, Lucía Díaz, Pedro Arias Lajara, Marta Melgosa, Angel Melgar, Carlota Fernández, Alicia Herranz Estellés, Pablo Lapunzina, Alberto M. Borobia, Antonio J. Carcas. *IBJ Clin Pharmacol* 2017 1(1):e0005.

4.3.2.1. Características de la cohorte de estudio.

La Tabla 16 resume las características de la cohorte de estudio formada por 21 pacientes estables sometidos a trasplante renal entre 4 y 17 años, la mayoría varones caucásicos. Se muestran también las frecuencias genotípicas de las variantes estudiadas. Todas están en equilibrio de Hardy-Weinberg.

4.3.2.2. Resultados Farmacocinéticos y Farmacogenéticos.

Los parámetros FC seleccionados para este análisis fueron AUC_{0-24h} , C_{max} y C_{min} ajustados por la dosis diaria administrada y el peso de cada paciente. Tal y como se muestra en la Tabla 17 y la Figura 16 en el análisis univariante detectamos diferencias significativas en el AUC_{0-24h} , C_{max} y C_{min} entre los grupos de genotipos establecidos para *CYP3A5* en función del rs776746 (c.219-237A>G; *CYP3A5**3). Los pacientes *CYP3A5* no-expresadores, no portadores de ningún alelo funcional (*CYP3A5**3/*3, n=17) presentaron un C_{max} , AUC_{0-24h} y C_{min} 72, 119 y 210% superiores que los *CYP3A5* expresadores, portadores de al menos un alelo funcional (*CYP3A5**1/*1 ó *1/*3). No se encontraron otras diferencias significativas.

Con el fin de evaluar la contribución de la variabilidad genética en BM no incluidos hasta la fecha en los algoritmos clínicos de predicción de TAC (*ABCB1* y *POR*) se seleccionaron aquellos pacientes *CYP3A5* no-expresadores (*CYP3A5**3/*3; n=17) y se construyó una puntuación genética aditiva en 3 grupos incluyendo: Pacientes en los que todas las variantes genotipadas son *wild type* (se les asignó el valor 0, referencia), pacientes con 1 o 2 variantes en *POR* y *ABCB1* *wild type* (se les asignó el valor 1), y pacientes con 3 variantes en *POR* y *ABCB1* (se les asignó el valor 2). Los valores medios para los parámetros FC seleccionados se muestran en la Tabla 18.

Los pacientes portadores de 1 o 2 variantes en *POR* y rs1045642 en *ABCB1* *wild type* (puntuación genética=1) presentaban un C_{max} , AUC_{0-24h} y C_{min} 43, 27 y 11% más elevado que los pacientes del grupo 1 (Tabla 18; Figura 17). Al comparar los valores de AUC_{0-24h} , C_{max} y C_{min} entre los 3 grupos encontramos diferencias significativas entre ellos (p=0,018, p=0,037 y p=0,018 respectivamente; Tabla 19).

Género (Masculino/Femenino %)	57/43			
Etnia				
Caucásica (n)	17			
Hispánica (n)	1			
Asiática (n)	2			
Árabe (n)	1			
Edad (años±DE)	12.29 ± 4.17			
Peso (kg±DE)	42.85 ± 15.42			
Talla (cm±DE)	143.4 ± 18.16			
IMC (Kg/m ² ±DE)	19.87 ± 3.28			
ASC (m ² ±DE)	1.30 ± 0.33			
Dosis total de Advagraf (mg±DE)	4.8±1.70			
Tiempo desde el trasplante hasta la conversión (años±DE)	5.390 ± 3.25			
Creatinina (mg/dL±DE)	0.90 ±0.29			
Albúmina (g/dL±DE)	3.83 ± 0.23			
Hemoglobina (g/dL±DE)	12.23 ± 1.23			
Cistatina C (mg/L±DE)	1.23 ± 0.27			
Bilirubina (mg/dL±DE)	0.39 ± 0.12			
Hematocrito (%±DE)	37.57 ± 3.54			
TEFG (mL/min±DE)	76.57 ± 23.01			
Información Molecular				
Variante	Genotipo	N	Frecuencia en la población de estudio	Frecuencia Poblacional (1000G)
<i>CYP3A5</i> rs776746	TT (*1/*1)	1	5%	22,7%
	CT (*1/*3)	3	14%	30,4%
	CC (*3/*3)	17	81%	47%
<i>ABCB1</i> rs1045642	GG	7	33%	39,6%
	AG	9	43%	41,7%
	AA	5	24%	18,7%
<i>POR*28</i> rs1057868	CC (*1/*1)	11	52%	51,1%
	CT (*1/*28)	9	43%	40,5%
	TT (*28/*28)	1	5%	8,3%
<i>POR</i> rs2868177	AA	4	14%	35,8%
	AG	12	57%	48,4%
	GG	5	24%	15,8%

Tabla 16. Características de la cohorte de estudio (N=21). IMC: Índice de Masa Corporal; ASC: Área de Superficie Corporal; TEFG: Tasa Estimada de Filtrado Glomerular. Las frecuencias poblacionales se obtuvieron de 1000 genomas (1000G; 2016).

Parámetro FC	Variante	Genotipo	Media \pm DE	p-valor
AUC ₀₋₂₄	<i>CYP3A5</i> (rs776746)	TT	879.6	0.009*
		CT	1232.24 \pm 578.64	
		CC	2507.88 \pm 967.676	
	ABCB1 (rs1045642)	GG	1967.69 \pm 2301.42	0.255
		AG	2301.42 \pm 1253.14	
		AA	2544.74 \pm 950.02	
	<i>POR</i> *28 (rs1057868)	CC	1884.88 \pm 808.24	0.178
		CT	2812.42 \pm 1103.67	
		TT	1164.86	
	<i>POR</i> (rs2868177)	AA	1886.27 \pm 985.47	0.946
		AG	2456.11 \pm 1198.81	
		GG	2038.38 \pm 667.65	
C _{max}	<i>CYP3A5</i> (rs776746)	TT	71.28	0.036*
		CT	112.16 \pm 34.92	
		CC	175.59 \pm 71.96	
	ABCB1 (rs1045642)	GG	144.47 \pm 48.40	0.922
		AG	182.65 \pm 94.00	
		AA	147.51 \pm 55.49	
	<i>POR</i> *28 (rs1057868)	CC	141.59 \pm 59.24	0.512
		CT	194.54 \pm 78.17	
		TT	84.37	
	<i>POR</i> (rs2868177)	AA	123.04 \pm 54.54	0.413
		AG	178.25 \pm 82.09	
		GG	152.32 \pm 53.27	
C _{min}	<i>CYP3A5</i> (rs776746)	TT	33.17	0.004*
		CT	29.96 \pm 11.70	
		CC	95.38 \pm 33.79	
	ABCB1 (rs1045642)	GG	60.87 \pm 24.28	0.055
		AG	87.14 \pm 46.99	
		AA	106.85 \pm 33.31	
	<i>POR</i> *28	CC	71.06 \pm 34.40	0.388
		CT	99.19 \pm 44.93	
		TT	70.15	
	<i>POR</i> (rs2868177)	AA	70.74 \pm 21.61	0.682
		AG	87.42 \pm 48.30	
		GG	82.53 \pm 32.27	

Tabla 17. Comparativa de los principales parámetros FC ajustados por dosis y peso en función de los genotipos de los SNPs analizados en la población general de estudio (N=21). *: Valores con p-valor menor a 0,05.

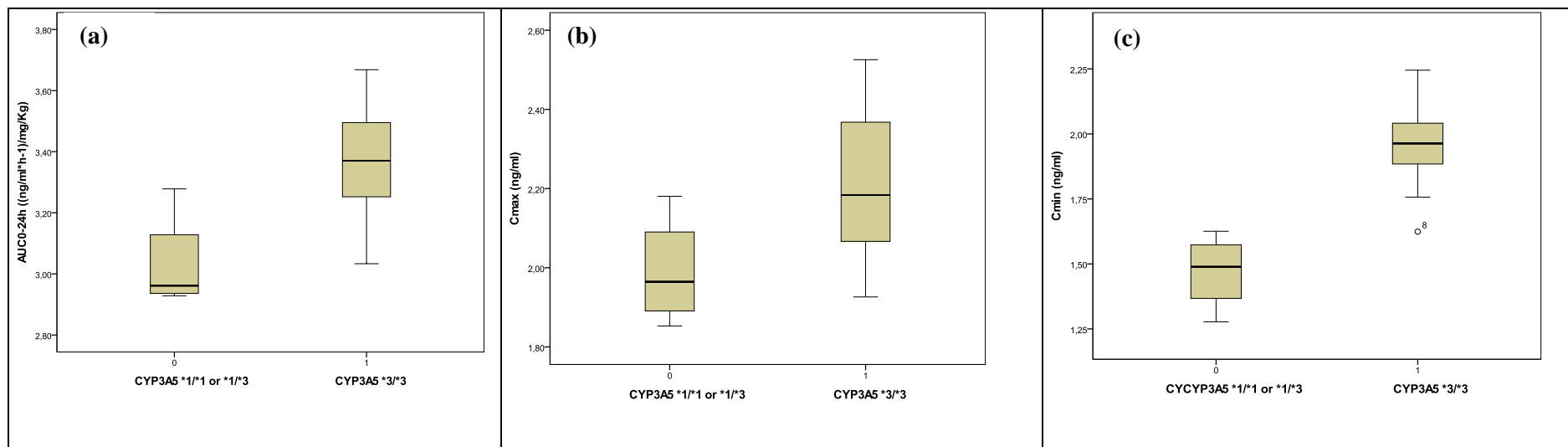


Figura 16. Parámetros FC en función de la clasificación según el genotipo de CYP3A5 (N=21). (a) AUC₀₋₂₄ ajustado por peso y dosis; (b) C_{max} ajustado por peso y dosis; y (c) C_{min} ajustado por peso y dosis. Puntuación genética: 0, pacientes en los que todas las variantes genotipadas son *wild type*; 1, pacientes con 1 o 2 variantes en *POR* y *ABCBI* *wild type*; y 2 pacientes con 3 variantes en *POR* y *ABCBI*.

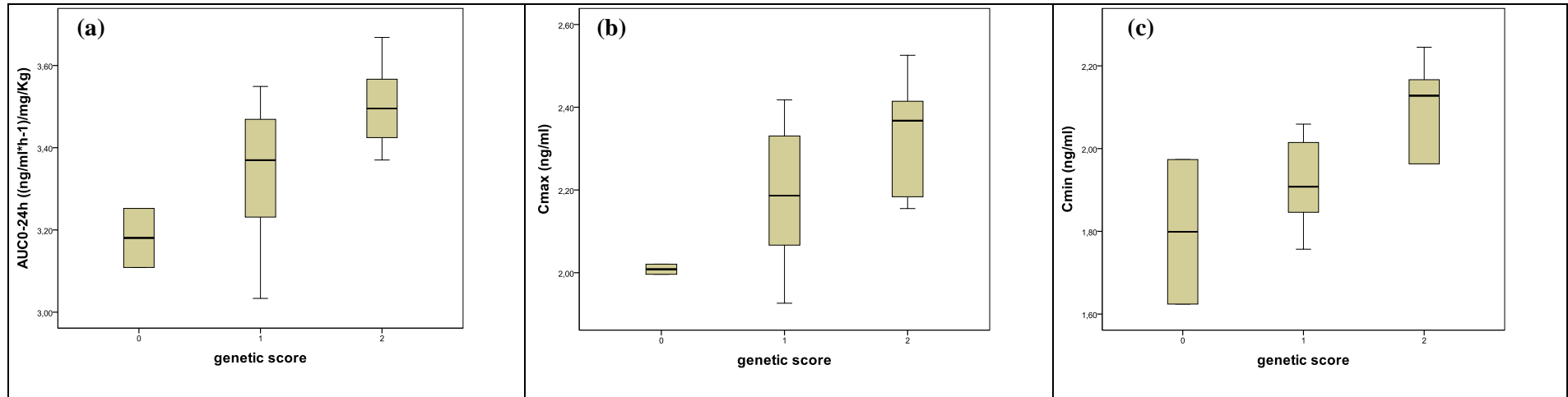


Figura 17. Parámetros FC en función de la clasificación según la puntuación genética (N=17). (a) AUC₀₋₂₄ ajustado por peso y dosis; (b) C_{max} ajustado por peso y dosis; y (c) C_{min} ajustado por peso y dosis. “Score” genético: 0, pacientes en los que todas las variantes genotipadas son *wild type*; 1, pacientes con 1 o 2 variantes en *POR* y *ABCBI* *wild type*; y 2 pacientes con 3 variantes en *POR* y *ABCBI*.

	Variantes	<i>CYP3A5</i> *1/*1 o *1/*3 n=4	<i>CYP3A5</i> *3/*3 n=17	Puntuación genética en el grupo de <i>CYP3A5</i> no-expresadores		
		0 n=2	1-2 n=10	3 n=5		
AUC_{0-24} / dosis/peso	media±DE	1144.09±504.28	2507.86±967.68	1805.65±530.37	2308.53±824.63	3295.26±915.10
C_{max} / dosis/peso	media±DE	101.94±35.08	175.58±71.96	115.63±23.80	165.72±61.00	224.76±79.75
C_{min} / dosis/peso	media±DE	30.76±9.69	95.38±33.79	76.01±29.40	84.48±19.97	128.11±36.36

Tabla 18. Parámetros FC en *CYP3A5* expresadores y no-expresadores, y en función de la puntuación genética en el grupo de *CYP3A5* no-expresadores. Puntuación genética: 0, pacientes en los que todas las variantes genotipadas son *wild type*; 1, pacientes con 1 o 2 variantes en *POR* y *ABCB1* *wild type*; y 2 pacientes con 3 variantes en *POR* y *ABCB1*.

Variante	Parámetro FC	Jonckheere–Terpstra (p)
<i>ABCB1</i> (rs1045642)	AUC_{0-24h}	0.507
	C_{max}	0.965
	C_{min}	0.102
<i>POR</i> *28 (rs1057868)	AUC_{0-24h}	0.262
	C_{max}	0.575
	C_{min}	0.852
<i>POR</i> (rs2868177)	AUC_{0-24h}	0.715
	C_{max}	0.235
	C_{min}	0.273
Puntuación genética	AUC_{0-24h}	0.018
	C_{max}	0.037
	C_{min}	0.018

Tabla 19. Resultados de la prueba no paramétrica de Jonckheere–Terpstra realizado en el grupo de no-expresadores de *CYP3A5* para las variantes analizadas en los BM adicionales propuestos y la puntuación genética calculada. El p-valor se considera significativo por debajo de 0,05.

4.3.2.3. Modelos explicativos de la Farmacocinética de Tacrolimus basados en farmacogenética.

Con el fin de evaluar la contribución de los distintos factores genéticos, clínicos y demográficos a la variabilidad de los parámetros FC C_{max} , AUC_{0-24h} y C_{min} ajustados por el peso y dosis se empleó una regresión lineal multivariante.

Se generó un modelo incluyendo toda la cohorte de estudio (n=21) en el que se seleccionaron 3 covariables: el rs776746 en *CYP3A5*, y el tratamiento concomitante con Deflazacort y Metilprednisolona. Los pacientes pertenecientes al grupo de no-expresadores de *CYP3A5* (*CYP3A5**3/*3) presentaron valores mayores de los parámetros FC seleccionados. El genotipo de *CYP3A5* explicaba el 39,6%, 20,6% y 59,5% de la variabilidad en AUC_{0-24h} , C_{max} y C_{min} respectivamente (Tabla 20). El tratamiento concomitante con Deflazacort y Metilprednisolona se relacionó con valores más bajos de los parámetros FC seleccionados. El tratamiento concomitante con Deflazacort explicaba el 20,9% y el 19,5% de la variabilidad en el AUC_{0-24h} y C_{max} y con Metilprednisolona el 14,3% de la variabilidad en el AUC_{0-24h} (Tabla 20).

Posteriormente, se generó un segundo modelo para el subgrupo de pacientes no-expresadores de *CYP3A5* (*CYP3A5**3/*3; n=17) con el fin de evaluar el efecto de la variabilidad genética en otros BM distintos a *CYP3A5*, *ABCB1* y *POR* mediante una puntuación genética. La variabilidad genética en estos BM explicaba el 13,7% de la variabilidad total del AUC_{0-24h} . Por otro lado, el tratamiento concomitante con Deflazacort y Metilprednisolona explicaba el 32% y el 11,1% de la variabilidad total del AUC_{0-24h} . No se encontró ninguna variable incluida en este estudio asociada significativamente a la variabilidad en el C_{max} en este grupo de pacientes.

4.3.2.4. Evaluación de los modelos propuestos.

Empleando los modelos desarrollados para C_{max} , AUC_{0-24h} y C_{min} ajustados por el peso y talla, se calculó el error medio absoluto (MAE) pronosticado para cada modelo. La Tabla 20 muestra el MAE expresado como un porcentaje para C_{max} , AUC_{0-24h} y C_{min} . Los resultados obtenidos con la formulación Prograf son muy similares y se presentan en el ANEXO II.

	Modelo		Coefficientes no-estandarizados	Coefficientes estandarizados	p valor	% de variabilidad explicado	MAE% (RIQ)
			B ± SE	Beta			
Todos los participantes (n=21)	AUC ₀₋₂₄ r ² _c = 0.571	(Constante)	3.179 ± 0.083		0.000		25.78 (7.13 – 34.88)
		CYP3A5	0.371 ± 0.089	0.519	0.001	39.6%	
		Metilprednisolona	-0.212 ± 0.080	-0.436	0.017	14.3%	
		Deflazacort	-0.376 ± 0.121	-0.513	0.006	20.9%	
	C _{max} r ² _c = 0.365	(Constante)	2.115 ± 0.088		0.000		25.63 (9.43 – 40.57)
		CYP3A5	0.246 ± 0.094	0.519	0.018	20.6%	
		Metilprednisolona	-0.172 ± 0.085	-0.436	0.059	-	
		Deflazacort	-0.325 ± 0.127	-0.513	0.021	19.5%	
	C _{min} r ² _c = 0.604	(Constante)	1.527 ± 0.090		0.000		27.66 (6.91 – 40.22)
		CYP3A5	0.504 ± 0.095	0.827	0.000	59.6%	
		Metilprednisolona	-0.093 ± 0.086	-0.184	0.295	-	
		Deflazacort	-0.143 ± 0.130	-0.175	0.285	-	
CYP3A5 no-expresadores (n=17)	AUC ₀₋₂₄ r ² _c = 0.573	(Constante)	3.390 ± 0.090		0.000		18.07 (7.34 – 26.91)
		“Score” genético	0.117 ± 0.050	0.413	0.035	13.7%	
		Metilprednisolona	-0.174 ± 0.081	-0.424	0.050	11.1%	
		Deflazacort	-0.474 ± 0.140	-0.639	0.005	32.0%	
	C _{max} r ² _c = 0.367	(Constante)	2.209 ± 0.129		0.000		22.36 (5.96 – 32.53)
		“Score” genético	0.115 ± 0.060	0.410	0.078	-	
		Metilprednisolona	-0.148 ± 0.098	-0.363	0.153	-	
		Deflazacort	-0.352 ± 0.169	-0.478	0.058	-	
	C _{min} r ² _c = 0.403	(Constante)	1.860 ± 0.109		0.000		21.11 (6.90 – 28.98)
		“Score” genético	0.136 ± 0.050	0.558	0.019	26.5%	
		Metilprednisolona	-0.067 ± 0.082	-0.189	0.429	-	
		Deflazacort	-0.239 ± 0.142	-0.375	0.116	-	

Tabla 20. Modelos explicativos desarrollados para la FC de TAC en nuestra cohorte de estudio. MAE: Error Medio Absoluto; RIQ: Rango Intercuartílico

5. Discusión

5.1. Bloque I. Estrategias para la implementación de la farmacogenética en la práctica clínica asistencial: Unidad de PGx Clínica del HULP.

El aumento exponencial en los últimos años del número de ensayos demostrando la contribución de la variabilidad genética en genes que codifican enzimas metabolizadoras de fármacos y proteínas transportadoras en la heterogeneidad interindividual de fenotipos de respuesta a fármacos, ha convertido a la PGx en una herramienta muy útil del paradigma de la medicina personalizada (6). Sin embargo, la implementación de la PGx en la práctica clínica de los sistemas sanitarios nacionales es un proceso complejo y lento que tiene que afrontar numerosas barreras. Los obstáculos percibidos para la implementación en España son muy similares a los descritos en Europa y EEUU(24, 27, 28).

En este primer bloque hemos presentado nuestra experiencia en la implementación de una estrategia desarrollada en el Hospital Universitario La Paz para la integración de la PGx en la práctica clínica asistencial de un hospital de tercer nivel asistencial mediante la creación de una unidad multidisciplinar de PGx clínica. La estrategia diseñada estaba basada en 2 ideas principales: **(a)** la individualización de las recomendaciones clínicas y **(b)** la evolución hacia una estrategia de genotipado anticipado. Nuestra estrategia presenta algunas similitudes con respecto a otros programas de implementación propuestos en EEUU y Europa. Los principales puntos en común en los distintos centros, incluido el nuestro, son el trabajo en equipos multidisciplinarios y el empleo de las guías clínicas CPIC como material de referencia. Además, el flujo de trabajo por pasos desarrollado en nuestra unidad (Figura 9) cumple las recomendaciones establecidas en las guías CPIC y en los centros que participan en el TPP (31). Un punto diferencial y fundamental de nuestro programa de implementación está relacionado con la interpretación de los resultados y el desarrollo de la recomendación clínica final. En la mayoría de estrategias previamente descritas, el paso final consiste en generar una recomendación clínica genérica basada en el fenotipo inferido a partir del diplotipo del paciente, generalmente en forma de alertas e información PGx simplificada a través de sistemas electrónicos de prescripción. En nuestra experiencia, esta aproximación puede resultar apropiada en algunos casos (por ejemplo, en el caso de BM pertenecientes al grupo 1 de nuestra clasificación; Figura 8A); sin embargo su utilización de forma generalizada puede resultar insuficiente e incluso perjudicial para BM pertenecientes a los grupos 2 y 3 (Figura 8A) en el caso de que la interpretación no sea apropiada para el paciente en concreto. A continuación enumeramos algunas razones que apoyan esta premisa:

- Por un lado un gran número de pacientes presenta una o más variantes en biomarcadores PGx que afectan a su tratamiento (debido a la presencia de una o más medicaciones concomitantes).

- Pueden aparecer interacciones entre fármacos y en distinto grado de severidad dependiendo del genotipo del paciente.
- En la actualidad existen pocas guías clínicas que contemplen estas situaciones por lo que una evaluación más profunda y una revisión bibliográfica extensiva es necesaria para el ajuste de las recomendaciones.

En este contexto, nuestro grupo consideraba necesaria la integración individualizada de la información clínica y molecular en cada paciente con el fin de desarrollar una recomendación clínica realmente personalizada basada en la información genética pero que también contemple la historia clínica del paciente además de otros factores como medicaciones concomitantes o incluso las preferencias del paciente recogidas a través de la HCE y una consulta médica especializada. Esto implica que nuestra estrategia de implementación está basada en la presencia de un especialista en farmacogenética clínica a lo largo de todo el proceso, siempre en coordinación con otros especialistas clínicos para la selección de los BM a estudiar y su integración en protocolos clínicos, la selección de los pacientes en los que el estudio PGx está indicado, y la elaboración de la recomendación clínica final y el consejo genético en el caso de que resulte necesario.

Por otro lado, consideramos también fundamental una interpretación individualizada de la información PGx y clínica para la optimización de la pauta terapéutica. Las guías clínicas CPIC y otros protocolos descritos representan una herramienta esencial para la unificación de las recomendaciones clínicas entre los distintos centros, demostrando que es posible la modificación de la pauta terapéutica basada en la información PGx sin ambigüedades (31). Sin embargo, en nuestra experiencia resulta esencial ajustar este tipo de estrategias guiadas por el genotipo a las características clínicas de cada paciente. Además, uno de los retos reportados para la entrega de los resultados PGx es la identificación de la persona adecuada para recibir este tipo de recomendaciones, así como los diversos usos de la información que puede realizar cada disciplina dentro del ámbito de la salud (26, 107). En este contexto, encontramos que la elaboración de una recomendación clínica específica para cada paciente (con un informe clínico y una consulta médica posterior al estudio para la entrega de resultados cuando resulte necesario), además del informe molecular, facilitaba la comprensión y aplicación de los resultados PGx para los especialistas de los servicios clínicos peticionarios, superando las barreras relacionadas con la interpretación y aplicación de los resultados PGx descritas con anterioridad.

La evolución progresiva de las estrategias de genotipado tradicionales “*ad hoc*” hacia una estrategia de genotipado anticipado resultaba también, en nuestra experiencia, fundamental para la unificación de la PGx y la práctica clínica. La estrategia de genotipado desarrollada y

registrada en esta tesis doctoral (PharmArray®v2) ha resultado de gran utilidad para promover esta evolución. A pesar de que se han descrito previamente en la literatura algunas plataformas basadas en la tecnología de *Next Generation Sequencing* (NGS) (108-111), encontramos que los resultados obtenidos con nuestra plataforma resultan más adecuados para la implementación en la rutina clínica en términos de simplicidad de análisis, tiempos de respuesta y coste para el SNS. Con la plataforma PharmArray®v2 hemos conseguido implementar una estrategia de genotipado semi-anticipado con 8 protocolos pre-establecidos en consenso con distintos servicios clínicos en poblaciones de riesgo. Bajo nuestro criterio, esta aproximación representa un paso intermedio adecuado en este momento hacia la evolución en el futuro a una estrategia de genotipado anticipado total. Sin embargo, la evolución desde esta aproximación intermedia hacia una estrategia de genotipado anticipado más extensiva o incluso completa aún necesita el apoyo de estudios de coste-efectividad.

Otro punto clave para la implementación de la PGx en nuestro hospital fue reunir la investigación y la práctica clínica mediante la promoción de proyectos de investigación multidisciplinarios y colaborativos (39, 112). Este tipo de iniciativas tuvo un impacto directo en la práctica clínica y facilitó la interacción activa con otras especialidades médicas a través de sesiones y reuniones clínicas que permitieron la creación de protocolos y guías clínicas más eficaces tal y como se muestra en las encuestas realizadas a los especialistas de distintas áreas (Tabla 9). Cabe destacar además en esta encuesta que prácticamente todos los especialistas consideran que en los últimos 3 años su comprensión de la utilidad de la PGx en la práctica clínica ha mejorado considerablemente principalmente gracias a las interacciones con nuestra unidad (88,2%). Los especialistas de nuestro hospital consideran que la información PGx es útil, con un índice global de satisfacción del 94,74%. Además, el 84,2% de los especialistas encuestados siguen las recomendaciones realizadas por nuestra unidad, y el 15,8% aunque no las sigue tiene en cuenta para realizar los ajustes de dosis (principalmente en las unidades de trasplante de órganos sólidos).

Tal y como se ha descrito previamente en la literatura, nuestros resultados muestran que el 6,17% de los pacientes a los que se realizó un estudio de genotipado anticipado del HLA-B*57:01 previo a la administración de Abacavir presentaba un perfil molecular asociado con un riesgo elevado de desarrollar reacciones de hipersensibilidad (SJS/TEN) al fármaco; por lo que se recomendó un tratamiento alternativo en estos pacientes (113). De forma similar, el porcentaje de pacientes con un genotipo asociado a baja respuesta al tratamiento con regímenes que contienen PEG-interferón-alfa (IL28B; rs12979860; MAF=0,31 T) fue del 63,68% (Figura 10). Esto supone que el 18,83% de los pacientes pertenecientes al grupo 1 de estudios PGx de nuestra clasificación (“*BM PGx requeridos para la selección de tratamiento según las agencias reguladoras*”; Figura 8A) presentó un perfil molecular según el cual era necesaria la

modificación de la pauta terapéutica estándar y la selección de un tratamiento alternativo. Si analizamos los estudios más frecuentes y relevantes del grupo 2 de nuestra clasificación interna (Figura 8A), encontramos que 13%, el 58%, el 21% y el 24% de los pacientes analizados previo a la administración de Tiopurinas, Metotrexate, Inmunosupresores y Voriconazol respectivamente presentaban un perfil molecular para el cual estaba indicada la modificación de la pauta terapéutica estándar (Figura 10). La cohorte de pacientes analizada es, hasta la fecha, una de las cohortes más grandes de España.

Finalmente, los costes estimados para el SNS por paciente fueron más bajos que aquellos descritos para el genotipado exclusivamente en EEUU y otros países (114). Además, los costes calculados para cada proceso, no difieren mucho de los costes de otras intervenciones rutinarias para el SNS como la administración intravenosa de fármacos (260€) o la determinación de niveles plasmáticos de un fármaco (106€). Sin embargo, debido a las diferencias en los sistemas sanitarios así como heterogeneidad de genotipos de la población diana parece necesaria la realización de un estudio de coste-eficiencia de nuestra estrategia con el fin de obtener un mayor apoyo a nivel institucional y lograr una mayor expansión de la cartera de servicios.

5.2. Bloque II. Implementación en la rutina clínica de una estrategia para la individualización del tratamiento con Voriconazol basada en el genotipado anticipado de CYP2C19 y monitorización de niveles plasmáticos.

La gran variabilidad interindividual en las concentraciones plasmáticas de VCZ, directamente asociada con su heterogeneidad de fenotipos de respuesta clínica hace que la individualización de la pauta terapéutica con VCZ resulte en la actualidad de gran interés. En este contexto, en los últimos años numerosos estudios han propuesto que la optimización de la dosis inicial de VCZ así como la monitorización de los niveles plasmáticos (TDM) constituyen herramientas de enorme utilidad para guiar el tratamiento y profilaxis con VCZ (48, 100, 115, 116). En el año 2017 nuestro grupo diseñó un protocolo para la individualización del tratamiento con VCZ, encuadrado dentro de la Unidad de Farmacogenética Clínica del HULP (descrita en el Bloque D), en pacientes inmunodeprimidos que iban a ser sometidos a trasplante de progenitores hematopoyéticos basado en la PGx para la optimización de la dosis inicial y TDM rutinario para los ajustes de dosis sucesivos. La estrategia implementada está basada en una “estrategia de genotipado anticipado en una población de riesgo pre-definida” (30), en la cual el genotipado de *CYP2C19* se solicitaba en las primeras evaluaciones clínicas pre-TPH junto con otras pruebas analíticas rutinarias. En este contexto, eran necesarios tiempos de respuesta ajustados de modo que los resultados moleculares y las recomendaciones clínicas individualizadas estuvieran disponibles en el momento de la prescripción. El tiempo medio de respuesta en nuestra cohorte de estudio fue de 18,30 días y en todos los pacientes incluidos el resultado se entregó previo al inicio del tratamiento.

Teniendo en cuenta los resultados moleculares y en base a los datos obtenidos en la simulación de Hicks et al. (48), la guía clínica CPIC (41) y nuestra experiencia previa, se recomendaron modificaciones de la dosis estándar inicial en el 29% de los pacientes analizados. Posteriormente, comparamos los resultados de nuestra cohorte (Tabla 11A) con los presentados en el estudio de Hicks et al. (48) empleando la estrategia terapéutica tradicional (sin PGx ni TDM; Tabla 11C). Los resultados de la comparativa se muestran en la Figura 3A. Encontramos que el 57,14% de los pacientes de nuestra cohorte (con modificaciones de la dosis estándar inicial en base al genotipo de *CYP2C19*) alcanzaron las concentraciones terapéuticas diana de VCZ en los primeros 5 días de tratamiento/profilaxis, en contraste con el 42% de los pacientes en el estudio de Hicks et al. (48) donde todos los pacientes fueron tratados con concentraciones iniciales estándar de VCZ. En la simulación realizada en este mismo estudio con dosis iniciales extrapoladas, Hicks et al. (48) propusieron que alrededor del 57% de los pacientes alcanzaría las concentraciones terapéuticas diana en los primeros 5 días.

En nuestra cohorte de estudio, se asignaron dosis estándar iniciales a los pacientes con genotipos *CYP2C19**1/*1, *1/*2 y *2/*17 (*CYP2C19* NM e IM), de modo que un 65% de los

pacientes alcanzaron concentraciones terapéuticas en los primeros 5 días. En pacientes CYP2C19*1/*17 (CYP2C19 RM) se recomendó una dosis estándar inicial de 26mg/kg/día en pacientes de ≥ 12 años y de 30 mg/kg/día en pacientes más jóvenes, obteniendo que un 33,33% de los pacientes alcanzaba concentraciones terapéuticas en los primeros 5 días (Tabla 11.1A; Figuras 11 y 12). Hicks et al. (48) reportaron en su estudio que sólo el 21% de los CYP2C19 RM menores de 12 años alcanzó concentraciones terapéuticas de VCZ con la pauta terapéutica estándar (Tabla 11.2C). En nuestra cohorte de estudio (en la que el 79% de los pacientes eran menores de 12 años) el ajuste de la dosis estándar de inicio en base al genotipo de CYP2C19 incrementó el porcentaje de RM que alcanzaron el rango terapéutico diana frente a los resultados obtenidos en el estudio de Hicks et al. empleando la estrategia terapéutica tradicional (Tabla 11.1C). Como era de esperar teniendo en cuenta la distribución de grupos de edad de nuestra cohorte general se obtuvieron resultados muy similares al analizar por separado los pacientes menores de 12 años (Tabla 11.2A). Hicks et al. no propusieron en su estudio modificaciones de la dosis estándar para pacientes con fenotipo de CYP2C19 RM mayores de 12 años, y sugirieron que alrededor del 57% de los pacientes podría alcanzar el rango terapéutico diana con dosis estándar de inicio (48) (Tabla 6). Sin embargo, en base a nuestra experiencia clínica previa, en nuestra estrategia recomendamos un aumento de las dosis estándar de inicio también pacientes RM mayores de 12 años (26mg/kg/día) obteniendo que el 50% de estos pacientes alcanzaron concentraciones terapéuticas diana en los primeros 5 días. En este contexto, proponemos que las recomendaciones de dosis para individuos CYP2C19 RM deberían ser revisadas con el fin de incrementar aún más el porcentaje de pacientes que alcanza concentraciones terapéuticas de VCZ, ya que resulta aún un porcentaje bajo especialmente en pacientes más jóvenes.

Finalmente, el ajuste de dosis inicial de VCZ basado en la PGx en nuestra cohorte de estudio permitió que uno de los pacientes CYP2C19*17/*17 (UM) alcanzase concentraciones terapéuticas diana en la primera medida de niveles plasmáticos tras la administración de VCZ. El otro paciente con fenotipo UM tuvo un primer nivel de 0,70 μ g/ml; sin embargo, consiguió alcanzar concentraciones terapéuticas de VCZ tras 14 días gracias a la técnica de TDM (Figura 13). En el estudio de Hicks et al., todos los pacientes CYP2C19*17/*17 presentaron concentraciones subterapéuticas de VCZ ($< 0,70\mu$ g/ml) con la estrategia terapéutica tradicional (48), sin embargo ninguno de nuestros pacientes con dosis de inicio ajustadas en base a la PGx presentó esas concentraciones tan bajas. Todos los pacientes UM de nuestra cohorte eran menores de 12 años (Tablas 11.1 y 11.2; Figura 11).

Estudios previos han reportado que las concentraciones supratrapéuticas de VCZ ($> 5,5\mu$ g/ml) pueden estar asociadas a la aparición de eventos adversos, especialmente neurotoxicidad (117, 118). En las primeras medidas tras la administración de VCZ sólo encontramos un paciente con

fenotipo de RM (CYP2C19*1/*17) menor de 12 años con una concentración terapéutica de 12µg/ml (Figura 12). Este paciente desarrolló fototoxicidad secundaria al tratamiento. Sin embargo, esta concentración fue corregida rápidamente tras las técnicas de TDM y se alcanzaron concentraciones terapéuticas en 7 días. Esta concentración podría deberse a la presencia de medicaciones concomitantes. El paciente comenzó tratamiento simultáneo con Septrin (combinación de Trimetoprim y Sulfametoxazol) que ha demostrado ser en estudios *in vitro* un inhibidor selectivo de CYP2C8 y CYP2C9, y a altas concentraciones de otros CYP incluyendo CYP2C19 (119). Como hemos descrito en el bloque III, CYP2C9 participa en menor medida en el metabolismo de VCZ de modo que el efecto de esta inhibición podría resultar en niveles plasmáticos de fármaco más elevados (52, 58). Otros factores que podrían explicar esta concentración podrían ser el porcentaje de variabilidad impredecible debido a la cinética no-lineal del fármaco o a alguna variante rara en CYP2C19 o polimorfismos en otros genes implicados en la ruta metabólica no detectados con nuestro panel de genotipado. Sin embargo, son los pacientes con fenotipo PM los más propensos a desarrollar concentraciones supraterapéuticas de VCZ (<5,5 µg/ml).

Por otro lado, las concentraciones subterapéuticas de VCZ se asocian con fallos en el tratamiento (100). Específicamente, concentraciones plasmáticas de VCZ <0,35µg/ml se han asociado con tasas de mortalidad más elevadas por IFIs (117). Sólo 2 pacientes de nuestra cohorte presentaron concentraciones terapéuticas <0,35µg/ml, un CYP2C19*1/*2 y un *2/*17 (Figura 12). El paciente CYP2C19*1/*2 alcanzó niveles terapéuticos en 18 días, sin embargo el *2/*17 que seguía profilaxis con VCZ no consiguió alcanzar niveles terapéuticos en todo el período. En el momento del estudio se administró al paciente tratamiento concomitante con Metilprednisolona entre otros fármacos. Se ha descrito que la metilprednisolona es un inductor de CYP219 y su coadministración con VCZ se ha asociado con niveles plasmáticos más bajos de este fármaco (120).

La segunda herramienta en la que se basó nuestra estrategia de individualización fue TDM para guiar los ajustes de dosis en aquellos pacientes que no alcanzaron concentraciones terapéuticas en la primera medida tras la administración de VCZ. Las recomendaciones de ajuste de dosis se basaron en las medidas de concentración plasmáticas realizadas periódicamente, sin embargo las modificaciones finales de dosis se realizaron bajo el criterio del especialista. Las Tablas 11.1B y 11.2B muestran el porcentaje de pacientes que alcanzaron concentraciones plasmáticas diana de VCZ durante el tratamiento/profilaxis en nuestra cohorte de estudio. Encontramos que el 90% de los CYP2C19 NM e IM y el 100% de los RM y UM alcanzaron concentraciones terapéuticas durante el tratamiento/profilaxis. Se ha reportado en la literatura que el fallo en el tratamiento suele ocurrir en los primeros 35 días (118). Mediante la implementación de nuestra estrategia combinada con PGx y TDM, el 82,14% de los pacientes alcanzó concentraciones terapéuticas

en los primeros 20 días de tratamiento (Figura 12). Sin embargo, debido al pequeño tamaño muestral de la población estudiada, parece necesaria la replicación de estos resultados en poblaciones más grandes y heterogéneas. Por otro lado, se ha descrito que alrededor de un 4,4% de la variabilidad genética total de *CYP2C19* se explica por variantes raras, poco frecuentes en población (5). En este estudio, al realizar un genotipado dirigido de SNPs en *CYP2C19*, no podemos descartar la presencia de este tipo de variantes menos frecuentes que no estaríamos detectando con la técnica empleada.

5.3. Bloque III. Identificación de nuevas asociaciones farmacogenéticas que permitan mejorar los algoritmos clínicos monogénicos existentes específicos de fármaco y patología.

5.3.1. Modelos predictivos de la farmacocinética de Voriconazol basados en farmacogenética: Estudio exploratorio anidado a estudios de bioequivalencia de dos formulaciones de Voriconazol 200mg en población española.

En este apartado hemos realizado un estudio observacional anidado a 3 ensayos de bioequivalencia de 2 formulaciones de VCZ en 106 pacientes españoles con el fin de evaluar si la incorporación de BM PGx adicionales a los algoritmos clínicos existentes, basados únicamente en el genotipo de *CYP2C19*, podría ayudar a mejorar las tasas de predicción de $AUC_{0-\infty}$. Este proceso es complejo principalmente debido a la FC no-lineal de VCZ (121).

Nuestros resultados confirmaron que, tal y como se ha descrito previamente (41, 45, 53), *CYP2C19* tiene un efecto mayoritario en el metabolismo de VCZ y constituye el factor principal para explicar la heterogeneidad interindividual en $AUC_{0-\infty}$ en nuestra cohorte (Figura 14). En este contexto, la primera aproximación consistió en el desarrollo de un modelo predictivo monogénico de referencia, basado en los algoritmos clínicos existentes para la optimización del tratamiento con VCZ, apoyado únicamente en el fenotipo inferido de *CYP2C19* y al que nos referiremos con el “modelo de referencia basado en *CYP2C19*” (Tabla 13). Tras el genotipado de *CYP2C19* dividimos nuestra cohorte de estudio en 5 grupos de fenotipos inferidos: UM (N=4), RM (N=34), NM (N=38), IM (N=28) y PM (N=2). El valor de R^2 de este modelo fue de 0,438 y de RMSEP 0,18.

Hasta la fecha, la mayoría de los algoritmos de dosificación basados en PGx implementados en la práctica clínica son monogénicos, y este es el caso de VCZ (22). Sin embargo, al estudiar la ruta metabólica de VCZ, encontramos que existen BM adicionales implicados en la FC de VCZ que podrían contribuir a la explicación de la variabilidad residual en las concentraciones plasmáticas. En este contexto, decidimos desarrollar un estudio estadístico exploratorio con el fin de evaluar si la incorporación de algoritmos poligénicos de predicción podría mejorar las tasas de predicción de $AUC_{0-\infty}$ de VCZ.

Con este fin, decidimos crear un modelo que incluyese todos los BM previamente seleccionados como variables de interés para este estudio, además de otras variables demográficas. Este modelo se denominó “modelo predictivo multifactorial del $AUC_{0-\infty}$ de VCZ” (Tabla 14). El objetivo de este modelo era detectar todas aquellas variables que podrían contribuir a la variabilidad interindividual de $AUC_{0-\infty}$. Para este análisis se infirieron los haplotipos para las enzimas metabolizadoras principales (*CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9* and *CYP2C19*) y se codificaron los diplotipos empleando la nomenclatura consenso Star (*) allele, para detectar el efecto global de la proteína en lugar de los SNPs individuales. El mejor modelo predictivo

obtenido confirmó el efecto principal de CYP2C19 en nuestra cohorte de población española (con una contribución de ~39% al R^2 global del modelo). Además, se revelaron otros BM como posibles variables de interés para la predicción del $AUC_{0-\infty}$: rs1057868 y rs2868177 en *POR* (~18%), *CYP2C9* (~8%), rs1800822 en *FMO3* (~4%), rs3814055 en *NR1I2* (~4%), *CYP3A4* (~3%) y, así como el género (~4%), y el IMC (~10%). La incorporación de estos BM y de los datos demográficos mencionados (género e IMC) incrementó el R^2 global con respecto al modelo de referencia ($R^2_{\text{Modelo Multifactorial}}=0.587 > R^2_{\text{Modelo de Referencia}}=0.438$) y disminuyó el valor de RMSEP global ($RMSEP_{\text{Multi-factorial Model}}=0.165 < RMSEP_{\text{Reference Model}}=0.180$) indicando un aumento en la precisión de las predicciones de $AUC_{0-\infty}$ en comparación con el modelo monogénico de referencia (Tabla 15; Figura 15).

En este estudio hemos identificado distintos BM, relacionados con la ruta metabólica de VCZ en la literatura, que contribuyen a explicar la variabilidad residual en el $AUC_{0-\infty}$ de VCZ en nuestra población de estudio. En este contexto, la inclusión de estos BM en los algoritmos existentes de predicción basados únicamente en CYP2C19 parece mejorar las predicciones de $AUC_{0-\infty}$ (Tabla 15). Por lo que sabemos a partir de la revisión de la literatura previa, no existen hasta la fecha estudios PGx que relacionen específicamente la variabilidad genética en *POR*, *FMO3* y *NR1I2* con la heterogeneidad interindividual en la FC de VCZ, sin embargo la implicación de estas proteínas en la ruta metabólica del fármaco está bien descrita.

Debido al efecto mayoritario de CYP2C19 en el metabolismo de VCZ, estos BM no explican de modo individual un porcentaje elevado de la variabilidad interindividual (Tabla 15). Sin embargo, en conjunto estos BM podrían explicar hasta el 60% de la variabilidad residual que no está explicada por el genotipo de *CYP2C19*. Además, planteamos que estos BM podrían resultar aún más relevantes en pacientes con fenotipos PM de CYP2C19 en los que, en ausencia de enzima CYP2C19 funcional, el efecto de otras enzimas metabolizadoras podría cobrar más importancia. Este fenómeno ha sido previamente descrito en otros fármacos como el TAC, tal y como se sugiere en el Bloque 3.2 de resultados de esta misma tesis doctoral. Sin embargo, debido al pequeño número de CYP2C19 PM en nuestra cohorte de estudio (N=2), no fuimos capaces de diseñar modelos de predicción para estos pacientes por lo que el efecto específico de estos BM en este grupo fenotípico debería ser analizado en estudios poblacionales mayores.

Sin embargo, tras la evaluación de los dos modelos descritos en este trabajo en base a los coeficientes de R^2 y RMSEP, podemos ver que el modelo más adecuado para la predicción del $AUC_{0-\infty}$ en nuestra población de estudio es el modelo poligénico (Figura 15). Teniendo en cuenta estos resultados y la literatura previa, proponemos que el genotipo de *FMO3*, *NR1I2*, *POR*, *CYP3A4* y *CYP2C9* podría representar una herramienta de utilidad para explicar la variabilidad FC de VCZ, y que su incorporación a los algoritmos clínicos monogénicos

existentes, basados únicamente en el genotipo de *CYP2C19*, podría mejorar las tasas de predicción de $AUC_{0-\infty}$. Sin embargo, parece necesario evaluar estos modelos en cohortes más grandes y en distintas poblaciones para validar estos resultados y trasladarlos a la clínica.

Con el fin de conseguir una implementación coste-eficiente de los modelos poligénicos en la práctica clínica es necesario contar con plataformas de genotipado que permitan el genotipado simultáneo de múltiples BM en una misma prueba. En este contexto, a medida que disminuyen los costes de las técnicas de NGS, existe una tendencia general hacia la aplicación de paneles de genotipado e incluso de secuenciación completa de exomas y genomas con el fin de tener disponible una gran cantidad de información molecular para su interpretación en distintos ámbitos. Sin embargo, como hemos mencionado en el Bloque I por el momento en nuestra experiencia la aplicación de *SNP-arrays* constituye la mejor solución para la implementación de modelos poligénicos en la práctica clínica en términos de costes y tiempos de respuesta.

5.3.2. Influencia de *ABCB1* y *POR* en la farmacocinética de Tacrolimus oral en pacientes pediátricos estables post-trasplante renal

TAC se caracteriza por presentar una gran variabilidad interindividual (74). Como hemos mencionado previamente, un elevado porcentaje de esta variabilidad se debe a polimorfismos genéticos en genes que codifican enzimas metabolizadoras (*CYP3A4/5*), genes que regulan la actividad de estas enzimas (*POR*) así como variantes en genes que codifican proteínas transportadoras como es el caso del gen *ABCB1* (78, 79, 122-124).

En este apartado, se exploró el impacto de factores genéticos y clínicos en la exposición a TAC en 21 pacientes pediátricos estables post-trasplante renal. Por lo que sabemos, este es el primer estudio analizando la influencia conjunta de la variabilidad genética en *CYP3A5* (rs776746), *POR* (rs1057868 y rs2868177) y *ABCB1* (rs1045642) en la FC de TAC tras la administración de Prograf y Advagraf, dos formulaciones bioequivalentes de TAC. Al obtenerse resultados muy similares con ambas formulaciones, en el cuerpo del artículo se han detallado los resultados de Advagraf pero los resultados de Prograf se detallan en el Anexo II.

En primer lugar realizamos un análisis univariante de los 21 pacientes incluidos en el estudio (Tabla 16). En este análisis encontramos que el único polimorfismo asociado significativamente a la FC de TAC es el rs776746 que codifica el haplotipo *CYP3A5**3, que afecta a los 3 parámetros FC seleccionados para este estudio: AUC_{0-24} , C_{max} and C_{min} y muestra una clara asociación genotipo-respuesta. Esto confirma el impacto mayoritario de este BM en la FC de TAC, bien descrito previamente en la literatura (78, 79, 84, 122).

Una vez confirmado este efecto, realizamos un análisis multivariante incluyendo todos los pacientes (N=21) encontrando que el genotipo de *CYP3A5* explicaba el 39,6%, 20,6% y 59,6%

de la variabilidad el AUC_{0-24} , C_{max} y C_{min} respectivamente (Tabla 20). Estos resultados coinciden con los reportados en estudios previos en los que se sugiere que el rs776746 en *CYP3A5* explica más del 29% de los requerimientos de dosis de TAC (69). Los inductores del CYP3A Deflazacort y Metilprednisolona fueron las únicas covariables no genéticas de interés retenidas en el modelo. El tratamiento concomitante con Deflazacort y Metilprednisolona explicó el 21% y 14% de la variabilidad en el AUC_{0-24} (Tabla 20). En el caso del C_{max} sólo Deflazacort se retuvo en el modelo, explicando el 20% de la variabilidad. La variabilidad en C_{min} no parecía estar influida por estos factores en nuestro estudio. Algunos autores han descrito que el hematocrito podría explicar alrededor del 11% y del 14% del aclaramiento y AUC_{0-24} de TAC respectivamente (61). Sin embargo, estos resultados no pudieron confirmarse en nuestro estudio probablemente debido al pequeño tamaño muestral y a la baja variabilidad en los valores de hematocrito entre nuestros pacientes.

Recientemente, el haplotipo CYP3A4*22 que codifica una enzima CYP3A4 no funcional se ha descrito como un factor genético determinante en la determinación del perfil FC de TAC (87, 124, 125). En este trabajo los ensayos de genotipado se realizaron de manera individualizada por lo que se decidió excluir el estudio de este polimorfismo debido a su baja frecuencia en población europea (MAF=0,025) y el pequeño tamaño de nuestra cohorte. En este contexto se asumió un genotipo *wild type* para este BM (CYP3A4*1/*1) para la interpretación de los resultados en este trabajo.

La influencia de polimorfismos en el gen *ABCB1* en la FC de TAC se ha analizado ampliamente en estudios previos, sin embargo los resultados son controvertidos (90, 93). Algunos estudios sugieren que la variabilidad genética en *ABCB1* no tiene ningún efecto en la FC de TAC (126), mientras que otros estudios proponen que pacientes con un genotipo homocigotos para el alelo C del polimorfismo rs1045642 requerirán dosis superiores de TAC para obtener niveles plasmáticos dentro del rango terapéutico (89). En nuestro análisis univariante de la cohorte general de estudio no se encontraron diferencias significativas entre los distintos genotipos de *ABCB1* (Tabla 17).

POR es una coenzima de membrana que funciona como donador de electrones para las enzimas CYP. De este modo, la variabilidad genética en el gen POR se ha asociado con alteraciones de la actividad enzimática de CYP3A. Existe también cierta controversia en la asociación entre la FC de TAC y la variabilidad en este BM. Algunos estudios describen que portadores del alelo T del rs1057868 (que codifica el haplotipo POR*28) en el gen *POR* presentan requerimientos superiores de dosis de TAC en pacientes CYP3A5-expresadores pero no en no-expresadores (61, 62). Sin embargo, otros grupos describen esta asociación en ambos grupos fenotípicos de CYP3A5 (124). El análisis univariante realizado en nuestra cohorte al completo no reveló

diferencias significativas en AUC_{0-24} , C_{max} y C_{min} en pacientes con distintos genotipos de este polimorfismo. Sin embargo, sí encontramos una tendencia creciente en estos parámetros en aquellos pacientes que presentan el alelo POR^*28 (Tabla 17). Recientemente, se ha descrito un polimorfismo intrónico en el gen *POR* (rs2868177) en asociación con mayores requerimientos de dosis de warfarina relacionados con alteraciones en la actividad de la proteína *POR* (64), sin embargo no se encontraron asociaciones significativas en nuestra cohorte de estudio (N=21; Tabla 17).

La Figura 16 muestra que existe una gran variabilidad interindividual en los parámetros FC, principalmente en el grupo de pacientes no-expresadores de *CYP3A5* ($CYP3A5^*3/^*3$). Este grupo de pacientes es el más frecuente en población caucásica. En este contexto, decidimos centrar la segunda parte de nuestro estudio en este grupo de pacientes $CYP3A5^*3/^*3$ (N=17). Con el fin de incrementar la sensibilidad de nuestro análisis estadístico, desarrollamos una puntuación genética incluyendo las variantes analizadas en *ABCB1* (rs1045642) y *POR* (rs1057868 y rs2867177), encontrando diferencias significativas en los parámetros FC entre los distintos subgrupos según el genotipo de estos BM (Tabla 19; Figura 17). La aplicación de esta puntuación genética en un modelo multivariante permitió revelar que esta variable explica un 14% y 27% de la variabilidad en AUC_{0-24} y C_{min} respectivamente (Tabla 20). Hasta la fecha, este es el primer modelo multivariante desarrollado para la predicción de parámetros FC de TAC en población pediátrica post-trasplante renal. El MAE de estos modelos es menor a 28%, por lo que en el caso de que puedan replicarse en poblaciones pediátricas independientes podrían representar buenos candidatos para mejorar las predicciones del perfil FC de TAC.

Como hemos mencionado previamente los resultados obtenidos para Prograf son muy similares (Anexo II). Este estudio validó en una cohorte de población española el importante papel de la variabilidad genética en *CYP3A5*. Sin embargo, nuestros resultados muestran que la variabilidad genética en otros BM (*POR* y *ABCB1*) puede contribuir a explicar la variabilidad residual en la respuesta a TAC en pacientes con actividad basal deficiente de *CYP3A5* ($CYP3A5^*3/^*3$; *CYP3A5* no expresadores).

Sin embargo, en los últimos años se han descrito nuevas asociaciones en relación con el perfil FC de TAC. En este contexto, recientemente nuestro grupo ha propuesto un protocolo de estudio ampliado incluyendo nuevos biomarcadores adicionales a las descritas en este estudio (*CYP3A4*, *CYP3A7* y *NR1I2*) en población pediátrica para explorar la posible influencia de la variabilidad genética en otros biomarcadores (ANEXO III).

6. Conclusiones

1. A lo largo de esta tesis doctoral se ha desarrollado una estrategia que ha permitido la implementación de la farmacogenética en la práctica clínica de un hospital perteneciente al Sistema Nacional de Salud. La plataforma de *microarray* de SNPs diseñada para el genotipado simultáneo de polimorfismos en genes que codifican enzimas y proteínas implicadas en las rutas metabólicas de los fármacos más relevantes ha resultado una herramienta esencial para el proceso de implementación en términos de costes y tiempos de respuesta.
2. La estrategia propuesta está basada en dos pilares principales, la individualización de las recomendaciones clínicas y el genotipado anticipado en poblaciones de riesgo. Esta es la primera estrategia para la implementación de la farmacogenética en España en la que las recomendaciones no están integradas en sistemas de prescripción automáticos. Esta aproximación facilita la comprensión y aplicación de los resultados farmacogenéticos a los especialistas de los servicios clínicos peticionarios y al propio paciente. De este modo la estrategia propuesta podría considerarse como un modelo para la implementación en otros hospitales públicos españoles.
3. Desde la creación de la Unidad de Farmacogenética Clínica del HULP se han realizado 3532 estudios. Se recomendaron modificaciones de la pauta terapéutica estándar en alrededor del 6% y el 63% de los pacientes a los que se realizó el genotipado anticipado de HLA-B*57:01 y de *ILE28B* previo a la administración de Abacavir y PEG-interferón-alfa, respectivamente. Por otro lado, se recomendaron modificaciones de la pauta terapéutica estándar en el 13% de los pacientes a los que se realizó el estudio de Tioguaninas, el 58% de pacientes de Metotrexate, el 21% de los pacientes de Inmunosupresores y el 24% de los pacientes de Voriconazol. En total, se recomendaron modificaciones de la pauta terapéutica en más de 900 pacientes. Alrededor del 9% de los estudios realizados fueron para fármacos sin protocolo consenso establecido hasta la fecha. Sin embargo, se espera que el número de protocolos aumente en los próximos años, disminuyendo por tanto este porcentaje.
4. Se ha implementado un protocolo multidisciplinar para la individualización terapéutica del tratamiento y profilaxis con Voriconazol en pacientes hematológicos inmunodeprimidos que van a ser sometidos a un trasplante de progenitores hematopoyéticos. En nuestra experiencia, la farmacogenética ha resultado una herramienta muy útil para la optimización de la dosis de inicio, permitiendo aumentar el número de pacientes dentro de rango terapéutico en los primeros días. Sin embargo, debido a la farmacocinética no-lineal de Voriconazol la monitorización de niveles terapéuticos resulta fundamental como estrategia adicional para guiar los ajustes de

dosis durante el tratamiento o profilaxis. De este modo, la combinación de ambas estrategias puede resultar muy beneficiosa para el paciente.

5. En este trabajo se ha desarrollado un modelo poligénico y multifactorial para la predicción del $AUC_{0-\infty}$ que mejora las tasas de predicción en nuestra cohorte de población española frente al algoritmo clínico monogénico basado únicamente en *CYP2C19*. *POR* contribuye en un 18% al R^2 total del modelo, seguido de *CYP2C9* (8%), BMI (10%), *NR1I2* (4%), *FMO3* (4%), *CYP3A4* (4%), y el género (2%), además de *CYP2C19* (39%) que sigue siendo la variable principal para explicar la variabilidad interindividual de Voriconazol. Sin embargo, este modelo debe ser validado en cohortes más grandes y en diferentes poblaciones antes de ser aplicado en la rutina clínica.
6. Por otro lado, se ha confirmado el efecto mayoritario de la variabilidad genética en *CYP3A5* en el perfil farmacocinético de Tacrolimus en pacientes pediátricos estables post-trasplante renal. Además, la construcción de una puntuación genética a partir de los genotipos obtenidos en los polimorfismos analizados en los genes *POR* y *ABCBI*, ha permitido proponer un modelo poligénico explicativo de AUC_{0-24h} y C_{min} para pacientes con actividad basal deficiente de *CYP3A5* (*CYP3A5**3/*3; PM). En nuestra cohorte de estudio, el genotipo de estos biomarcadores explicaba el 13,7% y el 26,5% de la variabilidad total en el AUC_{0-24h} y C_{min} respectivamente por lo que podrían resultar de utilidad para la evaluación de la respuesta al tratamiento con Tacrolimus.

7. Bibliografía

1. Bouvy JC, De Bruin ML, Koopmanschap MA. Epidemiology of adverse drug reactions in Europe: a review of recent observational studies. *Drug Saf.* 2015;38(5):437-53.
2. Shastry BS. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. *Pharmacogenomics J.* 2006;6(1):16-21.
3. Franceschi A, Tuccori M, Bocci G, Vannozzi F, Di Paolo A, Barbara C, et al. Drug therapeutic failures in emergency department patients. A university hospital experience. *Pharmacol Res.* 2004;49(1):85-91.
4. Giardina C, Cutroneo PM, Mocciaro E, Russo GT, Mandraffino G, Basile G, et al. Adverse Drug Reactions in Hospitalized Patients: Results of the FORWARD (Facilitation of Reporting in Hospital Ward) Study. *Front Pharmacol.* 2018;9:350.
5. Ingelman-Sundberg M, Mkrtchian S, Zhou Y, Lauschke VM. Integrating rare genetic variants into pharmacogenetic drug response predictions. *Hum Genomics.* 2018;12(1):26.
6. Bielinski SJ, Olson JE, Pathak J, Weinshilboum RM, Wang L, Lyke KJ, et al. Preemptive genotyping for personalized medicine: design of the right drug, right dose, right time-using genomic data to individualize treatment protocol. *Mayo Clin Proc.* 2014;89(1):25-33.
7. Relling MV, Evans WE. Pharmacogenomics in the clinic. *Nature.* 2015;526(7573):343-50.
8. Scott SA. Personalizing medicine with clinical pharmacogenetics. *Genet Med.* 2011;13(12):987-95.
9. Wang L, McLeod HL, Weinshilboum RM. Genomics and drug response. *N Engl J Med.* 2011;364(12):1144-53.
10. Sim SC, Kacevska M, Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenomics of drug-metabolizing enzymes: a recent update on clinical implications and endogenous effects. *Pharmacogenomics J.* 2013;13(1):1-11.
11. Rodney A, Rhoades DRB. *Medical physiology : principles for clinical medicine: Third edition.* Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, [2009] ©2009; 2009.
12. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther.* 2013;138(1):103-41.
13. Strolin Benedetti M, Whomsley R, Baltes E. Involvement of enzymes other than CYPs in the oxidative metabolism of xenobiotics. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006;2(6):895-921.
14. Yiannakopoulou E. Pharmacogenomics of phase II metabolizing enzymes and drug transporters: clinical implications. *Pharmacogenomics J.* 2013;13(2):105-9.
15. Li J, Zhang L, Zhou H, Stoneking M, Tang K. Global patterns of genetic diversity and signals of natural selection for human ADME genes. *Hum Mol Genet.* 2011;20(3):528-40.
16. Ehmann F, Caneva L, Prasad K, Paulmichl M, Maliepaard M, Llerena A, et al. Pharmacogenomic information in drug labels: European Medicines Agency perspective. *Pharmacogenomics J.* 2015;15(3):201-10.
17. Frueh FW, Amur S, Mummaneni P, Epstein RS, Aubert RE, DeLuca TM, et al. Pharmacogenomic biomarker information in drug labels approved by the United States food and drug administration: prevalence of related drug use. *Pharmacotherapy.* 2008;28(8):992-8.

18. Hovelson DH, Xue Z, Zawistowski M, Ehm MG, Harris EC, Stocker SL, et al. Characterization of ADME gene variation in 21 populations by exome sequencing. *Pharmacogenet Genomics*. 2017;27(3):89-100.
19. Gaedigk A, Ingelman-Sundberg M, Miller NA, Leeder JS, Whirl-Carrillo M, Klein TE, et al. The Pharmacogene Variation (PharmVar) Consortium: Incorporation of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database. *Clin Pharmacol Ther*. 2018;103(3):399-401.
20. Appell ML, Berg J, Duley J, Evans WE, Kennedy MA, Lennard L, et al. Nomenclature for alleles of the thiopurine methyltransferase gene. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(4):242-8.
21. Committee UN. June 2005 [
22. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, et al. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;92(4):414-7.
23. Sadee W. Pharmacogenomic biomarkers: validation needed for both the molecular genetic mechanism and clinical effect. *Pharmacogenomics*. 2011;12(5):675-80.
24. Horgan D, Jansen M, Leyens L, Lal JA, Sudbrak R, Hackenitz E, et al. An index of barriers for the implementation of personalised medicine and pharmacogenomics in Europe. *Public Health Genomics*. 2014;17(5-6):287-98.
25. Klein ME, Parvez MM, Shin JG. Clinical Implementation of Pharmacogenomics for Personalized Precision Medicine: Barriers and Solutions. *J Pharm Sci*. 2017;106(9):2368-79.
26. St Sauver JL, Bielinski SJ, Olson JE, Bell EJ, Mc Gree ME, Jacobson DJ, et al. Integrating Pharmacogenomics into Clinical Practice: Promise vs Reality. *Am J Med*. 2016;129(10):1093-9 e1.
27. Agundez JA, Abad-Santos F, Aldea A, Alonso-Navarro H, Bernal ML, Borobia AM, et al. Toward a clinical practice guide in pharmacogenomics testing for functional polymorphisms of drug-metabolizing enzymes. Gene/drug pairs and barriers perceived in Spain. *Front Genet*. 2012;3:273.
28. Dunnenberger HM, Crews KR, Hoffman JM, Caudle KE, Broeckel U, Howard SC, et al. Preemptive clinical pharmacogenetics implementation: current programs in five US medical centers. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2015;55:89-106.
29. Relling MV, Klein TE. CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium of the Pharmacogenomics Research Network. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;89(3):464-7.
30. Borobia AMCSA. Implementación de la farmacogenética en la práctica clínica: Hacia las estrategias de genotipado anticipado. *IBJ Clinical Pharmacology*. 2016;1(1).
31. Luzum JA, Pakyz RE, Elsey AR, Haidar CE, Peterson JF, Whirl-Carrillo M, et al. The Pharmacogenomics Research Network Translational Pharmacogenetics Program: Outcomes and Metrics of Pharmacogenetic Implementations Across Diverse Healthcare Systems. *Clin Pharmacol Ther*. 2017;102(3):502-10.
32. Shuldiner AR, Relling MV, Peterson JF, Hicks JK, Freimuth RR, Sadee W, et al. The Pharmacogenomics Research Network Translational Pharmacogenetics Program: overcoming challenges of real-world implementation. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;94(2):207-10.
33. Relling MV, Krauss RM, Roden DM, Klein TE, Fowler DM, Terada N, et al. New Pharmacogenomics Research Network: An Open Community Catalyzing Research and Translation in Precision Medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2017;102(6):897-902.

34. Manson LE, van der Wouden CH, Swen JJ, Guchelaar HJ. The Ubiquitous Pharmacogenomics consortium: making effective treatment optimization accessible to every European citizen. *Pharmacogenomics*. 2017;18(11):1041-5.
35. Hoffman JM, Haidar CE, Wilkinson MR, Crews KR, Baker DK, Kornegay NM, et al. PG4KDS: a model for the clinical implementation of pre-emptive pharmacogenetics. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2014;166C(1):45-55.
36. Weitzel KW, Elsey AR, Langae TY, Burkley B, Nessler DR, Obeng AO, et al. Clinical pharmacogenetics implementation: approaches, successes, and challenges. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2014;166C(1):56-67.
37. Pulley JM, Denny JC, Peterson JF, Bernard GR, Vnencak-Jones CL, Ramirez AH, et al. Operational implementation of prospective genotyping for personalized medicine: the design of the Vanderbilt PREDICT project. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;92(1):87-95.
38. Dhillon S. *Clinical pharmacokinetics*. England: London ; Chicago : Pharmaceutical Press; 2006.
39. Tong HY, Davila-Fajardo CL, Borobia AM, Martinez-Gonzalez LJ, Lubomirov R, Perea Leon LM, et al. A New Pharmacogenetic Algorithm to Predict the Most Appropriate Dosage of Acenocoumarol for Stable Anticoagulation in a Mixed Spanish Population. *PLoS One*. 2016;11(3):e0150456.
40. Zhang X, Lin G, Tan L, Li J. Current progress of tacrolimus dosing in solid organ transplant recipients: Pharmacogenetic considerations. *Biomed Pharmacother*. 2018;102:107-14.
41. Moriyama B, Obeng AO, Barbarino J, Penzak SR, Henning SA, Scott SA, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP2C19 and Voriconazole Therapy. *Clin Pharmacol Ther*. 2016.
42. Koehler P, Hamprecht A, Bader O, Bekerredjian-Ding I, Buchheidt D, Doelken G, et al. Epidemiology of invasive aspergillosis and azole resistance in patients with acute leukaemia: the SEPIA Study. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;49(2):218-23.
43. Lestrade PP, van der Velden W, Bouwman F, Stoop FJ, Blijlevens NMA, Melchers WJG, et al. Epidemiology of invasive aspergillosis and triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* in patients with haematological malignancies: a single-centre retrospective cohort study. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(5):1389-94.
44. Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica*. 2006;91(8):1068-75.
45. Mikus G, Scholz IM, Weiss J. Pharmacogenomics of the triazole antifungal agent voriconazole. *Pharmacogenomics*. 2011;12(6):861-72.
46. Andes D, Pascual A, Marchetti O. Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(1):24-34.
47. Pascual A, Calandra T, Bolay S, Buclin T, Bille J, Marchetti O. Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis*. 2008;46(2):201-11.

48. Hicks JK, Crews KR, Flynn P, Haidar CE, Daniels CC, Yang W, et al. Voriconazole plasma concentrations in immunocompromised pediatric patients vary by CYP2C19 diplotypes. *Pharmacogenomics*. 2014;15(8):1065-78.
49. Roffey SJ, Cole S, Comby P, Gibson D, Jezequel SG, Nedderman AN, et al. The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog, and human. *Drug Metab Dispos*. 2003;31(6):731-41.
50. Murayama N, Imai N, Nakane T, Shimizu M, Yamazaki H. Roles of CYP3A4 and CYP2C19 in methyl hydroxylated and N-oxidized metabolite formation from voriconazole, a new anti-fungal agent, in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol*. 2007;73(12):2020-6.
51. Yanni SB, Annaert PP, Augustijns P, Bridges A, Gao Y, Benjamin DK, Jr., et al. Role of flavin-containing monooxygenase in oxidative metabolism of voriconazole by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(6):1119-25.
52. Theuretzbacher U, Ihle F, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. *Clin Pharmacokinet*. 2006;45(7):649-63.
53. Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A, Grandia L, Maitland-van der Zee AH, Mulder H, et al. Pharmacogenetics: from bench to byte--an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;89(5):662-73.
54. Barbarino JM, Staats CE, Venkataramanan R, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(10):563-85.
55. Gijzen VM, van Schaik RH, Elens L, Soldin OP, Soldin SJ, Koren G, et al. CYP3A4*22 and CYP3A combined genotypes both correlate with tacrolimus disposition in pediatric heart transplant recipients. *Pharmacogenomics*. 2013;14(9):1027-36.
56. Hsieh KP, Lin YY, Cheng CL, Lai ML, Lin MS, Siest JP, et al. Novel mutations of CYP3A4 in Chinese. *Drug Metab Dispos*. 2001;29(3):268-73.
57. Yamazaki H, Nakamoto M, Shimizu M, Murayama N, Niwa T. Potential impact of cytochrome P450 3A5 in human liver on drug interactions with triazoles. *Br J Clin Pharmacol*. 2010;69(6):593-7.
58. Hyland R, Jones BC, Smith DA. Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-oxidation of voriconazole. *Drug Metab Dispos*. 2003;31(5):540-7.
59. Niwa T, Hata T. The Effect of Genetic Polymorphism on the Inhibition of Azole Antifungal Agents Against CYP2C9-Mediated Metabolism. *J Pharm Sci*. 2016;105(3):1345-8.
60. Van Booven D, Marsh S, McLeod H, Carrillo MW, Sangkuhl K, Klein TE, et al. Cytochrome P450 2C9-CYP2C9. *Pharmacogenet Genomics*. 2010;20(4):277-81.
61. de Jonge H, Metalidis C, Naesens M, Lambrechts D, Kuypers DR. The P450 oxidoreductase *28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients. *Pharmacogenomics*. 2011;12(9):1281-91.
62. Gijzen VM, van Schaik RH, Soldin OP, Soldin SJ, Nulman I, Koren G, et al. P450 oxidoreductase *28 (POR*28) and tacrolimus disposition in pediatric kidney transplant recipients--a pilot study. *Ther Drug Monit*. 2014;36(2):152-8.
63. Oneda B, Crettol S, Jaquenoud Sirot E, Bochud M, Ansermot N, Eap CB. The P450 oxidoreductase genotype is associated with CYP3A activity in vivo as measured by the midazolam phenotyping test. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19(11):877-83.

64. Zhang X, Li L, Ding X, Kaminsky LS. Identification of cytochrome P450 oxidoreductase gene variants that are significantly associated with the interindividual variations in warfarin maintenance dose. *Drug Metab Dispos.* 2011;39(8):1433-9.
65. Choi Y, Jiang F, An H, Park HJ, Choi JH, Lee H. A pharmacogenomic study on the pharmacokinetics of tacrolimus in healthy subjects using the DMET(TM) Plus platform. *Pharmacogenomics J.* 2017;17(2):174-9.
66. Yanni SB, Annaert PP, Augustijns P, Ibrahim JG, Benjamin DK, Jr., Thakker DR. In vitro hepatic metabolism explains higher clearance of voriconazole in children versus adults: role of CYP2C19 and flavin-containing monooxygenase 3. *Drug Metab Dispos.* 2010;38(1):25-31.
67. Ren L, Teng M, Zhang T, Zhang X, Sun B, Qin S, et al. Donors FMO3 polymorphisms affect tacrolimus elimination in Chinese liver transplant patients. *Pharmacogenomics.* 2017;18(3):265-75.
68. Tavira B, Gomez J, Diaz-Corte C, Suarez B, Coronel D, Arias M, et al. ABCB1 (MDR-1) pharmacogenetics of tacrolimus in renal transplanted patients: a Next Generation Sequencing approach. *Clin Chem Lab Med.* 2015;53(10):1515-9.
69. Tang JT, Andrews LM, van Gelder T, Shi YY, van Schaik RH, Wang LL, et al. Pharmacogenetic aspects of the use of tacrolimus in renal transplantation: recent developments and ethnic considerations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2016;12(5):555-65.
70. Weiss J, Ten Hoevel MM, Burhenne J, Walter-Sack I, Hoffmann MM, Rengelshausen J, et al. CYP2C19 genotype is a major factor contributing to the highly variable pharmacokinetics of voriconazole. *J Clin Pharmacol.* 2009;49(2):196-204.
71. First MR. Tacrolimus based immunosuppression. *J Nephrol.* 2004;17 Suppl 8:S25-31.
72. Scott LJ, McKeage K, Keam SJ, Plosker GL. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. *Drugs.* 2003;63(12):1247-97.
73. Felipe CR, Silva HT, Machado PG, Garcia R, da Silva Moreira SR, Pestana JO. The impact of ethnic miscegenation on tacrolimus clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring. *Clin Transplant.* 2002;16(4):262-72.
74. Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005;56(1):23-46.
75. Venkataramanan R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V, et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet.* 1995;29(6):404-30.
76. Martial LC, Verstegen RH, Cornelissen EA, Aarnoutse RE, Schreuder MF, Bruggemann RJ. A preliminary study searching for the right dose of tacrolimus in very young (≤ 4 years) renal transplant patients. *J Pharm Pharmacol.* 2016;68(11):1366-72.
77. Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P, Maes B, Coosemans W, Pirenne J, et al. Time-related clinical determinants of long-term tacrolimus pharmacokinetics in combination therapy with mycophenolic acid and corticosteroids: a prospective study in one hundred de novo renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(11):741-62.
78. Mourad M, Mourad G, Wallemacq P, Garrigue V, Van Bellingen C, Van Kerckhove V, et al. Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose requirements after kidney transplantation in relation to CYP3A5 and MDR1 polymorphisms and steroids. *Transplantation.* 2005;80(7):977-84.

79. Mourad M, Wallemacq P, De Meyer M, Brandt D, Van Kerkhove V, Malaise J, et al. The influence of genetic polymorphisms of cytochrome P450 3A5 and ABCB1 on starting dose- and weight-standardized tacrolimus trough concentrations after kidney transplantation in relation to renal function. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(10):1192-8.
80. Undre NA, van Hooff J, Christiaans M, Vanrenterghem Y, Donck J, Heeman U, et al. Low systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection. *Transplant Proc.* 1999;31(1-2):296-8.
81. Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, et al. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;74(3):245-54.
82. Jun KR, Lee W, Jang MS, Chun S, Song GW, Park KT, et al. Tacrolimus concentrations in relation to CYP3A and ABCB1 polymorphisms among solid organ transplant recipients in Korea. *Transplantation.* 2009;87(8):1225-31.
83. MacPhee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, et al. The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation. *Am J Transplant.* 2004;4(6):914-9.
84. Thervet E, Anglicheau D, King B, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P, et al. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation.* 2003;76(8):1233-5.
85. van Schaik RH, van der Heiden IP, van den Anker JN, Lindemans J. CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. *Clin Chem.* 2002;48(10):1668-71.
86. Hendijani F, Azarpira N, Kaviani M. Effect of CYP3A5*1 expression on tacrolimus required dose for transplant pediatrics: A systematic review and meta-analysis. *Pediatr Transplant.* 2018:e13248.
87. Tang HL, Xie HG, Yao Y, Hu YF. Lower tacrolimus daily dose requirements and acute rejection rates in the CYP3A5 nonexpressers than expressers. *Pharmacogenet Genomics.* 2011;21(11):713-20.
88. Birdwell KA, Decker B, Barbarino JM, Peterson JF, Stein CM, Sadee W, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP3A5 Genotype and Tacrolimus Dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2015;98(1):19-24.
89. Ayrton A, Morgan P. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica.* 2001;31(8-9):469-97.
90. Yu X, Xie H, Wei B, Zhang M, Wang W, Wu J, et al. Association of MDR1 gene SNPs and haplotypes with the tacrolimus dose requirements in Han Chinese liver transplant recipients. *PLoS One.* 2011;6(11):e25933.
91. Genvigir FD, Salgado PC, Felipe CR, Luo EY, Alves C, Cerda A, et al. Influence of the CYP3A4/5 genetic score and ABCB1 polymorphisms on tacrolimus exposure and renal function in Brazilian kidney transplant patients. *Pharmacogenet Genomics.* 2016;26(10):462-72.
92. Hawwa AF, McKiernan PJ, Shields M, Millership JS, Collier PS, McElnay JC. Influence of ABCB1 polymorphisms and haplotypes on tacrolimus nephrotoxicity and dosage requirements in children with liver transplant. *Br J Clin Pharmacol.* 2009;68(3):413-21.

93. Kim IW, Noh H, Ji E, Han N, Hong SH, Ha J, et al. Identification of factors affecting tacrolimus level and 5-year clinical outcome in kidney transplant patients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012;111(4):217-23.
94. Llaudo I, Colom H, Gimenez-Bonafe P, Torras J, Caldes A, Sarrias M, et al. Do drug transporter (ABCB1) SNPs and P-glycoprotein function influence cyclosporine and macrolides exposure in renal transplant patients? Results of the pharmacogenomic substudy within the symphony study. *Transpl Int*. 2013;26(2):177-86.
95. Shi XJ, Geng F, Jiao Z, Cui XY, Qiu XY, Zhong MK. Association of ABCB1, CYP3A4*18B and CYP3A5*3 genotypes with the pharmacokinetics of tacrolimus in healthy Chinese subjects: a population pharmacokinetic analysis. *J Clin Pharm Ther*. 2011;36(5):614-24.
96. Agrawal V, Huang N, Miller WL. Pharmacogenetics of P450 oxidoreductase: effect of sequence variants on activities of CYP1A2 and CYP2C19. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18(7):569-76.
97. Davis AP, Grondin CJ, Johnson RJ, Sciaky D, McMorran R, Wieggers J, et al. The Comparative Toxicogenomics Database: update 2019. *Nucleic Acids Res*. 2018.
98. The Genomes Project C, Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526:68.
99. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016;536:285.
100. Ashbee HR, Barnes RA, Johnson EM, Richardson MD, Gorton R, Hope WW. Therapeutic drug monitoring (TDM) of antifungal agents: guidelines from the British Society for Medical Mycology. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(5):1162-76.
101. Ahrens H, Searle, S. R.: *Linear Models*. John Wiley & Sons, Inc., New York-London-Sydney-Toronto 1971. XXI, 532 S. \$9.50. *Biometrische Zeitschrift*. 1974;16(1):78-9.
102. Akaike H. A New Look at the Statistical Model Identification. In: Parzen E, Tanabe K, Kitagawa G, editors. *Selected Papers of Hirotugu Akaike*. New York, NY: Springer New York; 1998. p. 215-22.
103. Edwards LJ, Muller KE, Wolfinger RD, Qaqish BF, Schabenberger O. An R2 statistic for fixed effects in the linear mixed model. *Stat Med*. 2008;27(29):6137-57.
104. Jaeger BC, Edwards LJ, Das K, Sen PK. An R2 statistic for fixed effects in the generalized linear mixed model. *Journal of Applied Statistics*. 2017;44(6):1086-105.
105. Hastie T, Tibshirani R, Friedman JH. *The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction*: Springer; 2009.
106. Carcas-Sansuan AJ, Espinosa-Roman L, Almeida-Paulo GN, Alonso-Melgar A, Garcia-Meseguer C, Fernandez-Cambor C, et al. Conversion from Prograf to Advagraf in stable paediatric renal transplant patients and 1-year follow-up. *Pediatr Nephrol*. 2014;29(1):117-23.
107. Freimuth RR, Formea CM, Hoffman JM, Matey E, Peterson JF, Boyce RD. Implementing Genomic Clinical Decision Support for Drug-Based Precision Medicine. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2017;6(3):153-5.
108. Lauschke VM, Ingelman-Sundberg M. Requirements for comprehensive pharmacogenetic genotyping platforms. *Pharmacogenomics*. 2016;17(8):917-24.

109. Qiao W, Yang Y, Sebra R, Mendiratta G, Gaedigk A, Desnick RJ, et al. Long-Read Single Molecule Real-Time Full Gene Sequencing of Cytochrome P450-2D6. *Hum Mutat.* 2016;37(3):315-23.
110. Twist GP, Gaedigk A, Miller NA, Farrow EG, Willig LK, Dinwiddie DL, et al. Constellation: a tool for rapid, automated phenotype assignment of a highly polymorphic pharmacogene, CYP2D6, from whole-genome sequences. *NPJ Genom Med.* 2016;1:15007.
111. Mizzi C, Peters B, Mitropoulou C, Mitropoulos K, Katsila T, Agarwal MR, et al. Personalized pharmacogenomics profiling using whole-genome sequencing. *Pharmacogenomics.* 2014;15(9):1223-34.
112. Borobia AM, Lubomirov R, Ramirez E, Lorenzo A, Campos A, Munoz-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.
113. Dean L. Abacavir Therapy and HLA-B*57:01 Genotype. In: Pratt V, McLeod H, Rubinstein W, Dean L, Kattman B, Malheiro A, editors. *Medical Genetics Summaries.* Bethesda (MD)2012.
114. Verbelen M, Weale ME, Lewis CM. Cost-effectiveness of pharmacogenetic-guided treatment: are we there yet? *Pharmacogenomics J.* 2017;17(5):395-402.
115. Boast A, Curtis N, Cranswick N, Gwee A. Voriconazole dosing and therapeutic drug monitoring in children: experience from a paediatric tertiary care centre. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(7):2031-6.
116. Wang T, Chen S, Sun J, Cai J, Cheng X, Dong H, et al. Identification of factors influencing the pharmacokinetics of voriconazole and the optimization of dosage regimens based on Monte Carlo simulation in patients with invasive fungal infections. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(2):463-70.
117. Miyakis S, van Hal SJ, Ray J, Marriott D. Voriconazole concentrations and outcome of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(7):927-33.
118. Park WB, Kim NH, Kim KH, Lee SH, Nam WS, Yoon SH, et al. The effect of therapeutic drug monitoring on safety and efficacy of voriconazole in invasive fungal infections: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis.* 2012;55(8):1080-7.
119. Wen X, Wang JS, Backman JT, Laitila J, Neuvonen PJ. Trimethoprim and sulfamethoxazole are selective inhibitors of CYP2C8 and CYP2C9, respectively. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(6):631-5.
120. Cojutti P, Candoni A, Forghieri F, Isola M, Zannier ME, Bigliardi S, et al. Variability of Voriconazole Trough Levels in Haematological Patients: Influence of Comedications with cytochrome P450(CYP) Inhibitors and/or with CYP Inhibitors plus CYP Inducers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2016;118(6):474-9.
121. Hope WW. Population pharmacokinetics of voriconazole in adults. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(1):526-31.
122. Roy JN, Barama A, Poirier C, Vinet B, Roger M. Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics.* 2006;16(9):659-65.
123. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet.* 2001;27(4):383-91.

124. Elens L, Hesselink DA, Bouamar R, Budde K, de Fijter JW, De Meyer M, et al. Impact of POR*28 on the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine A in renal transplant patients. *Ther Drug Monit.* 2014;36(1):71-9.
125. Kershner RP, Fitzsimmons WE. Relationship of FK506 whole blood concentrations and efficacy and toxicity after liver and kidney transplantation. *Transplantation.* 1996;62(7):920-6.
126. Rong G, Jing L, Deng-Qing L, Hong-Shan Z, Shai-Hong Z, Xin-Min N. Influence of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in Chinese renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2010;42(9):3455-8.

**ANEXO I. Aprobaciones del Comité Ético de
Investigación con medicamentos (CEIm) del Hospital
Universitario La Paz**

A continuación se incluyen las aprobaciones del CEIm del HULP para los estudios realizados en los distintos bloques de esta tesis doctoral:

Bloque I. Estrategias para la implementación de la farmacogenética en la práctica clínica asistencial del HULP: Unidad de Farmacogenética Clínica del HULP

Bloque II. Implementación en la rutina clínica de una estrategia para la individualización del tratamiento con Voriconazol basada en el genotipado anticipado de CYP2C19 y monitorización de niveles plasmáticos.



INFORME DEL COMITE DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

D^a Almudena Castro Conde, Presidenta del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del Hospital Universitario La Paz

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del investigador Alberto M. Borobia del Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario "La Paz" para que se realice el estudio titulado **'REGISTRO DE PACIENTES ATENDIDOS EN LA UNIDAD DE FARMACOGENÉTICA DEL HOSPITAL LA PAZ Y ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD REALIZADA DESDE SU CREACIÓN'**, Versión 1.0 de 1 septiembre 2017, código HULP: **PI-2915**,

y considera que:

- Se cumplen los requisitos éticos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Y que este Comité acepta que dicho estudio sea realizado por el investigador Alberto M. Borobia del Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario "La Paz", como investigador principal.

Lo que firmo en Madrid a 21 de septiembre de 2017

Firmado: D^a Almudena Castro Conde

Nota: El Dr. Frías no estuvo presente durante la evaluación del proyecto

Bloque III. Identificación de nuevas asociaciones farmacogenéticas que permitan mejorar los algoritmos clínicos monogénicos existentes específicos de fármaco y patología

- *Modelos predictivos de la farmacocinética de Voriconazol basados en farmacogenética: Estudio exploratorio anidado a estudios de bioequivalencia de dos formulaciones de Voriconazol 200mg en población española.*



INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Don Antonio Gil Aguado, Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del Dr. Frías Iniesta del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la UAM para que se realice el estudio titulado 'ESTUDIO DEL IMPACTO DE LOS FACTORES FARMACOGENÉTICOS Y MIRNAÓMICOS SOBRE LA VARIABILIDAD EN LA FARMACOCINÉTICA DE VORICONAZOL EN UNA POBLACIÓN DE VOLUNTARIOS SANOS: ESTUDIO OBSERVACIONAL ANIDADO EN UN ENSAYO CLÍNICO DE BIOEQUIVALENCIA DE UNA DOSIS ÚNICA DE VORICONAZOL 200 mg', código del protocolo VORIP3M, Versión 1, 23 de enero de 2013 y HIP/CI, Versión 1, 23 de enero de 2013, código HULP: PI-1438,

y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado y no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Y que este Comité acepta que dicho estudio sea realizado por el Dr Rubín Lubomirov Jristov del Departamento de Farmacología y Terapéutica de la UAM, como investigador principal.

Lo que firmo en Madrid a 14 de febrero de 2013



Firmado: Don Antonio Gil Aguado

Nota: EL DR. FRÍAS SE AUSENTÓ DE LA REUNIÓN DURANTE LA EVALUACIÓN DEL PROYECTO.

- *Influencia de ABCB1 y POR en la farmacocinética de Tacrolimus oral en pacientes pediátricos estables post-trasplante renal.*



Hospital Universitario La Paz

Comunidad de Madrid

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Don Antonio Gil Aguado, Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta del promotor **Asociación para la Investigación de Nefrología Infantil** para que se realice el ensayo clínico titulado **“ENSAYO INTRAPACIENTE DE BIODISPONIBILIDAD RELATIVA DE DOS FORMULACIONES DE TACROLIMUS: PROGRAF (COMPRIMIDOS DE LIBERACIÓN NORMAL) Y ADVAGRAF (COMPRIMIDOS DE LIBERACIÓN SOSTENIDA) EN NIÑOS TRASPLANTADOS DE RIÑÓN”**, código del protocolo: FC/hulp003, Versión 1.1 de 23 Febrero 2010, Hoja de Información al Padre/Tutor/Consentimiento Informado y Hoja de Información Padre/Tutor Estudio Genético/Consentimiento, Número EudraCT: 2009-017600-89, código HULP: 3094,

y considera que teniendo en cuenta la respuesta a las aclaraciones solicitadas

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el ensayo.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Y que este Comité acepta que dicho ensayo clínico sea realizado en el Hospital Universitario La Paz por la Dra. Laura Espinosa del Servicio de Nefrología Pediátrica del Hospital Universitario "La Paz", como investigadora principal.

Lo que firmo en Madrid a 1 de Marzo de 2010



Firmado:
Don Antonio Gil Aguado

Nota: El Dr. Frías se ausentó de la reunión durante la evaluación del ensayo

Ampliación del protocolo de estudio para el diseño de un algoritmo poligénico para Tacrolimus:



INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D^a Almudena Castro Conde, Presidenta del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario La Paz

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado, a propuesta del investigador Antonio Carcas Sansuán del Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario "La Paz", el Protocolo versión 2, Enero 2015 del estudio titulado 'INFLUENCIA DE CYP3A5, CYP3A4, CYP3A7, ABCB1 Y DOS POLIMORFISMOS DE POR EN LA FARMACOCINÉTICA DE TACRÓLIMUS EN PACIENTES PEDIÁTRICOS POST-TRANSPLANTE RENAL CON CONCENTRACIONES SÉRICAS ESTABLES: ESTUDIO RETROSPECTIVO', código del protocolo FC/HULP_002/2014, código HULP: PI-1708,

y considera que dichos cambios no afectan a la seguridad del estudio, ni entran en conflicto con las Normas de Buena Práctica Clínica, por lo que se decide su Aprobación.

Lo que firmo en Madrid a 4 de febrero de 2016



Firmado: D^a Almudena Castro Conde

ANEXO II. Influencia de *ABCB1* y *POR* en la FC de Tacrolimus oral en pacientes pediátricos estables post-trasplante renal: Resultados de la cohorte con Prograf.

Variante	Parámetro FC	Jonckheere–Terpstra (p)
ABCB1 (rs1045642)	AUC _{0-24h}	0.507
	C _{max}	0.691
	C _{min}	0.145
POR*28 (rs1057868)	AUC _{0-24h}	0.455
	C _{max}	0.112
	C _{min}	0.779
POR (rs2868177)	AUC _{0-24h}	0.584
	C _{max}	0.927
	C _{min}	0.235
Genetic score	AUC _{0-24h}	0.014
	C _{max}	0.023
	C _{min}	0.037

Tabla A1. Resultados de la prueba no paramétrica de Jonckheere–Terpstra realizado en el grupo de no-expresadores de CYP3A5 para las variantes analizadas en los BM adicionales propuestos y la puntuación genética calculada en la cohorte con Prograf.

	Variantes	<i>CYP3A5</i> *1/*1 o *1/*3 n=4	<i>CYP3A5</i> *3/*3 n=17	Puntuación genética en el grupo de <i>CYP3A5</i> no-expresadores		
		0 n=2	1 – 2 n=10	3 n=5		
$AUC_{0-24}/$ dosis/peso	media±DE	1148.12±191.37	2875.00±1066.12	2180.07±704.07	2474.87±532.76	3953.23±1299.59
$C_{max}/$ dosis/peso	media±DE	119.26±19.58	209.09±70.59	164.05±15.10	182.78±35.06	279.71±90.17
$C_{min}/$ dosis/peso	media±DE	29.95±8.59	82.60±32.55	61.98±31.15	69.98±19.10	116.09±34.08

Tabla A2. Parámetros FC en *CYP3A5* expresadores y no-expresadores, y en función de la puntuación genética en el grupo de *CYP3A5* no-expresadores en la cohorte con Prograf. Puntuación genética: 0, pacientes en los que todas las variantes genotipadas son *wild type*; 1, pacientes con 1 o 2 variantes en *POR* y *ABCB1* *wild type*; y 2, pacientes con 3 variantes en *POR* y *ABCB1*.

	Coeficientes no-estandarizados		Coeficientes estandarizados	p valor	% de variabilidad explicada	MAE% (RIQ)	MAE% Medio (RIQ)
			B \pm SE	Beta			
Todos los participantes (n=21)	$AUC_{0,24}$ $r^2_c = 0.663$	(Constante)	3.152 \pm 0.68		.000		20.29 8.17 – 29.53
		<i>CYP3A5</i>	.431 \pm 0.072	.859	.000	64.6%	
		Metilprednisolona	-.206 \pm 0.098	-.306	.052	12.0%	
		Deflazacort	-.178 \pm 0.066	-.427	.015	6.3%	
	C_{max} $r^2_c = 0.533$	(Constante)	2.163 \pm 0.060		.000		17.20 4.49 – 28.24
		<i>CYP3A5</i>	.277 \pm 0.064	.737	.000	46.5%	
		Metilprednisolona	-.198 \pm 0.087	-.395	.035	19.3%	
		Deflazacort	-.167 \pm 0.058	-.536	.010	11.0%	
	C_{min} $r^2_c = 0.511$	(Constante)	1.532 \pm 0.096		.000		27.98 16.02 – 40.80
		<i>CYP3A5</i>	.472 \pm 0.102	.803	.000	55.5%	
		Metilprednisolona	-.144 \pm 0.092	-.294	.138	-	
		Deflazacort	-.137 \pm 0.139	-.175	.336	-	
CYP3A5 no-expresadores (n=17)	$AUC_{0,24}$ $r^2_c = 0.574$	(Constante)	3.472 \pm 0.086	.086	.000		16.32 11.30 – 23.10
		“Score” genético	.099 \pm 0.040	.040	.028	15.7%	
		Metilprednisolona	-.179 \pm 0.065	.065	.017	19.9%	
		Deflazacort	-.299 \pm 0.113	.113	.020	18.3%	
	C_{max} $r^2_c = 0.348$	(Constante)	1.849 \pm 0.128		.000		14.77 2.59 – 25.97
		“Score” genético	.130 \pm 0.059	.479	.046	18.0%	
		Metilprednisolona	-.136 \pm 0.096	-.342	.182	-	
		Deflazacort	-.233 \pm 0.166	-.327	.184	-	
	C_{min} $r^2_c = 0$	(Constante)	2.330 \pm 0.086		.000		23.99 14.17 – 29.56
		“Score” genético	.087 \pm 0.049	.425	.049	14.1%	
		Metilprednisolona	-.158 \pm 0.031	-.529	.031	18.3%	
		Deflazacort	-.190 \pm 0.116	-.353	.116	7.0%	

Tabla A3. Modelos explicativos desarrollados para la FC de TAC en nuestra cohorte de estudio. MAE: Error Medio Absoluto; RIQ: Rango Intercuartílico

ANEXO III. Publicaciones científicas.

Publicación 1: “Clinical Implementation of Pharmacogenetic Testing in a Hospital of the Spanish National Health System: Strategy and Experience Over 3 years”.

Alberto M. Borobia, Irene Dapía, Hoi Y. Tong, Pedro Arias, Mario Muñoz, Jair Tenorio, Rafael Hernández, Irene García, Gema Gordo, Elena Ramírez, Jesús Frías, Pablo Lapunzina and Antonio J. Carcas. Clin Transl Sci (2017) 00, 1–10. doi:10.1111/cts.12526. PMID: 29193749.

Publicación 2: “Evaluation of Multifactorial Pharmacogenetics Predictive Models for Voriconazole Pharmacokinetics: An Exploratory Study Nested to three Bioequivalence Trials of Two Voriconazole Formulations of 200 mg in Spanish population”. En revisión en *Clinical Pharmacology and Therapeutics*.

Irene Dapía; Irene García; Jose Carlos Martinez; Pedro Arias; Pedro Guerra; Lucía Díaz; Alberto García; Jair Tenorio; Elena Ramírez; Gema Gordo; Jesús Frías; Pablo Lapunzina; Antonio J Carcas; Alberto M Borobia.

Publicación 3: “Weight of ABCB1 and POR genes on oral tacrolimus exposure in CYP3A5 nonexpressor pediatric patients with stable kidney transplant”.

GN Almeida-Paulo, I Dapía García, R Lubomirov, AM Borobia, NL Alonso-Sánchez, L Espinosa and AJ Carcas-Sansuán. Pharmacogenomics J (2018). Jan;18(1):180-186. doi: 10.1038/tpj.2016.93. PMID: 28094348.

Publicación 4: “Effect of the CYP3A5, CYP3A4, CYP3A7, ABCB1, POR and NR1I2 genes in the pharmacokinetics of tacrolimus in a pediatric cohort with stable serum concentrations after renal transplantation: study protocol”

Irene Dapía, Aleksandra Tabakov, Laura Espinosa Román, Lucía Díaz, Pedro Arias Lajara, Marta Melgosa, Angel Melgar, Carlota Fernández, Alicia Herranz Estellés, Pablo Lapunzina, Alberto M. Borobia, Antonio J. Carcas. IBJ Clin Pharmacol 2017 1(1):e0005.

ARTICLE

Clinical Implementation of Pharmacogenetic Testing in a Hospital of the Spanish National Health System: Strategy and Experience Over 3 Years

Alberto M. Borobia^{1,*}, Irene Dapia^{2,3}, Hoi Y. Tong¹, Pedro Arias^{2,3}, Mario Muñoz¹, Jair Tenorio^{2,3}, Rafael Hernández¹, Irene García García¹, Gema Gordo^{2,3}, Elena Ramírez¹, Jesús Frías¹, Pablo Lapunzina^{2,3} and Antonio J. Carcas¹

In 2014, we established a pharmacogenetics unit with the intention of facilitating the integration of pharmacogenetic testing into clinical practice. This unit was centered around two main ideas: i) individualization of clinical recommendations, and ii) preemptive genotyping in risk populations. Our unit is based on the design and validation of a single nucleotide polymorphism (SNP) microarray, which has allowed testing of 180 SNPs associated with drug response (PharmArray), and clinical consultation regarding the results. Herein, we report our experience in integrating pharmacogenetic testing into our hospital and we present the results of the 2,539 pharmacogenetic consultation requests received over the past 3 years in our unit. The results demonstrate the feasibility of implementing pharmacogenetic testing in clinical practice within a national health system.

Clin Transl Sci (2017) 00, 1–10; doi:10.1111/cts.12526; published online on yyyy-mm-dd.

Study Highlights

WHAT IS THE CURRENT KNOWLEDGE ON THE TOPIC?

✓ The integration of pharmacogenetics into clinical practice has been challenging over the years, primarily due to economic reasons, certain prescribers' skepticism and discomfort, and the difficulty of fitting case-by-case molecular analyses into the clinical routine.

WHAT QUESTION DID THIS STUDY ADDRESS?

✓ The feasibility of the implementation of a pharmacogenetic program in a university hospital supported by the Spanish NHS.

WHAT THIS STUDY ADDS TO OUR KNOWLEDGE

✓ Here we present a pharmacogenetic implementation strategy centered around a multidisciplinary clinical pharmacogenetics consultation and a custom SNP microarray, based on a preemptive genotyping strategy in risk populations and individualization of the clinical recommendations.

HOW THIS MIGHT CHANGE CLINICAL PHARMACOLOGY OR TRANSLATIONAL SCIENCE

✓ This strategy could be considered a model for the clinical implementation of pharmacogenetics in other public hospitals, mostly in our country, but also in other countries with a similar NHS.

The high variability in drug response between individuals has been of serious concern to health professionals. Studying the influence of genetic variations in drug response phenotypes can provide a more individualized and effective design for drug treatment.¹

The rapid development of molecular techniques and bioinformatics in recent years has permitted the identification and characterization of many relevant genes and their association with undesired events, such as toxicity and therapeutic failure. Over the past decade, both the US Food and Drug Administration and the European Medicines Agency have incorporated pharmacogenetics information into drug labels available for prescribers and patients.² However, the integration of this approach into clinical practice has been challenging, due primarily to economic reasons, certain prescribers'

skepticism and discomfort,^{3,4} and the difficulty of fitting case-by-case molecular analyses into the clinical routine. Despite these limitations, the increasing evidence supporting the integration of pharmacogenetics information into a clinical setting and the development of pharmacoeconomic studies reflecting the cost-effectiveness of a preemptive approach have to some extent fostered the transition to personalized medicine.

The difficulties of integrating pharmacogenetics into clinical practice are well recognized in the literature. A survey conducted in 2012 among members of the Spanish Societies of Pharmacology and Clinical Pharmacology classified the perceived barriers in Spain into three major groups related to low institutional promotion, the lack of clinical guidelines and protocols, and economic and institutional issues as well

¹Clinical Pharmacology Department, IdiPAZ, La Paz University Hospital, School of Medicine, Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain; ²Medical and Molecular Genetics Institute (INGEMM), La Paz University Hospital, Madrid, Spain; ³Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), ISCIII, Madrid, Spain.

*Correspondence: Alberto M. Borobia (alberto.borobia@salud.madrid.org) or Antonio J. Carcas (antonio.carcas@uam.es)

Received 21 September 2017; accepted 27 October 2017; published online on yyyy-mm-dd. doi:10.1111/cts.12526

as ethical, legal, and social implications.⁵ These reported hurdles are similar to those found in other countries.^{6,7} In 2011, the Translational Pharmacogenetics Program (TPP) of the National Institutes of Health (NIH) Pharmacogenomics Research Network was created to design solutions for the barriers to clinical pharmacogenetics implementation. Eight United States healthcare systems participated in this project by implementing custom pharmacogenetics implementation strategies. These institutions developed diverse solutions and workflows for pharmacogenetics implementation; however, they were all based on Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guidelines, which provided some consistency among the various institutions.⁸ Similarly, the Ubiquitous Pharmacogenomics Consortium and the Preemptive Pharmacogenomic Testing for Prevention of Adverse Drug Reactions (PREPARE) study were developed in Europe to design an implementation strategy and evaluate the impact of pharmacogenetics integration programs on clinical practice.⁹

In this context, in 2014 our group created a Pharmacogenetics Unit with the intention of facilitating the implementation of a strategy for the preemptive genotyping of pharmacogenetics biomarkers associated with drug response in the clinical practice of our hospital. This unit is based on a clinical pharmacogenetics consultation and a custom single nucleotide polymorphism (SNP) microarray, which has allowed screening of 180 SNPs associated with drug response (PharmArray). In this study, we report our strategy for the integration of pharmacogenetic testing into the clinical practice of a tertiary level hospital. We also report our activity over the last 3 years.

MATERIALS AND METHODS

Setting description

La Paz University Hospital (LPUH) in Madrid is a 1,308-bed tertiary-care teaching hospital of the Spanish NHS serving a population of ~600,000 people. It is also a national reference center for up to 22 specific diseases. Our clinical pharmacogenetics unit is a multidisciplinary unit integrated into both the Clinical Pharmacology Department and the Institute of Medical and Molecular Genetics Institute (INGEMM) of our hospital.

The Clinical Pharmacology Department is linked to the Pharmacology and Therapeutics Department of the School of Medicine of the Autonomous University of Madrid. Therapeutic individualization has always been an important objective for our department, primarily through our therapeutic drug monitoring, therapeutic consultation, pharmacovigilance,¹⁰ and clinical toxicology¹¹ programs. Therefore, adding a pharmacogenetics approach to our clinical practice appeared an essential tool for achieving a more personalized approach for the optimization of therapeutic strategies.

INGEMM was created in 2008 and belongs to the LPUH Health Research Institute. Over 40,000 genetic studies are performed every year in our institution as well as several competitive research projects in various areas related to omics.

Developing a strategy for the implementation of a pharmacogenetics unit

In the process of developing a strategy for the implementation of a pharmacogenetics unit in our hospital, we identified three main issues to address:

1. To obtain a minimum infrastructure to develop this activity, including setting up a pharmacogenetics unit in association with the INGEMM as well as the development of affordable and quick genotyping strategies.
2. To increase the knowledge and acceptance of pharmacogenetics among physicians through clinical sessions and development of clinical protocols and research projects.
3. To gain a wide acceptance and the necessary funding by the management of the hospital and the regional health system, demonstrating the cost-effectiveness and utility of adding a pharmacogenetics approach to clinical practice.

Developing an affordable and easy-to-use genotyping method

SNP selection

For the SNP selection process we decided to compose an in-house multidisciplinary team of clinical pharmacologists, molecular geneticists, and technicians to achieve good coverage of relevant pharmacogenetics associations in drug metabolism and transporter genes. Information about the pharmacogenetic testing variants and their impact on drug response was gathered mostly from the variant and clinical annotations in PharmGKB.¹² We relied mostly on level 1 through 3 Levels of Evidence based on PharmGKB Clinical Annotations. We also included some lower-evidence associations recently described but not yet implemented in the clinical routine that we found of local interest for further studies and research.

Array design and technology

We used the OpenArray technology first on the ABI Biotrove OpenArray NT image cyler system (Applied Biosystems, Foster City, CA) and recently updated to the QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). TaqMan SNP Genotyping Assays were selected in the catalog of PreDesigned and DME SNP Genotyping Assays for optimal typing of the polymorphic targets (Pub no: MAN0009593). The assays were then preloaded in the plates and configured onto OpenArrays.

The loading process is automatic, using the QuantStudio 12K Flex OpenArray AccuFill system. The arrays are then inserted into glass cases and sealed for polymerase chain reaction (PCR) and subsequent imaging. Genotypes are then determined using the TaqMan Genotyper software available from Thermo Fisher Scientific and the data are analyzed by a custom script (PharmHulp v. 1.0).

Array validation

Twenty commercially available DNA samples with previously reported *CYP2D6*, *CYP2C19*, and *CYP2C9* genotypes were acquired from the Coriell Biorepository (Camden, NJ) in order

to test the specificity and accuracy of the included assays and validate our platform. All samples were tested blindly.

Evaluating patient and physician's satisfaction

Since 2015 our unit is ISO9001:2008-certified and patient and physician's satisfaction is evaluated through surveys that include dichotomous (Yes/No), multiple choice, and numeric questions. Index of satisfaction (IS) was calculated using the following formula:

$$IS (\%) = \frac{(1 \times 1 + 2 \times 2 + 3 \times 3 + 4 \times 4 + 5 \times 5)}{N \times 5} \times 100$$

1.very poor, 2.poor, 3.acceptable, 4.good, 5.very good

Estimation of the costs associated with our activity

We made an approximation of the cost associated with our activity. For this calculation, we included: i) the price of health services (Consult price -115€- and clinical inform price -71€-) provided by the NHS, and ii) the cost of pharmacogenetics determination (PharmArray and Sanger sequencing/INNO-LIPA) including DNA extraction, consumables, and personnel costs for the hospital.

RESULTS

Developing a strategy for the implementation of a pharmacogenetics unit at La Paz University Hospital

In the process of implementing pharmacogenetics in clinical practice, our main objective was to evolve from the usual *ad hoc* (case-by-case) genotyping strategy, in which the decision to perform a pharmacogenetics test is individualized and always linked to prescription, to a preemptive strategy in which genetic information would be obtained *ab initio* in risk populations (those who are susceptible to receive a drug from which pharmacogenetics information could be available) and would therefore be available at the moment of prescription.¹³

To this end, we developed protocols in collaboration with the petitionary clinical services including pharmacogenetics markers relevant for drugs used for specific diseases, and therefore adopting an approach between a case-by-case strategy and a full preemptive one (Table 1).

Finally, our strategy is centered around the personalized medicine idea, in which an individualized interpretation of pharmacogenetics results is essential. Thus, unlike strategies based on alerts included in prescribing systems, each patient's clinical background, individual interactions, and other factors are taken into account, in addition to genetic information, to deliver an individual clinical recommendation.

Development of an affordable and easy-to-use genotyping method: Application of a custom SNP array (PharmArray) in a clinical pharmacogenetics unit

We designed a customized SNP microarray based on OpenArray Technology (Thermo Fisher Scientific) for the pharmacogenetics test (PharmArray, registration number 4571001). Human leukocyte antigen (HLA)-B studies were performed by Sanger sequencing and INNO-LIPA HLA-B probe assays (Fujirebio, Malvern, PA) for accurate allele discrimination.

SNP selection

We selected the 16-sample x 192 SNP format because it fulfilled our requirements and best fit the particular workflow and volume of patients in our hospital at that time. Our original version (PharmArray 2013) allowed testing of 192 SNPs in the same run. However, because of technical specifications and changes in manufacturer formatting, we recently had to update the number of probes to 180. The final compilation of SNPs included in our custom array and the specific treatments related to each gene are shown in Table 2.

Array validation

We genotyped 20 Coriell samples with previously reported genotypes for three relevant pharmacogenetics markers: *CYP2C19*, *CYP2C9*, and *CYP2D6*. Our design allowed an accurate determination of 95% of the genotypes; however, due to limitations of the technique, we found some discrepancies, especially among those samples showing copy number variants in *CYP2D6* (5 allele and xN alleles) and those expressing extremely rare haplotypes that were not included in our design (*CYP2C19**10 and *CYP2C9**9). These specific determinations are not included in our clinical routine.

Structure and functioning of the pharmacogenetics unit at La Paz University Hospital

In-house classification of pharmacogenetics tests

The clinical pharmacogenetics unit of La Paz University Hospital evaluates both the internal and external inquiries for which a pharmacogenetics test might be suited: i) drug response prediction; ii) the optimization of dosing requirements; and iii) the identification of therapy failure, adverse reactions, or interactions related to genetic variation. In order to handle the requests received, we classified pharmacogenetics tests into three groups (Figure 1):

- a. Preemptive molecular screening of actionable genetic markers required for treatment selection (HLA-B*57:01/abacavir; IL28B-PEG-interferon- α). The pharmacogenetics result is directly referred to the petitioner because a complementary specialized clinical counseling is not deemed necessary and standard information is provided along with the results of the test. Presently, IL28B studies before the administration of interferon in hepatitis C virus (HCV) are no longer performed due to the implementation of alternative pharmacological treatments.
- b. Drugs with a well-defined protocol for pharmacogenetics treatment recommendations in a particular disease. Included here are those cases in which treatment based on pharmacogenetics testing has been agreed upon by clinical service(s) and are included in clinical protocols (Table 1). In this case, pharmacogenetics determination is requested along with other complementary tests performed in the initial stages of diagnosis and/or treatment.
- c. Drugs without a well-defined protocol. *Ad hoc* phenotyping of pharmacogenetics markers is available but not included in clinical protocols. In this case, a consultation is made to the pharmacogenetics unit in order to

Table 1 Established drug–gene protocols for preemptive genotyping of PhGx markers in specific diseases in LPUH

Drug/gene pairs	Diseases	Requesting department
Thiopurines/ <i>TPMT</i>	Inflammatory bowel disease, psoriasis	Gastroenterology, Dermatology
Immunosuppressants/ <i>CYP3A5, CYP3A4, ABCB1, POR</i>	Pediatric kidney transplantation, Psoriasis,	Pediatric nephrology, Dermatology
Voriconazole/ <i>CYP2C19</i>	Aspergillosis in child bone marrow transplantation patients	Pediatric hemato-oncology
Anticoagulant agents/ <i>CYP2C9, VKORC1, CYP4F2, APOE</i>	Thromboembolic disease and atrial fibrillation	Internal Medicine, Hematology
Simvastatin/ <i>SLCO1B1, ABCG2</i>	High cardiovascular risk	Cardiology
Methotrexate/ <i>MTHFR</i>	Leukemia, psoriasis	Pediatric hemato-oncology, Rheumatology, Dermatology
Irinotecan/ <i>UGT1A1</i>	Colorectal cancer	Oncology
Fluoropyrimidines/ <i>DPYD, TP53</i>	Colorectal cancer	Oncology

evaluate a specific therapeutic problem and determine whether the pharmacogenetics test is recommended.

It is important to consider that this distribution is not static: one drug might fit into two different groups, depending on its clinical indication and the protocol established in agreement with the petitionary clinical service. Furthermore, one particular drug can change from group 3 to group 2 when a consistent protocol has been defined and a preemptive genotyping strategy is designed. This process is dynamic and continuously updated.

It is important to note that our implementation plan is aimed toward a preemptive pharmacogenetics approach; thus, the pharmacogenetics test is performed on risk populations in which patients might or might not receive treatment. Nevertheless, genetic information would be available should prescription be necessary; for example, prior to bone marrow transplantation procedures in which a preemptive pharmacogenetics study for voriconazole response is performed in case the patient develops aspergillosis after transplantation.

Pharmacogenetics unit workflow

Figure 1 shows the organization of our clinical pharmacogenetics unit, which includes six main steps (**Figure 2**). Petitionary services (treating physicians) send their request, including all clinical information, to the pharmacogenetics unit:

- For drugs belonging to the first group, samples are directly remitted to the INGEMM at LPUH for molecular analysis. The molecular report and its interpretation is then generated and sent back to the petitionary service through the LPUH electronic health record (EHR).
- In those cases in which a protocol has been agreed upon for the specific indication, clinical department samples are sent to the INGEMM and a consult with the pharmacogenetics unit is automatically created. A molecular report is generated by a molecular geneticist and remitted to the clinical pharmacologists for the elaboration of an individualized report, taking into account each patient's clinical record. This clinical report is usually sent to the treating physician through the EHR; however, a personal interview with the patient can be appointed if deemed necessary.

- If an agreed-upon protocol does not exist, the patient is directly referred to the pharmacogenetics unit. Then it is decided if a pharmacogenetic test is recommended; if this is the case the process would be the same as described for the second group of pharmacogenetics tests.

Activity of the pharmacogenetics unit from 2014 to 2016

Between the implementation of the pharmacogenetics unit at LPUH in January 2014 and December 2016 (3 years), we received 2,539 requests (**Figure 3**); 1,939 were for actionable genetic marker testing required for treatment selection (87% for HLA-B*57:01 and 13% for *IL28B*) and were therefore directly sent for molecular screening because no previous clinical evaluation was needed. Approximately 6.5% of the patients tested for HLA-B*57:01 showed a molecular profile related to a high risk of developing a hypersensitivity reaction to abacavir and, therefore, an alternative pharmacological treatment was recommended. Some 42.9% of the patients tested for *IL28B* before the administration of PEG-interferon-alpha-containing regimens in HCV genotype 1 patients showed a molecular profile related to low response to treatment.

A total of 711 enquiries belonging to tests groups 2 and 3 were requested. After clinical evaluation, we found that 84% of the patients (600) met the specific inclusion criteria for the requested pharmacogenetics test. We found that 32.1% of the patients showed a molecular profile that could be related to the specific requested drug's pharmacokinetics and pharmacodynamics. Among these patients, a clinical recommendation for dose adjustment was performed in 107 (57.5%).

TPMT preemptive testing before the administration of thioguanines is the most common request (60.7%). Genetic variants in the *MTHFR* gene are also frequently studied as predictors of methotrexate-induced liver toxicity (19.8%). The growing evidence regarding pharmacogenetics associations with the oral antifungal voriconazole and immunosuppressant agents' pharmacokinetics has led to an increase in the number of requests over the past year, mainly for patients needing transplantation (2.3% for voriconazole and 6.7% for immunosuppressant). We also performed pharmacogenetics tests before the administration of acenocoumarol (2.7%), fluoropyrimidines (2.8%), and other drugs, such as

Table 2 Final design of the PharmArray 180 SNPs format

Gene	Rs#	No. of SNPs	Treatment
<i>ABCB1</i>	rs2032582 [*] ; rs1045642 [*] ; rs3213619; rs1128503	4	Immunosuppressants and antiplatelet drugs
<i>ABCC2</i>	rs717620; rs56296335 ^{**} ; rs3740066; rs56199535 [*] ; rs56220353 [†]	5	<i>Tenofovir</i> (antiretroviral agent)
<i>ABCG2</i>	rs2231142; rs2273697; rs72552713	3	Statins, <i>Methotrexate</i> (cytotoxic agent), <i>Imatinib</i> (tyrosine-kinase inhibitor)
<i>APOE</i>	rs7412	1	Anticoagulants, <i>Pravastatin</i> (<i>Statin</i>)
<i>COMT</i>	rs4680	1	Nicotine
<i>CFTR</i>	rs75527207; rs113993960; rs199826652; rs267606723 [*] ; rs193922525; rs80282562; rs121909013; rs74503330; rs121909041; rs121908755 [*] ; rs121909005; rs121908757	12	<i>Ivacaftor</i> (CFTR potentiator)
<i>CYP2C19</i>	rs4244285 [*] ; rs4986893; rs12248560 [*] ; rs28399504; rs56337013; rs72552267; rs72558186; rs41291556	8	<i>Voriconazole</i> (triazole antifungal agent), antiplatelet and psychotropic therapy
<i>CYP2C8</i>	rs11572080; rs10509681; rs1058930; rs11572103	4	<i>Paclitaxel</i> (cytotoxic agent), psychotropic therapy and oral antidiabetic agents
<i>CYP2C9</i>	rs1799853; rs1057910	2	Anticoagulants, psychotropic therapy
<i>CYP2D6</i>	rs1080985; rs28371725; rs35742686; rs3892097; rs5030655; rs5030865 [*] ; rs5030867; rs5030656; rs1065852; rs1058164; rs1135840; rs16947; rs28371706; rs61736512; rs769258	15	Psychotropic therapy, opioids
<i>CYP3A4</i>	rs55785340; rs4646438	2	Immunosuppressants
<i>CYP3A5</i>	rs776746; rs55965422 [*] ; rs10264272; rs41303343; rs41279854	5	<i>Tacrolimus</i> (immunosuppressant)
<i>CYP4F2</i>	rs2108622	1	Anticoagulants
<i>DPYD</i>	rs3918290; rs55886062 [*] ; rs55886062 [*] ; rs67376798; rs1801159; rs1801265	6	Fluoropyrimidines (Cytotoxic agents)
<i>ERCC1</i>	rs11615; rs3212986	2	<i>Cisplatin</i> (cytotoxic agent)
<i>EPHX1</i>	rs1051740	1	<i>Cisplatin</i> (cytotoxic agent)
<i>FCGR2A</i>	rs1801274	1	Biological therapy
<i>HTR2A</i>	rs6311	1	Psychotropic therapy
<i>IL10</i>	rs1800896; rs1800872; rs1800871	3	Biological therapy
<i>IL23R</i>	rs7517847; rs10489629; rs11465804; rs1343151	4	Biological therapy
<i>KCNJ6</i>	rs2070995	1	Analgesics
<i>MTHFR</i>	rs1801133; rs4846051; rs1801131	3	<i>Methotrexate</i> (cytotoxic agent)
<i>POR</i>	rs1057868; rs2868177	2	Immunosuppressants
<i>SLC15A2</i>	rs2293616; rs2257212; rs1143671; rs1143672	4	Others
<i>SLC22A1</i>	rs72552763; rs55918055 [*] ; rs36103319 [*] ; rs34059508 [*] ; rs628031; rs4646277; rs2282143; rs4646278 [*] ; rs12208357	9	<i>Tramadol</i> (Opioid), <i>Metformin</i> (oral antidiabetic agent)
<i>SLC22A2</i>	rs316019; rs8177516; rs8177517; rs8177507 [*] ; rs8177504	5	<i>Fampridine</i> (potassium channel-blocking agent), <i>Metformin</i> (oral antidiabetic agent)
<i>SLC22A6</i>	rs11568626	1	Others
<i>SLCO1B1</i>	rs4149056; rs2306283; rs56101265; rs72559745; rs56061388; rs55901008 [*] ; rs59502379; rs56199088 [*] ; rs55737008; rs4149015	10	Statins, <i>Irinotecan</i> (cytotoxic agent), oral antidiabetic agents, conjugated estrogens
<i>TLR2</i>	rs4696480; rs11938228	2	Biological therapy
<i>TLR9</i>	rs352139	1	Biological therapy
<i>TNF</i>	rs1800629	1	Biological therapy
<i>TP53</i>	rs1042522	1	<i>Cisplatin</i> (cytotoxic agent)
<i>TPMT</i>	rs1800460; rs1800462; rs1142345; rs1800584	4	Thioguanines
<i>UGT1A1</i>	rs887829; rs4148323; rs34993780; rs35350960; rs55750087; rs4124874	6	<i>Irinotecan</i> (cytotoxic agent)
<i>UGT2B7</i>	rs7438135	1	Morphine, micophenolate (immunosuppressant)
<i>VKORC1</i>	rs9934438	1	Anticoagulants
<i>XPC</i>	rs2228001	1	<i>Cisplatin</i> (cytotoxic agent)
<i>XRCC1</i>	rs25487	1	<i>Cisplatin</i> (cytotoxic agent)

The table shows the final selection of SNPs (dbSNP b146) and genes included in our custom array. We also included two sex markers (rs768983 and rs3913290) for internal quality control of the genotyping process and the SNPs-related drugs. SNPs followed by * are reported to have more than two allelic variants.

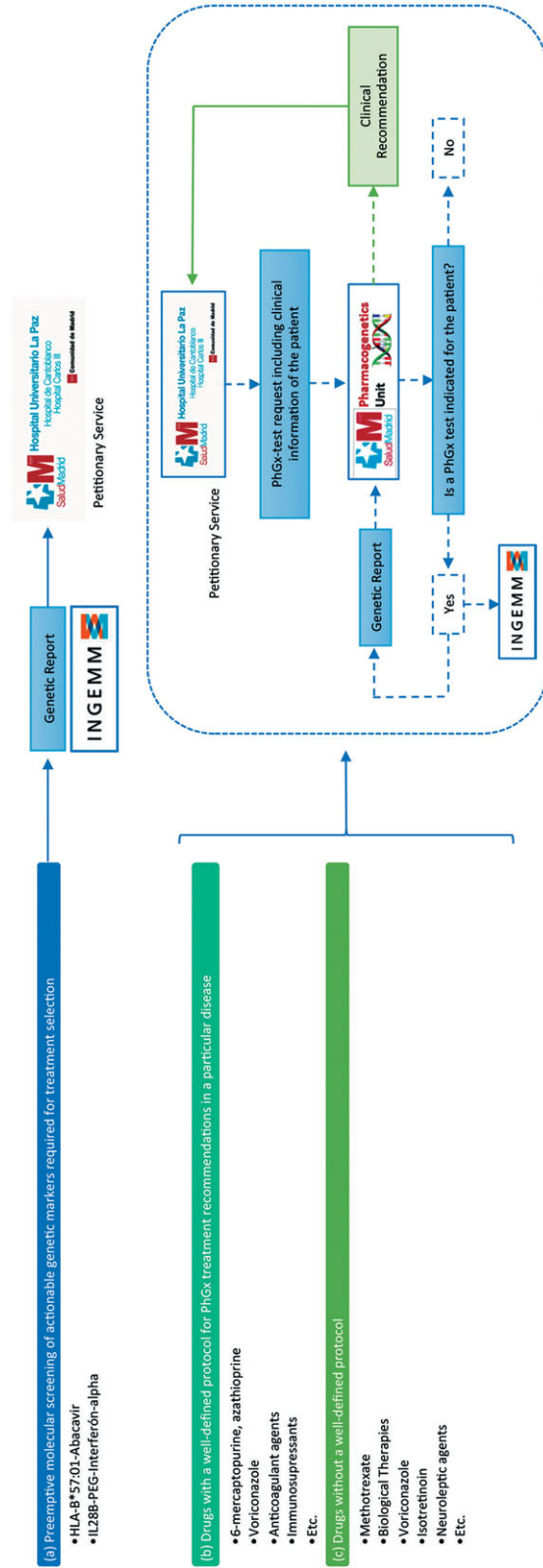


Figure 1 Classification of pharmacogenetics tests and pharmacogenetics unit workflow. We have divided pharmacogenetics tests into three main groups: For drugs belonging to group (a) in which the pharmacogenetics test is required before treatment prescription, requests and samples are directly forwarded to the genetics department (INGEMM) for sample processing and analysis. The final molecular report is directly sent to the petitionary service for treatment selection. Groups (b) and (c) share a different workflow: Petitionary services refer their request, including all clinical information, to the pharmacogenetics unit that will decide whether a pharmacogenetics test is indicated in each case. If the pharmacogenetics test is recommended, molecular analysis is performed in INGEMM and a genetic report is generated. Taking into account the molecular result and the clinical information of the patient, a final clinical recommendation is given to the original petitionary service. Clinical recommendations are specific for each patient because they are generated relying on a multifactorial basis. It is important to notice that groups (b) and (c) might share some particular drugs (e.g., voriconazole), given these might have a protocol when prescribed for a particular disease but not for a different pathology.

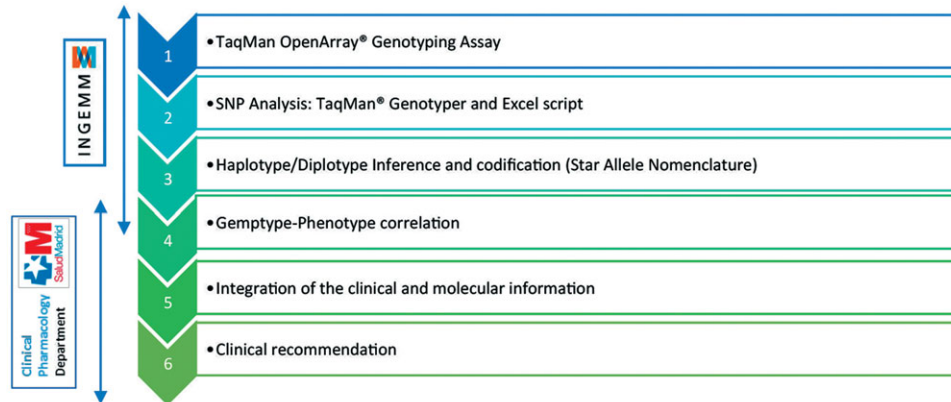


Figure 2 Analysis workflow. Our custom analysis workflow includes six main steps performed by both the Clinical Pharmacology Department and the INGEMM pharmacogenetics specialists. First, genomic DNA from the patients is automatically extracted from peripheral blood cells using Chemagen technology (Perkin-Elmer, Boston, MA). However, in particular patients, DNA can be obtained from other biological samples such as saliva or tissue. It is necessary that all patients give informed consent to genetic analysis. Subsequently, a TaqMan OpenArray Genotyping Assay is performed using our custom design (PharmArray; Reg. no. 4571001). An individualized analysis of each SNP included in the pharmacogenetics protocol for each specific drug and disease is then performed. We then proceed to haplotype and diplotype inference using population databases and codification using the star-allele nomenclature (.). Once genotypes are codified, phenotypes are also inferred. Finally, an integration of both the clinical and molecular information is performed for a more individualized clinical recommendation.

psychotropic agents; however, these studies were performed on a less frequent basis (6%, all).

Evaluating patient and physicians satisfaction

Patient's satisfaction has been evaluated in about 12% of the patients attending our consult (years 2015–2016). Also, we evaluated physician's perception (19 physicians from 9 different departments) about pharmacogenetics, their expectations on the application of pharmacogenetics, and the perceived utility of our pharmacogenetics unit. Questions and results of both surveys are presented in **Table 3**.

Estimation of the costs associated with our activity

Global cost of the activity for the NHS for the 3 years was 202,140 €, including all the costs for the NHS. The costs differ based on the level of consultation; the cost of a complete process, including pharmacogenetics determination and individual consultation, is 216 €. For the sake of comparison, the cost of attendance of a patient for an intravenous drug administration (i.e., anti-TNF administration) is 260 € and for a determination of drug plasma level is 106 €.

DISCUSSION

The growing evidence supporting the contribution of genetic variability in genes coding drug-metabolizing enzymes and transporters to interindividual heterogeneity in drug response has identified pharmacogenetics as a relevant tool for achieving the personalized medicine paradigm.³ However, several barriers have been perceived both in Spain and around the world for routine integration of pharmacogenetics into the clinical practice of various national health systems (NHSs).^{5–7}

Here we have presented our experience in the implementation of a custom strategy for integrating pharmacogenetics into the clinical practice of a Spanish tertiary-level hospi-

tal through the creation of a clinical pharmacogenetics unit covered by the Spanish NHS and accessible to all patients. This strategy is centered around two main ideas: individualization of clinical recommendations and the evolution to a preemptive genotyping strategy. Our strategy shows several similarities with other implementation programs previously proposed both in the United States and in Europe. The use of multidisciplinary teams and the common use of CPIC guidelines are two main points shared by most of the centers, including ours. In addition, our analysis workflow (**Figure 2**) is consistent with the stepwise process used across the TPP sites and advised by the CPIC guidelines.⁸ One critical point in our approach is related to the interpretation of results and the development of the final clinical recommendation. In most of the mentioned approaches, the final step is a general clinical recommendation based on the predicted phenotype from the patient diplotype, mostly provided through the inclusion of warnings and simple pharmacogenetics information into prescription systems. Although this approach has some advantages and might be appropriate in some cases (e.g., clear, actionable biomarkers), in our opinion it can be insufficient at the present stage of knowledge and general acceptance for many of the pharmacogenetics tests and could even be harmful if the interpretation is not appropriate for a particular patient. Some reasons for this include the following:

- A relevant number of patients have two or more variants affecting their treatment (of one or several concomitant drugs).
- Many patients also have concomitant diseases that can interact in various ways with the genotype of the patient.
- Drug interactions can appear (or severity can be different), depending on the genotype of the patient.
- Guidelines on these situations are rarely available and a more deep evaluation of evidence is needed.

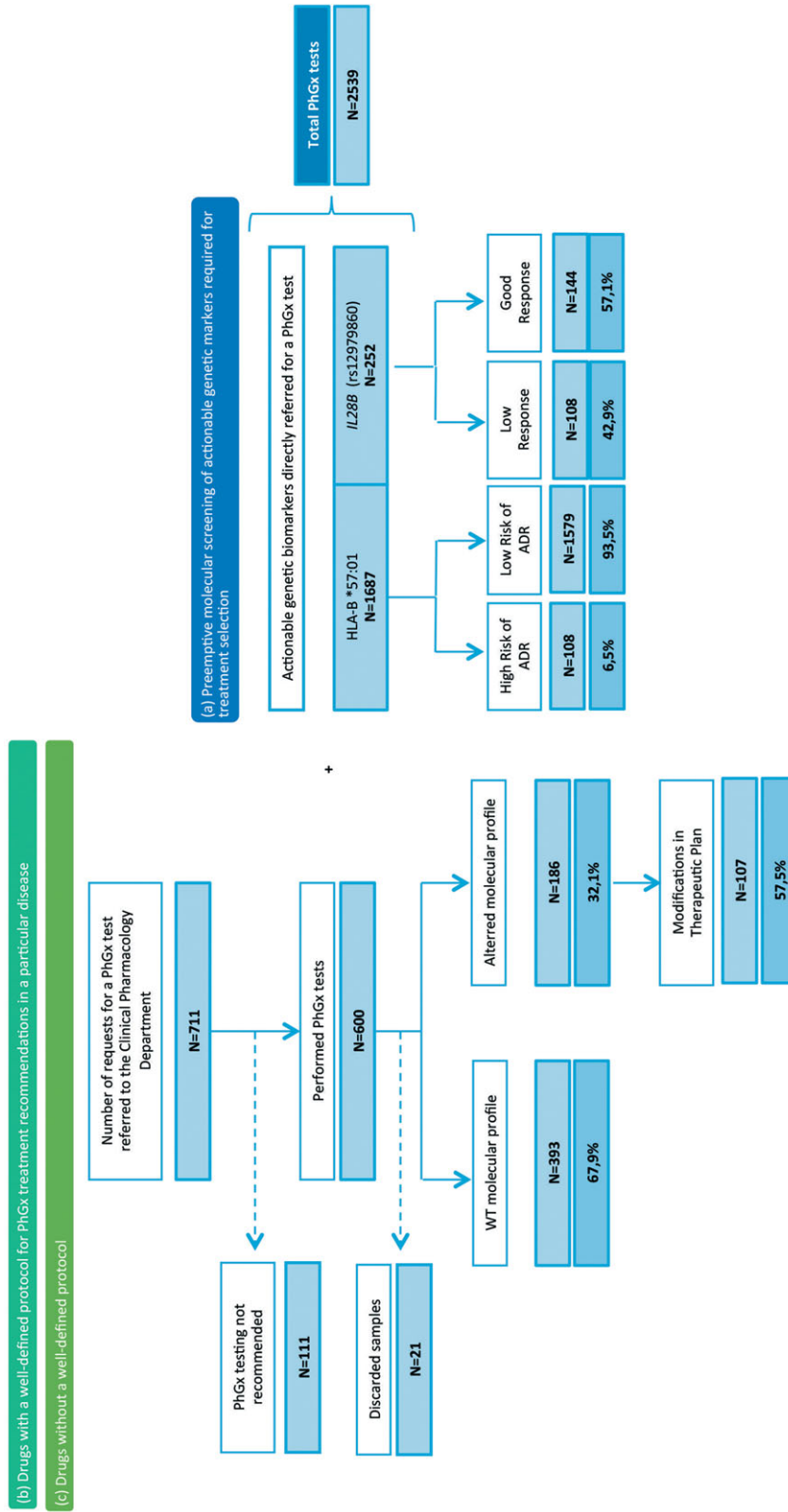


Figure 3 Patient Enrollment (2014–2016). Distribution of the 2,539 pharmacogenetics tests performed in our Pharmacogenetics Unit. PhGx: Pharmacogenetic.

Table 3 Patient's and physician's survey

Patient's s survey (n = 51)	
	YES (%)
Do the facilities seem to you decent, clean, and in accordance with the Clinical Genetic visit you have obtained?	100.00%
The expert who has attended to you has taken the adequate time to explain to you all the necessary details in order to understand the scope of the Clinical Pharmacogenetic visit?	100.00%
If studies were requested, have you understood what are they about, what it is expected from the result and how long it will take approximately?	100.00%
Do you consider that the information was complete?	100.00%
Regardless the number of experts assisting you in the visit, have you had enough privacy to comment with them the problems that afflict you?	100.00%
	IS (%)
Transparency of the expert's information.	89.57%
Time of response of the requested analysis with regard to your necessities.	79.13%
Degree of confidence that you have in the results of the Clinical visit of this Institute.	80.43%
Answer and/or possibility of new consultations if requested.	83.48%
Telephone answering service of the administrative assistants when you call in order to make an appointment or clarify doubts.	84.78%
GLOBAL IS	83.47%
Physician's survey (n = 19)	
	N (%)
Service/Unit	
Internal Medicine	4 (21.1)
Dermatology	3 (15.8)
Pediatric nephrology (kidney transplantation)	3 (15.8)
Gastroenterology	2 (10.5)
Pediatric hemato-oncology	2 (10.5)
Psychiatry	2 (10.5)
Oncology	1 (5.3)
Clinical Immunology	1 (5.3)
Thromboembolic unit	1 (5.3)
Do you think that in the last 3 years have improved your understanding about the utility of pharmacogenetics in clinical practice?	
Yes	19 (100)
If it has improved, which factors have contributed to it?*	
Contact with the Unit of Pharmacogenetics	17 (89.5)
Development of protocol and guidelines	4 (21.1)
Development of research projects related to pharmacogenetics	11 (57.9)
Education, sessions or specific courses	8 (42.1)
You make use of Pharmacogenetics according to:*	
Protocols agreed with the Unit of Pharmacogenetics	8 (42.1)
Request of tests of individual cases	14 (73.7)
In case of a recommendation of the Unit of Pharmacogenetics:	
I follow the indications reported by the Unit of Pharmacogenetics	16 (84.2)
I do not follow the exact indications but I consider the genetic result	3 (15.8)
I neither follow the indications nor I consider them	0 (0)

(continued)

Table 3 Continued

	IS (%)
Do you consider appropriate the way of requesting a test and/or visit?	79.0%
Do you consider appropriate the time of response?	76.8%
Do you consider appropriate and useful the provided pharmacogenetic information?	94.7%
Do you think that the use of pharmacogenetics has an impact on the management of your patient?	85.3%
Do you think that in the following years the use of pharmacogenetics will increase in your specialty?	91.6%
	N (%)
Which aspects do you think could increase the use of pharmacogenetics in your specialty?*	
Clearer guidelines about the use of pharmacogenetics	11 (57.9)
Greater level of evidence about its clinical validity and utility	11 (57.9)
Evaluation of the cost-effectiveness of the use of pharmacogenetics	10 (52.6)
Time of response more appropriate	5 (26.3)

IS: index of satisfaction.

*More than one choice question can be selected.

Therefore, both clinical and molecular information should be individually integrated for each patient in order to develop a true personalized clinical recommendation based not only on genetic information but also taking into account medical history, other clinical factors, concomitant treatments, and the patient's preferences, provided by medical records and the patient encounter. This implies that our implementation strategy relies on the presence of a clinical pharmacogenetics specialist throughout the process, always in close agreement with other clinical specialists: selection of pharmacogenetics biomarkers and their integration in clinical protocols, selection of the patients for whom a pharmacogenetics test is indicated, and a final clinical recommendation and genetic counseling for patients when necessary.

In our experience, an individualized interpretation of both pharmacogenetics and clinical information is needed to achieve an accurate and optimized therapeutic plan. CPIC and other guidelines represent a useful framework for unification of the clinical recommendations among different centers, demonstrating that actionable recommendations for drugs can be implemented with minimal ambiguity.⁸ However, we found it was essential to adjust this genotype-guided strategy to each patient's specific clinical background by a pharmacogenetics specialist. In addition, one of the challenges reported for the delivery of pharmacogenetics results is the identification of the right person to receive a recommendation as well as the various uses of information that might be made by each healthcare discipline.^{14,15} Moreover, we found that the elaboration of an accurate clinical recommendation (with a clinical report and a posttest consultation when necessary), in addition to the molecular report, made the comprehension and application of the pharmacogenetics results easier for the specialists of the petitionary clinical departments, overcoming the already mentioned barriers to interpretation and application of the use of pharmacogenetics.

We also find that the stepped evolution from *ad hoc* genotyping strategies to a preemptive genotyping strategy is essential for bringing pharmacogenetics and clinics together. Our designed custom genomic tool PharmArray (based on the TaqMan OpenArray) was of great help to this aim. Although tests based on next-generation sequencing (NGS) technologies^{16–19} have been reported in the literature, we found that our platform results are much more suitable for the clinical approach in terms of simplicity of analysis, turnaround times, and affordable costs in our NHS. This genotyping tool allowed us the implementation of a semipreemptive strategy with eight preestablished protocols agreed upon with various clinical services in risk populations. In our view, this is a very appropriate intermediate step to a full preemptive strategy. In this context, the evolution of this intermediate approach to a more extensive or even complete preemptive pharmacogenetics strategy still needs to be supported by cost-effectiveness studies.

Another key point for the implementation of pharmacogenetics in our hospital was bringing together research and clinical practice by promoting collaborative investigation^{20,21} and decision making; several investigation projects are underway evaluating the clinical results of this implementation. This approach led to a direct impact on clinical practice and a more active interaction with other medical specialties through lectures and clinical meetings, allowing the creation of more efficient and optimized treatment guidelines and protocols, as shown in the physician survey performed. In this survey it is also remarkable that all physicians consider that, in the last 3 years, its comprehension of the utility of pharmacogenetics in the clinical practice has improved, mainly due to their interaction with our unit (88.2%). Another important result is that physicians consider that pharmacogenetic information is useful, with a global index of satisfaction of 94.74%. Moreover, most physicians follow the recommendations of our unit (84.2%).

As reported in the literature, our results show that 6.5% of the patients tested for HLA-B*57:01 prior to the administration of abacavir showed a molecular profile associated with a high risk of developing severe hypersensitivity reactions to the drug; therefore, abacavir is not recommended in this subpopulation.²² Similarly, the number of patients with a low response genotype (IL28B; rs12979860; MAF = 0.31 T) for PEG-interferon-alpha-containing regimes was 42.9%, as expected. This means 11.1% of the patients belonging to the first group of pharmacogenetics tests, *i) actionable genetic markers required for treatment selection*, showed a molecular profile in which a modification in the initial therapeutic plan was needed (Figure 3). For pharmacogenetic tests belonging to groups *ii) drugs with a well-defined protocol for a specific disease* and *iii) drugs without a predefined protocol for a particular disease*, we found that 32.1% of the patients showed an altered molecular profile needing a reevaluation of the standard therapeutic strategies and dosing regimens. From these, we recommended modifications to the initial therapeutic plan for 57.5% of the patients (Figure 3).

The calculated costs are frequently lower than those described even for just genotyping in the United States and other countries.²³ Despite that our costs seem cost-effective

and similar to usual procedures within our NHS, a formal cost-efficiency study of our strategy would be necessary for stronger institutional support and expansion.

CONCLUSION

Based on our experience, the implementation of clinical pharmacogenetics programs in the clinical routine is feasible with the actual resources of the Spanish NHS. The clinical pharmacogenetics unit of La Paz University Hospital is centered around the two main ideas of *i) individualization of clinical recommendations* and *ii) preemptive genotyping in risk populations*. This is the first publication of a specific strategy for the implementation of pharmacogenetics in Spain that differs from genotype-based clinical decision support tools integrated in prescription systems. Therefore, the multidisciplinary structure and workflow of this strategy could be considered a model for the clinical implementation of pharmacogenetic testing in other public hospitals of our country and in other countries with a similar NHS.

Author Contributions. A.M.B., I.D., and A.J.A.C. wrote the article; A.M.B., P.A., J.T., G.G., P.L., and A.J.A.C. designed the research; A.M.B., H.Y.T., M.M., R.H., and I.G. performed the research; I.D., P.A., J.T., G.G., E.R., J.F., and P.L. analyzed the data.

Funding. No funding was received for this work.

Conflict of Interest. The authors declare no competing interests for this work.

1. International Conference on Harmonisation; guidance on specifications: test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products. Notice. Food and Drug Administration, HHS. *Fed. Regist.* **64**, 44928–44935 (1999).
2. Ehmman, F. *et al.* Pharmacogenomic information in drug labels: European Medicines Agency perspective. *Pharmacogenomics J.* **15**, 201–210 (2015).
3. Scott, S.A. Personalizing medicine with clinical pharmacogenetics. *Genet. Med.* **13**, 987–995 (2011).
4. Bielinski, S.J. *et al.* Preemptive genotyping for personalized medicine: design of the right drug, right dose, right time—using genomic data to individualize treatment protocol. *Mayo Clin. Proc.* **89**, 25–33 (2014).
5. Agundez, J.A. *et al.* Toward a clinical practice guide in pharmacogenomics testing for functional polymorphisms of drug-metabolizing enzymes. Gene/drug pairs and barriers perceived in Spain. *Front. Genet.* **3**, 273 (2012).
6. Dunnenberger, H.M. *et al.* Preemptive clinical pharmacogenetics implementation: current programs in five US medical centers. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **55**, 89–106 (2015).
7. Horgan, D. *et al.* An index of barriers for the implementation of personalised medicine and pharmacogenomics in Europe. *Public Health Genomics* **17**, 287–298 (2014).
8. Luzum, J.A. *et al.* The Pharmacogenomics Research Network Translational Pharmacogenetics Program: Outcomes and metrics of pharmacogenetic implementations across diverse healthcare systems. *Clin. Pharmacol. Ther.* **102**, 502–510 (2017).
9. Manson, L.E., van der Wouden, C.H., Swen, J.J. & Guchelaar, H.J. The Ubiquitous Pharmacogenomics consortium: making effective treatment optimization accessible to every European citizen. *Pharmacogenomics* **18**, 1041–1045 (2017).
10. Ramirez, E. *et al.* A pharmacovigilance program from laboratory signals for the detection and reporting of serious adverse drug reactions in hospitalized patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* **87**, 74–86 (2010).
11. Muñoz, R., Borobia, A.M., Quintana, M., Martínez-Virto, A.M., Frías, J. & Carcas, A.J. Development and validation of a poisoning surveillance program with automatic case detection in a tertiary care hospital (SAT-HULP) *Emergencias* **25**, 423–429 (2013).
12. Whirl-Carrillo, M. *et al.* Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin. Pharmacol. Ther.* **92**, 414–417 (2012).
13. Borobia, A. Implementación de la farmacogenética en la práctica clínica: Hacia las estrategias de genotipado anticipado. *IBJ Clin. Pharmacol.* **1** (2016).
14. Freimuth, R.R. *et al.* Implementing genomic clinical decision support for drug-based precision medicine. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* **6**, 153–155 (2017).

15. St Sauver, J.L. et al. Integrating pharmacogenomics into clinical practice: promise vs reality. *Am. J. Med.* **129**, 1093–1099 e1091 (2016).
16. Lauschke, V.M. * Ingelman-Sundberg, M. Requirements for comprehensive pharmacogenetic genotyping platforms. *Pharmacogenomics* **17**, 917–924 (2016).
17. Qiao, W. et al. Long-read single molecule real-time full gene sequencing of cytochrome P450-2D6. *Hum. Mutat.* **37**, 315–323 (2016).
18. Twist, G.P. et al. Constellation: a tool for rapid, automated phenotype assignment of a highly polymorphic pharmacogene, CYP2D6, from whole-genome sequences. *npj Genomic Medicine* **1**, 15007 (2016).
19. Mizzi, C. et al. Personalized pharmacogenomics profiling using whole-genome sequencing. *Pharmacogenomics* **15**, 1223–1234 (2014).
20. Borobia, A.M. et al. An acenocoumarol dosing algorithm using clinical and pharmacogenetic data in Spanish patients with thromboembolic disease. *PLoS One* **7**, e41360 (2012).
21. Tong, H.Y. et al. A new pharmacogenetic algorithm to predict the most appropriate dosage of acenocoumarol for stable anticoagulation in a mixed Spanish population. *PLoS One* **11**, e0150456 (2016).
22. Dean, L. Abacavir therapy and HLA-B*57:01 genotype. In: V. Pratt, H. McLeod, L. Dean, A. Malheiro, W. Rubinstein (eds). *Medical Genetics Summaries*. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD) 2012.
23. Verbelen, M. et al. Cost-effectiveness of pharmacogenetic-guided treatment: are we there yet? *Pharmacogenomics J.* **17**, 395–402 (2017).

© 2017 The Authors. Clinical and Translational Science published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

Prediction Models for Voriconazole Pharmacokinetics Based on Pharmacogenetics: An Exploratory Study in Spanish population

Irene Dapía^{1,2}; Irene García³; Jose Carlos Martinez³; Pedro Arias^{1,2}; Pedro Guerra³; Lucía Díaz³; Alberto García³; Dolores Ochoa⁴; Jair Tenorio^{1,2}; Elena Ramírez³; Manuel Román⁴; Gema Gordo^{1,2}; Miriam Saiz-Rodríguez⁴; Jesús Frías³; Francisco Abad-Santos⁴; Pablo Lapunzina^{1,2}; Antonio J Carcas³; Alberto M Borobia³

¹ Medical and Molecular Genetics Institute (INGEMM), La Paz University Hospital, Madrid, Spain

² Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), ISCIII, Madrid, Spain

³ Clinical Pharmacology Department, IdiPAZ, La Paz University Hospital School of Medicine, Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain

⁴ Clinical Pharmacology Department, Hospital Universitario de La Princesa, Instituto Teófilo Hernando, Universidad Autónoma de Madrid (UAM), Instituto de Investigación Sanitaria La Princesa (IP), Madrid, Spain

* Correspondence:

Antonio J. Carcas, MD, PhD; Alberto M. Borobia, MD, PhD

Clinical Pharmacology Department

La Paz University Hospital

Paseo de la Castellana 261

28046-Madrid (SPAIN)

Telephone and FAX: +34-917277558

E-mail: alberto.borobia@salud.madrid.org; antonio.carcas@uam.es

Keywords: Pharmacogenetics, Pharmacokinetics, Voriconazole, AUC-prediction models, *CYP2C19*.

Number of words: 3323

Number of Figures: 1

Number of Tables: 4 + 1 Supplementary Material

Number of References: 41

1. Abstract

Individualization of the therapeutic strategy for the oral antifungal voriconazole (VCZ) is extremely important for treatment optimization. To date, regulatory agencies include *CYP2C19* as the only major pharmacogenetics (PGx) biomarker in their dosing guidelines; however, the effect of other genes might be important for VCZ dosing prediction. We developed an exploratory PGx study to identify new biomarkers related to VCZ pharmacokinetics (PK). We first designed a “Clinical Practice VCZ-AUC prediction model” based on *CYP2C19* to be used as a reference model in this study. We then designed a multifactorial polygenic prediction model and found that genetic variability in *FMO3*, *NR1I2*, *POR*, *CYP2C9* and *CYP3A4* partially contributes to VCZ-AUC_{0-∞} interindividual variability and its inclusion in VCZ-AUC_{0-∞} prediction algorithms improves model precision. To our knowledge, there are not PGx studies specifically relating *POR*, *FMO3* and *NR1I2* polymorphisms to VCZ-PK variability. Further research is needed in order to test the model here proposed.

2. Introduction

Voriconazole (VCZ) is a second-generation triazole antifungal agent generally accepted as the first-line treatment for invasive aspergillosis and indicated for the treatment and prophylaxis of a variety of other fungal infections. However, its use is sometimes limited by its narrow therapeutic range and its wide interpatient variability in serum concentrations, which are directly related to both VCZ efficacy and the occurrence of adverse drug reactions (ADRs)¹.

In this context, the individualization of VCZ therapeutic strategy is very important for treatment optimization. VCZ pharmacokinetic (PK) variability depends on many clinical covariates such as age, hepatic function, concomitant medications, inflammation and genetic factors.^{1, 2} Therefore, the implementation of a multidisciplinary approach in clinical practice combining both therapeutic drug monitoring (TDM)^{3, 4} and preemptive pharmacogenetics (PGx) studies shows great potential for improving drug efficacy and reducing toxicities.

VCZ presents an extensive hepatic metabolism with less than 2% of the original dose excreted in unchanged form. The main circulating metabolite is voriconazole N-oxide, which has minimal antifungal activity.⁵ It is estimated that approximately 70%–75% of total VCZ metabolism is mediated through cytochrome P450 (CYP) enzymes, mostly CYP3A4 and CYP2C19, and the flavin-containing monooxygenase (FMO) family mediates the remaining 25%–30%.^{5, 6, 7, 8} VCZ also has the potential to be both a substrate and an inhibitor of the CYP2C19, CYP3A4 and CYP2C9 enzymes.⁹ Therefore, genetic heterogeneity in the genes encoding these enzymes appears to have great influence on VCZ PK interindividual variability.

The association between the *CYP2C19* genotype and VCZ PK variability is well described. In fact, to date VCZ dosing guidelines based on PGx are monogenic and rely exclusively on *CYP2C19* as a relevant biomarker (BM) for VCZ PK prediction and therapeutic recommendations^{1, 10}. There is significant evidence suggesting that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *CYP2C19* gene explain 50%–55% of VCZ metabolism.^{6, 8, 11} Up to

35 variant star (*) alleles along the *CYP2C19* gene have been described by the Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c19.htm>) related to absent, reduced or increased enzymatic CYP2C19 activities. Table S1 (supplementary material) shows some of the most relevant variants related to CYP2C19 enzymatic activity in the white population.

In vivo and *in vitro* studies suggest that 20%–30% of human VCZ metabolism can be catalyzed by CYP3A4^{6, 8, 11}; thus, *CYP3A4* preemptive genotyping could be also useful before VCZ administration.¹² In addition, the effect of CYP3A4 on VCZ metabolism appears to be more relevant among those who metabolize CYP2C19 poorly.⁸ Several SNPs have been reported in association with CYP3A4 activity^{13, 14, 15} (Table S1; Supplementary Material). Studies on the influence of CYP3A5 on VCZ PK have yielded contradictory findings; however, an *in vitro* study suggests that interindividual differences in drug clearance and drug interactions of triazole antifungal drugs, including VCZ, are appreciably affected by *CYP3A5* genotypes.¹⁶ The most relevant variants among whites are shown in Table S1 (Supplementary Material).

In vitro studies using human liver microsomes showed that VCZ is also metabolized to a lesser extent by CYP2C9^{9, 11}. The most common SNPs related to CYP2C9 activity are shown in Table S1 (Supplementary Material), both of which lead to poor metabolism (PM) phenotypes.^{17, 18}

CYP enzymes are regulated by a variety of other regulatory proteins; therefore, the activity of these proteins appears to have an additive effect on the PK of some CYP- metabolizing drugs. P-450 oxidoreductase (POR) enables the activity of P450 enzymes and is essential for CYP-mediated drug oxidation. Polymorphisms in the *POR* gene are related to alterations in POR modulation of CYP3A enzyme activity^{19, 20, 21, 22} (Table S1; Supplementary Material). To our knowledge, there are not pharmacogenetics studies specifically relating *POR* genetic variability to VCZ PK interindividual heterogeneity. However, recent studies have reported that POR

concentrations significantly contribute to interindividual variability in CYP2C19 activity and CYP2C19-catalyzed drug metabolism, such as VCZ metabolism²³.

On the other hand, Nuclear Receptor Subfamily 1 Group I Member 2 (*NR1I2*), which encodes the human pregnane X receptor (PXR), is responsible for the upstream regulation of CYP3A enzymes. Therefore, variants in the *NR1I2* gene are associated with alterations in CYP metabolic activity, which in turn might alter the PK of CYP-metabolized drugs.²⁴

FMOs represent the second-most important group of human Phase I drug-metabolizing enzymes, after CYP. An important role of FMO in VCZ metabolism has been reported in the literature, especially among children. An *in vitro* study suggests a contribution of approximately 20% of FMOs, mainly of the FMO3 enzyme, in VCZ N-oxidation.^{8, 25} To our knowledge, the association between *FMO3* SNPs and VCZ PK has not yet been well described; however a study performed on liver transplant patients treated with tacrolimus (TAC) reported an association between *FMO3* SNPs and both FMO3 activity and rapid TAC elimination.²⁶ Therefore, these SNPs might also be associated with VCZ PK variability (Table S1; Supplementary Material).

Finally, P-glycoprotein (P-gp; MDR1), encoded by the *ABCB1* gene, is the most important drug-efflux transporter and it has been associated with VCZ PK²⁷. Several SNPs have been reported in *ABCB1* related to altered transport function of P-gp and leading to interindividual variability in the PK of its substrates^{27, 28} (Table S1; Supplementary Material).

In conclusion, VCZ efficacy and toxicity show a great variability both in the adult and pediatric population. It has been reported that *CYP2C19* genotyping can be a robust tool for guiding VCZ therapy. However, part of this variability might also be explained by genetic variability in other genes (such as *ABCB1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9*, *POR*, *NR1I2* and *FMO3*). We therefore performed an observational study nested to 3 bioequivalence clinical trials of two VCZ formulations in 106 Spanish patients. The studies were performed at La Paz University Hospital

and La Princesa University Hospital in Madrid (EUDRA-CT: 2012-004029-26; 2014-001964-36, 2014-005342-22), with the aim of: **(1)** Evaluating the additional contribution of PGx variability in other BM, different to *CYP2C19*, to VCZ PK profile and; **(2)** study whether the creation of polygenic prediction algorithms may help in the optimization of the existing *CYP2C19*-based VCZ dosing recommendations.

3. Results

3.1. Study population characteristics.

Table 1 shows demographic features as well as SNP and haplotype frequencies found in our study population. Our population consisted of 106 individuals: 4 ultra-rapid metabolizers (URM), 34 rapid metabolizers (RM), 38 normal metabolizers (NM), 28 intermediate metabolizers (IM) and 2 poor metabolizers (PM), according to *CYP2C19* genotypes.

3.2. CYP2C19 reference predictive model.

We first designed a monogenic reference predictive model of VCZ $AUC_{0-\infty}$ based only on *CYP2C19* as a PGx biomarker by creating a linear repeated measures model under minimum AIC, including the *CYP2C19* phenotype as a covariate. The resulting predictive model based on the *CYP2C19* phenotype is shown in Table 2 and Figure 1. The global R^2 for this model was 0.438 and RMSEP was 0.18 (Table 4). This model was cross validated in two groups, A and B, as there are only 4 UM patients. We performed 100 simulations for validation. The *CYP2C19* predictive model will be used later as a reference model for comparison with the proposed polygenic predictive model, including additional biomarkers related to VCZ $AUC_{0-\infty}$ revealed in our exploratory study.

3.3. Identification of additional candidate biomarkers related to VCZ pharmacokinetics: Design of a multifactorial predictive model for VCZ $AUC_{0-\infty}$.

We performed an exploratory study for the identification of additional candidate BM that could be related to VCZ PK in our study cohort. Table 3 shows the best model estimated under minimum AIC after the inclusion of all biomarkers genotyped for this study. For this analysis, we included demographic data and SNP information of all BM genotyped in our study

population. SNP results for *CYP3A5*, *CYP2C19* and *CYP2C9* were codified into haplotypes using the star allele nomenclature. The best model obtained selects SNPs among the *CYP2C9*, *CYP3A4*, *POR*, *NR1I2* and *FMO3* genes (in addition to the *CYP2C19* gene) as variables of interest for VCZ AUC_{0-∞} prediction (Table 3). BMI and gender were also selected as relevant covariates. The inclusion of additional BM in the *CYP2C19* predictive model increased R² values and decreased RMSEP calculation (R²=0.587; RMSEP=0.165, Table 4).

When evaluating the contribution and significance of each of the selected variables, we have seen that *POR* accounts for 18% of the R² of the model, followed by *CYP2C9* (~8%), *BMI* (~10%), *NR1I2* (~4%), *FMO3* (~4%), *CYP3A4* (~4%), and gender (~2%), in addition to *CYP2C19* (~39%) that remains the main factor explaining interindividual variability (Table 3).

4. Discussion

We have performed an observational study nested to three bioequivalence clinical trials of two VCZ formulations in 106 Spanish patients with the aim of evaluating whether the incorporation of additional PGx biomarkers to the *CYP2C19*-based VCZ dosing algorithms could improve VCZ AUC_{0-∞} prediction rates. This is highly challenging due to VCZ non-linear PK and its inherent variability²⁹.

As previously reported and as stated in clinical guidelines,^{1, 2, 10} *CYP2C19* has a major effect on VCZ metabolism, and it is therefore the main factor explaining AUC_{0-∞} heterogeneity in our cohort (Figure 1). In this context, our first step was the development of a monogenic reference predictive model, based on the existing clinical algorithms for VCZ treatment optimization, relying exclusively on *CYP2C19* phenotype and referred to as the reference *CYP2C19* predictive model (Table 2). The *CYP2C19* genotype divides our study population into 5 *CYP2C19* phenotypic subgroups: UM (N=4), RM (N=34), NM (N=38), IM (N=28) and PM (N=2). The calculated R² for this model was 0.438 and RMSEP was 0.18.

To date, most of the dosing algorithms based on PGx implemented in the clinical practice are monogenic, and that is the case of VCZ⁷. However, when studying VCZ metabolic pathway, one can realize that there are additional BM involved in VCZ PK that could help in the explanation of VCZ residual variability in plasma concentrations. We then developed an exploratory statistical analysis in order to evaluate the additional contribution of other BM (different to *CYP2C19*), to VCZ metabolism and to investigate whether the incorporation of polygenic prediction algorithms may improve VCZ $AUC_{0-\infty}$ prediction rates based only on *CYP2C19* genotype.

To this aim, we decided to create a model including all previously selected BM as variables of interest for this study, as well as other demographic data. This model was referred to as the “multifactorial predictive model for VCZ $AUC_{0-\infty}$ ” (Table 4). The aim of this model was to detect all variables that could be involved in VCZ $AUC_{0-\infty}$ interindividual variability. For this analysis, haplotypes were inferred for the major metabolizing enzymes (*CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C9* and *CYP2C19*) and diplotypes were codified using the star-allele nomenclature, to detect the overall effect of the protein instead of the individual SNPs. The best predictive model obtained confirmed the major metabolic effect of *CYP2C19* in our study cohort of Spanish population (with a contribution of ~39% to global R^2 of the model). In addition, other BM were revealed as possible variables of interest for VCZ $AUC_{0-\infty}$ prediction: rs1800822 in *FMO3* (~4%), rs3814055 in *NR1I2* (~4%), rs1057868 and rs2868177 in *POR* (~18%) and *CYP3A4* (~3%) and *CYP2C9* genotype (~8%), as well as gender (~4%), and BMI (~10%). The incorporation of all of these BM and demographic data increased global R^2 of the reference model ($R^2_{\text{Multi-factorial Model}}=0.587 > R^2_{\text{Reference Model}}=0.438$) as it decreased the global RMSEP of the model ($RMSEP_{\text{Multi-factorial Model}}=0.165 < RMSEP_{\text{Reference Model}}=0.180$) indicating an increase in precision of VCZ $AUC_{0-\infty}$ predictions when compared to the *CYP2C19* reference model (Table 4).

In this study we identified several BM, related to VCZ metabolic pathway in the literature, that partially explained VCZ AUC_{0-∞} residual variability in our study population. In this context, the inclusion of these BM into the existing algorithms based only on *CYP2C19* as a PGx BM for guiding VCZ treatment seems to improve VCZ AUC_{0-∞} predictions (Table 4). To our knowledge, there are not PGx studies specifically linking *POR*, *FMO3* and *NR1I2* genetic variability to VCZ PK interindividual heterogeneity, however the implication of these proteins in VCZ metabolic pathway has been well described.

Due to strong influence of *CYP2C19* on VCZ metabolism, these BM do not individually explain a great percentage of VCZ AUC interindividual variability (Table 4). However, in global they contribute to the explanation of ~60% of the residual variability that is not explained by *CYP2C19* genotype. In addition, we hypothesize, that the reported BM might become even more relevant in patients with *CYP2C19* PM phenotypes (e.g. *CYP2C19**2/*2 patients; PM), where in the absence of functional *CYP2C19* enzyme the effect of other metabolizing enzymes may arise. This has previously been described in other drugs such as Tacrolimus where complementary BM such as *POR* and *ABCB1* become more relevant in *CYP3A5*-defective genotypes³⁰. Due to the small number of PM found in our study cohort (N=2), we were not able to design prediction models for these patients and the specific effect of these BM in *CYP2C19* PM should be tested in forthcoming studies.

However, after the evaluation of the two models here proposed based on R² and RMSEP coefficients, we can see that the most suitable model for VCZ AUC_{0-∞} prediction in our population is the polygenic predictive model (Table 4). Taking into account these results and previous literature, we propose that *FMO3*, *NR1I2*, *POR*, *CYP3A4* and *CYP2C9* genotype might represent a useful tool for explaining VCZ PK variability, and that their incorporation to the “clinical practice *CYP2C19*” prediction algorithms could improve VCZ AUC_{0-∞} prediction rates. However, further research is needed in larger cohorts with a higher representation of rare

diplotypes and in different populations to test the model proposed herein. Additionally, this study was performed in healthy volunteers with a single dose of VCZ and therefore further research in patient cohorts where multiple doses are administered is necessary in order to validate the biomarkers here proposed for its clinical use.

In order to achieve a cost-efficient implementation of polygenic models in the clinical practice it is necessary to rely on genotyping platforms that allow simultaneous genotyping of multiple BM in the same run. In this context, as the costs and analysis time of Next Generation Sequencing (NGS) decreases, there is a general tendency towards the application of genotyping panels and exomes in order to have available a great amount of molecular information to be extracted for different purposes. However, to date the authors think the application of SNP-arrays constitutes the best solution for the implementation of polygenic models in the clinical practice in terms of costs and response time³¹, mostly because whole exome sequencing does not cover much SNPs that map to non-coding genomic regions.

5. Methods

5.1. Patients.

The present study was performed within three randomized crossover clinical trials to evaluate the bioequivalence of two 200-mg VCZ formulations. One hundred six Spanish healthy volunteers were included. All the participants provided written consent before study initiation and after reception of written and oral information related to objectives, characteristics, procedures, risks and rights of participation in the study. Bioequivalence of the two formulations was demonstrated for AUC in all three trials, following the criteria accepted by the current European Medicines Agency (EMA) regulations. Therefore, both formulations were included in the analysis as described in the statistical analysis section.

5.2. Pharmacokinetic study.

Venous blood samples (3 ml) were collected and placed in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid K₂ as anticoagulant at baseline, 0.33 h, 0.67 h, 1 h, 1.33 h,

1.67 h, 2 h, 2.33 h, 2.67 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 24 h (± 1 h) and 32 h (± 1 h) (or 36h depending on the study) after drug administration. VCZ and internal standard were measured by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometry detector (LC/MS/MS) by a certified laboratory compliant with EMA regulation for bioavailability and bioequivalence studies. The lower limit of quantification was 5.03 ng/mL. The pharmacokinetic analysis was performed using WinNonlin 6.3 software (Pharsight Corporation, Cary, NC, USA) by means of a noncompartmental analysis.

Maximum concentration (C_{max}) and the time to reach it (T_{max}) were directly obtained from the plasma concentration results. $AUC_{0-\infty}$ (total area under the concentration-time curve; ng/ml*h) was calculated from the addition of two partial AUCs: (a) AUC_{last} , area between the dosage time and the last time with detectable concentrations, calculated by the trapezoidal rule; and (b) $AUC_{t-\infty}$, calculated as the ratio C/k , in which C is the last detectable concentration and k is the slope obtained in the lineal regression calculated from the points corresponding to the elimination phase of the drug. Pharmacokinetic data were log-transformed; C_{max} and AUC were adjusted to dose/weight administered.

5.3. Patient genotyping.

A molecular analysis was performed on all 106 patients for the selected SNPs (Table S1; Supplementary Material): rs4244285, rs4986893, rs12248560 and rs28399504 in *CYP2C19*; rs2032582 and rs1045642 in *ABCB1*; rs55785340, rs4646438, rs2740574 and rs35599367 in *CYP3A4*; rs776746, rs55965422, rs10264272, rs41303343 and rs41279854 in *CYP3A5*, rs1799853 and rs1057910 in *CYP2C9*; rs1057868 and rs2868177 in *POR*; rs3814055 in *NR1I2* and rs1800822, rs2266782 and rs909530 in *FMO3*, using our custom SNP-array platform PharmArray. For those SNPs that were not included in the array design (rs2740574, rs35599367, rs3814055 and *FMO3*), we performed Sanger sequencing. Diplotypes were codified to the star-allele nomenclature (*) using the Haplotype Set IDs provided by PharmGKB⁷ and PhamVar³²: *CYP3A5* (PA165980507), *CYP3A4* (PA165980506), *CYP2C19*

(PA166128323) and *CYP2C9*. *CYP2C19* phenotypes were inferred using the CPIC standardized allele definition and functionality tables (PA166124411) as well as specific clinical guidelines¹.

5.4. Statistical analysis.

Descriptive statistics of continuous variables are presented as minimum, maximum, standard deviation and mean. Effects of factors in these variables were evaluated with a nonparametric test. Qualitative variables and factors are presented in terms of frequency and contingency tables. Fisher's exact test was used to determine association between factors. Statistical analyses were focused on $AUC_{0-\infty}$, transformed using a decimal logarithm after correction for dosage/weight.

According to previous knowledge, we adjusted a linear repeated measures model³³, where individual are considered as random, under minimum Akaike information criterion (AIC)³⁴, performing an automatic backward elimination of all effects (age, sex, height, weight, BMI, *CYP2C19* phenotype) of a linear mixed effect model, which includes the *CYP2C19* phenotype as a covariate. We refer to this model as the *CYP2C19* model and we used it as the gold standard for comparison with the proposed polygenic model herein.

For each model coefficient of determination R^2 (or Rsq) was calculated taking into account that we are fitting linear mixed models, according to Edwards and Jaeger approaches^{35, 36}. The value for the overall model is provided. In order to know the contribution of each fixed effect a partial R^2 was also calculated. This partial R^2 should not be considered equivalent to the partial R^2 in a linear model, values here presented represent a hierarchy of importance of the fixed effect in the model. Larger R^2 indicate higher importance in the pharmacological process described by the model.

We also calculated the root mean of standard errors of prediction (RMSEP)³⁷ as the prediction ability measure of the models:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_1^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}}$$

Where y_i is the observed value, \hat{y}_i is the predicted value, and n , the number of observations.

CYP2C19 model was cross validated in two sets, where the four UM subjects were assigned randomly in two sets, and 100 replicates were done using both set, first to fit the model, and second to predict $\log_{10} AUC_{0-\infty}$. PM subjects were discharged since only two individuals presented this phenotype.

In order to detect possible variables of interest for VCZ $AUC_{0-\infty}$ prediction we used a model based on all genotyped SNPs and other demographic variables instead of CYP2C19 phenotypes only after variable selection under minimum AIC, called the "SNP model". R^2 was calculated for the overall model as well as the partial contribution of each variable. RMSEP was also obtained.

Statistical computations were performed using R³⁸ and RStudio.³⁹ R package lme4⁴⁰ was used when the repeated measures models approach holds and Genetics⁴¹ for Hardy-Weinberg disequilibrium testing. P values lower than 0.05 are considered as significant. For the false discovery rate p values lower than 0.0316 are considered as significant.

6. Study Highlights

What is the current knowledge on the topic? Individualization of the therapeutic strategy for the oral antifungal voriconazole (VCZ) is highly important for treatment optimization. To date, clinical guidelines for dose adjustment of VCZ based on PGx are only based on *CYP2C19* genotype.

What question did this study address? Whether the incorporation of additional BM to the existing VCZ monogenic dosing algorithms may help improve VCZ PK profile predictions.

What does this study add to our knowledge? Our results show that genetic variability in *FMO3*, *NR1I2*, *POR*, *CYP2C9* and *CYP3A4* partially contributes to VCZ AUC_{0-∞} interindividual variability and its inclusion in VCZ-AUC_{0-∞} prediction algorithms based on CYP2C19 improved model precision in our study cohort.

How might this change clinical pharmacology or translational science? The creation of polygenic prediction algorithms for VCZ AUC_{0-∞} may improve prediction rates and contribute in the optimization of VCZ therapy.

7. Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

F. Abad-Santos and D. Ochoa have been consultants or investigators in clinical trials sponsored by the following pharmaceutical companies: Abbott, Alter, Bristol-Myers, Chemo, Cinfa, FAES Farma, Farmalíder, Ferrer, GlaxoSmithKline, Galenicum, Gilead, Italfarmaco, Janssen-Cilag, Kern Pharma, Normon, Novartis, Servier, Silverpharma, Teva, and Zambon.

8. Author contributions

Study design: ID, JCM, AMB, DO, FAS

Conducting the study and processing of samples: ID, PA, IG, AB, DO, MR, MSR, FAS

Pharmacokinetic analysis: IG, LD, PG, AG, AJC

Molecular analysis: ID, IG, PA, JT, GG

Pharmacogenetics results analysis and interpretation: ID, IG, PA, AMB

Statistical analysis and computation: JCM

Drafting of the manuscript: ID, IG, JCM, AMB, AJC

Critical revision of the manuscript for important intellectual content: PG, ER, PL, JF, FAS, AJC,

AMB

9. References

1. Moriyama B, *et al.* Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP2C19 and Voriconazole Therapy. *Clin Pharmacol Ther.* (2016)
2. Mikus G, Scholz IM, Weiss J. Pharmacogenomics of the triazole antifungal agent voriconazole. *Pharmacogenomics* **12** 861-872. (2011)
3. Andes D, Pascual A, Marchetti O. Antifungal therapeutic drug monitoring: established and emerging indications. *Antimicrob Agents Chemother* **53** 24-34. (2009)
4. Pascual A, *et al.* Voriconazole therapeutic drug monitoring in patients with invasive mycoses improves efficacy and safety outcomes. *Clin Infect Dis* **46** 201-211. (2008)
5. Roffey SJ, *et al.* The disposition of voriconazole in mouse, rat, rabbit, guinea pig, dog, and human. *Drug Metab Dispos* **31** 731-741. (2003)
6. Murayama N, Imai N, Nakane T, Shimizu M, Yamazaki H. Roles of CYP3A4 and CYP2C19 in methyl hydroxylated and N-oxidized metabolite formation from voriconazole, a new anti-fungal agent, in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* **73** 2020-2026. (2007)
7. Whirl-Carrillo M, *et al.* Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther* **92** 414-417. (2012)
8. Yanni SB, *et al.* Role of flavin-containing monooxygenase in oxidative metabolism of voriconazole by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **36** 1119-1125. (2008)
9. Theuretzbacher U, Ihle F, Derendorf H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. *Clin Pharmacokinet* **45** 649-663. (2006)
10. Swen JJ, *et al.* Pharmacogenetics: from bench to byte--an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther* **89** 662-673. (2011)
11. Hyland R, Jones BC, Smith DA. Identification of the cytochrome P450 enzymes involved in the N-oxidation of voriconazole. *Drug Metab Dispos* **31** 540-547. (2003)
12. Gautier-Veyret E, Fonrose X, Stanke-Labesque F. Pharmacogenetics of Voriconazole: CYP2C19 but Also CYP3A4 Need to Be Genotyped. *Clin Pharmacol Ther* **102** 189. (2017)
13. Barbarino JM, Staatz CE, Venkataramanan R, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenet Genomics* **23** 563-585. (2013)

14. Gijzen VM, *et al.* CYP3A4*22 and CYP3A combined genotypes both correlate with tacrolimus disposition in pediatric heart transplant recipients. *Pharmacogenomics* **14** 1027-1036. (2013)
15. Hsieh KP, *et al.* Novel mutations of CYP3A4 in Chinese. *Drug Metab Dispos* **29** 268-273. (2001)
16. Yamazaki H, Nakamoto M, Shimizu M, Murayama N, Niwa T. Potential impact of cytochrome P450 3A5 in human liver on drug interactions with triazoles. *Br J Clin Pharmacol* **69** 593-597. (2010)
17. Niwa T, Hata T. The Effect of Genetic Polymorphism on the Inhibition of Azole Antifungal Agents Against CYP2C9-Mediated Metabolism. *J Pharm Sci* **105** 1345-1348. (2016)
18. Van Booven D, *et al.* Cytochrome P450 2C9-CYP2C9. *Pharmacogenet Genomics* **20** 277-281. (2010)
19. de Jonge H, Metalidis C, Naesens M, Lambrechts D, Kuypers DR. The P450 oxidoreductase *28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients. *Pharmacogenomics* **12** 1281-1291. (2011)
20. Gijzen VM, *et al.* P450 oxidoreductase *28 (POR*28) and tacrolimus disposition in pediatric kidney transplant recipients--a pilot study. *Ther Drug Monit* **36** 152-158. (2014)
21. Oneda B, *et al.* The P450 oxidoreductase genotype is associated with CYP3A activity in vivo as measured by the midazolam phenotyping test. *Pharmacogenet Genomics* **19** 877-883. (2009)
22. Zhang X, Li L, Ding X, Kaminsky LS. Identification of cytochrome P450 oxidoreductase gene variants that are significantly associated with the interindividual variations in warfarin maintenance dose. *Drug Metab Dispos* **39** 1433-1439. (2011)
23. Shirasaka Y, *et al.* Interindividual variability of CYP2C19-catalyzed drug metabolism due to differences in gene diplotypes and cytochrome P450 oxidoreductase content. *Pharmacogenomics J* **16** 375-387. (2016)
24. Choi Y, *et al.* A pharmacogenomic study on the pharmacokinetics of tacrolimus in healthy subjects using the DMETTM Plus platform. *Pharmacogenomics J* **17** 105-106. (2017)

25. Yanni SB, *et al.* In vitro hepatic metabolism explains higher clearance of voriconazole in children versus adults: role of CYP2C19 and flavin-containing monooxygenase 3. *Drug Metab Dispos* **38** 25-31. (2010)
26. Ren L, *et al.* Donors FMO3 polymorphisms affect tacrolimus elimination in Chinese liver transplant patients. *Pharmacogenomics* **18** 265-275. (2017)
27. Tang JT, *et al.* Pharmacogenetic aspects of the use of tacrolimus in renal transplantation: recent developments and ethnic considerations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **12** 555-565. (2016)
28. Weiss J, *et al.* CYP2C19 genotype is a major factor contributing to the highly variable pharmacokinetics of voriconazole. *J Clin Pharmacol* **49** 196-204. (2009)
29. Hope WW. Population pharmacokinetics of voriconazole in adults. *Antimicrob Agents Chemother* **56** 526-531. (2012)
30. Almeida-Paulo GN, *et al.* Weight of ABCB1 and POR genes on oral tacrolimus exposure in CYP3A5 nonexpressor pediatric patients with stable kidney transplant. *Pharmacogenomics J* **18** 180-186. (2018)
31. Borobia AM, *et al.* Clinical Implementation of Pharmacogenetic Testing in a Hospital of the Spanish National Health System: Strategy and Experience Over 3 Years. *Clin Transl Sci.* (2017)
32. Gaedigk A, *et al.* The Pharmacogene Variation (PharmVar) Consortium: Incorporation of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database. *Clin Pharmacol Ther* **103** 399-401. (2018)
33. Ahrens H, Searle, S. R.: Linear Models. John Wiley & Sons, Inc., New York-London-Sydney-Toronto 1971. XXI, 532 S. \$9.50. *Biometrische Zeitschrift* **16** 78-79. (1974)
34. Akaike H. A New Look at the Statistical Model Identification. In: Parzen E, Tanabe K, Kitagawa G (eds). *Selected Papers of Hirotugu Akaike*. Springer New York: New York, NY, 1998, pp 215-222.
35. Edwards LJ, Muller KE, Wolfinger RD, Qaqish BF, Schabenberger O. An R² statistic for fixed effects in the linear mixed model. *Stat Med* **27** 6137-6157. (2008)
36. Jaeger BC, Edwards LJ, Das K, Sen PK. An R² statistic for fixed effects in the generalized linear mixed model. *Journal of Applied Statistics* **44** 1086-1105. (2017)
37. Hastie T, Tibshirani R, Friedman JH. *The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction*. Springer, 2009.

38. Team RDC. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria; 2010.
39. Rs T. RStudio: Integrated Development for R. Boston, Mass.: Rstudio Inc.; 2015.
40. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *2015* **67** 48. (2015)
41. Warnes G. genetics: Population Genetics. 2013.

10. Figure Legends

Tables:

Table 1. Patient characterization.

Table 2. Predictive model based on the CYP2C19 phenotype: Reference model.

Table 3. Variables of importance for $AUC_{0-\infty}$ in the polygenic model based on SNPs.

Table 4. RMSEP comparison between the CYP2C19 reference model and the proposed multifactorial predictive model.

Figures:

Figure 1. Effect of CYP2C19 phenotype in VCZ $AUC_{0-\infty}$ after administration of a single 200 mg dose.

Supplementary material:

Table S1. Review of the most relevant PGx biomarkers related to VCZ PK.

Table 1. Patient characterization (N=106).

Patient characterization					
Sex (male/female %)			57/49		
Age (years ± s.d)			23.8 ± 4.3		
Weight (Kg ± s.d)			67.9 ± 12.2		
Height (cm ± s.d)			170.2 ± 9.6		
BMI (Kg/m ²)			23.3 ± 2.9		
Genetic information					
Gene	Codified Genotype	Codified Phenotype	Study N	Study frequency (N=106)	Population frequency (European)
CYP2C19	*2/*2	PM	2	0.02	*1 HapFreq= 0.621 *2 HapFreq= 0.146 *4A HapFreq= 0.003 *17 HapFreq= 0.213
	*1/*1	NM	38	0.36	
	*1/*2	IM	26	0.24	
	*1/*4a				
	*1/*17	RM	34	0.32	
	*17/*17	UM	4	0.04	
CYP3A5	*3/*3	PM	90	0.85	*1 HapFreq= 0.078 *3 HapFreq= 0.921 *6 HapFreq=0.100
	*3/*6				
	*1/*3	IM	16	0.15	
CYP2C9	*2/*2	PM	3	0.03	*1 HapFreq= 0.80 *2 HapFreq= 0.12 *3 HapFreq= 0.07
	*2/*3				
	*1/*2	IM	37	0.35	
	*1/*3				
	*1/*1	EM	66	0.62	
CYP3A4	*1/*1		91	0.86	*1 HapFreq= 0.92 *1B HapFreq= 0.02 *22 HapFreq= 0.04
	*1/*1B		7	0.07	
	*1/*22		8	0.08	
FMO3	rs1800822				MAF= 0.60 (T)
	CC		97	0.92	
	CT		8	0,08	
	TT		1	0.01	
	rs2266782				MAF= 0.37 (A)
	GG		48	0.45	
	GA		43	0.41	
	AA		15	0.14	
	rs909530				
CC		73	0.69		
CT		28	0.26		
TT		5	0.05		
POR	rs1057868				MAF= 0.30 (T)
	CC		59	0.56	
	CT		39	0.37	
	TT		8	0.08	
	rs2868177				MAF= 0.34 (G)
	AA		54	0.51	
AG		38	0.36		
GG		14	0.13		

NR1I2	rs3814055				
	CC		34	0.32	MAF= 0.37 (T)
	CT		54	0.51	
TT		18	0.17		
ABCB1	rs2032582				MAF= 0.41 (A)/0.02 (T)
	CC		41	0.39	
	CA		56	0.53	
	AA		6	0.06	
	CT		2	0.02	
	TA		1	0.01	
	rs1045642				MAF= 0.52 (A)
GG		26	0.24		
GA		68	0.64		
	AA		12	0.11	

PM: Poor Metabolizer; NM: Normal Metabolizer; IM: Intermediate Metabolizer; RM: Rapid Metabolizer; UM: Ultrarapid Metabolizer; HapFreq: *Haplotype Frequency*

Table 2. Predictive model based on the CYP2C19 phenotype: Reference model.

	Estimate	Std. Error	Pr(> t)	R ²
(Intercept)	3.038	0.089	0.000	
CYP2C19 RM	0.074	0.095	0.437	0.010
CYP2C19 NM	0.129	0.094	0.172	0.030
CYP2C19 IM	0.325	0.096	0.001	0.157
CYP2C19 PM	0.657	0.156	0.000	0.203

RM: rapid metabolizer; NM: normal metabolizer; IM: intermediate metabolizer; PM: Poor Metabolizer. The UM group is assigned an estimate value of 0. The global R² for the proposed model is 0.438 and RMSEP is 0.180.

Table 3. Variables of importance for $AUC_{0\infty}$ in the polygenic model based on SNPs.

	Variable	Estimate	Std. Error	Pr (> t)	R ² / % of total R ² explained by each BM	
Associated gene	(Intercept)	2.687	0.093	0.000		
	GenderM	-0.045	0.020	0.024	0.018 (-2%)	
	BMI	0.023	0.004	0.000	0.103 (-10%)	
<i>CYP2C19</i>	*1/*1	-0.026	0.032	0.429	0.002	~39%
	*1/*17	-0.0136	0.034	0.000	0.058	
	*1/*2	0.234	0.035	0.000	0.150	
	*17/*17	-0.170	0.058	0.004	0.031	
	*2/*17	-0.064	0.076	0.404	0.002	
	*2/*2	0.547	0.077	0.000	0.142	
<i>CYP2C9</i>	*1/*2	0.097	0.025	0.000	0.052	~8%
	*1/*3	0.037	0.028	0.188	0.006	
	*2/*2	0.137	0.102	0.182	0.007	
	*2/*3	0.137	0.071	0.055	0.014	
<i>FMO3</i>	rs1800822CT	-0.087	0.041	0.033	0.018	~4%
	rs1800822TT	0.248	0.089	0.006	0.023	
<i>NR1I2</i>	rs3814055CT	-0.010	0.022	0.661	0.001	~4%
	rs3814055TT	-0.090	0.026	0.001	0.037	
<i>POR</i>	rs1057868CT	-0.062	0.027	0.021	0.023	~18%
	rs1057868TT	0.222	0.046	0.000	0.114	
	rs2868177AG	0.045	0.024	0.060	0.015	
	rs2868177GG	-0.078	0.033	0.017	0.023	
<i>CYP3A4</i>	rs2740574AG	-0.128	0.045	0.005	0.032	~3%

The global R2 for the best proposed model is 0.587 and RMSEP is 0.165.

Table 4. RMSEP comparison between the CYP2C19 reference model and the proposed multifactorial predictive model.

	RMSEP			R ²		
	CYP2C19 reference model	Proposed model	% change	CYP2C19 reference model	Proposed model	% change
	0.180	0.165	-8.33	0.438	0.587	34.02

ORIGINAL ARTICLE

Weight of *ABCB1* and *POR* genes on oral tacrolimus exposure in *CYP3A5* nonexpressor pediatric patients with stable kidney transplant

GN Almeida-Paulo¹, I Dapía García², R Lubomirov¹, AM Borobia¹, NL Alonso-Sánchez¹, L Espinosa³ and AJ Carcas-Sansuán¹

Tacrolimus (TAC) is highly effective for the prevention of acute organ rejection. However, its clinical use may be challenging due to its large interindividual pharmacokinetic variability, which can be partially explained by genetic variations in TAC-metabolizing enzymes and transporters. The aim of this study was to evaluate the influence of genetic and clinical factors on TAC pharmacokinetic variability in 21 stable pediatric renal transplant patients. This study was nested in a previous Prograf to Advagraf conversion clinical trial. *CYP3A5*, *ABCB1* and two *POR* genotypes were assessed by real-time PCR. The impact on TAC pharmacokinetics of individual genetic variants on *CYP3A5* nonexpressors was evaluated by genetic score. Explicative models for TAC AUC_{0–24h}, C_{max} and C_{min} after Advagraf were developed by linear regression. The built genetic scores explain 13.7 and 26.5% of the total AUC_{0–24h} and C_{min} total variability, respectively. Patients genetic information should be considered to monitorize and predict TAC exposure.

The Pharmacogenomics Journal advance online publication, 17 January 2017; doi:10.1038/tpj.2016.93

INTRODUCTION

Tacrolimus (TAC) is a calcineurin inhibitor highly effective in preventing acute organ rejection after transplantation.^{1,2} However, TAC administration is complicated with side effects directly related to its drug blood concentrations such as nephrotoxicity, hypertension, hypercholesterolemia and diabetes mellitus.^{3,4} This drug has a high grade of complexity on its use mainly due to its narrow therapeutic index and its high inter and intra subject pharmacokinetic (PK) variability, requiring therapeutic drug monitoring to optimize treatment^{1,5,6} and avoid graft loss and toxicity.⁷

However, despite therapeutic drug monitoring some transplant recipients experience TAC concentrations above or below the therapeutic range and therefore are either at a greater risk for toxicity (those with higher concentrations) or acute rejection (those with lower concentrations). TAC interindividual PK variability depends on many clinical co-variants such as serum levels of albumin, hematocrit and hemoglobin, concomitant use of drugs, post-operative time, as well as genetic factors.^{8–11} TAC presents an extensive hepatic metabolism by cytochrome P450, and its bioavailability is also influenced by the multidrug resistance genotypes (*MDR1* or *ABCB1*),^{12,13} Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *CYP3A5* gene explain 40–50% of TAC dose variability.¹⁴ In particular the rs776746 SNP (c.219-237A > G), also referred to as *CYP3A5**3 allele, is a consistent predictor of TAC-dosing requirements. Homozygous carriers of the G allele of this SNP (*CYP3A5* *3/*3) are referred to *CYP3A5* nonexpressors in contrast to *CYP3A5**1 carriers (known as *CYP3A5* expressors) who show normal protein function and therefore lower trough concentrations related to higher metabolic rates.^{10,15–22} The *CYP3A5**3 allele causes an abnormal spliced messenger RNA that

results in protein truncation, a decrease of functional *CYP3A5* enzyme and reduced TAC-dosing requirements.^{23–25}

ABCB1 is thought to be responsible for the low oral bioavailability of TAC and is also involved in the distribution of TAC throughout the body and its excretion.^{14,26,27} However, associations between *ABCB1* genotype and TAC PKs remain unclear. Some authors describe that there is no association between *ABCB1* variations and TAC trough concentrations.^{28–30} However other groups found significant differences between patients with different *ABCB1* genotypes.^{27,31} Up to now, the most studied polymorphism affecting P-glycoprotein expression in human tissue is the silent mutation at position in exon 26 of the gene (c.3435 T > C rs1045642 SNP).³² The CC genotype has been related to a higher expression of P-glycoprotein in the small intestine compared with the TT genotype.³³ Polymorphisms in the P450 oxidoreductase (*POR*) have been recently demonstrated to modulate the activity of P450 enzymes such as *CYP1A2*, *CYP2C19* and *CYP3A*.^{34,35} *POR* seems to be essential for CYP-mediated drug oxidation through electron donation. *POR* is highly polymorphic and more than 100 SNPs have been identified and linked to differential CYP activities. The rs1057868 (c.1508 C > T, *POR**28) is the most common variant of the gene, and has been associated to a reduced protein activity *in vitro*.³⁵ Homozygous *POR**28 carriers (TT-expressors) require higher doses of TAC to maintain similar exposure to the drug when compared with wild-type patients (*POR**1/*1).³⁶ An association between *POR* rs2868177 and *CYP* activity has also been described as it is strongly related to warfarin maintenance dose variations.³⁷

Our main objective was to identify and report the influence of *CYP3A5*, *ABCB1* and two different *POR* polymorphisms on the PKs

¹Department of Clinical Pharmacology, La Paz University Hospital, School of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, IdiPAZ, Madrid, Spain; ²Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), La Paz University Hospital, Universidad Autónoma de Madrid, IdiPAZ, Madrid, Spain and ³Department of Pediatric Nephrology, La Paz University Hospital, IdiPAZ, Madrid, Spain. Correspondence: Dr AJ Carcas-Sansuán, Department of Clinical Pharmacology, La Paz University Hospital, School of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, IdiPAZ, Madrid 28029 Spain.

E-mail: antonio.carcas@salud.madrid.org

Received 12 September 2016; accepted 8 December 2016

2
of TAC in order to describe a simple method for TAC AUC, C_{max} and C_{min} prediction in our study population.

MATERIALS AND METHODS

This study was nested in a previous Prograf to Advagraf conversion clinical trial in pediatric patients (EudraCT: 2009-017600-89).³⁸

Twenty-one pediatric patients who underwent kidney transplantation and with stable TAC-based immunosuppressive treatment were included in this study (Table 1). All patients were transplanted at La Paz University Hospital in Madrid, which is a reference hospital for pediatric kidney transplantation. Written informed consent was obtained from all subjects or from their legal tutors. All of them continued with its regular TAC doses and were converted from Prograf to Advagraf following a 1:1 (mg: mg) daily dose relation. Twenty-four hours PK profiles at steady state were obtained for Prograf and Advagraf after 7 days administration. For the first 7 days patients received Prograf and then switched to the same dose of Advagraf.

All patients included in the study had stable renal function, followed stable TAC doses over the past 30 days and none of them had changes in co-medications that could modify TAC PKs.

Gender (male/female %)	57/43			
<i>Race</i>				
Caucasian (n)	17			
Hispanic (n)	1			
Asian (n)	2			
Arabian (n)	1			
Age (years ± s.d.)	12.29 ± 4.17			
Weight (kg ± s.d.)	42.85 ± 15.42			
Height (cm ± s.d.)	143.4 ± 18.16			
BMI (kg m ⁻² ± s.d.)	19.87 ± 3.28			
BSA (m ² ± s.d.)	1.30 ± 0.33			
Total Advagraf dose (mg ± s.d.)	4.8 ± 1.70			
Time since transplant until conversion (years ± s.d.)	5.390 ± 3.25			
Creatinine (mg dl ⁻¹ ± s.d.)	0.90 ± 0.29			
Albumin (g dl ⁻¹ ± s.d.)	3.83 ± 0.23			
Hemoglobin (g dl ⁻¹ ± s.d.)	12.23 ± 1.23			
Cystatin C (mg l ⁻¹ ± s.d.)	1.23 ± 0.27			
Bilirubin (mg dl ⁻¹ ± s.d.)	0.39 ± 0.12			
Hematocrit (% ± s.d.)	37.57 ± 3.54			
eGFR (ml min ⁻¹ ± s.d.)	76.57 ± 23.01			
Genetic information				
<i>Variant</i>	<i>Genotype</i>	<i>No.</i>	<i>Study frequency</i>	<i>Population frequency (1000G)</i>
<i>CYP3A5</i> rs776746 ^a	TT (*1/*1)	1	5%	22,7%
	CT (*1/*3)	3	14%	30,4%
	CC (*3/*3)	17	81%	47%
<i>ABCB1</i> rs1045642 ^a	GG	7	33%	39,6%
	AG	9	43%	41,7%
<i>POR*28</i> rs1057868	AA	5	24%	18,7%
	CC (*1/*1)	11	52%	51,1%
	CT (*1/*28)	9	43%	40,5%
<i>POR</i> rs2868177	TT (*28/*28)	1	5%	8,3%
	AA	4	14%	35,8%
	AG	12	57%	48,4%
	GG	5	24%	15,8%

Abbreviations: 1000G, 1000 Genomes Database; BMI, body mass index; BSA, body surface area; eGFR, estimated glomerular filtration rate. ^a*CYP3A5* and *ABCB1* genes are located in the reverse strand and therefore variants are reported in reverse orientation of the genome.

Drug concentration measurement and AUC estimation

Advagraf blood samples were gathered before the beginning of the treatment and at 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12, 15 and 24 h after intake. Whole-blood concentrations were analyzed by enzyme immunoassay method made on the DIMENSION RXL platform (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany). The lower and upper limits of quantification were 2 and 30 ng ml⁻¹, respectively. The PK data analysis was performed following a non-compartmental model using WinNonlin Pro 2.0 software (Pharsight Corporation, Cary, NC, USA). AUC₀₋₂₄ was calculated by the trapezoidal rule.

Genotyping assays

Blood samples were collected from each patient and DNA was extracted using a commercial extraction kit QuickGene DNA Whole Blood Kit S on a QuickGene-810 semiautomatic extractor (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan). All subjects were genotyped for *CYP3A5**3 c.219-237A>G (rs776746), *ABCB1* c.3435C>T (rs1045642) and two SNPs: c.1508C>T (*POR**28, rs1057868) and c.188+6405A>G (rs2868177) in the *POR* gene using commercial RT-PCR Taqman assays following the manufacturer recommendations (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with IBM SPSS Statistics 19.0 (SPSS: an IBM company, IBM Corporation, Armonk, NY, USA). The differences between genotype groups for each genetic variant were assessed by the nonparametric Jonckheere–Terpstra trend test. The results were considered significant when *P*-values were lower than 0.05. No adjustments for multiple comparisons were performed.

Multivariate linear regression was used to assess the impact of clinical, demographic, concomitant medication and genetic covariates on subject variability of dose- and body weight-adjusted Advagraf PK parameters AUC, C_{max} and C_{min} .

Genetic score

Aiming to increase the sensibility to detect the influence of genetic on PK disposition factors in our population a genetic score was built. In order to evaluate the impact of *CYP3A5* SNPs on TAC PK parameters the study sample was divided in two groups: *CYP3A5* expressers (*1/*1 or *1/*3) and *CYP3A5* nonexpressers (*3/*3). Due to the reduced sample size and the physiological plausibility, the contribution of the genetic variants in *ABCB1* and *POR* on TAC PKs was only evaluated in *CYP3A5* nonexpressors. An additive genetic score was built using the analysed genetic variants in *ABCB1* (rs1045642) and *POR* (rs1057868 and rs2868177) genes. Three genetic groups were delimited to build the score: one with no variant alleles, another with one or two and a third group with three variant alleles. The differences between *CYP3A5* expressors and nonexpressors, as well as between the three genetic score groups were assessed by the nonparametric Jonckheere–Terpstra trend test.

Model building

Two different linear regression models were built. One model including all subjects and a second model for *CYP3A5* nonexpressors. Genetic and nongenetic (race, body weight, body height, age, sex, body mass index, body surface area (BSA), hemoglobin, hematocrit, albumin and concomitant treatments) covariates were tested in a step-wise manner. Covariates removal was also performed in a step by step way. To evaluate the bias and precision of our model we calculated dose-/weight-adjusted AUC_{0-24h} and dose-/weight-adjusted C_{min} (predicted values) in our patients and we compared them with the real ones, determining mean error, mean absolute error and mean absolute error as a percentage of the real value.

All models were built using dose/weight AUC_{0-24h}, C_{max} and C_{min} with logarithmic transformation in order to assure a normal distribution of dependant variables.

Same procedures were followed for Prograf before the conversion to Advagraf.

RESULTS

Study population characteristics

Twenty-one stable kidney-transplanted children aged between 4 and 17 years were included in the study. Most of them were

Table 2. Comparison of the main pharmacokinetic parameters adjusted by dose and weight according to the different genotypes analysed

Pharmacokinetic parameter	Variant	Genotype	Mean \pm s.d.	P-value
AUC ₀₋₂₄	CYP3A5 (rs776746) ^a	TT	879.6	0.009
		CT	1232.24 \pm 578.64	
		CC	2507.88 \pm 967.676	
	ABCB1 (rs1045642) ^a	GG	1967.69 \pm 2301.42	0.255
		AG	2301.42 \pm 1253.14	
		AA	2544.74 \pm 950.02	
	POR*28 (rs1057868)	CC	1884.88 \pm 808.24	0.178
		CT	2812.42 \pm 1103.67	
		TT	1164.86	
	POR (rs2868177)	AA	1886.27 \pm 985.47	0.946
AG		2456.11 \pm 1198.81		
GG		2038.38 \pm 667.65		
C _{max}	CYP3A5 (rs776746) ^a	TT	71.28	0.036
		CT	112.16 \pm 34.92	
		CC	175.59 \pm 71.96	
	ABCB1 (rs1045642) ^a	GG	144.47 \pm 48.40	0.922
		AG	182.65 \pm 94.00	
		AA	147.51 \pm 55.49	
	POR*28 (rs1057868)	CC	141.59 \pm 59.24	0.512
		CT	194.54 \pm 78.17	
		TT	84.37	
	POR (rs2868177)	AA	123.04 \pm 54.54	0.413
AG		178.25 \pm 82.09		
GG		152.32 \pm 53.27		
C _{min}	CYP3A5 (rs776746) ^a	TT	33.17	0.004
		CT	29.96 \pm 11.70	
		CC	95.38 \pm 33.79	
	ABCB1 (rs1045642) ^a	GG	60.87 \pm 24.28	0.055
		AG	87.14 \pm 46.99	
		AA	106.85 \pm 33.31	
	POR*28	CC	71.06 \pm 34.40	0.388
		CT	99.19 \pm 44.93	
		TT	70.15	
	POR (rs2868177)	AA	70.74 \pm 21.61	0.682
AG		87.42 \pm 48.30		
GG		82.53 \pm 32.27		

^aCYP3A5 and ABCB1 genes are located in the reverse strand and therefore variants are reported in reverse orientation of the genome.

Caucasian males. Study population characteristics are shown in Table 1. Allelic frequencies for CYP3A5, ABCB1 and POR SNPs in our study population are also shown in Table 1. All genetic variants are in Hardy–Weinberg equilibrium.

Pharmacokinetic and pharmacogenetic results

For this analysis we selected AUC_{0-24hr}, C_{max} and C_{min} as the main PK parameters adjusted by daily dose administered and body weight.

As shown in Table 2 and Figure 1 the univariate analysis found significant differences in AUC_{0-24hr}, C_{max} and C_{min} between different genotypes of CYP3A5 (CYP3A5*3/*3, rs776746). CYP3A5 nonexpressors (CYP3A5*3/*3, n=17) presented a C_{max}, AUC_{0-24hr} and C_{min} 72, 119 and 210% higher than expressors (CYP3A5*1/*1 or *1/*3). No other significant differences were observed.

In order to evaluate the contribution of the genetic variants in ABCB1 and POR genes we selected the 17 CYP3A5 nonexpressors

(CYP3A5*3/*3) and built a three-group additive genetic score. The genetic score groups includes subjects with 0 (group 1, reference), 1 or 2 (group 2) SNPs in POR, and 3 (group 3) variants in ABCB1 and POR genes. Mean values for TAC PK parameters for these three groups are shown in Table 3. Group 2 (carriers of 1 or 2 POR genes variant alleles) have a C_{max}, AUC_{0-24hr} and C_{min} 43, 27 and 11% higher than subjects in group 1, respectively (Table 3 and Figure 2). The C_{max}, AUC_{0-24hr} and C_{min} observed in group 3 are 94, 82 and 68% higher than subjects without variant alleles (group 1), respectively (Table 3). Comparing the AUC_{0-24hr}, C_{max} and C_{min} values of each group we can find significant differences between them (P=0.018, P=0.037 and P=0.018, respectively) (Table 4).

Explanative models

A multivariate linear regression was used to evaluate the contribution of genetic and nongenetic factors to daily dose and body weight-adjusted C_{max}, AUC_{0-24hr} and C_{min} variability. In

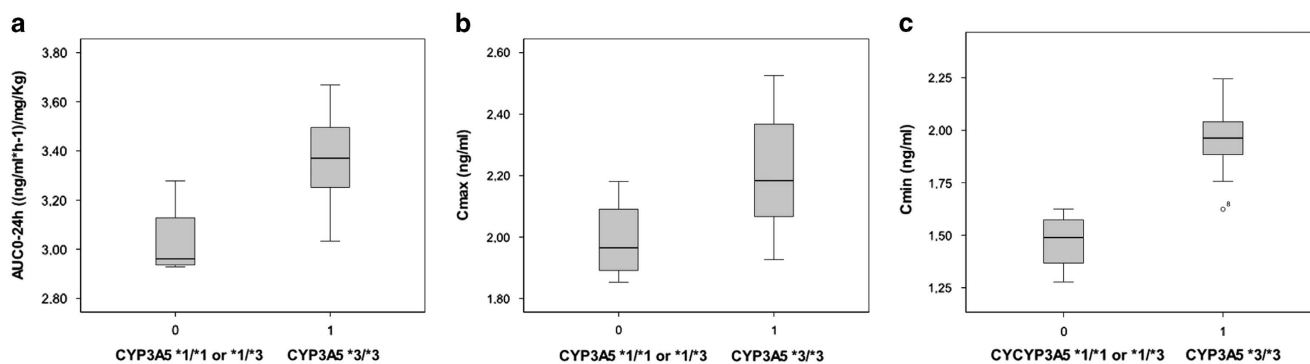


Figure 1. Pharmacokinetic parameters in *CYP3A5* (*CYP3A5**1*1 or *1/*3 and *CYP3A5**3/*3) genotypes ($n=21$). (a) Dose-/weight-adjusted AUC_{0-24h} . (b) Dose-/weight-adjusted C_{max} . (c) Dose-/weight-adjusted C_{min} .

Table 3. Pharmacokinetic parameters in *CYP3A5* expressors and nonexpressors, and by genetic score in *CYP3A5* nonexpressors

	Variants	<i>CYP3A5</i> *1/*1 or *1/*3 $n=4$	<i>CYP3A5</i> *3/*3 $n=17$	Genetic score of the <i>CYP3A5</i> nonexpressors		
				0 $n=2$	1-2 $n=10$	3 $n=5$
$AUC_{0-24}/\text{dose}/\text{weight}$	Mean \pm s.d.	1144.09 \pm 504.28	2507.86 \pm 967.68	1805.65 \pm 530.37	2308.53 \pm 824.63	3295.26 \pm 915.10
$C_{max}/\text{dose}/\text{weight}$	Mean \pm s.d.	101.94 \pm 35.08	175.58 \pm 71.96	115.63 \pm 23.80	165.72 \pm 61.00	224.76 \pm 79.75
$C_{min}/\text{dose}/\text{weight}$	Mean \pm s.d.	30.76 \pm 9.69	95.38 \pm 33.79	76.01 \pm 29.40	84.48 \pm 19.97	128.11 \pm 36.36

Genetic score: 0, any variant allele in *ABCB1* or *POR*; 1-2, one or two genes with at least one variant allele in *ABCB1* or *POR*; 3, all three genes with at least one variant.

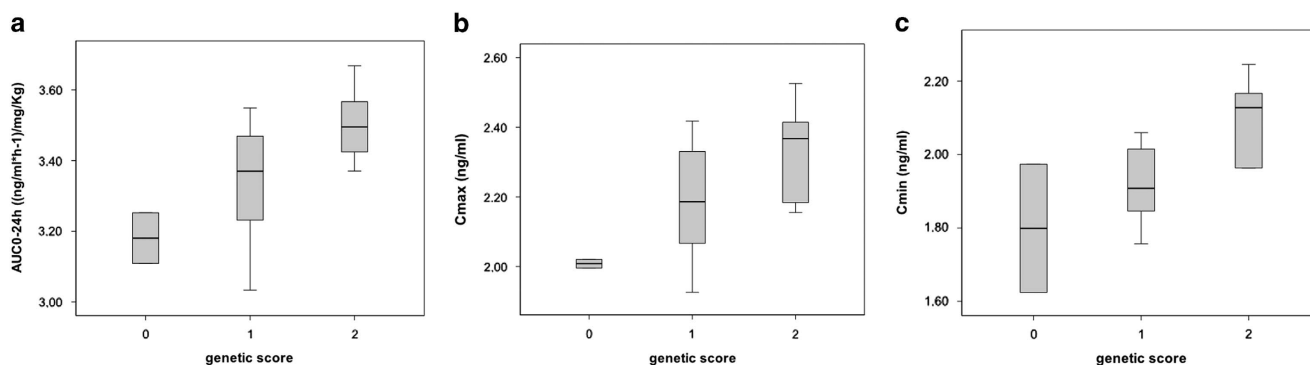


Figure 2. Pharmacokinetic parameters by genetic score ($n=17$). (a) Dose-/weight-adjusted AUC_{0-24h} . (b) Dose-/weight-adjusted C_{max} . (c) Dose-/weight-adjusted C_{min} .

Table 4. Jonckheere–Terpstra trend test performed for the 17 patients, *CYP3A5* nonexpressors for all the remaining three genetic variants and for the built score

Variant	Pharmacokinetic parameter	Jonckheere–Terpstra trend test (p)
<i>ABCB1</i> (rs1045642)	AUC_{0-24h}	0.507
	C_{max}	0.965
	C_{min}	0.102
<i>POR</i> *28 (rs1057868)	AUC_{0-24h}	0.262
	C_{max}	0.575
<i>POR</i> (rs2868177)	C_{min}	0.852
	AUC_{0-24h}	0.715
	C_{max}	0.235
Genetic score	C_{min}	0.273
	AUC_{0-24h}	0.018
	C_{max}	0.037
	C_{min}	0.018

the model including the whole-study population ($n=21$) the three retained covariates were: *CYP3A5* rs776746 SNP and Deflazacort and methylprednisolone co-medications. *CYP3A5* nonexpressors (*CYP3A5**3/*3) showed increased TAC PK parameters and *CYP3A5* genotype explained 39.6, 20.6 and 59.5% of AUC_{0-24h} , C_{max} and C_{min} variability, respectively (Table 5). Deflazacort and methylprednisolone co-medications were related to decreased TAC PK parameters. Deflazacort explained 20.9 and 19.5% of AUC_{0-24h} and C_{max} variability, respectively, and methylprednisolone explained 14.3% of the AUC_{0-24h} variability (Table 5).

A second model was built for the subgroup of *CYP3A5* nonexpressors (*CYP3A5* *3/*3, $n=17$) in order to assess the effect of the genetic variants in *ABCB1* and *POR* genes through a genetic score. Genetic variants explained 13.7% of total AUC_{0-24h} variability. On the other hand, Deflazacort and methylprednisolone co-medications explained 32 and 11.1% of total AUC_{0-24h} variability. The genetic score was the only significant covariate in case of C_{min} explaining 26.5% of its variability. None of the genetic and nongenetic covariates included in this study were found to explain a significant part of C_{max} variability.

Table 5. Developed models with respective MAE%

Model	Non-standardized coefficients	Standardized coefficients	P-value	Explained variability (%)	MAE% mean (IQR)
	<i>B</i> ± s.e.	Beta			
<i>All participants (n = 21)</i>					
<i>AUC₀₋₂₄ r_c² = 0.571</i>					
(Constant)	3.179 ± 0.083		0.000		25.78 (7.13–34.88)
CYP3A5	0.371 ± 0.089	0.519	0.001	39.6%	
Methylprednisolone	−0.212 ± 0.080	−0.436	0.017	14.3%	
Deflazacort	−0.376 ± 0.121	−0.513	0.006	20.9%	
<i>C_{max} r_c² = 0.365</i>					
(Constant)	2.115 ± 0.088		0.000		25.63 (9.43–40.57)
CYP3A5	0.246 ± 0.094	0.519	0.018	20.6%	
Methylprednisolone	−0.172 ± 0.085	−0.436	0.059	–	
Deflazacort	−0.325 ± 0.127	−0.513	0.021	19.5%	
<i>C_{min} r_c² = 0.604</i>					
(Constant)	1.527 ± 0.090		0.000		27.66 (6.91–40.22)
CYP3A5	0.504 ± 0.095	0.827	0.000	59.6%	
Methylprednisolone	−0.093 ± 0.086	−0.184	0.295	–	
Deflazacort	−0.143 ± 0.130	−0.175	0.285	–	
<i>CYP3A5 nonexpressors (n = 17)</i>					
<i>AUC₀₋₂₄ r_c² = 0.573</i>					
(Constant)	3.390 ± 0.090		0.000		18.07 (7.34–26.91)
Genetic score	0.117 ± 0.050	0.413	0.035	13.7%	
Methylprednisolone	−0.174 ± 0.081	−0.424	0.050	11.1%	
Deflazacort	−0.474 ± 0.140	−0.639	0.005	32.0%	
<i>C_{max} r_c² = 0.367</i>					
(Constant)	2.209 ± 0.129		0.000		22.36 (5.96–32.53)
Genetic score	0.115 ± 0.060	0.410	0.078	–	
Methylprednisolone	−0.148 ± 0.098	−0.363	0.153	–	
Deflazacort	−0.352 ± 0.169	−0.478	0.058	–	
<i>C_{min} r_c² = 0.403</i>					
(Constant)	1.860 ± 0.109		0.000		21.11 (6.90–28.98)
Genetic score	0.136 ± 0.050	0.558	0.019	26.5%	
Methylprednisolone	−0.067 ± 0.082	−0.189	0.429	–	
Deflazacort	−0.239 ± 0.142	−0.375	0.116	–	

Abbreviations: AUC, area under the curve; IQR, interquartile range; MAE, mean predicted absolute error.

Model evaluation

Using the developed models for daily dose and body weight-adjusted C_{max} , AUC_{0-24h} and C_{min} the mean predicted absolute error for each model was calculated. The mean predicted absolute error expressed as percentage for C_{max} , AUC_{0-24h} and C_{min} is shown in Table 5. Similar results were found for the Prograf formulation and are presented in Supplementary Material.

DISCUSSION

Optimization of therapeutic strategies through individual genetic information can maximize therapeutic efficacy and reduce adverse drug reactions,^{39,40} thus contributing to the development of personalized medicine.

TAC shows a large interindividual variation in oral bioavailability ranging from 4 to 89%.⁷ A significant amount of this variability is explained by genetic variants affecting the drug metabolizing enzymes CYP3A4/5, genes regulating their activity as well as those genetic variants in cellular transporters as *ABCB1*.^{10,11,13,23,41}

The aim of this project was to explore the impact of genetic and clinical factors in the exposure to TAC in kidney-transplanted children. As far as we know this is the first study assessing the joint influence of *CYP3A5* (*rs776746*), *POR* (*rs1057868* *POR*28* and

rs2868177) and *ABCB1* (*rs1045642*) in the disposition of TAC after the administration of both Prograf and Advagraf. Advagraf results are reported in the main body of the article. Information about the Prograf study is reported in the Supplementary Material.

In a first univariate analysis with all 21 patients (Table 2) we found that the only genetic variant significantly related to TAC disposition is the *rs776746* SNP (*CYP3A5*3* allele) affecting all three PK parameters analysed (dose weight-adjusted AUC_{0-24h} , C_{max} and C_{min}) and showing a clear gene–dose response. This confirms the major impact of this polymorphism in the disposition of TAC. This fact has been well described in the literature.^{10,11,13,15–17,19,20}

We therefore performed a multivariate analysis including all the patients ($n = 21$) and found that *CYP3A5*3* genotype explains 40, 21 and 60% of variability in daily dose and body weight-adjusted AUC_{0-24h} , C_{max} and C_{min} , respectively, in stable renal transplant children receiving one-daily TAC formulation (Advagraf) (Table 5). Similar results were found for Prograf (see Supplementary Table 1S to Supplementary Table 3S presented in Supplementary Material). These findings are in agreement with previous published results by de Jonge *et al.*⁴² in adult stable Prograf-treated renal allograft recipients, where *CYP3A5*3* (*rs776746*) explains more than 29% of the TAC dose requirements. The well-known *CYP3A* activity

inducers Deflazacort and methylprednisolone were the only nongenetic covariates retained in the model. Deflazacort and methylprednisolone explain 21 and 14% of variability in adjusted AUC_{0-24hr} , respectively (Table 5). Only Deflazacort was retained in the case of C_{max} , explaining 20% of its variability. C_{min} variability was not influenced by these co-medications. No other clinical, biochemical or demographic variables explain a significant part of TAC exposure variability. Some authors have described that hematocrit could explain up to 14 and 11% of TAC clearance and dose-adjusted AUC_{0-12hr} , respectively.⁴² The discrepancy found in our study may be due to the reduced sample size and low variability in the hematocrit values among our patients (CV % = 9.4%).

Recently *CYP3A4*22* has been described as a determinant genetic factor influencing TAC total exposure, as this variant increases the formation of the non-functional *CYP3A4* splice variant.^{3,14,42,43} We did not evaluate these variants as we considered that its low frequency (minor allele frequency = 0.025) made it very unlikely to be found in our cohort due to the number of patients included (we would require at least twice the patients to find more than 1 carrier). We therefore assumed that all patients were wildtype for *CYP3A4* (*CYP3A4*1/*1*) for the interpretation and evaluation of our results.

The influence of *ABCB1* polymorphisms on TAC PKs has been extensively investigated; however the results are still controversial.^{27,30} Rong et al.⁴⁴ describe that *ABCB1* variants have no effect on TAC exposure, whereas some others found that patients homozygous for allele C (rs1045642) would require higher daily doses of TAC to obtain levels into the therapeutic range when compared with the T allele carriers.²⁶ In our determinations we haven't found any significant difference between the different *ABCB1* (rs1045642) genotypes (Table 2).

POR is a membrane-bound coenzyme that functions as an electron donor for the CYP enzymes, therefore genetic variability in this gene may be related to *CYP3A* enzymatic activity variations. De Jongue et al.³⁶ and Gijsen et al.⁴⁵ found that *POR*28* T allele carriers had significantly higher TAC dose requirements in *CYP3A5* expressors (*CYP3A5*1* carriers) but not in *CYP3A5* nonexpressors (*CYP3A5*3/*3*). However, Elens et al.⁴¹ found that *POR*28* homozygosity (CC) was related to a significant higher *CYP3A4* activity in *CYP3A5* nonexpressors for TAC metabolism. We found no significant differences in dose weight-adjusted AUC_{0-24} , C_{max} or C_{min} in patients with different *POR*28* genotypes ($P=0.178$, $P=0.512$ and $P=0.388$, respectively) but like Elens et al.⁴¹ we did find an increasing trend in these parameters in *POR*28* carriers (Table 2). Recently, an intronic polymorphism (rs2868177) in *POR* gene was related to higher warfarin maintenance dose needs (mutated patients require lower doses)³⁷ but in a univariate analysis we found no significant relation between the TAC PK parameters and the different *POR* rs2868177 genotypes (Table 2).

Figure 1 shows there is a great variability in the TAC PK parameters dose-adjusted AUC_{0-24} and C_{max} mainly in *CYP3A5* nonexpressors (*CYP3A5*3/*3*). In addition, due to the majority of *CYP3A5* nonexpressors in Caucasian population we decided to study this variability only in this group of patients ($n=17$).

To increase the sensibility of our statistical analysis we developed an additive genetic score using the analysed genetic variants in *ABCB1* (rs1045642) and *POR* (rs1057868 and rs2868177) and we found significant differences in TAC PK parameters between different *ABCB1* and *POR* genotypes (Table 4 and Figure 2).

By applying the built genetic score in a multivariate analysis we found that this variable explains 14 and 27% of the daily dose and body weight-adjusted AUC_{0-24hr} and C_{min} , variability, respectively (Table 5). The concomitant administration of Deflazacort and methylprednisolone explained 32 and 11% of daily dose and body weight-adjusted AUC_{0-24hr} variability (Table 5).

To our knowledge, this is the first multivariate model developed, for pediatric population with kidney transplant, for daily dose and body weight-adjusted TAC PK parameters. The mean absolute error of all models is lower than 28% indicating that if these results are replicated in another independent pediatric population the models could be used in clinics to improve TAC exposure prediction.

Similar results have been found for the Prograf formulation (Supplementary Material). This study confirmed that *CYP3A5* genetic variants have a major effect in TAC-dosing requirements, with *CYP3A5* genotype explaining ~21% of C_{max} and 60% of C_{min} variability. Nonetheless, our results show that some previously reported SNPs in *ABCB1* (rs1045642) and *POR* (rs1057868 and rs2868177) may explain residual variability in response to TAC in *CYP3A5* nonexpressors and shouldn't be underestimated when evaluating TAC exposure.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- 1 Scott LJ, McKeage K, Keam SJ, Plosker GL. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. *Drugs* 2003; **63**: 1247–1297.
- 2 First MR. Tacrolimus based immunosuppression. *J Nephrol* 2004; **17** (Suppl 8): S25–S31.
- 3 Kershner RP, Fitzsimmons WE. Relationship of FK506 whole blood concentrations and efficacy and toxicity after liver and kidney transplantation. *Transplantation* 1996; **62**: 920–926.
- 4 Laskow DA, Vincenti F, Neylan JF, Mendez R, Matas AJ. An open-label, concentration-ranging trial of FK506 in primary kidney transplantation: a report of the United States Multicenter FK506 Kidney Transplant Group. *Transplantation* 1996; **62**: 900–905.
- 5 Felipe CR, Silva HT, Machado PG, Garcia R, da Silva Moreira SR, Pestana JO. The impact of ethnic miscegenation on tacrolimus clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring. *Clin Transplant* 2002; **16**: 262–272.
- 6 Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; **56**: 23–46.
- 7 Venkataraman R, Swaminathan A, Prasad T, Jain A, Zuckerman S, Warty V et al. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet* 1995; **29**: 404–430.
- 8 Undre NA, van Hooff J, Christiaans M, Vanrenterghem Y, Donck J, Heeman U et al. Low systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection. *Transplant Proc* 1999; **31**: 296–298.
- 9 Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P, Maes B, Coosemans W, Pirenne J et al. Time-related clinical determinants of long-term tacrolimus pharmacokinetics in combination therapy with mycophenolic acid and corticosteroids: a prospective study in one hundred *de novo* renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2004; **43**: 741–762.
- 10 Mourad M, Mourad G, Wallemacq P, Garrigue V, Van Bellingen C, Van Kerckhove V et al. Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose requirements after kidney transplantation in relation to *CYP3A5* and *MDR1* polymorphisms and steroids. *Transplantation* 2005; **80**: 977–984.
- 11 Mourad M, Wallemacq P, De Meyer M, Brandt D, Van Kerckhove V, Malaise J et al. The influence of genetic polymorphisms of cytochrome P450 3A5 and *ABCB1* on starting dose- and weight-standardized tacrolimus trough concentrations after kidney transplantation in relation to renal function. *Clin Chem Lab Med* 2006; **44**: 1192–1198.
- 12 Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, Becquemont L, Schlageter MH, Cassinat B et al. Association of the multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2003; **14**: 1889–1896.
- 13 Roy JN, Barama A, Poirier C, Vinet B, Roger M. *Cyp3A4*, *Cyp3A5*, and *MDR-1* genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics* 2006; **16**: 659–665.
- 14 Tang JT, Andrews LM, van Gelder T, Shi YY, van Schaik RH, Wang LL et al. Pharmacogenetic aspects of the use of tacrolimus in renal transplantation: recent developments and ethnic considerations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2016; **12**: 555–565.
- 15 Thervet E, Anglicheau D, King B, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P et al. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and

- concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation* 2003; **76**: 1233–1235.
- 16 Zheng H, Webber S, Zeevi A, Schuetz E, Zhang J, Bowman P et al. Tacrolimus dosing in pediatric heart transplant patients is related to CYP3A5 and MDR1 gene polymorphisms. *Am J Transplant* 2003; **3**: 477–483.
- 17 Goto M, Masuda S, Kiuchi T, Ogura Y, Oike F, Okuda M et al. CYP3A5*1-carrying graft liver reduces the concentration/oral dose ratio of tacrolimus in recipients of living-donor liver transplantation. *Pharmacogenetics* 2004; **14**: 471–478.
- 18 MacPhee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A et al. The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2004; **4**: 914–919.
- 19 Tsuchiya N, Satoh S, Tada H, Li Z, Ohyama C, Sato K et al. Influence of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in renal transplant recipients. *Transplantation* 2004; **78**: 1182–1187.
- 20 Zheng H, Zeevi A, Schuetz E, Lamba J, McCurry K, Griffith BP et al. Tacrolimus dosing in adult lung transplant patients is related to cytochrome P4503A5 gene polymorphism. *J Clin Pharmacol* 2004; **44**: 135–140.
- 21 MacPhee IA, Fredericks S, Mohamed M, Moreton M, Carter ND, Johnston A et al. Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. *Transplantation* 2005; **79**: 499–502.
- 22 Numakura K, Satoh S, Tsuchiya N, Horikawa Y, Inoue T, Kakinuma H et al. Clinical and genetic risk factors for posttransplant diabetes mellitus in adult renal transplant recipients treated with tacrolimus. *Transplantation* 2005; **80**: 1419–1424.
- 23 Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; **27**: 383–391.
- 24 Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; **54**: 1271–1294.
- 25 Op den Buijsch RA, Christiaans MH, Stolk LM, de Vries JE, Cheung CY, Undre NA et al. Tacrolimus pharmacokinetics and pharmacogenetics: influence of adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1) and cytochrome (CYP) 3A polymorphisms. *Fundam Clin Pharmacol* 2007; **21**: 427–435.
- 26 Ayrton A, Morgan P. Role of transport proteins in drug absorption, distribution and excretion. *Xenobiotica* 2001; **31**: 469–497.
- 27 Yu X, Xie H, Wei B, Zhang M, Wang W, Wu J et al. Association of MDR1 gene SNPs and haplotypes with the tacrolimus dose requirements in Han Chinese liver transplant recipients. *PLoS One* 2011; **6**: e25933.
- 28 Santoro A, Felipe CR, Tedesco-Silva H, Medina-Pestana JO, Struchiner CJ, Ojopi EB et al. Pharmacogenetics of calcineurin inhibitors in Brazilian renal transplant patients. *Pharmacogenomics* 2011; **12**: 1293–1303.
- 29 Shi XJ, Geng F, Jiao Z, Cui XY, Qiu XY, Zhong MK. Association of ABCB1, CYP3A4*18B and CYP3A5*3 genotypes with the pharmacokinetics of tacrolimus in healthy Chinese subjects: a population pharmacokinetic analysis. *J Clin Pharm Ther* 2011; **36**: 614–624.
- 30 Kim IW, Noh H, Ji E, Han N, Hong SH, Ha J et al. Identification of factors affecting tacrolimus level and 5-year clinical outcome in kidney transplant patients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2012; **111**: 217–223.
- 31 Hawwa AF, McKiernan PJ, Shields M, Millership JS, Collier PS, McElnay JC. Influence of ABCB1 polymorphisms and haplotypes on tacrolimus nephrotoxicity and dosage requirements in children with liver transplant. *Br J Clin Pharmacol* 2009; **68**: 413–421.
- 32 Lopez-Montenegro Soria MA, Kanter Berga J, Beltran Catalan S, Milara Paya J, Pallardo Mateu LM, Jimenez Torres NV. Genetic polymorphisms and individualized tacrolimus dosing. *Transplant Proc* 2010; **42**: 3031–3033.
- 33 Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 3473–3478.
- 34 Murakami M. Rupture of renal arterial aneurysm in a pregnant patient. *Masui* 1993; **42**: 1367–1370.
- 35 Agrawal V, Huang N, Miller WL. Pharmacogenetics of P450 oxidoreductase: effect of sequence variants on activities of CYP1A2 and CYP2C19. *Pharmacogenet Genomics* 2008; **18**: 569–576.
- 36 de Jonge H, Metalidis C, Naesens M, Lambrechts D, Kuypers DR. The P450 oxidoreductase *28 SNP is associated with low initial tacrolimus exposure and increased dose requirements in CYP3A5-expressing renal recipients. *Pharmacogenomics* 2011; **12**: 1281–1291.
- 37 Zhang X, Li L, Ding X, Kaminsky LS. Identification of cytochrome P450 oxidoreductase gene variants that are significantly associated with the interindividual variations in warfarin maintenance dose. *Drug Metab Dispos* 2011; **39**: 1433–1439.
- 38 Carcas-Sansuan AJ, Espinosa-Roman L, Almeida-Paulo GN, Alonso-Melgar A, Garcia-Meseguer C, Fernandez-Cambor C et al. Conversion from Prograf to Advagraf in stable paediatric renal transplant patients and 1-year follow-up. *Pediatr Nephrol* 2014; **29**: 117–123.
- 39 Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med* 2006; **57**: 119–137.
- 40 Meyer UA. Pharmacogenetics - five decades of therapeutic lessons from genetic diversity. *Nat Rev Genet* 2004; **5**: 669–676.
- 41 Elens L, Hesselink DA, Bouamar R, Budde K, de Fijter JW, De Meyer M et al. Impact of POR*28 on the pharmacokinetics of tacrolimus and cyclosporine A in renal transplant patients. *Ther Drug Monit* 2014; **36**: 71–79.
- 42 de Jonge H, de Loor H, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. *In vivo* CYP3A4 activity, CYP3A5 genotype, and hematocrit predict tacrolimus dose requirements and clearance in renal transplant patients. *Clin Pharmacol Ther* 2012; **92**: 366–375.
- 43 Elens L, Capron A, van Schaik RH, De Meyer M, De Pauw L, Eddour DC et al. Impact of CYP3A4*22 allele on tacrolimus pharmacokinetics in early period after renal transplantation: toward updated genotype-based dosage guidelines. *Ther Drug Monit* 2013; **35**: 608–616.
- 44 Rong G, Jing L, Deng-Qing L, Hong-Shan Z, Shai-Hong Z, Xin-Min N. Influence of CYP3A5 and MDR1(ABCB1) polymorphisms on the pharmacokinetics of tacrolimus in Chinese renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2010; **42**: 3455–3458.
- 45 Gijsen VM, van Schaik RH, Soldin OP, Soldin SJ, Nulman I, Koren G et al. P450 oxidoreductase *28 (POR*28) and tacrolimus disposition in pediatric kidney transplant recipients—a pilot study. *Ther Drug Monit* 2014; **36**: 152–158.

Supplementary Information accompanies the paper on the The Pharmacogenomics Journal website (<http://www.nature.com/tpj>)

Effect of the *CYP3A5*, *CYP3A4*, *CYP3A7*, *ABCB1*, *POR* and *NR1I2* genes in the pharmacokinetics of tacrolimus in a pediatric cohort with stable serum concentrations after renal transplantation: study protocol.

Irene Dapia^{1,†}, Aleksandra Tabakov^{2,†}, Laura Espinosa Román³, Lucía Díaz⁴, Pedro Arias Lajara¹, Marta Melgosa³, Angel Melgar³, Carlota Fernández³, Alicia Herranz Estellés⁵, Pablo Lapunzina¹, Alberto M. Borobia^{4,‡}, Antonio J. Carcas^{4,‡}

¹Medical and Molecular Genetics Institute (INGEMM). La Paz University Hospital. Madrid.

²Clinical Pharmacology Department. Gomez Ulla Hospital. Madrid

³Pediatric Department, La Paz University Hospital, IdiPAZ.

⁴Clinical Pharmacology Department. La Paz University Hospital. School of Medicine. Universidad Autónoma de Madrid. IdiPAZ

⁵Clinical Trial Unit. Clinical Pharmacology Department. IdiPAZ

† Contributed equally to this work

‡ Corresponding authors: Antonio J. Carcas Sansuan, MD, PhD - Alberto M. Borobia, MD, PhD, Clinical Pharmacology Department. La Paz University Hospital of Madrid, Paseo de la Castellana, 261. 28046-Madrid emails: antonio.carcas@uam.es; alberto.borobia@salud.madrid.org

ABSTRACT

BACKGROUND: Therapeutic response to pharmacological therapy in humans shows large inpatient and outpatient variability both in treatment efficacy and adverse drug reactions (ADR). Part of this variability can be explained by genetic polymorphisms in genes encoding TAC metabolism related proteins. The aim of this study is to evaluate the contribution of genetic variation in the *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7*, *POR*, *NR1I2* and *ABCB1* genes to this variability in order to achieve a better understanding of TAC pharmacokinetics and a more personalized approach for TAC dosing in a cohort of pediatric patients with stable serum concentrations after renal transplantation.

METHODS AND DESIGN: This is a unicenter retrospective cross-sectional study. The protocol was approved by the Clinical Research Ethics Committee of the La Paz University Hospital (Madrid, Spain) and will be carried in this same hospital. 50 pediatric patients with stable serum concentrations after renal transplantation are expected to be included. Peripheral blood samples will be collected for molecular analysis (pharmacogenetics studies) and AUC estimation (C0, C1 and C3 hours after TAC administration).

DISCUSSION: To date there are not dosing algorithms that can explain accurately TAC metabolism. The incorporation of a complete pharmacogenetic (PhGx) profile into these algorithms may help in the individualization and optimization of TAC treatment in pediatric renal transplant patients.

STUDY REGISTRATION: FC/HULP_002/2014

Keywords: Tacrolimus, transplantation, pharmacokinetics, pharmacogenetics, cytochrome P450, metabolism.

Received: December, 22 2016; **Accepted:** January, 10 2017; **Published:** January, 16 2017.

Copyright: © 2017 Authors. 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.

Editor: Hoi Yan Tong

Cite as: Dapia I., Tabakov A., Espinosa Roman L., Díaz L., Arias Lajara P., Melgosa M., Melgar A., Fernandez C., Herranz Estellés A., Lapunzina P., Borobia AM., Carcas AJ., Effect of the *CYP3A5*, *CYP3A4*, *CYP3A7*, *ABCB1*, *POR* and *NR1I2* genes in the pharmacokinetics of tacrolimus in a pediatric cohort with stable serum concentrations after renal transplantation: study protocol. *IBJ Clin Pharmacol* 2017 1(1):e0005.

Funding: The authors have no financial relationships relevant to this article to disclose.

Competing Interests: The authors have no financial relationships relevant to this article to disclose

Background

Therapeutic response to pharmacological therapy in humans shows large intra and interindividual variability both in treatment efficacy and adverse drug reactions (ADR). Part of this variability can be explained by clinical features such as the stage of the disease or concomitant medications as well as patient age, sex, weight, liver and kidney function among others. However, it has been reported that interindividual variability in drug bioavailability and metabolism as well as differences in molecular and cellular drug targets (both controlled by genetic mechanisms) may have an even more important specific weight over therapeutic response to pharmacological treatments⁽¹⁾⁽²⁾

The fast development of molecular techniques and bioinformatics has allowed the identification and characterization of many of the genetic factors explaining the interindividual variability in drug response. The increasing evidence supporting the association of genetic variation to drug efficacy and toxicity heterogeneity has led to the implementation of a Pharmacogenetic (PhGx) approach in the clinical setting which aims to achieve the individualization of therapies by the identification of the most suitable drug and dose for each patient.

Immunosuppressive agents prescribed for renal transplant recipients show a high interindividual pharmacokinetic variability making the individualization of the therapeutic plan necessary to optimize the treatment and avoid graft loss and toxicity. Therapeutic Drug Monitoring (TDM) is mandatory in those drugs showing a narrow therapeutic range such as the calcineurin inhibitor (CNI) tacrolimus (FK506, TAC)⁽³⁾. Specifically, in pediatric population interindividual variability in TAC metabolism is significantly affected by the gradual maturation of enzyme systems. These differences in metabolic capacity as well as other physiological differences between children and adults lead to higher dose requirements (mg/kg) in children for achieving similar plasma concentrations⁽⁴⁾.

TAC is a substrate of the drug-efflux pump ABCB1 or P-glycoprotein (encoded by the *ABCB1* gene), which is expressed at high concentrations in the small intestine and thought to be related to TAC heterogeneous bioavailability. Following absorption, TAC is metabolized to up to 15 active and inactive metabolites in the liver, intestine and to a limited degree in the kidney by CYP3A isozymes (predominantly CYP3A5 with CYP3A4 contribution). Interindividual differences in CYP3A activity are the most important determinants of the variability in TAC clearance. However, genetic polymorphisms in other enzymes responsible of the regulation and activation of these drug-metabolizing enzymes such as the P450 oxidoreductase (POR) or the

Nuclear Receptor Subfamily 1 Group I Member 2 (NR1I2) may explain residual variability in the response to TAC⁽⁵⁾.

The human CYP3A subfamily (CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 and CYP43) plays a dominant role in the metabolic elimination of drugs, other xenobiotic compounds and endogenous molecules from the body. These enzymes are encoded by the *CYP3A4*, *CYP3A5* and *CYP3A7* genes, located on chromosome 7. CYP3A4 is the dominant CYP3A enzyme in the adult liver and small intestine. CYP3A5 is also found in the adult liver but with a more variable pattern of expression. In addition, CYP3A5 is also polymorphically expressed in the fetal liver. CYP3A7 is the major fetal liver CYP3A enzyme and its expression generally decreases after birth giving rise to its adult form, CYP3A4. However, CYP3A7 has also been detected in some adults and it may contribute to drug/xenobiotic clearance⁽⁶⁾.

1. *CYP3A5* gene

Genetic polymorphisms in the *CYP3A5* gene explain 40-50% of the variability in TAC dose requirements⁽³⁾. It has been reported that the strongest predictor of TAC dosing requirements is the rs776746 SNP (c.219-237A>G; CYP3A5*3 allele; MAF=0,38 T) in intron 3. This variant creates an alternative splice site in the pre-mRNA and therefore production of aberrant mRNA resulting in truncation of the translated protein and a severe decrease of functional CYP3A5 enzyme. Homozygous carriers of the G allele of this SNP (CYP3A5*3/*3) are referred to as CYP3A5 non-expressers in contrast to CYP3A5*1 carriers (known as CYP3A5 expressers) who show normal protein function and therefore lower trough concentrations related to higher metabolic rates⁽⁷⁻⁹⁾. This association between *CYP3A5* genotype and TAC metabolism has been replicated many times in a variety of different studies. However, the contribution of this genetic variant to TAC pharmacokinetic variability specifically in paediatric population has not been widely reported yet. Turolo et al. (2010) performed a study in teenagers undergoing kidney transplantation and found that carriers of the CYP3A5*1 allele (CYP3A5 expressers) required a TAC loading dose that was 1,5 times higher than CYP3A5 non-expressers⁽¹⁰⁾. The *1 allele has also been related to a slower achievement of therapeutic levels. Similar results were obtained by Durand et al. in a paediatric cohort⁽¹¹⁾. On the other hand, Shillbayeh et al. (2013) found this association only during the first 3 months after transplantation, however this may be due to CYP3A5 induction because of corticosteroid comedication or the low frequency of the *1 allele in their cohort⁽¹²⁾. As TAC is metabolized by both intestinal and hepatic CYP3A5 enzymes, the combined contribution of CYP3A5 expression in the native intestine and liver

allograft is likely to influence the pharmacokinetics of TAC in liver transplant. However, due to the short number of studies, up to date results have been inconclusive⁽³⁾.

Other *CYP3A5* SNPs have been reported in association to TAC pharmacokinetics, including the rs10264272 (c.624G>A; *CYP3A5**6; MAF=0,04 T) and rs41303343 (c.1035_1036insT; *CYP3A5**7; MAF=0,03 A) encoding nonfunctional proteins as well as the rs41279854 (c.1337T>C; *CYP3A5**3K; MAF<0,01 G) encoding a protein with decreased activity. The rs55965422 (c.432+2T>C; *CYP3A5**5; MAF<0,01 G) has also been reported affecting the intron 5 splicing donor site of the gene, however the in vitro results revealing the enzymatic activity of the encoded protein were unclear⁽¹³⁻¹⁵⁾.

2. *CYP3A4* gene

The *CYP3A4* SNPs rs2740574 (c.-392G>A; *CYP3A4**1B; MAF=0,23 C) and rs35599367 (c.522-191C>T; *CYP3A4**22; MAF=0,01 A) have both been related to TAC pharmacokinetic variability. The rs2740574 is a promoter variant known to increase gene transcription. Therefore carriers of the *CYP3A4**1B allele have shown 35% lower TAC dose-adjusted through concentrations compared to those homozygous for the *1 allele. However the rs2740574 was shown to be in linkage disequilibrium (LD) with *CYP3A5* rs776746 and therefore its effect in TAC pharmacokinetics is likely mediated by this SNP⁽³⁾. The rs35599367 is located in intron 6 of the *CYP3A4* gene and has been related to reduced *CYP3A4* enzymatic activity. In fact, a study in paediatric heart transplant patients reported that *CYP3A4**22 carriers need 30% less TAC to reach similar target concentrations compared to *CYP3A4* *1/*1⁽¹⁶⁾. This SNP is not in LD with rs776746 in *CYP3A5* and therefore its contribution to TAC metabolism is independent from the *CYP3A5**3 allele. A combination of the *CYP3A4* and *CYP3A5* genotypes has been proposed in order to predict TAC dosing requirements giving rise to three groups: Ultrarapid (*CYP3A5* expressers and *CYP3A4**1/*1), intermediate (*CYP3A5* non-expressers and *CYP3A4**1/*1) and poor (*CYP3A5* non-expressers and *CYP3A4**22 carriers) *CYP3A* metabolizers (17-19). The rs28371759 (c.875T>C; *CYP3A4**18; MAF<0,01 G) in intron 10 of the *CYP3A4* gene has also been related to TAC pharmacokinetics⁽³⁾. Despite not having evidence of a direct association between the rs4646438 (c.827_828insA; *CYP3A4**6) and rs55785340 (c.664T>C; *CYP3A4**2; MAF<0,01 G) TAC pharmacokinetics, Hsieh et al. (2001) reported that these SNPs were associated with reduced *CYP3A4* enzymatic activity (in vivo and in vitro respectively) and may therefore affect TAC concentrations⁽²⁰⁾.

Recently Werk et al. (2014) described a kidney transplant patient with extremely high TAC plasma

trough levels during immunosuppressant therapy and a novel *CYP3A4* variant resulting in a premature stop codon in *CYP3A4* exon 9, rs138105638 (c.802 C>T; *CYP3A4**26) resulting in a complete failure of the *CYP3A4* locus. In addition, this patient was a *CYP3A5* non-expressor and therefore showed a complete failure of the *CYP3A* enzyme activity and unusually low TAC dosing requirements⁽²¹⁾.

3. *CYP3A7* gene

CYP3A7 is the most abundant *CYP* isoform and accounts for up to 50% of the total P450 in embryonic, fetal and neonate livers. Generally its expression decreases after birth giving rise to its adult form, *CYP3A4*; however it has been reported that individuals carrying the *CYP3A7**1C allele that contains the proximal PXR/CAR element of *CYP3A4* express significant levels of *CYP3A7* in their adult life which could therefore contribute to TAC metabolism⁽²²⁾. 5 SNPs define the *CYP2C7**1C allele: rs11568824 (c.-291G>T), rs45494802, rs45575938 (c.-282T>C; MAF=0,01), rs45467892 (c.-281A>T; MAF=0,01 A), rs11568825 (c.-270T>G), rs11568826 (c.-262T>A) and rs45446698 (c.-232A>C; MAF=0,02 G). This allele was reported at a frequency of 3% in Caucasian populations and 6% in African Americans⁽⁶⁾.

Other SNPs in *CYP3A7* 5'-flanking region have been reported such as rs45465393 (c.-314C>T; *CYP3A7**1B; MAF<0,01 A), rs55798860 (c.-91G>A; *CYP3A7**1D; MAF=0,01 T) and rs28451617 (c.-49G>A ; *CYP3A7**1E; MAF=0,04 T). However, these variants occur in regions outside those associated with the regulation of *CYP3A* transcription (6). Another common *CYP3A7* SNP is the rs2257401 (c.1226C>G; *CYP3A7**2; MAF=0,33 C), associated with higher drug metabolic rates but only in fetal livers. Lee et al. (2007) reported a novel *CYP3A7* variant in a human fetal liver, (c.141_142insT; *CYP3A7**3), that causes a premature termination of *CYP3A7* translation which may result in a null phenotype⁽²³⁾.

4. *ABCB1* gene

ABCB1 has been related to the low bioavailability of TAC as well as to TAC distribution throughout the body and its excretion into bile and urine⁽⁵⁾. However, associations between TAC pharmacokinetics and variations in *ABCB1* are controversial. The rs2032582 (c.2677T>G/A; *ABCB1**2; MAF=0,05 T), rs1045642 (c.3435T>C; *ABCB1**2; MAF=0,40 A) and rs1128503 (c.1236T>C; *ABCB1**2; MAF=0,42 A) which are likely in LD are the most studied SNPs, however results are conflicting and there is no consistent evidence for an association between TAC adjusted-through concentrations and these variants^(24, 25). Some studies report a sig-

nificant association between rs1045642 and TAC dose^(8, 26), however this association was not confirmed by other authors⁽²⁷⁾.

ABCB1 is also expressed in the membrane of lymphocytes so it may play a role in affecting the intracellular concentrations of TAC within these cells. Indeed, Capron et al (2010) reported an association between these SNPs and intracellular PBMC TAC concentrations (probably due to a reduction in P-glycoprotein expression and function). In addition, this association was not correlated with TAC blood concentrations, demonstrating that blood concentration may not accurately reflect the level of TAC available for immunosuppression⁽²⁸⁾. *ABCB1* SNPs have also been related to TAC nephrotoxicity as P-gp expression in renal cells could determine the amount of TAC entering these cells and therefore tissue concentrations⁽²⁹⁾. However, this association was not replicated by other studies⁽³⁰⁾.

Kroetz et al. described the *13 haplotype⁽³¹⁾. *ABCB1**13 is indistinguishable from the *2 haplotype in terms of coding region and amino acid sequence but different in 3 intronic variants: rs10276036 (c.1000-44G>A; *ABCB1**13; MAF=0,43 A), rs2235033 (c.1554+24T>C; *ABCB1**13; MAF=0,47 G) and rs2235013 (c.1725+38G>A; *ABCB1**13; MAF=0,47 T). This haplotype does not affect *ABCB1* protein function.

5. *POR* gene

P-450 oxidoreductase (*POR*) enables the activity of *CYP3A* enzymes and it is essential for *CYP*-mediated drug oxidation. The rs1057868 (c.1508C>T; *POR**28; MAF=0,29 T) affects the electron binding domain of *POR* and therefore modifies *POR* modulation of the *CYP3A* enzymes. Indeed, it has been reported that homozygous carriers of the *POR**28 allele show an increased *CYP3A* in vivo activity⁽³²⁾. In pediatric population, a recent study in 43 transplant children showed that heterozygous and homozygous carriers of the *28 allele show TAC concentration/dose ratios 20,2% lower than *POR**1/*1 individuals. An association between *POR* rs2868177 (c.188+6405A>G; MAF=0,40 G) and *CYP* activity has also been described as it strongly related to warfarin maintenance dose variations⁽³³⁾.

6. *NR1I2* gene

The Nuclear Receptor Subfamily 1 Group I Member 2 (*NR1I2*) encodes the human pregnane X receptor (*PXR*), responsible of the upstream regulation of the *CYP3A* enzymes. The promoter *NR1I2* SNP rs3814055 (c.-1570C>T; MAF=0,32 T) has been related to a significantly increased exposure to TAC. It has been suggested that this variant produces a downregulation of *PXR* and therefore decreased *CYP* metabolic activity resulting in decreased clearance of TAC⁽³⁴⁾.

In conclusion, TAC efficacy and toxicity show a great variability both in adult and pediatric population. Part of this variability can be explained by genetic variation in the *CYP3A5*, *CYP3A4* and *CYP3A7*, *POR*, *NR1I2* and *ABCB1* genes. Therefore our group proposes this study for the evaluation of SNP affecting these genes could help us in the design and optimization of new strategies, such as dosing algorithms for treatment individualization and optimization (FC/HULP_002/2014).

Methods

1. Design and setting

This study was designed as a unicenter retrospective cross-sectional study to evaluate the contribution of genetic polymorphisms in TAC metabolism related genes in the pharmacokinetics of TAC in pediatric patients with stable serum concentrations after renal transplantation. The study will be performed in La Paz University Hospital in Madrid (Spain). This study has an estimated duration of 24 months. A Flowchart of the study procedures can be found in Figure 1.

2. Study population

The target population is a cohort of pediatric patients after renal transplantation referred to the Pediatric Nephrology Division of La Paz University Hospital and following a pharmacological treatment with TAC. Peripheral blood samples will be drawn for molecular analysis and AUC estimation.

3. Inclusion criteria

- Male and female patients who underwent a renal transplantation procedure.
- Under 18 years of age.
- Follow stable immunosuppressive treatment with TAC. Treatment is considered stable when variations in the 3 last blood concentrations determinations are <30%, being these determinations separated by 1 week.
- Patients give written consent to participate in the study once they have received information on the design, goals and possible risk of the study and they are made aware that they can withdraw from the study at any time.

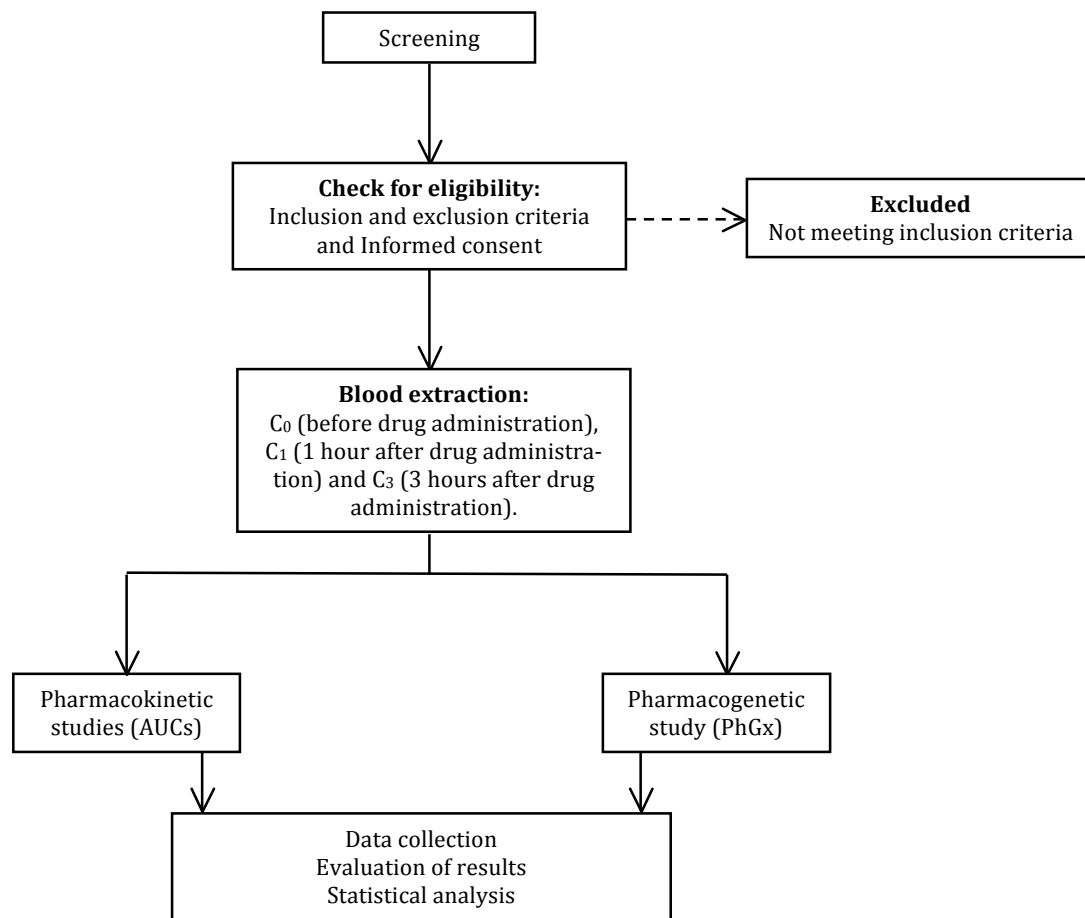
4. Exclusion criteria

- Inability to understand directions or lack of collaboration during the study.

5. Objectives

a) Primary

Figure 1. Flowchart of study procedures



- To evaluate the contribution of genetic variation in the *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7*, *POR*, *NR1I2* and *ABCB1* genes to TAC pharmacokinetics.

b) Secondary

- To perform molecular analysis and characterization of *CYP3A*, *ABCB1*, *POR* and *NR1I2* haplotypes in a pediatric cohort after renal transplantation.
- To evaluate the contribution of genetic variation (in addition to other individual features) to TAC heterogeneity in clinical response and related adverse reactions by mathematical modelling.

6. Study timeline

The study will be distributed as shown in Table 1.

a) Inclusion phase

- Recruitment of a cohort of pediatric patients referred to the Pediatric Nephrology Division

after renal transplant. Patients will be checked to ensure they meet the selection criteria.

- Before any procedure is performed patients and relatives will be informed (verbally and in written by the patient information sheet). Informed consent sheets will be gathered. An example of the Informed Consent sheets can be found in the Supplementary Material.
- Once patients and relatives have consent to participation in the study clinical and demographic information will be collected by personal interviews and review of medical history.
- 3 blood samples will be taken from each patient for a TAC AUC study: C0, C1 (1 hour) and C3 (3 hours).
- In order to minimize the number of blood extractions, one of the previous samples will be used for the PhGx studies.

b) Result collection and analysis

- PhGx tests will be performed. Results will be collected in electronic databases for subsequent statistical analysis.

Table 1. Study timeline

	April 2014-January 2017	January-March 2017	April 2017
Inclusion Phase	Recruitment	✓	
	Informed consent	✓	
	Selection criteria	✓	
	Medical history	✓	
	Blood samples	✓	
Result collection and analysis	Pharmacokinetic study		✓
	Pharmacogenetic study		✓
	Data analysis		✓
Result dissemination	Final report		✓
	Publication of results		✓

c) Results dissemination

- Preparation of a final report.
- Publication of the results in scientific journals.
- Communications in scientific meetings and conferences.

7. Data collection

Patient's clinical information will be collected by medical history review and a personal interview with patients and relatives. Three blood samples will be drawn for AUC and PhGx studies. Information will be recorded in the Case Report Form (CRF).

a) Pharmacogenetics studies

One of the blood samples obtained for the pharmacokinetic study will be used for DNA extraction and genotyping of various SNP in the following genes related to TAC metabolism and pharmacokinetics: *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7*, *POR*, *NR1I2* and *ABCB1* in the Medical and Molecular Genetics Institute (INGEMM) in La Paz University Hospital. Table 2 shows the final selection of SNPs for TAC PhGx analysis. After the assessment of different molecular techniques we finally selected the OpenArray® technique with a custom format: PharmArray® as well as direct sequencing for those SNPs which were not included in the design.

b) Pharmacokinetic study

Three blood samples will be collected from each patient: One before drug administration (C0), and two after 1 and 3 hours respectively (C1 and C3) in order to calculate TAC abbreviated AUC as an indicator of total drug exposure. This method is completely validated and is performed on a daily basis in many patients (35). These determinations will be performed in the Clinical Pharmacology Department of La Paz University Hospital by an automatized immunoassay method (Architect®),

which is generally used for TDM of immunosuppressive drugs.

8. Case Report Form (CRF)

Each patient's CRF will include the following information:

Age, sex, intercurrent diseases that may modify the activity of TAC metabolizing enzymes as well as possible concomitant treatments with enzyme inducers or inhibitors (erythromycin, phenobarbital, itraconazole, diltiazem, Ritonavir/Lopinavir, etc). TAC concentrations will also be recorded (abbreviated AUC in C0, C1 and C3). In the event of TAC-related adverse reactions, an independent evaluation of immunosuppressive treatment will be performed.

9. Withdrawal criteria

Patients 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 required by the patient's clinical situation or if the patient does not comply with the protocol. The motive and justification of the withdrawal will be reflected in the study development.

10. Sample size calculation

Due to the exploratory nature of this study our aim is to include all pediatric patients referred to the Pediatric Nephrology Division of La Paz University Hospital. Taking into account ~20% of patients that refuse to collaborate in the study and/or withdrawals, we estimate a number of patients of around 50, this sample size seemed adequate as compared to other previous similar studies^(8, 12, 16).

11. Data analysis

Data will be collected in electronic databases for subsequent analysis:

- We will perform a descriptive analysis of socio-demographic factors, personal records and

Table 2. Final selection of SNPs included in the TAC PhGx study. Information about SNPs coordinates and Minor allele Frequencies (MAF) is shown.

Gene	SNPs (#rs)	cDNA	Genomic Location	MAF	
ABCB1	rs2032582	c.2677T>G/A	Chr7:87531302	0,05 T	
	rs1045642	c.3435T>C	Chr7:87509329	0,40 A	
	rs1128503	c.1236T>C	Chr7:87550285	0,42 A	
	rs10276036	c.1000-44G>A	Chr7:87550882	0,43 A	
	rs2235033	c.1554+24T>C	Chr7:87549827	0,47 G	
	rs2235013	c.1725+38G>A	Chr7:87549310	0,47 T	
CYP3A4	rs55785340	c.664T>C	Chr7:99768360	<0,01 G	
	rs4646438	c.827_828insA	Chr7:99766411_99766412	-	
	rs2740574	c.-392G>A	Chr7:99784473	0,23 C	
	rs35599367	c.522-191C>T	Chr7:99768693	0,01 A	
	rs28371759	c.875T>C	Chr7:99764003	<0,01 G	
	rs138105638	c.802 C>T	Chr7:99766440	-	
CYP3A5	rs776746	c.219-237A>G	Chr7:99672916	0,38 T	
	rs55965422	c.432+2T>C	Chr7:99666950	<0,01 G	
	rs10264272	c.624G>A	Chr7:99665212	0,04 T	
	rs41303343	c.1035_1036insT	Chr7:99652770_99652771	0,03 A	
	rs41279854	c.1337T>C	Chr7:99650149	0,01 G	
CYP3A7	rs45465393	c.-314C>T	Chr7:99735407	<0,01 A	
	rs11568824	c.-291G>T	Chr 7:99735384	-	
	rs45494802	c.-284T>A	Chr7:99735377	0,01 T	
	rs45575938	c.-282T>C	Chr7:99735375	0,01 G	
	rs45467892	c.-281A>T	Chr 7:99735374	0,01 A	
	rs11568825	c.-270T>G	Chr7:99735363	-	
	rs11568826	c.-262T>A	Chr 7:99735355	-	
	rs45446698	c.-232A>C	Chr7:99735325	0,02 G	
	rs55798860	c.-91G>A	Chr7:99735184	0,01 T	
	rs28451617	c.-49G>A	Chr7:99735142	0,04 T	
	rs2257401	c.1226C>G	Chr7:99709062	0,33 C	
	-	c.141_142insT	Chr7:99731082_99731083	-	
	POR	rs1057868	c.1508C>T	Chr7:75985688	0,29 T
		rs2868177	c.188+6405A>G	Chr7:75960585	0,40 G
NR1I2	rs3814055	c.-1570C>T	Chr3:119781188	0,32 T	

Transcripts IDs: *ABCB1* (NM_000927), *CYP3A4* (NM_001202855), *CYP3A5* (NM_000777), *CYP3A7* (NM_000765), *POR* (NM_000941) and *NR1I2* (NM_022002). **Genome version:** Human GRCh38.p7.

concomitant drugs, transplant and immunosuppression information, pharmacokinetic parameters (abbreviated AUC) and PhGx data (allelic and genotypic frequencies). Data will be expressed as incidence (number/percentage) or average (with standard deviation, SD), as applicable.

- b. A univariate analysis will be performed for the evaluation of the relationship between kinetic parameters (drug exposure-AUC) and the other independent variables (including PhGx). T-Student, ANOVA and bivariate correlation (or its corresponding non-parametric test) will be applied. For the evaluation of each separate variable in AUC a univariate lineal regression will be performed and R2 and AIC will be used for comparison of the different variables.
- c. A multivariate regression analysis will be used for building an explicative model of the patient's clinical response, being the independent variables the selected genetic variants and clinical a demographic features of the patients and the dependent variable the pharmacokinetic results (AUC).

12. Ethical aspects

Researchers will abide strictly to the provisions of this protocol as well as to the Good Clinical Practice guidelines. This project will be carried according to the recommendations for clinical studies and drug evaluation in humans as reflected in the Declaration of Helsinki (reviewed in successive world meetings) and in the current Spanish legislation on clinical studies (RD 223/2004) and patient data confidentiality. This study has been approved by the Clinical Research Ethics Committee of the La Paz University Hospital (Madrid, Spain).

Patients will receive verbal and written information about the study and the possible associated risks before being included in the study and a written consent form will be collected. Included patients will be underage and therefore different information sheets and informed consent forms suitable for the different age group will be designed. Patients will be able to withdraw from this study at any moment. Results obtained in this study are considered confidential and will be treated strictly as such.

Discussion

Tacrolimus is the most commonly used calcineurin inhibitor (with more than 90% of kidney transplants performed with TAC as immunosuppressive agent)⁽³⁶⁾. However, TAC therapy is complicated by its narrow therapeutic window requiring TDM to optimize treatment and avoid graft loss and toxicities⁽³⁷⁻³⁹⁾. Despite

TDM, a high inter and intraindividual pharmacokinetic variability has been reported in transplant patients treated with TAC. This pharmacokinetic variability depends on many clinical co-variants such as age, sex, weight, serum levels of albumin, haematocrit and haemoglobin, concomitant medications or post-operative time. However, it has been reported that genetic variations in the genes encoding proteins related to TAC metabolism and disposition may contribute in a high degree to this heterogeneity of responses⁽⁴⁰⁻⁴²⁾.

Recently it has been proposed the implementation of dosing algorithms in the clinical routine that include all of these variables for increasing both the efficacy and safety of TAC in renal transplant patients. Several dosing algorithms have been proposed⁽⁴³⁻⁴⁵⁾. However, these algorithms do not incorporate the complete TAC related PhGx profile and therefore are unable to accurately determine TAC clearance.

Our project aims to evaluate the individual contribution of the most common and important genetic variants reported in association to TAC pharmacokinetics in order to identify new variables that could be incorporated in dosing algorithms and therefore improve TAC dosing and security.

Passey et al. included *CYP3A5* genotype as a variable in their TAC dosing algorithm. Genetic polymorphisms in the *CYP3A5* gene explain 40-50% of the variability in TAC dose requirements. However TAC presents an extensive hepatic metabolism by other cytochrome P450 enzymes (such as *CYP3A4* and *CYP3A7*), and its bioavailability is also influenced by the multidrug resistance genotypes (*ABCB1*)^(8, 46). In addition, recent studies have related variants in *POR* and *NR1I2* with TAC pharmacokinetics, as these genes encode proteins related to the regulation of the *CYP3A* enzymes⁽³⁾. *CYP3A7* is the major fetal liver metabolizing enzyme. Its expression generally decreases after birth, however it has been reported that individuals carrying the *CYP3A7*1C* allele express significant levels of *CYP3A7* in their adult life. We therefore included *CYP3A7* screening in our study as we hypothesize that this protein, especially in pediatric population, may contribute in some way to TAC metabolism⁽²²⁾.

In summary, the proposed study aims to review and identify the specific contribution of genetic variation in these genes in relation to TAC pharmacokinetics in pediatric population. Preemptive screening of these genes may result an informative tool that could help clarifying TAC heterogeneity of responses and help in the prevention of toxicities and graft loss as well as in the optimization of TAC dose and efficiency.

References

- [1] McLeod HL. Pharmacogenetics: more than skin deep. *Nature genetics*. 2001;29(3):247-8.

- [2] Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. 1999;286(5439):487-91.
- [3] Barbarino JM, Staatz CE, Venkataramanan R, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: cyclosporine and tacrolimus pathways. *Pharmacogenetics and genomics*. 2013;23(10):563-85.
- [4] Martial LC, Verstegen RH, Cornelissen EA, Aarnoutse RE, Schreuder MF, Bruggemann RJ. A preliminary study searching for the right dose of tacrolimus in very young (≤ 4 years) renal transplant patients. *J Pharm Pharmacol*. 2016;68(11):1366-72.
- [5] Tang JT, Andrews LM, van Gelder T, Shi YY, van Schaik RH, Wang LL, et al. Pharmacogenetic aspects of the use of tacrolimus in renal transplantation: recent developments and ethnic considerations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016;12(5):555-65.
- [6] Lamba JK, Lin YS, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54(10):1271-94.
- [7] Mourad M, Mourad G, Wallemacq P, Garrigue V, Van Bellinghen C, Van Kerckhove V, et al. Sirolimus and tacrolimus trough concentrations and dose requirements after kidney transplantation in relation to CYP3A5 and MDR1 polymorphisms and steroids. *Transplantation*. 2005;80(7):977-84.
- [8] Roy JN, Barama A, Poirier C, Vinet B, Roger M. Cyp3A4, Cyp3A5, and MDR-1 genetic influences on tacrolimus pharmacokinetics in renal transplant recipients. *Pharmacogenetics and genomics*. 2006;16(9):659-65.
- [9] Thervet E, Anglicheau D, King B, Schlageter MH, Cassinat B, Beaune P, et al. Impact of cytochrome p450 3A5 genetic polymorphism on tacrolimus doses and concentration-to-dose ratio in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2003;76(8):1233-5.
- [10] Turolo S, Tirelli AS, Ferrareso M, Ghio L, Belingheri M, Groppali E, et al. Frequencies and roles of CYP3A5, CYP3A4 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms in Italian teenagers after kidney transplantation. *Pharmacol Rep*. 2010;62(6):1159-69.
- [11] Durand P, Debray D, Kolaci M, Bouligand J, Furlan V, Fabre M, et al. Tacrolimus dose requirement in pediatric liver transplantation: influence of CYP3A5 gene polymorphism. *Pharmacogenomics*. 2013;14(9):1017-25.
- [12] Shilbayeh S, Zmeili R, Almardini RI. The impact of CYP3A5 and MDR1 polymorphisms on tacrolimus dosage requirements and trough concentrations in pediatric renal transplant recipients. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2013;24(6):1125-36.
- [13] Chou FC, Tzeng SJ, Huang JD. Genetic polymorphism of cytochrome P450 3A5 in Chinese. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2001;29(9):1205-9.
- [14] Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nature genetics*. 2001;27(4):383-91.
- [15] Lee SJ, Usmani KA, Chanas B, Ghanayem B, Xi T, Hodgson E, et al. Genetic findings and functional studies of human CYP3A5 single nucleotide polymorphisms in different ethnic groups. *Pharmacogenetics*. 2003;13(8):461-72.
- [16] Gijzen VM, van Schaik RH, Elens L, Soldin OP, Soldin SJ, Koren G, et al. CYP3A4*22 and CYP3A combined genotypes both correlate with tacrolimus disposition in pediatric heart transplant recipients. *Pharmacogenomics*. 2013;14(9):1027-36.
- [17] Elens L, Bouamar R, Hesselink DA, Haufroid V, van der Heiden IP, van Gelder T, et al. A new functional CYP3A4 intron 6 polymorphism significantly affects tacrolimus pharmacokinetics in kidney transplant recipients. *Clinical chemistry*. 2011;57(11):1574-83.
- [18] Elens L, Capron A, van Schaik RH, De Meyer M, De Pauw L, Eddour DC, et al. Impact of CYP3A4*22 allele on tacrolimus pharmacokinetics in early period after renal transplantation: toward updated genotype-based dosage guidelines. *Ther Drug Monit*. 2013;35(5):608-16.
- [19] Elens L, van Schaik RH, Panin N, de Meyer M, Wallemacq P, Lison D, et al. Effect of a new functional CYP3A4 polymorphism on calcineurin inhibitors' dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients. *Pharmacogenomics*. 2011;12(10):1383-96.
- [20] Hsieh KP, Lin YY, Cheng CL, Lai ML, Lin MS, Siest JP, et al. Novel mutations of CYP3A4 in Chinese. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2001;29(3):268-73.
- [21] Werk AN, Lefeldt S, Bruckmueller H, Hemmrich-Stanisak G, Franke A, Roos M, et al. Identification and characterization of a defective CYP3A4 genotype in a kidney transplant patient with severely diminished tacrolimus clearance. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2014;95(4):416-22.
- [22] Sim SC, Edwards RJ, Boobis AR, Ingelman-Sundberg M. CYP3A7 protein expression is high in a fraction of adult human livers and partially associated with the CYP3A7*1C allele. *Pharmacogenetics and genomics*. 2005;15(9):625-31.
- [23] Lee SS, Jung HJ, Park JS, Cha IJ, Cho DY, Shin JG. Identification of a null allele of cytochrome P450 3A7: CYP3A7 polymorphism in a Korean population. *Mol Biol Rep*. 2010;37(1):213-7.

- [24] Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(10):623-53.
- [25] Tang HL, Xie HG, Yao Y, Hu YF. Lower tacrolimus daily dose requirements and acute rejection rates in the *CYP3A5* nonexpressers than expressers. *Pharmacogenetics and genomics.* 2011;21(11):713-20.
- [26] Macphee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, et al. Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503A5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement. *Transplantation.* 2002;74(11):1486-9.
- [27] Tavira B, Gomez J, Diaz-Corte C, Suarez B, Coronel D, Arias M, et al. *ABCB1* (MDR-1) pharmacogenetics of tacrolimus in renal transplanted patients: a Next Generation Sequencing approach. *Clin Chem Lab Med.* 2015;53(10):1515-9.
- [28] Capron A, Mourad M, De Meyer M, De Pauw L, Eddour DC, Latinne D, et al. *CYP3A5* and *ABCB1* polymorphisms influence tacrolimus concentrations in peripheral blood mononuclear cells after renal transplantation. *Pharmacogenomics.* 2010;11(5):703-14.
- [29] Naesens M, Lerut E, de Jonge H, Van Damme B, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. Donor age and renal P-glycoprotein expression associate with chronic histological damage in renal allografts. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 2009;20(11):2468-80.
- [30] Debette-Gratien M, Woillard JB, Picard N, Sebahg M, Loustaud-Ratti V, Sautereau D, et al. Influence of Donor and Recipient *CYP3A4*, *CYP3A5*, and *ABCB1* Genotypes on Clinical Outcomes and Nephrotoxicity in Liver Transplant Recipients. *Transplantation.* 2016;100(10):2129-37.
- [31] Kroetz DL, Pauli-Magnus C, Hodges LM, Huang CC, Kawamoto M, Johns SJ, et al. Sequence diversity and haplotype structure in the human *ABCB1* (MDR1, multi-drug resistance transporter) gene. *Pharmacogenetics.* 2003;13(8):481-94.
- [32] Oneda B, Crettol S, Jaquenoud Sirot E, Bochud M, Ansermot N, Eap CB. The P450 oxidoreductase genotype is associated with *CYP3A* activity in vivo as measured by the midazolam phenotyping test. *Pharmacogenetics and genomics.* 2009;19(11):877-83.
- [33] Zhang X, Li L, Ding X, Kaminsky LS. Identification of cytochrome P450 oxidoreductase gene variants that are significantly associated with the interindividual variations in warfarin maintenance dose. *Drug Metab Dispos.* 2011;39(8):1433-9.
- [34] Choi Y, Jiang F, An H, Park HJ, Choi JH, Lee H. A pharmacogenomic study on the pharmacokinetics of tacrolimus in healthy subjects using the DMETTM Plus platform. *The pharmacogenomics journal.* 2016.
- [35] Almeida-Paulo GN, Lubomirov R, Alonso-Sanchez NL, Espinosa-Roman L, Fernandez Camblor C, Diaz C, et al. Limited sampling strategies for tacrolimus exposure (AUC₀₋₂₄) prediction after Prograf(R) and Advagraf(R) administration in children and adolescents with liver or kidney transplants. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation.* 2014;27(9):939-48.
- [36] Pulk RA, Schladt DS, Oetting WS, Guan W, Israni AK, Matas AJ, et al. Multigene predictors of tacrolimus exposure in kidney transplant recipients. *Pharmacogenomics.* 2015;16(8):841-54.
- [37] Felipe CR, Silva HT, Machado PG, Garcia R, da Silva Moreira SR, Pestana JO. The impact of ethnic miscegenation on tacrolimus clinical pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring. *Clin Transplant.* 2002;16(4):262-72.
- [38] Scott LJ, McKeage K, Keam SJ, Plosker GL. Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation. *Drugs.* 2003;63(12):1247-97.
- [39] Taylor AL, Watson CJ, Bradley JA. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005;56(1):23-46.
- [40] Kuypers DR, Claes K, Evenepoel P, Maes B, Coosemans W, Pirenne J, et al. Time-related clinical determinants of long-term tacrolimus pharmacokinetics in combination therapy with mycophenolic acid and corticosteroids: a prospective study in one hundred de novo renal transplant recipients. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(11):741-62.
- [41] Mourad M, Wallemacq P, De Meyer M, Brandt D, Van Kerkhove V, Malaise J, et al. The influence of genetic polymorphisms of cytochrome P450 3A5 and *ABCB1* on starting dose- and weight-standardized tacrolimus trough concentrations after kidney transplantation in relation to renal function. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(10):1192-8.
- [42] Undre NA, van Hooff J, Christiaans M, Vanrenterghem Y, Donck J, Heeman U, et al. Low systemic exposure to tacrolimus correlates with acute rejection. *Transplant Proc.* 1999;31(1-2):296-8.
- [43] Passey C, Birnbaum AK, Brundage RC, Oetting WS, Israni AK, Jacobson PA. Dosing equation for tacrolimus using genetic variants and clinical factors. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;72(6):948-57.
- [44] Passey C, Birnbaum AK, Brundage RC, Schladt DP, Oetting WS, Leduc RE, et al. Validation of tacrolimus equation to predict troughs using genetic and clinical factors. *Pharmacogenomics.* 2012;13(10):1141-7.
- [45] Storset E, Asberg A, Skauby M, Neely M, Bergan S, Bremer S, et al. Improved Tacrolimus Target Concentration Achievement Using Computerized Dosing in Renal

Transplant Recipients--A Prospective, Randomized Study.
Transplantation. 2015;99(10):2158-66.

[46] Anglicheau D, Verstuyft C, Laurent-Puig P, Becquemont L, Schlageter MH, Cassinat B, et al. Association of the

multidrug resistance-1 gene single-nucleotide polymorphisms with the tacrolimus dose requirements in renal transplant recipients. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 2003;14(7):1889-9