

DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA , TERAPÈUTICA I TOXICOLOGIA DE LA  
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

**Primeras administraciones de un  
nuevo antileucotrieno en humanos:  
seguridad y farmacocinética.  
Papel del modelado poblacional en el  
desarrollo clínico de nuevos  
compuestos**

Memòria presentada per  
**Ilonka Zsolt Fradera**  
Per optar al Grau de Doctor  
en Farmacologia

Director: MJ Barbanoj

Barcelona, Enero de 2007

**MANUEL JOSÉ BARBANOJ RODRÍGUEZ**, Professor Titular de Farmacologia de la Universitat Autònoma de Barcelona,

**CERTIFICO:**

Que la memòria de la Tesi titulada “**Primeras administraciones de un nuevo antileucotrieno en humanos: seguridad y farmacocinética. Papel del modelado poblacional en el desarrollo clínico de nuevos compuestos**” presentada per *Ilonka Zsolt Pradera* per optar al Grau de Doctor en Farmacologia, ha estat realitzada sota la meva direcció.

I perquè en prengueu coneixement i tingui els efectes que corresponguin, lliuro i signo la present certificació a Barcelona, a dos de Febrer de dos mil set.

*a Carlos e Iván*

## AGRADECIMIENTOS

El gusto por la ciencia y la curiosidad por las cosas viene, en parte, definido de una forma innata, pero es absolutamente decisiva la influencia de ciertas personas que permiten que esta tendencia se refuerce y consolide.

Mi iniciación y trayectoria en el campo de la investigación científica nunca hubiese podido materializarse sin la inestimable influencia y ayuda de todo el equipo del “Centre d’Investigació del Medicament”.

Por ello quiero agradecer;

A Manel Barbanoj, el haberme ofrecido la oportunidad de integrarme en su equipo de investigación y haberme permitido compartir y disfrutar de sus conocimientos y enseñanzas.

A Rosa M<sup>a</sup> Antonijoan, el haberme transmitido parte de sus amplios conocimientos sobre la organización de las Unidades de Fase I.

A Ignasi Gich, por su preciada colaboración y orientación en los cálculos estadísticos.

A Marta Valle por su inestimable ayuda en ampliar mis conocimientos sobre farmacocinética poblacional.

A M<sup>a</sup> Angeles Funes, Chelo García, David Martínez, Lola Almirall e Isabel Padrol por haber hecho posible la realización y presentación de este trabajo de investigación.

## ABREVIATURAS MÁS FRECUENTES

AA:	acontecimiento adverso
AED:	análisis estadístico descriptivo
A <sub>ENZ</sub> :	actividad enzimática
AIC:	criterio de Akaike
ANOVA:	análisis de la varianza
AUC <sub>0</sub> <sup>∞</sup> :	área bajo la curva de concentración vs tiempo desde 0 hasta infinito
AUC <sub>0</sub> <sup>∞</sup> /D:	área bajo la curva de concentración vs tiempo desde 0 hasta infinito en relación a la dosis administrada
AUC <sub>τ</sub> <sup>EE</sup> :	área bajo la curva durante un intervalo de dosificación en estado de equilibrio estacionario
C <sub>av</sub> <sup>EE</sup> :	concentración plasmática promedio en estado de equilibrio estacionario
CE <sub>50</sub> :	concentración eficaz 50%
CI <sub>50</sub> :	concentración inhibitoria 50%
CIM:	Centre d'Investigació del Medicament
Cl <sub>2</sub> :	aclaramiento plasmático que representa las vías de eliminación no afectadas por el AM-24
Cl/F:	aclaramiento plasmático total
Cl <sub>H</sub> :	aclaramiento hepático
Cl <sub>INT</sub> :	cambio en la actividad enzimática intrínseca
C <sub>max</sub> :	concentración plasmática máxima
C <sub>min</sub> <sup>EE</sup> :	concentración plasmática mínima en estado de equilibrio estacionario
C <sub>max</sub> <sup>EE</sup> :	concentración plasmática máxima en estado de equilibrio estacionario
C <sub>max</sub> /D:	concentración plasmática máxima en relación a la dosis administrada
COX:	ciclooxigenasa
C <sub>p</sub> :	concentración plasmática del fármaco
DMT:	dosis máxima tolerada
E <sub>0</sub> :	efecto a tiempo 0
EEG:	electroencefalograma
EER:	error estándar relativo
E <sub>max</sub> :	efecto máximo
F:	biodisponibilidad
f <sub>L</sub> :	fracción de fármaco libre en plasma
FLA <sub>2</sub> :	fosfolipasa A <sub>2</sub>

## Abreviaturas más frecuentes

---

FLAP:	proteína activadora de la 5-lipooxigenasa, “five lipooxygensae activating proteín”
FLC:	fosfolipasa C
$\gamma$ :	sigmoidicidad de la curva
HED:	dosis equivalente humana, “human equivalent dose”
HETE:	ácido hidroecosatetraenoico
HPETE:	ácido hidroperoxieicosatetraenoico
HPLC:	cromatografía líquida de alta resolución, “high performance liquid chromatography”
IC:	intervalo de confianza
$I_{MAX}$ :	máxima capacidad inhibitoria
$k_a$ :	microconstante de velocidad de paso desde el lugar de absorción al compartimento central
$k_e$ :	constante de eliminación
$K_{ENZ}$ :	constante de velocidad de primer orden que controla la velocidad de recambio de la cantidad de enzima
$k_i$ :	constante de afinidad por el receptor
$K_m$ :	concentración plasmática a la que la velocidad de metabolización se corresponde con la mitad de la velocidad máxima
KW:	test no paramétrico de comparación de rangos de Kruskal-Wallis
LTB <sub>4</sub> :	leucotrieno B <sub>4</sub>
LOX:	lipooxigenasa
MAICE:	estimado mínimo del criterio de Akaie, “minimum Akaike information criterion estimates”
NOAEL:	nivel al que no se observan efectos adversos, “ non-observed adverse effect level”
NOEL:	nivel al que no se observan efectos, “ non-observed effect level”
PG:	prostaglandina
PGI <sub>2</sub> :	prostacilina
PK/PD:	farmacocinética/farmacodinamia
PNT:	procedimiento normalizado de trabajo
PTF:	índice de fluctuación pico-valle
Q:	flujo plasmático hepático
$Q_{int}$ :	cantidad de fármaco en el intestino
$t_{1/2}$ :	tiempo de semivida de eliminación
$t_{1/2k_a}$ :	tiempo de semivida de absorción

$t_{\max}$ :	tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima
TX:	tromboxano
Vd/F:	volumen de distribución aparente
VHB:	virus de la hepatitis B
VHC:	virus de la hepatitis C
VII:	variabilidad interindividual
VIH:	virus de la inmunodeficiencia humana
$V_{\max}$ :	velocidad máxima de metabolización del fármaco





# Índice

## Introducción

1.- MEDIADORES DE LA COMUNICACIÓN BIOLÓGICA A PARTIR DE LOS FOSFOLÍPIDOS DE MEMBRANA .....	3
1.1.- Inflamación .....	3
1.1.1.- Concepto.....	3
1.1.2.- Mediadores .....	4
1.2.- Eicosanoides .....	6
1.2.1.- Biosíntesis de los eicosanoides .....	6
1.2.2.- Catabolismo del ácido araquidónico.....	6
1.2.2.1.- Vía de la ciclooxigenasa (COX).....	6
1.2.2.2.- Vía de la lipoxigenasa (LOX).....	8
1.2.3.- Leucotrienos .....	11
1.2.3.1.- Control de la producción de LTB <sub>4</sub> y péptido-leucotrienos .....	11
1.2.3.2.- Mecanismo de acción y receptores de leucotrienos .....	11
1.2.3.3.- Actividad biológica del LTB <sub>4</sub> y los péptido-leucotrienos .....	13
1.2.3.4.- Catabolismo de los leucotrienos .....	19
1.2.3.5.- Implicación de los leucotrienos en diversas patologías .....	19
1.3.- Antileucotrienos: características farmacológicas .....	24
1.3.1.- Generalidades .....	24
1.3.1.1.-Recuerdo histórico del desarrollo de los fármacos moduladores de los leucotrienos.....	24
1.3.1.2.- Puntos farmacológicos de actuación a nivel de la vía de los leucotrienos .....	25
1.3.1.3.- Antagonistas de los receptores de los péptido-leucotrienos.....	26
1.3.1.4.- Inhibidores de la 5-lipoxigenasa .....	27
1.3.2.- Características clínicas de los antileucotrienos comercializados .....	28
1.3.3.- Seguridad de los antileucotrienos .....	36
1.3.4.- Posición en terapéutica.....	37
1.3.5.- Futuro del desarrollo de nuevos antileucotrienos .....	40
2.- DESARROLLO CLÍNICO DE NUEVOS FÁRMACOS .....	42
2.1.- Ensayos clínicos de fase I.....	42
2.1.1. Riesgo de los ensayos de fase I .....	45
2.1.2.- Estudios de seguridad y tolerabilidad .....	45
2.1.3.- Estudios farmacocinéticos.....	46
2.1.3.1.- Tipos de estudios farmacocinéticos en fase I.....	47
2.1.4.- Estudios farmacodinámicos: evaluación del efecto farmacológico .....	47
2.1.4.1.- Métodos farmacodinámicos disponibles en fase I.....	52
2.2.- Ensayos clínicos de fase II .....	53
2.3.- Ensayos clínicos de fase III .....	54
2.4.- Ensayos clínicos de fase IV.....	55
3.- INVESTIGACIÓN “ <i>IN NUMERO</i> ”: APROXIMACIÓN POBLACIONAL .....	56
3.1.- Estudios “ <i>in numero</i> ” .....	56
3.2.- Aproximación poblacional.....	57
3.2.1.- Estructura básica de un modelo poblacional .....	59
3.3.- Recuerdo histórico .....	62
3.4.- Áreas de utilidad de los estudios “ <i>in numero</i> ”.....	65
3.4.1.- Aplicada .....	65
3.4.1.1.- Desarrollo de nuevos fármacos .....	65
3.4.1.2.- Práctica clínico-asistencial .....	71
3.4.2.- Academia .....	72
3.4.2.1.- Investigación farmacológica .....	73
3.4.2.2.- Investigación fisiológica .....	74
4.- AM-24.....	75
4.1.- Características fisico-químicas.....	75

4.2.-Toxicología .....	76
4.2.1.- Pruebas "in vitro".....	76
4.2.2.- Pruebas "in vivo".....	76
4.2.2.1.- Toxicidad crónica a 6 meses en rata por vía oral.....	76
4.2.2.2.- Dosis máxima tolerada oral en perro beagle (4 semanas).....	77
4.2.3.- Pruebas de mutagenicidad.....	77
4.3.- Estudios farmacológicos pre-clínicos .....	78
4.3.1.- Estudios "in vitro" del efecto antiinflamatorio de AM-24 .....	78
4.3.1.1.- Estudio comparativo del efecto de AM-24 sobre la biosíntesis de derivados del ácido araquidónico vía 5- lipoxigenasa en leucocitos polimorfonucleares .....	78
4.3.1.2.- Estudio del efecto del AM-24 sobre la inhibición de la ciclooxigenasa en suspensiones de plaquetas lavadas .....	78
4.3.2.- Estudios en animales.....	79
4.3.2.1.- Modelos de inflamación .....	79
4.3.2.2.- Modelos de dolor .....	80
4.4.- Estudios farmacocinéticos pre-clínicos.....	80
4.4.1.- Estudio farmacocinético en la rata .....	80
4.4.2.- Estudio farmacocinético en el perro .....	81
4.4.3.- Estudio farmacocinético en el caballo.....	81
4.5.- Conclusiones.....	82

### **Objetivos e Hipótesis**

1.- OBJETIVOS .....	85
1.1.- Objetivo principal.....	85
1.2.- Objetivos intermedios.....	85
2.- HIPÓTESIS .....	86
3.- DESARROLLO.....	88

### **Voluntarios y Método**

1.- INVESTIGACIÓN "IN VIVO".....	91
1.1.- Diseño de los estudios .....	91
1.2.- Población a estudiar .....	92
1.3.- Tratamientos .....	93
1.4.- Variables objeto de estudio .....	95
1.4.1.- Tolerabilidad .....	95
1.4.1.1.- Cuestionario de acontecimientos adversos sugeridos.....	95
1.4.1.2.- Registro de acontecimientos adversos reportados espontáneamente por los voluntarios y/o alteraciones analíticas evaluados según las recomendaciones de la OMS <sup>(WHO, 1986)</sup> .....	96
1.4.1.3.- Exploración física.....	97
1.4.1.4.- Constantes vitales .....	98
1.4.1.5.- Electrocardiograma .....	98
1.4.1.6.- Parámetros de laboratorio .....	99
1.4.2.- Farmacocinética.....	100
1.4.2.1.- Obtención de las muestras .....	100
1.4.2.2.- Método analítico .....	102
1.4.2.3.- Evaluación de los resultados.....	104
1.4.3.- Farmacodinamia .....	107
1.4.3.1.- Obtención de las muestras .....	107
1.4.3.2.- Método analítico para determinar la actividad de la enzima 5- LOX .....	108
1.4.3.3.- Evaluación de los resultados.....	108
1.5.- Desarrollo de los estudios .....	109
1.5.1.- Screening pre-estudio.....	109
1.5.2.- Institucionalización y supervisión de los sujetos .....	109

1.6.- Análisis estadístico .....	111
1.6.1.- Tolerabilidad .....	111
1.6.1.1.- Evaluación individualizada .....	111
1.6.1.2.- Estadística descriptiva .....	112
1.6.1.3.- Estadística inferencial .....	112
1.6.2.- Farmacocinética .....	113
1.6.2.1.- Estadística descriptiva .....	113
1.6.2.2.- Estadística inferencial .....	113
1.6.3.- Farmacodinamia .....	114
1.6.3.1.- Estadística descriptiva .....	114
1.7.- Condiciones éticas y legales .....	114
<b>2.- INVESTIGACIÓN “IN NÚMERO”: SIMULACIONES .....</b>	<b>115</b>
2.1.- Desarrollo de los modelos para describir las concentraciones plasmáticas .....	115
2.1.1.- Pauta de dosificación a evaluar para caracterizar la administración repetida .....	115
2.1.2.- Pauta de dosificación a proponer para continuar con el desarrollo del compuesto en pacientes .....	119
2.2.- Selección del modelo final .....	121
2.3.- Validación del modelo seleccionado .....	123
2.3.1.- Validación interna .....	123
2.3.2.- Validación externa .....	124
2.4.- Simulación .....	124
2.4.1.- Pauta de dosificación a evaluar para caracterizar la administración repetida .....	124
2.4.2.- Pauta de dosificación a proponer para continuar con el desarrollo del compuesto en pacientes .....	124

## Resultados

<b>PARTE I: DETERMINACIÓN DE LA PRIMERA DOSIS A ADMINISTRAR EN VOLUNTARIOS SANOS .....</b>	<b>129</b>
1.1.- Cálculo de la dosis mediante un factor .....	131
1.2.- Cálculo de la dosis a partir de fármacos similares .....	132
1.3.- Cálculo de la dosis guiado farmacocinéticamente .....	133
1.4.- Cálculo de la dosis comparativo .....	133
1.5.- Determinación de la primera dosis de AM-24 a administrar en voluntarios sanos .....	134
<b>PARTE II: INVESTIGACIÓN “IN VIVO”: ESTUDIO EXPERIMENTAL EN VOLUNTARIOS SANOS TRAS ADMINISTRACIÓN ORAL ÚNICA DE AM-24 EN EL RANGO DE DOSIS DE 6 mg A 1200 mg .....</b>	<b>135</b>
1.- DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN PARTICIPANTE .....	135
1.1.- Datos demográficos .....	135
1.2.- Anamnesis y exploración física .....	136
1.3.- Constantes vitales .....	136
1.4.- Electrocardiograma .....	137
1.5.- Parámetros de laboratorio .....	138
1.5.1.- Hematología .....	138
1.5.2.- Bioquímica .....	140
1.5.2.1.- Estándar .....	140
1.5.2.2.- Específica .....	141
1.5.3.- Sedimento urinario .....	141
1.6.- Otras evaluaciones efectuadas en el momento de la selección .....	142
2.- TOLERABILIDAD .....	143
2.1.- Cuestionario de acontecimientos adversos sugeridos .....	143
2.2.- Acontecimientos adversos reportados espontáneamente por los voluntarios y/o alteraciones analíticas evaluadas según las recomendaciones de la OMS <sup>(WHO, 1986)</sup> .....	148
2.3.- Exploración física .....	149
2.4.- Constantes vitales .....	150
2.4.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación) .....	150
2.4.2.- Evolución tras administración de la medicación .....	150
2.5.- Electrocardiograma .....	153
2.5.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación) .....	153
2.5.2.- Evolución tras administración de la medicación .....	153

2.6.- Parámetros de laboratorio .....	154
2.6.1.- Hematología .....	154
2.6.1.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación) .....	154
2.6.1.2.- Evolución tras administración de la medicación .....	156
2.6.2.- Bioquímica .....	157
2.6.2.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación) .....	157
2.6.2.2.- Evolución tras administración de la medicación .....	158
2.6.3.- Sedimento urinario .....	160
2.6.3.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación) .....	160
2.6.3.2.- Evolución tras administración de la medicación .....	160
3.- FARMACOCINÉTICA.....	161
3.1.- Concentraciones plasmáticas.....	161
3.2.- Parámetros farmacocinéticos: aproximación amodelística.....	162
3.3.- Linealidad cinética al incrementar la dosis .....	163
4.- FARMACODINAMIA .....	166
<b>PARTE III: INVESTIGACIÓN “IN NUMERO”: DETERMINACIÓN DE LA PAUTA DE DOSIFICACIÓN A EVALUAR PARA CARACTERIZAR LA ADMINISTRACIÓN REPETIDA. ....</b>	<b>168</b>
1.- DESARROLLO Y SELECCIÓN DEL MODELO .....	168
1.1.- Criterio de AIC .....	168
1.2.- Índice de Correlación .....	169
1.3.- Inclusión de 0 en los IC de los distintos parámetros .....	170
1.4.- Modelo seleccionado.....	173
2.- SIMULACIONES .....	174
2.1.- Dosis de 240mg/día durante 6 días.....	174
2.2.- Dosis de 350mg/día durante 6 días.....	175
2.3.- Dosis de 500mg/día durante 6 días.....	175
2.4.- Propuesta de diseño para la realización del estudio a dosis repetida .....	176
<b>PARTE IV: INVESTIGACIÓN “IN VIVO”: ESTUDIO EXPERIMENTAL EN VOLUNTARIOS SANOS TRAS ADMINISTRACIÓN ORAL REPETIDA DE AM-24 A LAS DOSIS DE 240, 350 Y 500 mg (UNA VEZ AL DÍA DURANTE 6 DÍAS).....</b>	<b>178</b>
1.- DESCRIPCIÓN DE LA POBALCIÓN PARTICIPANTE .....	178
1.1.- Datos demográficos .....	178
1.2.- Anamnesis y exploración física .....	179
1.3.- Constantes vitales .....	179
1.4.- Electrocardiograma .....	180
1.5.- Parámetros de laboratorio .....	181
1.5.1.- Hematología .....	181
1.5.2.- Bioquímica .....	182
1.5.2.1.- Estándar .....	182
1.5.2.2.- Específica .....	183
1.5.3.- Sedimento urinario .....	183
1.6.- Otras evaluaciones efectuadas en el momento de la selección .....	183
2.- TOLERABILIDAD .....	184
2.1.- Cuestionario de acontecimientos adversos sugeridos .....	185
2.2.- Acontecimientos adversos reportados espontáneamente por los voluntarios y/o alteraciones analíticas evaluadas según las recomendaciones de la OMS <sup>(WHO, 1986)</sup> .....	191
2.3.- Exploración física .....	193
2.4.- Constantes vitales .....	193
2.4.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación).....	193
2.4.2.- Evolución tras la administración de la medicación .....	194
2.4.2.1.- Evolución durante el día 0 (fase de estudio de dosis única (0-24h)) .....	194
2.4.2.2.- Evolución durante el día +12 (fase de estudio de dosis repetida, última administración) .....	196
2.4.2.3.- Evolución global a lo largo del estudio (dosis única y repetida).....	199
2.5.- Electrocardiograma .....	201
2.5.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación).....	201
2.5.2.- Evolución tras administración de la medicación .....	202

2.6.- Parámetros de laboratorio .....	203
2.6.1.- Hematología .....	203
2.6.1.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación) .....	203
2.6.1.2.- Evolución tras administración de la medicación .....	204
2.6.2.- Bioquímica .....	205
2.6.2.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación) .....	205
2.6.2.2.- Evolución tras administración de medicación .....	206
2.6.3.- Sedimento urinario .....	208
2.6.3.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación) .....	208
2.6.3.2.- Evolución tras administración de la medicación .....	208
3.- FARMACOCINÉTICA.....	209
3.1.- Concentraciones plasmáticas.....	209
3.2.- Parámetros farmacocinéticos: aproximación amodelística.....	210
3.2.1.- Tras administración única .....	210
3.2.2.- Tras administración repetida (6 días) .....	211
3.3.- Linealidad cinética tras administración repetida .....	212

**PARTE V: INVESTIGACIÓN “IN NUMERO”: DETERMINACIÓN DE LA PAUTA DE DOSIFICACIÓN A PROPONER PARA CONTINUAR CON EL DESARROLLO DEL COMPUESTO EN PACIENTES ..... 213**

1.- DESARROLLO Y SELECCIÓN DEL MODELO .....	213
1.1.- Modelo para el $CL_H$ y F .....	214
1.2.- Modelo para $CL_{INT}$ .....	215
1.3.- Exploración del modelo .....	222
2.- VALIDACIÓN DEL MODELO .....	223
2.1.- Validación interna .....	223
2.2.- Validación externa .....	224
3.- SIMULACIONES .....	225
3.1.- Propuesta de pauta de dosificación para continuar con el desarrollo clínico del compuesto en pacientes .....	226

**Discusión**

Tolerabilidad y DMT .....	230
Farmacocinética .....	234
Farmacodinamia .....	242
Pauta de dosificación para futuros estudios .....	243
Métodos y procedimientos .....	245

**Conclusiones**

Conclusiones .....	249
--------------------	-----

**Bibliografía**

Bibliografía.....	253
-------------------	-----

**Anexos**

- ANEXO I:** Valores de normalidad del Laboratorio del Centre d'Investigació de Medicaments (PNT FASEI.Doc/015).  
**ANEXO II:** Adverse Reaction Dictionary. WHO Collaborating Centre for International Drug Monitoring (Uppsala 1986).

## Índice de Tablas

<b>Tabla I-1:</b>	Principales efectos fisiológicos de los leucotrienos.....	16
<b>Tabla I-2:</b>	Efecto del LTB <sub>4</sub> sobre los distintos tipos celulares .....	17
<b>Tabla I-3:</b>	Visión general de los receptores CysLT y sus antagonistas .....	26
<b>Tabla I-4:</b>	Características de los antileucotrienos para el asma comercializados .....	29
<b>Tabla I-5:</b>	Características farmacocinéticas de los antagonistas de los leucotrienos y de la 5- LOX .....	34
<b>Tabla I-6:</b>	Acontecimientos adversos más comunes de los antileucotrienos .....	37
<b>Tabla I-7:</b>	Estudios “ <i>in vivo</i> ” frente a estudios “ <i>in numero</i> ”: dimensiones de ambos tipos de estudio.....	57
<b>Tabla I-8:</b>	Actividad antiinflamatoria comparativa de indometacina y AM-24 evidenciada mediante la prueba de la carragenina efectuada en ratas Wistar, tras administración oral de los fármacos.....	80
<b>Tabla M-1:</b>	Esquema del número y distribución de los sujetos del ensayo según el nivel de dosis (Estudio 1).....	94
<b>Tabla M-2:</b>	Tabla de aleatorización de los voluntarios a los distintos tratamientos (Estudio 2).....	95
<b>Tabla M-3:</b>	Distribución temporal de puntos de extracción en cada voluntario en función del nivel de dosis administrada (Estudio 1).....	101
<b>Tabla M-4:</b>	Distribución temporal de las extracciones para el estudio farmacocinético a dosis única y repetida (Estudio 2).....	102
<b>Tabla M-5:</b>	Parámetros farmacocinéticos estudiados. Para cada uno de los parámetros se calculó la media, desviación estándar, mínimo y máximo.....	106
<b>Tabla M-6:</b>	Distribución temporal de puntos de extracción sanguínea para la caracterización farmacodinámica.....	107
<b>Tabla M-7:</b>	Tabla resumen de los estudios 1 y 2.....	125
<b>Tabla R-II-1:</b>	Medias y desviación estándar (DE) de los parámetros demográficos de los voluntarios sanos que recibieron medicación, para cada una de las dosis administradas.....	135
<b>Tabla R-II-2:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de las constantes vitales (PAS, PAD, FC y T), obtenidos en los voluntarios sanos en el momento de la selección, para cada una de las dosis posteriormente administradas.....	137
<b>Tabla R-II-3:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de los principales parámetros electrocardiográficos (ECG de 12 derivaciones) obtenidos en los voluntarios sanos en el momento de la selección, para cada una de las dosis posteriormente administradas.....	138
<b>Tabla R-II-4:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de los parámetros hematológicos obtenidos en los voluntarios sanos en el momento de la selección, para cada una de las dosis posteriormente administradas.....	139
<b>Tabla R-II-5:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de los parámetros bioquímicos obtenidos en los voluntarios sanos en el momento de la selección, para cada una de las dosis posteriormente administradas.....	140
<b>Tabla R-II-6:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de los niveles de TSH obtenidos en los voluntarios sanos en el momento de la selección, para cada una de las dosis posteriormente administradas.....	141
<b>Tabla R-II-7:</b>	Número de individuos que reportan cada uno de los acontecimientos adversos sugeridos, expresado por tipo de acontecimiento adverso y por tratamiento administrado, en orden de frecuencia.....	144
<b>Tabla R-II-8:</b>	Número total de ocasiones en las que se reportan acontecimientos adversos sugeridos en orden de frecuencia con relación al tratamiento administrado y al momento de notificación (basal/final).....	145
<b>Tabla R-II-9:</b>	Tabla resumen del número de AA sugeridos desglosados por tratamiento y momento de la notificación (basal/final).....	147
<b>Tabla R-II-10:</b>	Acontecimientos adversos notificados espontáneamente por los voluntarios sanos y/o alteraciones analíticas evidenciadas durante el estudio.....	148
<b>Tabla R-II-11:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de los principales parámetros hemodinámicos (PAS, PAD, FC y T) obtenidos en el periodo basal (premedicación), para cada una de las dosis administradas.....	150
<b>Tabla R-II-12:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de los principales parámetros electrocardiográficos (ECG de 12 derivaciones) obtenidos en los voluntarios sanos en el periodo basal (premedicación), para cada una de las dosis administradas.....	153
<b>Tabla R-II-13:</b>	Parámetros obtenidos a partir del electrocardiograma que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +24 horas tras administración de la medicación.....	154

<b>Tabla R-II-14:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de los parámetros hematológicos obtenidos en los voluntarios sanos en el periodo basal (premedicación), para cada una de las dosis.....	155
<b>Tabla R-II-15:</b>	Parámetros hematológicos que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +24 horas tras administración de la medicación. ....	156
<b>Tabla R-II-16:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de los parámetros bioquímicos obtenidos en los voluntarios sanos en el periodo basal (premedicación), para todas las dosis administradas. ....	157
<b>Tabla R-II-17:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de los niveles plasmáticos de TSH obtenidos en los voluntarios sanos en el periodo basal (premedicación) para todas las dosis administradas. ....	158
<b>Tabla R-II-18:</b>	Parámetros bioquímicos que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +24 horas tras administración de la medicación. ....	159
<b>Tabla R-II-19:</b>	Observaciones de los niveles de TSH que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +24 horas tras administración de la medicación.....	160
<b>Tabla R-II-20:</b>	Descriptivos de los parámetros farmacocinéticos que caracterizan la biodisponibilidad (magnitud y velocidad): media (desviación estándar). ....	162
<b>Tabla R-II-21:</b>	Descriptivos de los parámetros farmacocinéticos que caracterizan la distribución y la eliminación: media (desviación estándar).....	163
<b>Tabla R-II-22:</b>	Media (desviación estándar) del porcentaje de extrapolación del AUC desde el último punto experimental hasta el infinito, según la dosis administrada. ....	163
<b>Tabla R-II-23:</b>	Valores de “p” tras la realización del ANOVA de un solo factor, del Test de Kruskal-Wallis o de la Prueba de Jonckheere-Terpstra (Homogeneidad de las varianzas comprobada mediante el test de Levene).....	164
<b>Tabla R-II-24:</b>	Número de voluntario, dosis administrada, tiempo de extracción final (ya que el tiempo basal siempre fue 0), concentraciones plasmáticas de AM-24 en mg/L obtenidas a tiempo final (a tiempo basal son todas igual a 0), concentración basal y final de LTB <sub>4</sub> en $\mu$ g/L (LTB <sub>4</sub> B y LTB <sub>4</sub> F, respectivamente).....	166
<b>Tabla R-II-25:</b>	Parámetros farmacodinámicos finales. ....	167
<b>Tabla R-III-1:</b>	Comparación del AIC en las distintas estrategias de cálculo y en los distintos modelos farmacocinéticos.....	169
<b>Tabla R-III-2:</b>	Comparación del índice de Correlación en las distintas estrategias de cálculo y en los distintos modelos farmacocinéticos. ....	170
<b>Tabla R-III-3:</b>	Comparación de la inclusión o no del 0 en los IC de los parámetros obtenidos en las distintas estrategias de cálculo y en los distintos modelos farmacocinéticos. ....	172
<b>Tabla R-III-4:</b>	Valores obtenidos para los parámetros farmacocinéticos calculados mediante el ajuste de un modelo farmacocinético monocompartmental con eliminación lineal bajo la estrategia de promediado simple. ....	173
<b>Tabla R-III-5:</b>	Parámetros empleados para las dosis de 240mg, 350mg y 500mg de AM-24.....	174
<b>Tabla R-III-6:</b>	Tabla resumen de los parámetros finales obtenidos tras la simulación a dosis repetida. ....	176
<b>Tabla R-IV-1:</b>	Medias y desviaciones estándar (DE) de los parámetros demográficos de los voluntarios sanos que participaron en el estudio, para cada una de las dosis administradas y para placebo.....	178
<b>Tabla R-IV-2:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de las constantes vitales (PAS, PAD, FC y T) obtenidos en los voluntarios sanos el momento de la selección, para cada una de las dosis que serían administradas posteriormente y placebo. ....	180
<b>Tabla R-IV-3:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de los principales parámetros electrocardiográficos (ECG de 12 derivaciones) obtenidos en los voluntarios sanos en el momento de la selección, para cada una de las dosis que serían administradas posteriormente y placebo.....	180
<b>Tabla R-IV-4:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de los parámetros hematológicos obtenidos en los voluntarios sanos en el momento de la selección, para cada una de las dosis que serían administradas posteriormente y placebo. ....	181
<b>Tabla R-IV-5:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de los parámetros bioquímicos obtenidos en los voluntarios sanos en el momento de la selección, para cada una de las dosis que serían administradas posteriormente y placebo. ....	182
<b>Tabla R-IV-6:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de los niveles de TSH obtenidos en los voluntarios sanos en el momento de la selección, para cada una de las dosis que serían administradas posteriormente y placebo. ....	183
<b>Tabla R-IV-7:</b>	Número de individuos que reportan cada uno de los acontecimientos adversos sugeridos, expresado por tipo de acontecimiento adverso y por tratamiento administrado, en orden de frecuencia.....	185

<b>Tabla R-IV-8:</b>	Número total de ocasiones en las que se reportan acontecimientos adversos sugeridos en orden de frecuencia con relación al tratamiento administrado, al período del estudio (dosis única/dosis repetida) y al momento de notificación (basal/final). .....	186
<b>Tabla R-IV-9:</b>	Tabla resumen del número de AA sugeridos desglosados por tratamiento, momento de la notificación (basal/final) y períodos del estudio (dosis única/dosis repetida). .....	190
<b>Tabla R-IV-10:</b>	Acontecimientos adversos notificados espontáneamente por los voluntarios sanos y/o alteraciones analíticas evidenciadas durante el estudio. ....	191
<b>Tabla R-IV-11:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de los principales parámetros hemodinámicos (PAS, PAD, FC, y T) obtenidos en los voluntarios sanos a tiempo basal (premedicación), para cada una de las dosis administradas y placebo. ....	194
<b>Tabla R-IV-12:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de los principales parámetros electrocardiográficos (ECG de 12 derivaciones) obtenidos en los voluntarios sanos a tiempo basal (día 0), para cada una de las dosis administradas y placebo. ....	202
<b>Tabla R-IV-13:</b>	Parámetros obtenidos a partir del electrocardiograma que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +18 días, al finalizar el estudio. ....	202
<b>Tabla R-IV-14:</b>	Parámetros obtenidos a partir del electrocardiograma que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a + 1, +5, +9, +12 y +13 días postmedicación. ....	203
<b>Tabla R-IV-15:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de los parámetros hematológicos obtenidos en los voluntarios sanos a tiempo basal, para cada una de las dosis administradas y placebo. ....	204
<b>Tabla R-IV-16:</b>	Parámetros hematológicos que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +18 días, al finalizar el estudio. ....	204
<b>Tabla R-IV-17:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de los parámetros bioquímicos obtenidos en los voluntarios sanos a tiempo basal, para cada una de las dosis administradas y placebo. ....	205
<b>Tabla R-IV-18:</b>	Valores medios ( $\pm$ DE) de los niveles de TSH obtenidos en los voluntarios sanos a tiempo basal, para cada una de las dosis administradas y placebo. ....	206
<b>Tabla R-IV-19:</b>	Parámetros bioquímicos que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +18 días, al finalizar el estudio. ....	207
<b>Tabla R-IV-20:</b>	Observaciones de los niveles de TSH que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +18 días, al finalizar el estudio. ....	207
<b>Tabla R-IV-21:</b>	Descriptivos de los parámetros farmacocinéticos que caracterizan la biodisponibilidad (magnitud y velocidad): media (desviación estándar) tras administración única. ....	210
<b>Tabla R-IV-22:</b>	Descriptivos de los parámetros farmacocinéticos que caracterizan la distribución y la eliminación: media (desviación estándar) tras administración única. ....	210
<b>Tabla R-IV-23:</b>	Descriptivos de los parámetros farmacocinéticos que caracterizan la biodisponibilidad (magnitud y velocidad): media (desviación estándar) tras administración repetida. ....	211
<b>Tabla R-IV-24:</b>	Descriptivos de los parámetros farmacocinéticos que caracterizan la distribución y la eliminación: media (desviación estándar) tras administración repetida. ....	211
<b>Tabla R-IV-25:</b>	Comparación entre AUCs, Vd/F, Cl/F, $k_e$ y $t_{1/2}$ tras administración única y los mismos parámetros obtenidos tras administración repetida, para cada una de las dosis (Test de datos apareados). ....	212
<b>Tabla R-V-1:</b>	Resultados del AIC de los diferentes modelos evaluados .....	215
<b>Tabla R-V-2:</b>	Parámetros farmacocinéticos poblacionales obtenidos del modelo finalmente seleccionado. ....	218
<b>Tabla D-1:</b>	Parámetros farmacocinéticos que caracterizan la absorción del AM-24 obtenidos por las distintas aproximaciones de cálculo realizadas. ....	236
<b>Tabla D-2:</b>	Parámetros farmacocinéticos que caracterizan la distribución del AM-24 obtenidos por las distintas aproximaciones de cálculo realizadas. ....	237
<b>Tabla D-3:</b>	Parámetros farmacocinéticos que caracterizan la eliminación del AM-24 obtenidos por las distintas aproximaciones de cálculo realizadas. ....	239



## Índice Figuras

<b>Figura I-1:</b>	Mediadores de la inflamación: Estructuras del ácido araquidónico, de los anillos fundamentales de las prostaglandinas naturales D,E y F, de los endoperóxidos ciclicos G y H, de la prostaciclina (I) y del tromboxano A (TXA).....	5
<b>Figura I-2:</b>	Vía de la ciclooxigenasa (COX): biosíntesis de los derivados del ácido araquidónico producidos por ciclooxigenación. ....	8
<b>Figura I-3:</b>	Vía de la lipooxigenasa (LOX): biosíntesis de los derivados del ácido araquidónico producidos por la acción de las 5, 12 y 15 lipooxigenasas. ....	10
<b>Figura I-4:</b>	Puntos de actuación de los antileucotrienos .....	25
<b>Figura I-5:</b>	Opciones terapéuticas de tratamiento de mantenimiento en niños, recomendadas por la Guía Española para el tratamiento del Asma (GEMA) .....	38
<b>Figura I-6:</b>	Opciones terapéuticas de tratamiento de mantenimiento en adultos, recomendadas por la Guía Española para el tratamiento del Asma (GEMA). ....	39
<b>Figura I-7:</b>	Ilustración gráfica de los distintos componentes de los estudios de fase I .....	43
<b>Figura I-8:</b>	Representación esquemática de un modelo poblacional en que se puede observar la integración entre el modelo estructural y el estadístico. ....	60
<b>Figura I-9:</b>	Áreas de la farmacología en las que los estudios “ <i>in numero</i> ” han mostrado su utilidad y relevancia. ....	65
<b>Figura M-1:</b>	Modelo farmacodinámico de efecto inhibitorio de tipo sigmoide con efecto residual por encima de la línea basal .....	108
<b>Figura M-2:</b>	Modelo monocompartimental con eliminación lineal .....	116
<b>Figura M-3:</b>	Modelo bicompartimental con eliminación lineal .....	117
<b>Figura M-4:</b>	Modelo monocompartimental con eliminación de Michaelis-Menten. ....	118
<b>Figura R-I-1:</b>	Árbol de decisión para el cálculo de la dosis de inicio .....	130
<b>Figura R-II-1:</b>	Número de AA notificados en el cuestionario de acontecimientos sugeridos en función del tratamiento administrado y desglosado según el momento de la notificación (basal/final).....	147
<b>Figura R-II-2:</b>	Representación gráfica de los valores medios de la presión arterial sistólica obtenidos para cada una de las dosis administradas. ....	151
<b>Figura R-II-3:</b>	Representación gráfica de los valores medios de la presión arterial diastólica obtenidos para cada una de las dosis administradas. ....	151
<b>Figura R-II-4:</b>	Representación gráfica de los valores medios de la frecuencia cardiaca obtenidos para cada una de las dosis administradas. ....	152
<b>Figura R-II-5:</b>	Representación gráfica de los valores medios de la temperatura axilar obtenidos para cada una de las dosis administradas. ....	152
<b>Figura R-II-6:</b>	Valores medios de las concentraciones plasmáticas de AM-24 a lo largo del tiempo tras una única administración oral de distintas dosis.....	161
<b>Figura R-II-7:</b>	Parámetros farmacocinéticos en que se han hallado diferencias estadísticamente significativas en relación a las diferentes dosis administradas, tras aplicar el test de Duncan o de Conover, según la homogeneidad de las varianzas comprobada. ....	165
<b>Figura R-II-8:</b>	Representación gráfica de la relación entre las distintas concentraciones plasmáticas de AM-24 y la magnitud del efecto sobre las concentraciones finales de LTB <sub>4</sub> .....	167
<b>Figura R-III-1:</b>	Concentración (mg/L)-tiempo (h) de la simulación a dosis repetida para la dosis de 240 mg.....	174
<b>Figura R-III-2:</b>	Concentración (mg/L)-tiempo(h) de la simulación a dosis repetida para la dosis de 350mg .....	175
<b>Figura R-III-3:</b>	Concentración (mg/L)-tiempo(h) de la simulación a dosis repetida para la dosis de 500mg. ....	176
<b>Figura R-IV-1:</b>	Número de AA notificados en el cuestionario de acontecimientos sugeridos en función del tratamiento administrado y desglosado según el momento de la notificación (basal/final).....	189
<b>Figura R-IV-2:</b>	Número de AA notificados en el cuestionario de acontecimientos sugeridos en función del tratamiento administrado y desglosado en relación al período de tratamiento (dosis única/repetida) .....	190
<b>Figura R-IV-3:</b>	Representación gráfica de los valores medios de la presión arterial sistólica obtenidos de 0-24 horas (día 0) para todas las dosis administradas.....	194

<b>Figura R-IV-4:</b>	Representación gráfica de los valores medios de la presión arterial diastólica obtenidos de 0-24 horas (día 0) para todas las dosis administradas.....	195
<b>Figura R-IV-5:</b>	Representación gráfica de los valores medios de la frecuencia cardiaca obtenidos de 0-24 horas (día 0) para todas las dosis administradas.....	195
<b>Figura R-IV-6:</b>	Representación gráfica de los valores medios de la temperatura axilar obtenidos de 0-24 horas (día 0) para todas las dosis administradas.....	196
<b>Figura R-IV-7:</b>	Representación gráfica de los valores medios de la presión arterial sistólica obtenidos de +288 a +312 horas (día +12) para todas las dosis administradas.....	197
<b>Figura R-IV-8:</b>	Representación gráfica de los valores medios de la presión arterial diastólica obtenidos de +288 a +312 horas (día +12) para todas las dosis administradas.....	197
<b>Figura R-IV-9:</b>	Representación gráfica de los valores medios de la frecuencia cardiaca obtenidos de +288 a +312 horas (día +12) para todas las dosis administradas.....	198
<b>Figura R-IV-10:</b>	Representación gráfica de los valores medios de la temperatura axilar obtenidos de +288 a +312 horas (día +12) para todas las dosis administradas.....	198
<b>Figura R-IV-11:</b>	Representación gráfica de los valores medios de la presión arterial sistólica obtenidos a lo largo de todo el estudio (dosis única y repetida) para todas las dosis administradas.....	199
<b>Figura R-IV-12:</b>	Representación gráfica de los valores medios de la presión arterial diastólica obtenidos a lo largo de todo el estudio (dosis única y repetida) para todas las dosis administradas.....	200
<b>Figura R-IV-13:</b>	Representación gráfica de los valores medios de la frecuencia cardiaca obtenidos a lo largo de todo el estudio (dosis única y repetida) para todas las dosis administradas.....	200
<b>Figura R-IV-14:</b>	Representación gráfica de los valores medios de la temperatura axilar obtenidos a lo largo de todo el estudio (dosis única y repetida) para todas las dosis administradas.....	201
<b>Figura R-IV-15:</b>	Valores medios de las concentraciones plasmáticas de AM-24 a lo largo del tiempo para las 3 dosis administradas (240mg, 350mg y 500mg).....	209
<b>Figura R-V-1:</b>	Perfiles de concentración media observada (símbolos) y predicciones típicas poblacionales obtenidas a partir de un modelo farmacocinético lineal (líneas) frente al tiempo.....	214
<b>Figura R-V-2:</b>	Representación esquemática del modelo farmacocinético seleccionado; $K_A$ , constante de velocidad de absorción de 1 <sup>er</sup> orden; C, Concentración plasmática; V, volumen de distribución aparente; $Cl$ , aclaramiento plasmático susceptible de inhibición por el fármaco; $Cl_2$ , aclaramiento plasmático representando vías de eliminación no afectadas por AM-24; $K_{ENZ}$ , constante de velocidad de 1 <sup>er</sup> orden que controla la velocidad de recambio de la cantidad de enzima.....	216
<b>Figura R-V-3:</b>	Perfiles de concentración media observada (símbolos) y predicciones típicas poblacionales obtenidas a partir del modelo seleccionado (líneas) frente al tiempo.....	216
<b>Figura R-V-4:</b>	Perfiles individuales de concentración observada (puntos) y predicciones individuales (líneas continuas) frente al tiempo para los individuos que recibieron la dosis de 240mg.....	219
<b>Figura R-V-5:</b>	Perfiles individuales de concentración observada (puntos) y predicciones individuales (líneas continuas) frente al tiempo para los individuos que recibieron la dosis de 350mg.....	220
<b>Figura R-V-6:</b>	Perfiles individuales de concentración observada (puntos) y predicciones individuales (líneas continuas) frente al tiempo para los individuos que recibieron la dosis de 500mg.....	221
<b>Figura R-V-7:</b>	Exploración del comportamiento farmacocinético de AM-24 tras su administración oral en dosis de 120mg (trazos) y 500mg (línea continua). Panel superior derecho, puntos 120mg, cruces 500mg.....	222
<b>Figura R-V-8:</b>	Puntos blancos, observaciones experimentales; puntos negros, media de las observaciones; Líneas a trazos, percentiles 5 y 95 de las 1000 simulaciones; línea continua, mediana de las 1000 simulaciones.....	223
<b>Figura R-V-9:</b>	Puntos, observaciones experimentales obtenidas en voluntarios sanos tras dosis única, estudio 1; líneas continuas, predicciones obtenidas en base al modelo seleccionado en el estudio de dosis repetidas, estudio 2.....	224
<b>Figura R-V-10:</b>	Perfiles de concentraciones plasmáticas simuladas de AM-24 vs tiempo tras 28 días de una administración oral única diaria de 120, 240, 350 y 500 mg. Las líneas horizontales muestran los niveles plasmáticos de AM-24 necesarios para alcanzar un 50, 75 ó 90% de inhibición máxima de la síntesis de $LTB_4$ .....	225

# INTRODUCCIÓN



# 1.- MEDIADORES DE LA COMUNICACIÓN BIOLÓGICA A PARTIR DE LOS FOSFOLÍPIDOS DE MEMBRANA

## 1.1.- Inflamación

### 1.1.1.- Concepto

La inflamación es la respuesta defensiva de los tejidos vascularizados ante cualquier tipo de agresión (estímulos físicos –calor, traumatismos-, químicos –ácido úrico, pirofosfato-, biológicos –bacterias, virus- o inmunológicos –inmunocomplejos, entre otros). La reacción vascular es el componente más importante de la inflamación. Permite la afluencia a la zona afectada de moléculas y células, encargadas de neutralizar y retirar los agentes agresores y los restos de tejido dañado. El objetivo final de la respuesta inflamatoria es, en definitiva, la reparación del daño sufrido por el organismo, mediante la proliferación de células específicas, con regeneración total o bien su substitución por fibroblastos, dejando en este caso como secuela una cicatriz.

Entre los mediadores de la inflamación se encuentran los metabolitos del ácido araquidónico (mediadores de la comunicación biológica a partir de los fosfolípidos de membrana), que son agentes biológicos muy potentes con una amplia variedad de efectos. Su concentración en sangre circulante es mínima, por ser altamente inestables (tromboxano  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>) y prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) o por la acción de enzimas que los degradan con rapidez. Su corta vida media explica que actúen a nivel local, allí donde son generados y durante períodos breves. Además, estos mediadores no pueden ser almacenados, sino que deben ser sintetizados “*de novo*” por las células ante los estímulos adecuados <sup>(Álvaro y López Bote, 1996)</sup>. El ácido araquidónico deriva del metabolismo del ácido linoléico. Se ingiere como componente de la carne y se almacena formando parte de los fosfolípidos de la membrana celular <sup>(Lapetina, 1982)</sup>. Su liberación se produce como respuesta a un número diverso de estímulos físicos, químicos o mecánicos y es metabolizado por dos sistemas enzimáticos principales: i) la ciclooxigenasa (COX), de cuya actuación proceden los prostanoideos (prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) y la PGI<sub>2</sub>); en la actualidad se conoce la existencia de, por lo menos, dos tipos de COX: hay una enzima constitutiva, que se encuentra en todas las células nucleadas del organismo

(COX-1) y una forma inducible por la acción de sustancias proinflamatorias (COX-2). Una vez iniciada la síntesis por la COX-1 o COX-2, el tipo de prostanoide producido en cada tejido dependerá del enzima/isomerasa que éste posea y ii) las diversas lipoxigenasas (LOX) (5-lipoxigenasa, 12-lipoxigenasa y 15-lipoxigenasa), que median la producción de los leucotrienos, lipoxinas y hepoxilinas (quimiotaxinas), respectivamente (Sharma y Sharma, 1997).

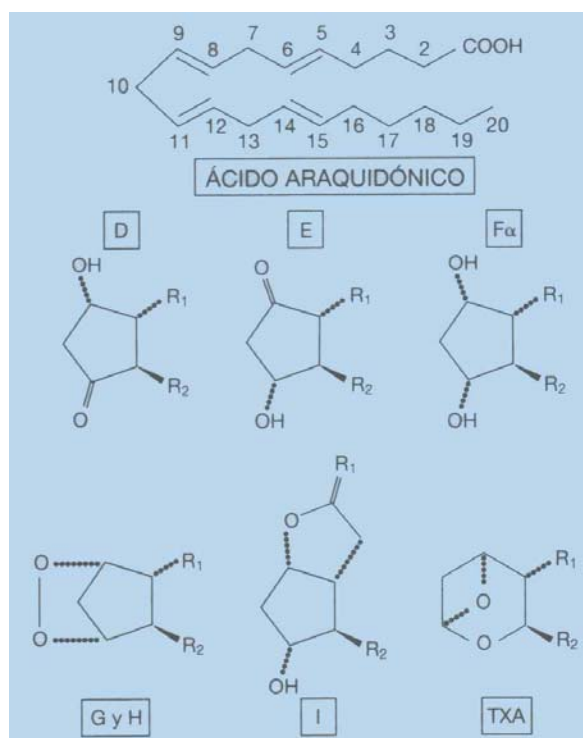
### 1.1.2.- Mediadores

#### Estructura Química:

Todos estos compuestos derivados de la metabolización del ácido araquidónico, que es el ácido poli-insaturado más relevante de los lípidos de membrana, se denominan eicosanoides, tienen estructuras químicas diferentes entre sí y únicamente tienen en común 20 átomos de carbono en su molécula condicionado por sus precursores comunes.

Los prostanoideos, (las PGs, los TXs y la PGI<sub>2</sub>) están formados por un anillo ciclopentano y dos cadenas laterales. La estructura del anillo con diversas sustituciones, es designada por las letras mayúsculas A, B, C, etc.; la posición del OH en el carbono 9 da origen a dos formas:  $\alpha$  y  $\beta$ . El subíndice 1, 2 y 3 señala el número de enlaces dobles en las cadenas laterales e identifica el ácido graso precursor; por ejemplo, los derivados del ácido araquidónico forman la serie 2, que es la más importante en el ser humano. Así, en la figura I-1, se pueden observar los anillos fundamentales de las PGs D, E y F, de los endoperóxidos cíclicos G y H, de la PGI<sub>2</sub> y del tromboxano A (TXA).

**Figura I-1:** Mediadores de la inflamación: Estructuras del ácido araquidónico, de los anillos fundamentales de las prostaglandinas naturales D,E y F, de los endoperóxidos cíclicos G y H, de la prostaciclina (I) y del tromboxano A (TXA).



Los leucotrienos (LT) son sustancias que carecen de anillo. Su disposición lineal posee los enlaces dobles propios del ácido graso precursor, cuatro en el caso del ácido araquidónico, si bien tres de ellos están dispuestos de manera conjugada. Su nombre deriva de su estructura química y del hecho de que su síntesis mayoritaria se realiza en los leucocitos <sup>(Samuelsson, 1983)</sup>. La letra que acompaña al leucotrieno (LT), A, B, C, D, E o F, indica la naturaleza de los sustituyentes y el subíndice numérico indica el número de dobles enlaces presentes en la molécula. Esta nomenclatura es análoga a la utilizada para los prostanoideos. El sitio de oxidación inicial es el carbono 5, por lo que derivan del ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE), y se denominan LTA<sub>4</sub>, LTB<sub>4</sub>, etc. Existen otros derivados eicosanoides con oxidación en posición 12 (12-HPETE) y 15 (15-HPETE) y que dan lugar a las hepoxilinas y lipoxinas respectivamente <sup>(Esplugues y Barrachina, 2003)</sup>. Todo ello se puede observar en la figura I-3.

## 1.2.- Eicosanoides

### 1.2.1.- Biosíntesis de los eicosanoides

La liberación del ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de la membrana es el paso limitante que condiciona la velocidad de síntesis de los eicosanoides. Se desencadena como respuesta a estímulos de muy diverso origen: impulso nervioso, antígenos, reacciones inmunitarias, daño celular, isquemia, hormonas, neuropéptidos, etc. Intervienen dos mecanismos diferentes: el primero, de un solo paso, catalizado por la fosfolipasa A<sub>2</sub> (FLA<sub>2</sub>) escinde la estructura de los glicerofosfolípidos liberando el ácido graso y un lisofosfolípido. En el segundo mecanismo, en que intervienen 2 pasos sucesivamente, primeramente, se rompe el fosfolípido por la acción de la fosfolipasa C (FLC) en la unión éster-fosfato y se produce 1,2-diaglicerol, sobre el cual actúan a continuación diversas lipasas que originan ácido araquidónico y glicerol <sup>(Samuelsson et al., 1987; Esplugues y Barrachina, 2003; Sharma y Mohammed, 2005)</sup>.

### 1.2.2.- Catabolismo del ácido araquidónico

#### 1.2.2.1.- Vía de la ciclooxigenasa (COX)

La ciclooxigenasa se encuentra en la mayoría de las células de los mamíferos y fue la primera enzima microsómica descrita con capacidad de actuar sobre el ácido araquidónico libre. Existen principalmente dos isoformas, la COX-1 y la COX-2. Ambas isoenzimas presentan una homología del 60%, manifiestan valores similares de K<sub>m</sub>, los mismos sitios de unión para el ácido araquidónico y se metabolizan mediante mecanismos similares. Sin embargo, se diferencian en su especificidad de sustrato, pues la COX-2 acepta mayor rango de ellos que la COX-1. Se ha demostrado que los genes encargados de su síntesis son diferentes, de manera que los relacionados con al COX-2 tienen lugares de unión específicos para los glucocorticoides, interleucina 6 (IL-6) y otras citocinas. La COX-1 es una enzima constitutiva encargada de la síntesis de prostanoides, implicados en la homeostasis general y, en consecuencia, está expresada en la mayoría de los tejidos del organismo (riñón, estómago, plaquetas, vasos), si bien los niveles de dicha expresión pueden variar entre los distintos tipos celulares. Los valores de esta enzima se mantienen constantes dentro de una misma población celular, aunque pueden aparecer pequeños incrementos por estímulos hormonales o factores del crecimiento. El endotelio vascular y las plaquetas se caracterizan por presentar niveles de COX-1 muy elevados <sup>(Esplugues y Barrachina, 2003)</sup>.



La COX-2, por el contrario, es una isoenzima indetectable de forma basal en la mayoría de los tejidos y se encarga de producir prostanoïdes en los lugares inflamados o que han padecido un daño celular. Hay ciertas excepciones, ya que se han encontrado niveles altos de esta isoenzima en la próstata, el timo del recién nacido y el cerebro. En el resto de tejidos, su expresión puede ser precipitada por estímulos adecuados (mitógenos, citocinas, factores tumorales) y es inhibida por la acción de los corticoides.

Datos recientes sugieren que podría existir otro tipo de COX a nivel cerebral que sería inhibida selectivamente por el paracetamol, fenacetina, antipirina y dipirona y que se denomina COX-3. La inhibición de este isoenzima de la COX, parece que podría representar el mecanismo primario central por el que actuarían estos fármacos para disminuir el dolor y probablemente la fiebre (Chandrasekharan et al., 2002).

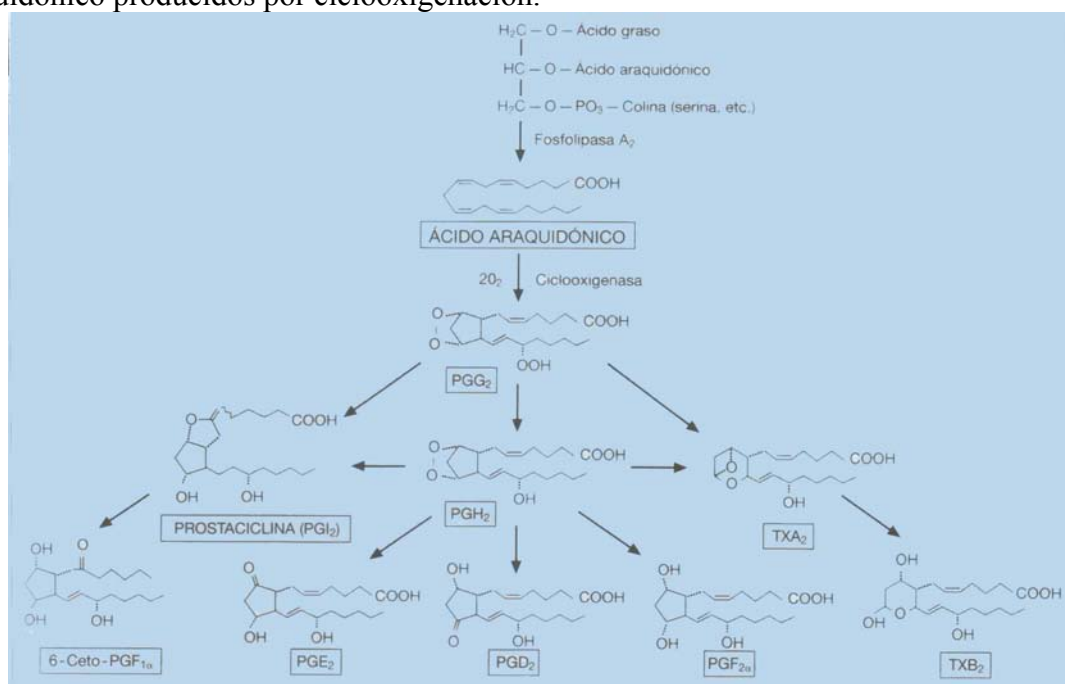
### **Actuación de la COX**

La COX tiene una doble acción sobre el ácido araquidónico: primeramente se encarga de su ciclación y oxigenación formando la prostaglandina  $G_2$  ( $PGG_2$ ) y después reduce la  $PGG_2$  y origina la prostaglandina  $H_2$  ( $PGH_2$ ). Estos dos compuestos se denominan endoperóxidos intermedios, son químicamente inestables pero tienen una gran actividad biológica. La mayoría de los tejidos son capaces de sintetizar endoperóxidos intermedios.

A partir de la  $PGH_2$  a través de la acción de las endoperóxido-isomerasas se sintetizan la prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) y la prostaglandina  $D_2$  ( $PGD_2$ ) y tras un proceso de reducción la  $PGF_{2\alpha}$ .

Sobre la  $PGH_2$  también pueden actuar otros 2 enzimas: la tromboxano-sintetasa y la prostaciclín-sintetasa. A través de la acción de la tromboxano sintetasa se originan dos compuestos inestables muy potentes, el  $TXA_2$  que se metaboliza muy rápidamente (semivida inferior a 3 minutos) de forma no enzimática y el  $TXB_2$ , mucho más estable desde el punto de vista químico, pero también biológicamente mucho menos potente. A través de la acción de la prostaciclín-sintetasa se origina la  $PGI_2$ , que también se metaboliza muy rápidamente (semivida inferior a 3 minutos) (Samuelsson., 1987; Esplugues y Barrachina, 2003).

**Figura I-2:** Vía de la ciclooxygenasa (COX): biosíntesis de los derivados del ácido araquidónico producidos por ciclooxygenación.



PG: prostaglandina. TX: Tromboxano.

### 1.2.2.2.- Vía de la lipoxigenasa (LOX)

Las lipoxigenasas constituyen una familia de enzimas citosólicas encargadas de oxidar (sin ciclar) los ácidos grasos poliéncicos a la altura del carbono 5 (5-lipoxigenasa), 12 (12-lipoxigenasa) o 15 (15-lipoxigenasa) formando los correspondientes hidroperóxidos lipídicos: HPETE, que conforman el sustrato de los leucotrienos y otros eicosanoides.

La actuación de la 12-lipoxigenasa sobre el ácido araquidónico produce el 12-HPETE, mientras que la 15-lipoxigenasa sintetiza el 15-HPETE. Los derivados del 12-HPETE se denominan hepoxilinas y tienen un papel fisiológico poco estudiado. Las lipoxinas, originadas en los neutrófilos tienen un origen combinado entre la 15- y la 5-lipoxigenasa (Samuelsson et al., 1987; Esplugues y Barrachina, 2003).

La 5-lipoxigenasa es la más importante de las tres y se localiza sobre todo en células que participan en la respuesta inflamatoria, como los neutrófilos, los eosinófilos, los monocitos, y los macrófagos y da lugar a la formación de leucotrienos. La secuencia de aminoácidos de la 5-lipoxigenasa no se conoció hasta que se consiguió su clonación en 1988, viéndose que se trata de una proteína de 78 kDa, compuesta por 674 aminoácidos.

Al contrario que la ciclooxygenasa, la 5-lipoxigenasa necesita ser activada y ello implica su

movilización desde el citoplasma hasta la membrana celular donde, tras unirse a la proteína activadora de la 5-lipoxigenasa (FLAP), convierte al ácido araquidónico en ácido 5-hidroperoxi 6,8,11,14-eicosatetraenoico (5-HPETE) (Samuelsson et al., 1987; Crooke et al., 1991; Henderson, 1994a).

### **Importancia de la FLAP (“five lipoxygenase activating protein”)**

Hay diversas proteínas que son capaces de unirse a los ácidos grasos (Dixon et al., 1990; Coe y Bernlohr 1998). A pesar de ello las distintas funciones que ejercen son, en su mayoría desconocidas. La FLAP es un miembro de la familia de proteínas con unión a ácidos grasos asociadas a la membrana celular que puede ser importante en diversos contextos. Se trata de una proteína transmembrana de 18 Kda que es un cofactor esencial para la 5-lipoxigenasa (5-LOX) (Mancini et al., 1993). Hay trabajos que muestran que puede tener funciones independientes de la LOX, como por ejemplo, la activación de la COX. Otro ejemplo de su posible actuación independiente sería la acción de ciertos inhibidores de la FLAP (MK886) provocando apoptosis celular incluso en ausencia de LOX. Así la concentración de MK886 necesaria para producir inhibición de la LOX es de unos 3 nM (Vickers, 1995) mientras que para inducir la apoptosis se requieren concentraciones 10 nM.

En cuanto a su acción como activadora de la LOX, se produce mediante un mecanismo que no es del todo conocido, aunque el más plausible, en base a los conocimientos actuales, es el que refiere Ford-Hutchinson (Ford-Hutchinson, 1991). Después de la activación con hidroperóxidos, ATP y  $Ca^{++}$ , la 5-lipoxigenasa se transforma a la forma férrica activa y se transloca a la membrana uniéndose a la FLAP. Una vez situada en la membrana actúa sobre el sustrato que es oxidado mediante un proceso radicalario estereoselectivo. Tanto la actividad enzimática en sí misma como la traslocación a la membrana son dependientes de la concentración de calcio citosólico. El resultado final de la acción de la 5-LOX sobre el ácido araquidónico es la formación de 5-HPETE.

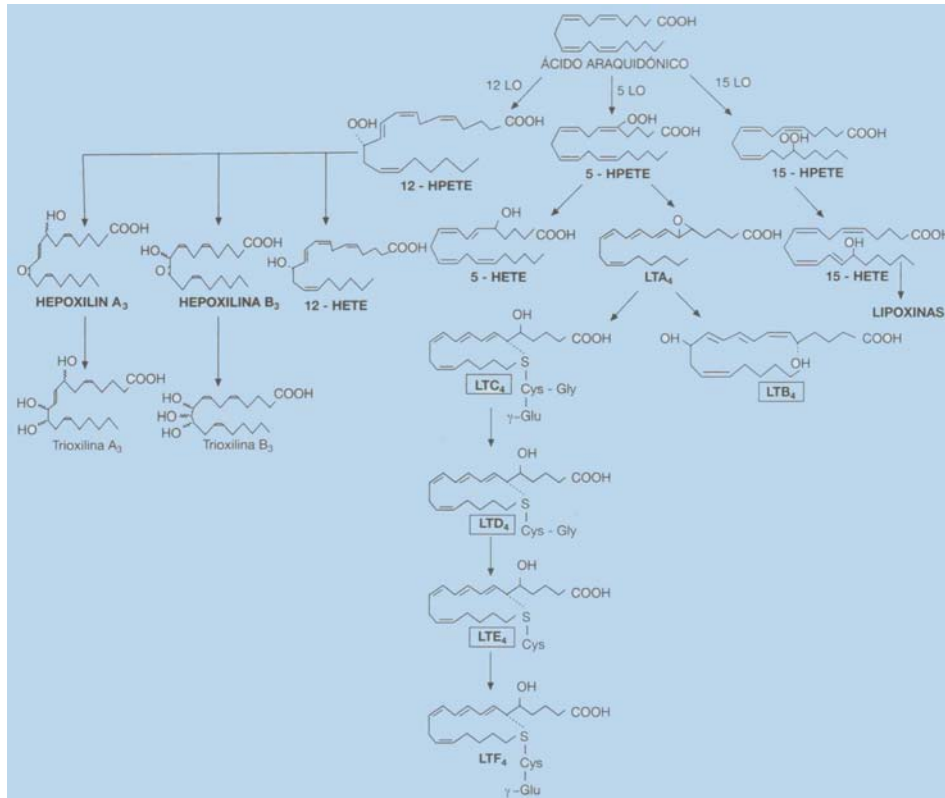
Una vez obtenido el 5-HPETE, éste puede ser metabolizado a su vez por dos vías distintas; pasa a formar ácido 5-hidroeoicosatetraenoico (5-HETE) tras ser degradado por una peroxidasa mientras que si su degradación se produce por la acción de la 5-lipoxigenasa (5-LOX), dará lugar al Leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>). A su vez, el LTA<sub>4</sub>, compuesto con un tiempo de semivida muy corto, puede seguir dos vías metabólicas; por una parte puede dar lugar a productos de

hidrólisis no enzimática, los cuales presentan una actividad reducida, y por otra a productos de hidrólisis enzimática, a través de la leucotrieno-A hidrolasa, como son el leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) y conjugándose con glutatión mediante la glutatión-S-transferasa, los denominados péptido-leucotrienos o cisteinil-leucotrienos [leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), leucotrieno D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) y leucotrieno E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>)] los cuales presentan una gran actividad biológica (Samulesson et al., 1987; Sala et al., 1990; Henderson, 1994a) (Figura I-3).

Las sustancias de reacción lenta liberadas en el curso de las reacciones alérgicas e inmunes, que fueron denominadas SRS-A (“slow reacting substance of anaphylaxis”) son una mezcla de LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>, siendo el LTD<sub>4</sub> el compuesto biológico más activo.

Las diferentes poblaciones celulares son capaces de producir leucotrienos distintos y, por ejemplo, los eosinófilos humanos producen mayoritariamente LTC<sub>4</sub>, mientras que el LTB<sub>4</sub> predomina en los neutrófilos (Henderson, 1994a).

**Figura I-3:** Vía de la lipooxigenasa (LOX): biosíntesis de los derivados del ácido araquidónico producidos por la acción de las 5, 12 y 15 lipooxigenasas.



HPETE: ácido hidroperoxieicosatetraenoico. HETE: ácido hidroeicosatetraenoico. LT: leucotrieno.

### 1.2.3.- Leucotrienos

#### 1.2.3.1.- Control de la producción de LTB<sub>4</sub> y péptido-leucotrienos

La disponibilidad de ácido araquidónico depende del grado de activación de las fosfolipasas de la membrana y del grado de incorporación de ácido araquidónico a los fosfolípidos de membrana. También son fundamentales para la síntesis de LTB<sub>4</sub> la activación de la 5-LOX y de la FLAP.

Las moléculas que inducen el aumento de liberación de ácido araquidónico son las endotoxinas, el complemento 5a (C5a), la interleucina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa), el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GMCSF), el factor inhibidor de leucemia (Lif), el factor activador de las plaquetas (PAF), la elastasa de los neutrófilos y el propio LTB<sub>4</sub> (Dixon et al., 1990).

La activación (“up-regulation”) de la 5-LOX se produce por la presencia de C5a, GMCSF, factor del crecimiento transformador beta (TGF beta), interleucina 8 (IL-8), factor activador de las plaquetas (PAF), formil-metionil-leucil fenilalanina (FMLP), 12-HPETE y LTB<sub>4</sub>.

La expresión de la FLAP aumenta por la acción de la interleucina 3 (IL-3), GMCSF, TNF alfa, vitamina D<sub>3</sub> y dexametasona (Vickers et al, 1995; Crooks y Stockley, 1998).

La expresión de la 5-LOX parece restringida a los leucocitos de la línea mieloide. Sin embargo, otros tipos celulares que no poseen 5-LOX pueden producir LTB<sub>4</sub> y péptido-leucotrienos a partir de LTA<sub>4</sub> (Jakobsson et al., 1991; Griminger et al., 1991; Solá et al., 1992; Busse et al. 1998; Figueroa et al., 2003).

#### 1.2.3.2.- Mecanismo de acción y receptores de leucotrienos

La caracterización de receptores para leucotrienos está poco definida. Se admite la existencia de un receptor común para LTD<sub>4</sub>/LTE<sub>4</sub> cuya activación estimularía la FLC modulando, tanto la producción de inositoltrifosfato, como la movilización de Ca<sup>++</sup> y la génesis de metabolitos del ácido araquidónico con funciones de segundos mensajeros intracelulares. Los estudios con

radioligandos también sugieren la presencia de receptores para  $\text{LTB}_4$  y  $\text{LTC}_4$  capaces de aumentar la producción de inositoltrifosfato<sup>(Sarau et al. 1999)</sup>.

Los receptores para  $\text{LTB}_4$  se encuentran a nivel de la membrana plasmática de los neutrófilos. Son receptores acoplados a proteínas. La unión al receptor puede ser de alta o baja afinidad. Las uniones de alta afinidad dan lugar a la adhesión y migración quimiotáctica de los polimorfonucleares (PMN), mientras que las uniones de baja afinidad, dan lugar a la desgranulación de PMN. Aunque como ya se ha dicho, los receptores se encuentran fundamentalmente a nivel de los neutrófilos, también se ha descrito su presencia a nivel del pulmón. Se han descrito dos tipos de receptores para el  $\text{LTB}_4$ , el receptor de tipo 1 para el leucotrieno B ( $\text{BLT}_1$ ) y el receptor de tipo 2 para el leucotrieno B ( $\text{BLT}_2$ )<sup>(Goldman et al., 1987; Sarau et al, 1999; Heise et al, 2000)</sup>. El  $\text{BLT}_1$ , aunque había sido caracterizado farmacológicamente, no fue hasta 1999 en que se caracterizó su composición molecular; se trata de un receptor unido a proteína de 352 aminoácidos<sup>(McMillan, 2001)</sup>.

Ambos receptores difieren en su afinidad y especificidad para el  $\text{LTB}_4$ ; el receptor de tipo 1 ( $\text{BLT}_1$ ) presenta alta afinidad mientras que el de tipo 2 ( $\text{BLT}_2$ ) es de baja afinidad<sup>(Wang et al., 2000)</sup>. La distribución tisular de ambos receptores es distinta y todavía se desconoce el papel exacto de cada tipo de receptor<sup>(Yokomizo et al., 2001)</sup>.

El resto de péptido-leucotrienos ( $\text{LTC}_4$ ,  $\text{LTD}_4$ ,  $\text{LTE}_4$ ) también se une a dos tipos de receptores específicos para producir su actividad denominados receptor de tipo 1 para los péptido-leucotrienos ( $\text{CysLT}_1$ ) y receptor de tipo 2 para los péptido-leucotrienos ( $\text{CysLT}_2$ ). Al igual que en el caso del receptor de  $\text{BLT}_1$  la caracterización molecular del  $\text{CysLT}_1$  fue posterior a su caracterización farmacológica, e incluso a la aprobación de fármacos antagonistas de dicho receptor. Se trata de un receptor de 336 aminoácidos unido a proteína G<sup>(McMillan, 2001)</sup>. Se ha descrito la presencia de receptores para  $\text{LTC}_4$  a nivel de células endoteliales, riñón y neutrófilos mientras que los de  $\text{LTD}_4$  se han hallado a nivel de PMN y macrófagos alveolares<sup>(Brom et al., 1988; Snyderman y Uhling, 1988; Andazola et al., 1992; Sherman et al., 1992)</sup>. A nivel del receptor  $\text{CysLT}_1$  actúan el  $\text{LTC}_4$ ,  $\text{LTD}_4$  y el  $\text{LTE}_4$ . Sobre el  $\text{CysLT}_2$  únicamente actúan el  $\text{LTC}_4$  y el  $\text{LTD}_4$ .<sup>(Leff, 2001)</sup>. Todo ello tiene implicaciones terapéuticas en cuanto al desarrollo de antagonistas de los distintos tipos de receptores, como se describe más adelante.

### 1.2.3.3.- Actividad biológica del LTB<sub>4</sub> y los péptido-leucotrienos

En un principio, el papel de los leucotrienos parecía que se limitaba a mediar numerosos cuadros fisiopatológicos (asma, bronquitis crónica, fibrosis quística, shock séptico, psoriasis, enfermedad inflamatoria intestinal e isquemia miocárdica) y sólo en fecha reciente empezó a conocerse su posible papel fisiológico en aspectos de la respuesta inflamatoria, en la transmisión nerviosa y, sobre todo en su participación en el proceso de señalización en las vías que conducen a la apoptosis celular <sup>(Tang et al., 2002)</sup>.

Intracelularmente el LTB<sub>4</sub> actúa como ligando del receptor proliferador de peroxisoma activado de tipo alfa (PPAR $\alpha$ ), un factor de transcripción que juega un importante papel en la degradación oxidativa de los ácidos grasos y sus derivados, incluyendo al propio LTB<sub>4</sub> <sup>(Devchand et al., 1996)</sup>.

Los péptido-leucotrienos son mediadores proinflamatorios que juegan un papel importante en la fisiopatología del asma. Son potentes broncoconstrictores, al menos de 100 a 1000 veces más potentes que la histamina. También producen vasoconstricción e incrementan la permeabilidad vascular permitiendo la exudación de macromoléculas desde el plasma, lo que conduce al edema en la vía aérea que caracteriza al asma bronquial <sup>(Bisgaard, 2001)</sup>. Adicionalmente, los péptido-leucotrienos estimulan la secreción mucosa e inhiben la limpieza mucociliar. Hay evidencia de que tanto el LTD<sub>4</sub> como el LTE<sub>4</sub> atraen de forma potente y específica a los eosinófilos, lo que también tiene importancia en la fisiopatología del asma <sup>(Bisgaard, 2001)</sup>.

- **Participación en el proceso inflamatorio**

Los derivados de la lipoxigenasa se forman y son liberados por neutrófilos, eosinófilos y macrófagos convenientemente estimulados.

El LTB<sub>4</sub> es uno de los agentes quimiotácticos más potentes que se conocen; su actividad favorece la concentración de neutrófilos, su desgranulación, la generación de radicales superóxido, agregación y adherencia a las paredes de las vénulas poscapilares. Así mismo facilita la migración de los polimorfonucleares (PMN) a través del endotelio merced a la

interacción entre las integrinas y el resto de las moléculas que intervienen en la adhesividad de los leucocitos al endotelio. Esta potente acción contribuye notablemente a promover la liberación local de mediadores que amplifican de este modo el fenómeno inicial y contribuyen a producir los fenómenos inflamatorios. El LTB<sub>4</sub> también produce hiperalgesia en presencia de neutrófilos. Tanto LTB<sub>4</sub> como el LTC<sub>4</sub> y el LTD<sub>4</sub> facilitan la adhesión y tránsito de leucocitos a través del endotelio vascular mediante la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de leucocitos y células endoteliales, contribuyendo al aumento de la permeabilidad vascular y la permeabilidad plasmática (Henderson, 1994b; Busse et al., 1998).

- **Efectos sobre el sistema vascular**

El LTC<sub>4</sub> y el LTD<sub>4</sub> contraen las arterias coronarias, pulmonares y mesentéricas, careciendo de efectos sobre otros grandes territorios vasculares (Drazen et al., 1980; Soter et al., 1983). Su efecto es particularmente acusado sobre los vasos arteriovenosos de menor calibre y los capilares, donde dosis bajas ocasionan un importante aumento de la permeabilidad endotelial y condicionan a una extravasación plasmática intensa capaz de desencadenar una acusada hipotensión sistémica (Dahlen et al., 1981; Soter et al., 1983; Bisgaard, 2001).

- **Efectos sobre el pulmón**

Los ácidos hidroecosatetraenoicos (HETE), en particular el 15-HETE, son los metabolitos del ácido araquidónico más abundantes en el tejido pulmonar, donde ocasionan un aumento moderado del tono y de la secreción bronquial.

El LTC<sub>4</sub>, el LTD<sub>4</sub> y el LTE<sub>4</sub> también son producidos en los mastocitos y su síntesis es la responsable de los fenómenos de reducción del calibre y aumento de la secreción mucosa bronquial durante las crisis alérgicas; los asmáticos muestran una especial sensibilidad a sus efectos contracturantes. El LTE<sub>4</sub> produce una constricción bronquial inferior a la producida por LTC<sub>4</sub> y LTD<sub>4</sub>, pero de más larga duración. El LTA<sub>4</sub> ocasiona una profunda y duradera contracción del músculo liso bronquial, pero no se ha podido determinar su relación con el broncoespasmo alérgico (Dahlen et al., 1983; Henderson, 1994b; Sharma, 2005).



- **Efectos sobre el Sistema Nervioso**

El principal sistema enzimático encargado de metabolizar el ácido araquidónico en el SNC es el de la 12-LOX. Su síntesis sería iniciada por la activación de un número diverso de receptores en la membrana neuronal y sus acciones consisten en la modulación de la actividad de los canales de  $K^+$  y la inhibición de la actividad proteín-cinasa II  $Ca^{++}$ -calmodulina-dependiente. En consecuencia, provocan inhibición presináptica de la liberación de neurotransmisores, como noradrenalina, histamina, etc (Li et al., 2002). Además algunos de los metabolitos del ácido araquidónico desempeñan un importante papel como segundos mensajeros intraneuronales (hepoxilina A) o como factores de sincronización en la función de un conjunto neuronal (12-HPETE) (Koller et al., 1993).

También existe actividad de la 5-LOX en el tejido nervioso y los leucotrienos resultantes pueden regular la actividad de diferentes canales iónicos de la membrana. Los resultados de un estudio realizado por Klegeris y McGeer en 2003 (Klegeris y McGeer, 2003), sugieren que la inhibición de la producción de leucotrienos mediante inhibidores de la 5-LOX podría reducir selectivamente la toxicidad sobre las células de la microglía y ser por tanto beneficiosa en las patologías neuroinflamatorias.

Entre los leucotrienos, el  $LTB_4$  produce hiperalgesia, pero mediante una acción indirecta, ya que parece que requiere la presencia de leucocitos polimorfonucleares (Andoh y Kuriashi, 2005).

- **Efectos sobre el sistema digestivo**

Los leucotrienos, en particular el  $LTC_4$ , acompañan a los fenómenos ulcerativos que aparecen en multitud de modelos experimentales, proponiéndose como causa de algunos tipos de ulceración péptica o de la enfermedad inflamatoria intestinal. Su acción lesiva sería consecuencia de la reducción del riego sanguíneo de la mucosa, de la vasoconstricción y la extravasación plasmática y de la activación de fenómenos inmunitarios. Algunos derivados de la 5-LOX también desempeñan un importante papel en la regulación de la motilidad gastrointestinal, reduciendo el tiempo de tránsito gastrointestinal, aumentando la secreción de agua y electrolitos. La activación de su síntesis se ha propuesto como causa de diarreas y trastornos motores durante episodios inflamatorios e infecciosos gastrointestinales (Dias et al., 1992).

• **Efectos sobre la piel**

Los efectos fisiopatológicos de los leucotrienos y en particular del LTB<sub>4</sub> sobre la piel son bastante desconocidos. La inactivación inicial del LTB<sub>4</sub> en los queratinocitos, a diferencia de lo que ocurre en hepatocitos y leucocitos, se produce por la enzima 12-hidroxicicosanoide-deshidrogenasa (Wheelan et al., 1993). El LTB<sub>4</sub> ejerce un importante efecto mitogénico a nivel de los queratinocitos epidérmicos “*in vitro*” (Kragballe et al., 1985). Las células epiteliales participan en las fases iniciales de la inflamación como fuente de LTB<sub>4</sub> (Eberhard et al., 2002). La aplicación epicutánea de LTB<sub>4</sub> da lugar a una respuesta inflamatoria (Seyger et al., 1997) y experimentos realizados en animales han mostrado que el LTB<sub>4</sub> puede estar implicado en los mecanismos que conducen al dolor y prurito (Levine et al., 1984; Amann et al., 1996; Andoh, 2006).

En la tabla I-1 se resumen los efectos fisiológicos previamente descritos del LTB<sub>4</sub> y los péptido-leucotrienos sobre los distintos sistemas del organismo.

**Tabla I-1:** Principales efectos fisiológicos de los leucotrienos.

Localización	LTB <sub>4</sub>	LTC <sub>4</sub> -LTD <sub>4</sub>
Músculo liso		
Bronquial	Contrae	Contrae
Uterino	Contrae	Contrae
Gastrointestinal	Contrae	Contrae
Vascular	Nula o contrae	Nula o contrae
<b>Sistemas</b>		
Cardiovascular		Nulo o vasoconstrictor ↑ permeabilidad vascular
Sangre	↑ función leucocitaria	
Digestivo	↑ lesión mucosa	↑ lesión mucosa
Nervioso	↓ Umbral del dolor	Modula la actividad neuronal

• **Efectos sobre la respuesta inmune**

Existe un diálogo cruzado entre las citoquinas y los eicosanoides, fundamentalmente los leucotrienos. Una citoquina denominada GM-CSF estimula la producción de leucotrienos. Por otra parte, el LTB<sub>4</sub> estimula la producción de citoquinas (interleucina 6 (IL-6), IL-1 y factor de necrosis tumoral (TNF)). El LTB<sub>4</sub> estimula así mismo la producción de IL-8 e IL-6, citoquinas implicadas en diversas enfermedades autoinmunes y en procesos inflamatorios crónicos. Por otra parte, la IL-1 y el TNF son capaces de estimular la producción de PGI<sub>1</sub> y PGE<sub>2</sub> quienes a su vez inducen la expresión génica de la ciclooxigenasa (COX).

Otra función importante del LTB<sub>4</sub> es su capacidad de estimular la expresión del receptor de IL-2 fundamental en los procesos de crecimiento y diferenciación de los linfocitos B (Ford-Hutchinson et al., 1980; Long, 1992; Rola-Pleszczynski y Stanková, 1992). Por otra parte, el mismo receptor tiene un papel central en la expresión clonal de linfocitos T activados. También se la ha relacionado con la actividad citotóxica mediada por células K. (Mantovani et al., 1992; Stanková et al., 1992; Smith, 1992; Minami et al., 1992; Gerritsen y Bloor, 1993; Stanková et al., 1993; Stenke et al., 1993; Henderson, 1994a)

Crooks y Stockley (Crooks y Stockley, 1998) han revisado el efecto que produce el LTB<sub>4</sub> sobre los distintos tipos celulares y los resultados se resumen en la tabla I-2.

**Tabla I-2:** Efecto del LTB<sub>4</sub> sobre los distintos tipos celulares.

Tipo celular	Efecto del LTB <sub>4</sub>
Neutrófilos	Quimiotaxis Liberación de enzimas lisosómicas y generación de radicales superóxidos. Producción de IL-8 y LTB <sub>4</sub> Aumenta la expresión del receptor de C3b.
Eosinófilos	Quimiotaxis Activación de la NADPH oxidasa
Monocitos/macrófagos	Quimiotaxis Producción de IL-1, IL-6, IL-8 TNF alfa Expresión del receptor de la IL-2 Expresión de c-fos y c-jun Producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y citotoxicidad tumoral
Linfocitos	Células NK: expresión de la IL-2R beta Células T: producción de IFN gamma, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10. LTs CD8+: proliferación celular LTh CD4+: proliferación disminuida.

Adaptada de Crooks y Stockley, 1998. Explicación de abreviaturas: IL:interleucina. C3b: complemento 3b. NADPH: fosfato dinucleótido de adenosina nicotinamida. c-fos y c-jun: vías de activación intracelulares. IL-2R: receptor de interleucina 2. IFN: interferón. LT: linfocitos T. NK: natural killer. LTs: linfocitos T supresores. LTh: linfocitos T colaboradores.

- **Participación en el proceso de apoptosis celular**

Tanto la 12-LOX como la 5-LOX presentan una función pro-supervivencia y anti-apoptosis en ciertas células de leucemia/linfoma (Tang y Honn, 1997), en células de cáncer de páncreas (Ding et al., 1999), en células de cáncer de mama (Avis et al., 2001) y en células epiteliales neoplásicas intestinales (Mezhybovska et al., 2006).

Desde hace tiempo, <sup>(Levine, 1982)</sup> se sabe que las células tumorales generalmente producen niveles superiores de metabolitos del ácido araquidónico que las células normales. Por ello, se postuló que los eicosanoides podrían regular positivamente la proliferación celular. Así, diversos trabajos <sup>(Ohuchi y Levine, 1978; Parker et al., 1987; Wu et al., 1988; Noguchi et al., 1995; Hong et al., 1999)</sup> han mostrado que diversos reguladores del crecimiento, incluyendo mitógenos, estimuladores de los tumores y proteinquinasas, son capaces de activar el metabolismo del ácido araquidónico. Se cree que, tanto el ácido araquidónico como sus metabolitos, son lípidos de señalización celular biológicamente activos a concentraciones del orden de nano o micromolar y tienen un efecto anti-apoptótico, como mínimo, en algunos sistemas celulares.

Hasta el momento, se han identificado dos vías apoptóticas principales: la vía mediada por el receptor de muerte celular y la vía mitocondrial <sup>(Hagmann y Brogers, 1997; Szekeres et al., 2000)</sup>. La primera vía se inicia por la activación mediante diversos ligandos de los receptores de muerte celular pertenecientes a la superfamilia de los receptores de TNF, lo que deriva en la activación de la caspasa 8. La segunda vía, la mitocondrial, se inicia por sustancias químicas, privación de factores de crecimiento o irradiación. Esta vía implica la liberación de citocromo C por parte de la mitocondria y la activación de la caspasa 9. La activación de las caspasas 8 ó 9 inicia la vía de las caspasas (3, 6 y 7) que al unirse a sus substratos respectivos provocan los típicos cambios apoptóticos. Se ha demostrado que los inhibidores de la lipoxigenasa son capaces de inducir la liberación de citocromo C y activar la vía de las caspasas <sup>(Tong et al., 2002a; Tong et al., 2002b)</sup>.

La mecánica de la forma en que estos ácidos grasos modulan el crecimiento celular, no es del todo conocida, pero últimamente <sup>(Scorrano et al., 2001)</sup> se cree que el ácido araquidónico evitaría la transición a la forma permeable de la membrana mitocondrial, que permite la liberación y paso del citocromo C a través de la membrana, mecanismo que ha sido propuesto como un iniciador importante de la apoptosis celular.

Por otra parte, el metabolismo oxidativo de estas sustancias lipídicas derivadas del ácido araquidónico, da lugar al aumento de sustancias oxidantes; que estas sustancias están implicadas en los procesos de apoptosis se deriva de que los antioxidantes inhiben esta forma de muerte celular en muchos sistemas <sup>(Adams y Cory, 1998)</sup>.

#### 1.2.3.4.- Catabolismo de los leucotrienos

El LTC<sub>4</sub> se destruye sobre todo en hígado, pulmón y riñones por una doble vía, al poder convertirse en LTE<sub>4</sub>, o ser oxidado y originar un derivado sulfóxido. En el caso del LTB<sub>4</sub>, parece que es modificado en el neutrófilo, mediante una  $\omega$ -oxidación por enzimas intracelulares de escasa especificidad, siendo excretado por orina.

#### 1.2.3.5.- Implicación de los leucotrienos en diversas patologías

- **Asma bronquial**

La hiperreactividad del asma bronquial se debe a un proceso inflamatorio de las vías aéreas. Los tipos celulares implicados en la génesis y mantenimiento del asma bronquial son los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos. Todos ellos producen importantes cantidades de leucotrienos los cuales están muy aumentados en los pacientes asmáticos, habiéndose constatado un importante aumento de la excreción urinaria de LTE<sub>4</sub>. (Knapp et al., 1992; Drazen et al., 1992; Henderson, 1994b; Green et al., 2004). Así mismo, los leucocitos de pacientes asmáticos presentan una mayor capacidad biosintética de LTB<sub>4</sub> y una mayor fluidez de su membrana celular.

A nivel pulmonar, los leucotrienos incrementan la permeabilidad microvascular, modulan el sistema nervioso aferente, estimulan la secreción de moco, enlentecen el transporte de moco y disminuyen la actividad del sistema ciliar respiratorio. Todos estos efectos tienen importancia en la hiperreactividad bronquial, deterioro del transporte mucociliar, formación de acúmulos de moco, descamación de células epiteliales, estrechamiento de las vías aéreas e influjo de las células inflamatorias. (Hay et al, 1995; Bisgaard, 2001). Hay evidencia de que la síntesis de péptido-leucotrienos aumenta durante las crisis asmáticas, así como inducida por los alérgenos o el ejercicio (Zaitu et al, 2003). El LTD<sub>4</sub> junto con el PAF es la causa principal del incremento de permeabilidad vascular en el territorio pulmonar. Así mismo, la secreción de moco por el PAF está mediada por la síntesis de leucotrienos (Marom et al., 1982; Coles et al., 1983; Lundgren et al., 1990). En el pulmón se ha descrito la presencia de receptores para LTD<sub>4</sub> a los que se pueden unir distintos leucotrienos (Shirley y Cheng, 1991; Labat et al., 1992; Hidi et al., 1992; Leff, 2001).

- **Dermatitis atópica (DA)**

Es la manifestación cutánea del estado atópico. Las personas afectas de dermatitis atópica suelen tener historia familiar de asma, fiebre del heno o dermatitis. Las manifestaciones cutáneas suelen ser piel seca, pruriginosa, respuestas vasculares cutáneas anómalas y en muchas ocasiones se acompaña de aumento de las concentraciones séricas de IgE. Los cambios histopatológicos en la epidermis no son específicos y consisten en acantosis y espongiosis, mientras que en la dermis se encuentran infiltrados de células polimorfonucleares y linfocitos T (Leung et al., 1983; Reinhold et al., 1991; van der Heikden et al., 1991). Parece ser que el LTB<sub>4</sub> jugaría un papel en el reclutamiento y acumulación de linfocitos en la piel lesionada (Payan y Goetzl, 1983; Ternowitz et al, 1987).

Un estudio piloto realizado en DA con zileuton, fármaco inhibidor de la 5-LOX, (Woodmansee y Simon, 1999) ha mostrado resultados esperanzadores en cuanto a la disminución de las lesiones y del prurito. En esta enfermedad, la causa del prurito no es enteramente conocida, y se ha relacionado en ocasiones con la secreción de neuropéptidos y sustancia P, sobre todo en los brotes de DA de causa psicógena. En estudios preclínicos realizados en ratas, se ha observado que el prurito inducido por la sustancia P no se puede inhibir mediante antihistmínicos, ni inhibidores de la ciclooxigenasa (indometacina, diclofenac) y sí en cambio por el inhibidor de la 5-lipoxigenasa, zileuton (Andoh et al., 2001). Estos resultados sugieren que el LTB<sub>4</sub> y los queratinocitos, células que lo producen, juegan un importante papel en el círculo picor-rascado inducido por la sustancia P en la rata. Por ello sugieren que los inhibidores de la 5-lipoxigenasa podrían utilizarse con fines antipruríticos (Andoh, 2006).

- **Enfermedad inflamatoria intestinal**

Este es un término general que engloba a diversas enfermedades inflamatorias crónicas del tubo digestivo, entre ellas la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Los síntomas de la colitis ulcerosa son las diarreas hemorrágicas y el dolor abdominal que se acompaña a menudo de fiebre. Histológicamente se caracteriza por afectación de las células superficiales y de las criptas de la mucosa intestinal que son capaces de sintetizar LTB<sub>4</sub>, lo que promueve la formación de infiltrados de neutrófilos que alcanzan la submucosa y destruyen las criptas al provocar abscesos (Dias et al., 1992).

La enfermedad de Crohn también se presenta clínicamente como un cuadro diarreico (generalmente no hemorrágico) que se acompaña de fiebre, dolor abdominal y fatiga generalizada. Histológicamente, sin embargo, existe una afectación de todas las capas de la pared intestinal, mesenterio y ganglios linfáticos regionales (Brynskov et al., 1989; Jewell y Snook., 1990; Brynskov et al., 1991). Se han detectado concentraciones aumentadas de leucotrienos en las secreciones rectales de enfermos afectados de colitis ulcerosa (Henderson, 1994a).

- **Inflamaciones articulares y musculoesqueléticas**

La osteoartritis es la forma más frecuente de enfermedad articular en la que se produce destrucción de la matriz extracelular, los condrocitos entran en división mitótica y aparecen clones celulares. En la fase tardía de la enfermedad, el cartílago se hace hipocelular.

En modelos animales en que se provoca artritis mediante la aplicación local de carragenina se ha podido apreciar que los leucotrienos, y en particular el LTB<sub>4</sub> es un mediador seriamente implicado en la fisiopatología de la artritis (Higgs y Salmon, 1979; Chem et al., 2006; Kim et al., 2006).

En pacientes afectados de enfermedades reumáticas como la artritis reumatoide, la espondiloartritis, la gota, la osteoartritis y la artritis juvenil se ha detectado la presencia de LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> y 5-HETE en el líquido sinovial (Klickstein et al., 1980; Rae et al., 1982; Koshihara et al., 1988).

- **Síndrome del distress respiratorio del adulto (SDRA)**

El SDRA es una catástrofe inflamatoria asociada a sepsis, aspiración pulmonar, coagulación intravascular diseminada, neumonía severa en unidades de cuidados intensivos, hipertransfusión, fractura de los huesos largos y pelvis, quemaduras, etc. (Pepe et al., 1982; Fowler et al., 1983). La observación microscópica muestra unas paredes alveolares edematosas cuyos capilares contienen neutrófilos, plaquetas y coágulos de fibrina. Muchos espacios alveolares están inundados y delimitados por una membrana hialina. El componente celular del exudado alveolar consiste básicamente en eritrocitos, macrófagos, neutrófilos y ocasionalmente eosinófilos (Hill et al., 1982; Pratt, 1982). En el lavado broncoalveolar de estos pacientes se encuentran concentraciones elevadas de LTE<sub>4</sub> (Steinberg et al., 1994).

- **Endotoxemia y sepsis**

Las acciones mediadas por los leucotrienos, como la quimiotaxis de células inflamatorias, liberación de citoquinas (TNF e IL1), aumento de la permeabilidad vascular, broncoconstricción, disminución de la función cardíaca y vasoconstricción coronaria, renal, pulmonar y de la musculatura esquelética sugieren que los leucotrienos están implicados en la patogénesis del shock séptico (Hagmann et al., 1984; Cook et al., 1985; Puranapanda et al., 1987; Pacitti et al., 1987). Por otra parte, la inhibición de los leucotrienos ha mostrado ser beneficiosa en el tratamiento del shock atribuible a traumatismos, isquemia del tracto intestinal, hemorragia y endotoxinas (Bittermann y Lefer, 1988; Bitterman et al., 1988).

- **Psoriasis**

La psoriasis es un proceso mixto, inflamatorio y proliferativo en que se ha visto que existe implicación de los leucotrienos. La lesiones psoriásicas se inician con la desgranulación de los mastocitos, fenestración e hipertrofia endoteliales y la espongiosis focal de la capa basal y parte inferior de la capa de Malpighi. A estas lesiones iniciales, se le añade un infiltrado perivascular con exocitosis y formación de microabscesos de Munro junto a una hiperplasia epidérmica. Diversos estudios (Wong et al., 1985; Ruzicka y Burg, 1987) han demostrado que el LTB<sub>4</sub> juega un papel fundamental en el inicio de la lesión, mientras que el 12-HETE estaría implicado en la consolidación de la misma. El LTB<sub>4</sub> se genera en estos pacientes de forma automática en las células epidérmicas, ya que son capaces de expresar 5-LOX (Luo et al., 2003).

Se han detectado niveles de LTB<sub>4</sub> cuatro veces superiores en orina en pacientes psoriáticos en comparación con voluntarios sanos (Fauler et al., 1992).

- **Síndrome de Sjögren-Larsson (SSL)**

Se trata de un síndrome congénito del metabolismo lipídico caracterizado clínicamente por ictiosis congénita, retraso mental y espasticidad. Se acompaña de prurito muy severo. La causa de este síndrome se relaciona con la actividad deficiente de la enzima microsómica lipoaldehído-deshidrogenasa (LADH), debido a mutaciones en el gen de la LADH (Rizzo et al., 2001). Entre otras funciones, esta enzima es responsable de la  $\omega$ -oxidación del LTB<sub>4</sub>, por lo que



se producen aumentos muy importantes de LTB<sub>4</sub> y de ω-OH- LTB<sub>4</sub> lo que podría contribuir a la patogénesis del SSL. En un estudio piloto realizado en 6 pacientes afectados de este síndrome con el inhibidor de la 5-lipoxigenasa, zileuton, los resultados mostraron que las concentraciones urinarias de LTB<sub>4</sub> y de ω-OH-LT disminuían significativamente con el tratamiento, pero no a nivel del LCR en que no se detectaban concentraciones elevadas de estas sustancias en ningún momento durante la enfermedad. No hubo mejoría en la evaluación neuropsicológica ni en el electroencefalograma (EEG), pero sí disminuyó significativamente el prurito. Por tanto, los autores sugieren que el LTB<sub>4</sub> jugaría un papel muy importante en la patogenia del prurito (Willemsen et al., 2001) asociado a este síndrome y que la mejoría clínica conseguida se debería a un efecto sistémico y no a nivel del SNC.

- **Implicación en la patogenia del cáncer**

En los últimos años, diversos estudios han sugerido la importancia de la vía de la lipoxigenasa en el desarrollo de los cánceres humanos, incluyendo el pancreático, el cáncer de mama, el de próstata y el de pulmón (Chen et al., 1994; Shureiqi y Lippman, 2001; Avis et al., 2001).

Chen y cols (Chen et al., 1994) demostraron que tanto las células de cáncer de colon, de carcinoma de Walker de la rata, de melanoma del ratón como las del cáncer de pulmón expresan ARNm para la 12-LOX y producen 12-HETE.

Recientemente, Ghosh y Meyers (Ghosh y Meyers, 1997) han mostrado que la 5-LOX más que la 12-ó la 15-lipoxigenasa juega un papel crítico en el crecimiento celular del cáncer de próstata estimulado por los derivados del ácido araquidónico.

Los trabajos realizados por el grupo de Adrian en la Northwestern University Medical School de Chicago (Ghosh y Meyers, 1997; Natarajan et al., 1997; Natarajan y Nadler, 1998) han demostrado que el bloqueo de la vía de la lipoxigenasa induce apoptosis en células de cáncer pancreático humano a través de la vía mitocondrial, con liberación de citocromo C y activación de las caspasas (Mezhybovska et al., 2006). El tratamiento mediante un inhibidor de la lipoxigenasa inhibió igualmente el crecimiento de un injerto de células de cáncer pancreático realizado en ratas atímicas e indujo apoptosis “*in vivo*”. Por tanto, este grupo concluye que el bloqueo de la vía de la lipoxigenasa podría resultar en nuevos tratamientos para el cáncer de páncreas.

Por otra parte, la disminución de ácidos poliinsaturados (PUFAs) mediante aceite de pescado conlleva la disminución de la concentración de LTB<sub>4</sub>, aumentado en los pacientes con cáncer de páncreas <sup>(Heucamp et al., 2006)</sup>.

Natarajan y Nadler <sup>(Natarajan y Nadler, 1998)</sup> han mostrado que la 12-LOX de tipo leucocitaria se encontraba estimulada (“up-regulated”) en muchas células y tejidos de cáncer de mama, en comparación con células del epitelio mamario normal y tejidos adyacentes. Por otra parte, encontraron una correlación entre la estimulación con EGF (factor de crecimiento epidérmico) de las células de cáncer de mama y un aumento dosis-dependiente de 12-HETE en dichas células. En otros trabajos <sup>(Avis et al., 2001)</sup> se ha demostrado que la adición de 5-HETE a células de cáncer de mama daba lugar a una estimulación del crecimiento, mientras que la aplicación de inhibidores de la 5-LOX o de la FLAP resultaba en una disminución del crecimiento, inducía apoptosis y detenía el crecimiento celular en fase G1, a través de la estimulación de la liberación de citocromo C y activación de la vía de las caspasas <sup>(Tong et al., 2002b)</sup>.

### **1.3.- Antileucotrienos: características farmacológicas**

#### **1.3.1.- Generalidades**

##### **1.3.1.1.-Recuerdo histórico del desarrollo de los fármacos moduladores de los leucotrienos**

Las actividades biológicas del LTB<sub>4</sub> y de los péptido-leucotrienos generaron un considerable interés en la industria farmacéutica. Así, a principio de la década de 1980 la mayoría de compañías farmacéuticas importantes habían iniciado programas de búsqueda de fármacos que modularan la acción de los leucotrienos, ya sea por el bloqueo de su acción (antagonistas de los péptido-leucotienos) o bien por inhibición de su biosíntesis (inhibidores de la 5-lipoxigenasa). Todos ellos iniciaron su desarrollo clínico para el tratamiento del asma bronquial <sup>(McMillan, 2001)</sup>.

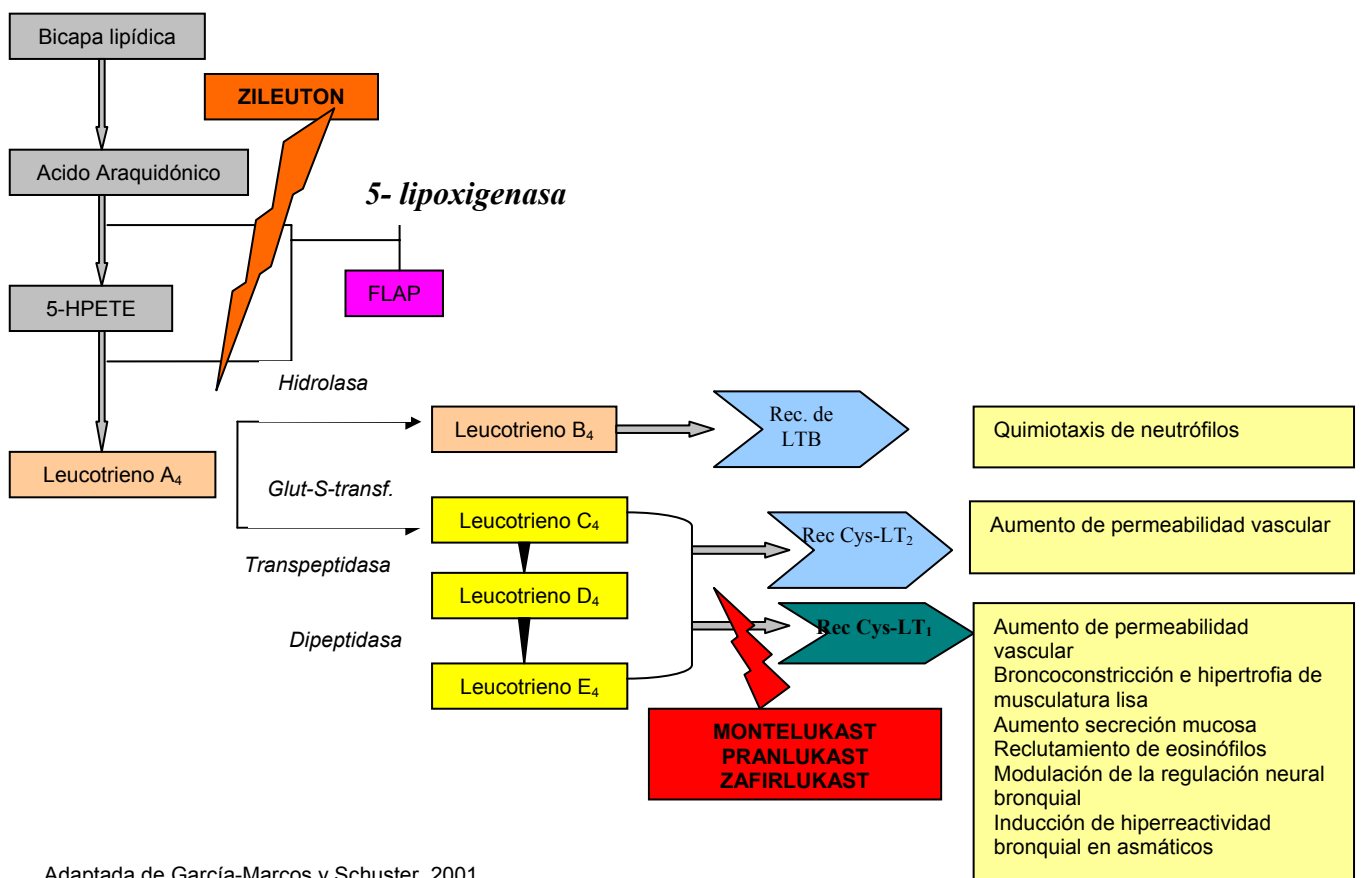
Se han desarrollado diversos antagonistas de los leucotrienos e inhibidores de la 5-LOX, con el objetivo de conseguir fármacos para el tratamiento del asma bronquial de administración oral y con un buen perfil de seguridad. De todas formas, únicamente algunos de ellos han mostrado eficacia en el tratamiento de esta entidad. Únicamente zafirlukast, montelukast,

pranlukast y zileuton están actualmente disponibles y han sido aprobados por la FDA para el tratamiento del asma bronquial. En la actualidad se encuentran comercializados en España montelukast y zafirlukast, no así pranlukast y zileuton. El Código ATC de este tipo farmacológico es el R03DC02: Antiasmáticos, antagonistas de leucotrienos.

### 1.3.1.2.- Puntos farmacológicos de actuación a nivel de la vía de los leucotrienos

Desde hace años se está investigando la forma de inhibir la síntesis de leucotrienos o la de bloquear sus efectos. Los investigadores se han concentrado en cuatro puntos de la cascada de los leucotrienos: los dos primeros están relacionados con la biosíntesis de los leucotrienos, ya sea mediante la inhibición de la 5-lipoxigenasa o bien mediante la inhibición de la FLAP. Los otros dos puntos de acción se encuentran situados más adelante en la cascada de producción de los leucotrienos. Se trata de los denominados antagonistas de los receptores de los leucotrienos D<sub>4</sub> que bloquean la acción de los leucotrienos de tipo C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> y E<sub>4</sub>. Todo ello se puede ver esquematizado en la figura I-4.

**Figura I-4:** Puntos de actuación de los antileucotrienos.



Adaptada de García-Marcos y Schuster, 2001.

FLAP: proteína activadora de la 5-lipoxigenasa. Glut-S-Transf.: glutatión-S-transferasa. Rec. de LTB: receptor de leucotrieno B. Rec Cys-LT<sub>1</sub>: receptor de tipo 1 para los péptido-leucotrienos. Rec Cys-LT<sub>2</sub>: receptor de tipo 2 para los péptido-leucotrienos.

### 1.3.1.3.- Antagonistas de los receptores de los péptido-leucotrienos

En la tabla I-3 se muestra una visión general de los antagonistas de los receptores CysLT que han iniciado su desarrollo, incluidos los que lo han completado y están actualmente comercializados.

**Tabla I-3:** Visión general de los receptores CysLT y sus antagonistas.

	CysLT <sub>1</sub>	CysLT <sub>2</sub>
Tejido	Bronquio humano Tráquea de cobaya Vesícula biliar de cobaya Tira pulmonar de rata	Vena pulmonar humana Tráquea e ileo de cobaya Tráquea y bronquio de cordero Tráquea de rana
Antagonista	FPL 55712 LY 171 883 ICI 198 615/ ICI 204 219 (zafirlukast) MK 571/ MK 679/ MK 476 (montelukast) SKF 104 353/ SKF 106 203 ONO 1078 (pranlukast)/ SB 205 312 RG 12 525 CGP 45715 BAY x7195 / BAY u 9773	BAY u 9773
Agonista	LTC <sub>4</sub> = LTD <sub>4</sub> ≥ LTE <sub>4</sub>	LTC <sub>4</sub> ≥ LTD <sub>4</sub> >> LTE <sub>4</sub>

Tabla adaptada de Leff, 2001. LT: leucotrieno.

La biodisponibilidad oral era un criterio esencial en los programas de desarrollo de antileucotrienos, ya que la mayoría de fármacos utilizados actualmente para el asma bronquial se administran por vía inhalatoria, por lo que la vía oral presentaría la ventaja de una mayor comodidad y mejor cumplimiento. Uno de los primeros compuestos, el FPL55712, presentaba una baja potencia, poca selectividad y una baja biodisponibilidad oral. Durante la década de 1990 se desarrollaron y lanzaron con éxito 3 antagonistas de los péptido-leucotrienos, activos y selectivos: estos fueron ICI204219 (zafirlukast, Accolate™, Astra-Zeneca), MK0476 (montelukast, Singulair™, Merck) y ONO1078 (pranlukast, Onon™, Ono, Aziaire™, Shering-Plough). Estos estructuralmente distintos antagonistas dan lugar a perfiles farmacológicos preclínicos similares que se ilustrará a continuación de forma breve utilizando los datos de zafirlukast (Carter et al., 1991). Se observó un antagonismo competitivo muy potente frente a las acciones de los péptido-leucotrienos a nivel de los receptores CysLT<sub>1</sub> con valores de K<sub>i</sub> que oscilan desde 0,2 nM a 1nM dependiendo del antagonista utilizado y de la especie

estudiada. Contrariamente, zafirlukast es virtualmente inactivo a nivel de los receptores CysLT<sub>2</sub> lo que queda manifiesto por presentar una  $K_i > 3 \mu\text{M}$  para antagonizar la unión de LTC<sub>4</sub> a las membranas pulmonares humanas. La selectividad se confirmó por el hecho de que zafirlukast a una concentración de  $10^{-5}$  M no presentaba actividad frente a ningún otro receptor, incluyendo receptor adrenérgico, histaminérgico, serotoninérgico, muscarínico, ni prostanoide.

Los estudios con estos antagonistas se realizaron fundamentalmente en cobayas. En estos animales, zafirlukast mostró una inhibición dosis-dependiente de la disnea producida por la administración de LTD<sub>4</sub> en aerosol con una concentración eficaz 50% (CE<sub>50</sub>) oral de aproximadamente 0,5 $\mu\text{mol/kg}$ . A esta dosis oral, los efectos de zafirlukast se mantuvieron durante 16 horas. Todos ellos han mostrado que son activos frente al broncoespasmo inducido por alergenos, frío y ejercicio. Todos ellos fueron efectivos frente a la fase precoz y tardía del broncoespasmo y redujeron igualmente la hiperreactividad bronquial.

#### **1.3.1.4.- Inhibidores de la 5-lipoxigenasa**

El interés de la industria farmacéutica por obtener compuestos capaces de antagonizar la 5-lipoxigenasa radica en que, al menos teóricamente, tendrían la ventaja de bloquear la acción de todos los metabolitos biológicamente activos que genera su activación.

Se han evaluado muchos compuestos clínicamente, pero únicamente uno (zileuton) ha obtenido la aprobación por las Agencias Regulatoras <sup>(Kane et al., 1996)</sup>. Las primeras moléculas que se intentaron desarrollar, fueron compuestos redox, pero todos ellos presentaban una baja biodisponibilidad oral y un mal perfil de seguridad, por lo que no continuaron su desarrollo.

Debido a que la reacción de redox catalizada por la lipoxigenasa es dependiente de hierro, se desarrollaron diversos compuestos utilizando ligandos para el hierro, como es el caso del zileuton (Abbot). El problema principal de los inhibidores de la 5-lipoxigenasa basados en los ligandos para el hierro, es su baja selectividad, ya que también presentan una actividad de 10 a 30 veces superior sobre la ciclooxigenasa, lo que podría generar broncoespasmo en pacientes asmáticos que presenten intolerancia a los inhibidores de la ciclooxigenasa.

Posteriormente, dos clases de inhibidores de la síntesis de leucotrienos han demostrado un incremento marcado de la selectividad, sin producir inhibición de la ciclooxigenasa. El primero de esta clase es ZD2138 (AstraZeneca). El segundo grupo incluye los antagonistas de la FLAP como MK886 (Merck) que impiden la activación de la 5-LOX. Tanto algunos de los compuestos redox como los antagonistas de la FLAP han sido ensayados en voluntarios sanos y en pacientes, ninguno de ellos ha seguido el desarrollo más allá de la fase II. En la actualidad se ha postulado un nuevo mecanismo de acción para el MK886 por el que se le confieren propiedades antitumorales <sup>(Mayburd et al., 2006)</sup>.

Las características farmacológicas de los inhibidores de la síntesis de leucotrienos se asemejan a las de los antagonistas de los cisteinil-leucotrienos aunque no son capaces de bloquear las acciones de los leucotrienos administrados en aerosol. Estos compuestos presentan, por otra parte, actividad en modelos inflamatorios que no son sensibles a la acción de los antagonistas de los receptores de cisteinil-leucotrienos, como la inhibición de la infiltración por los neutrófilos y el edema vascular en piel de ratón o conejo, ya que estas acciones estarían mediadas por la acción del LTB<sub>4</sub>.

### **1.3.2.- Características clínicas de los antileucotrienos comercializados**

Actualmente, en los Estados Unidos y Canadá están comercializados tres antagonistas de los receptores de LTD<sub>4</sub>, (montelukast, pranlukast y zafirlukast) y un antagonista de la 5-lipoxigenasa (zileuton). Las características de los antileucotrienos e inhibidores de la 5-LOX comercializados se pueden ver de forma esquemática en la tabla I-4. Todos ellos se presentan en formulación en comprimidos por v.o. y su posología varía entre una (montelukast) y 4 (zileuton) dosis al día <sup>(Med Letter, 2000)</sup>. En España se encuentran comercializados zafirlukast y montelukast únicamente.

Todos ellos han mostrado una eficacia clínica en el asma bronquial comparable, aunque no se han realizado estudios comparativos entre los diversos antileucotrienos. En casos de asma atópica, los antagonistas de los receptores de LTD<sub>4</sub> produjeron una inhibición de la respuesta precoz de la vía aérea de hasta un 81% y de hasta un 57% de la respuesta tardía tras la exposición al alérgeno <sup>(Findlay et al., 1992; Diamant et al., 1996; Hamilton et al., 1997)</sup>. En cambio zileuton tiene una acción inhibitoria mínima sobre la respuesta precoz y ninguna acción sobre la respuesta

tardía, tras la administración del alérgeno (Hui et al., 1991) impidiendo, sin embargo, la infiltración de la vía aérea por eosinófilos y disminuyendo su presencia en la sangre (Leff, 1997; Ramsay et al., 1997; Knorr et al., 1998)

Los antileucotrienos poseen la capacidad de disminuir la respuesta de la vía aérea a la metacolina, los alérgenos, al aire frío o al ejercicio (Taylor et al., 1991; Fujimura et al., 1993; Fisher et al., 1995). Así mismo, se han mostrado eficaces en la reducción de los síntomas de broncoconstricción y gastrointestinales producidos por el AAS en pacientes hipersensibles (Israel et al., 1993a; Yamamoto et al., 1994)

**Tabla I-4:** Características de los antileucotrienos para el asma comercializados.

Fármaco	Identificación del compuesto	Estado de comercialización	Edad (años)	Dosis	Precio
<b>Antagonistas de los receptores del leucotrieno D<sub>4</sub></b>					
Montelukast (Singulair)	MK-0476 (Merck Frosst)	Lanzado en Canadá, México, EEUU, Japón, Italia, Grecia, Alemania y España	2-5 años de 6-14 años > 14 años	4 mg/d 5 mg/d 10 mg/d	75.80 \$ 44,33 €
Pranlukast (Onon) (Azlaire)	ONO-1078 (ONO) (Shering-Plough)	Lanzado en Japón. Lanzado en México	Adultos	300-450 mg/1 ó 2xd	ND
Zafirlukast (Accolate)	ICI-204219 (Astra-Zeneca)	Lanzado en Canadá, EEUU y España	> 12 años	20 mg/2xd	52.50\$ 47,42€
<b>Inhibidor de la 5- Lipoxigenasa</b>					
Zileuton (Zyflo)	A-64077 (Abbott)	Lanzado en EEUU	> 12 años	600 mg/4xd	75.00\$

Tabla adaptada de Leff, 2001. ND: no disponible

Todos ellos han demostrado una clara eficacia en el tratamiento del asma leve al compararlos con placebo. Durante el tratamiento con antileucotrienos los pacientes mejoraron la sintomatología, reduciendo sensiblemente (30%) la utilización de agonistas  $\beta_2$ , menor número de despertares nocturnos y mejorando la sintomatología diurna (Israel et al., 1993b; Reiss et al., 1996). También han mostrado buenos resultados en cuanto a mejoría del FEV1, disminución del uso de agonistas  $\beta_2$  y mejora en la calidad de vida en los ensayos clínicos realizados en niños (Knorr et al., 1998)

Los efectos terapéuticos de los antileucotrienos en el asma bronquial son como mínimo comparables a los del cromoglicato (Hofstra et al., 1997), nedocromil (Sahn et al., 1997) y teofilina (Schwartz et al., 1995). La desventaja principal es que algunos pacientes no responden a los antileucotrienos

probablemente debido a que en ellos los leucotrienos no representan un factor importante en sus vías de la inflamación.

Al ser administrados por vía oral, la cumplimentación terapéutica debería ser mejor que la de los fármacos administrados por vía inhalatoria, sobre todo en el caso de los niños. Por otra parte, representan un ahorro de tiempo en la consulta ya que no se requiere educar a los pacientes. La relación coste-efectividad de estos fármacos es comparable a la de los agonistas  $\beta_2$  de acción prolongada.

### **Montelukast**

#### ***Acción y mecanismo:***

Actúa antagonizando selectivamente los receptores de péptido-leucotrienos (CysLT) en las vías respiratorias, reduciendo la broncoconstricción, secreción mucosa, permeabilidad vascular y reclutamiento de eosinófilos mediada por la secreción de leucotrienos. Posee efectos broncodilatadores aditivos con agonistas  $\beta$ -adrenérgicos y corticoides. Inhibe la broncoconstricción de las fases temprana y tardía del asma mediada por antígenos (Markham y Faulds, 1998). Reduce significativamente los eosinófilos en vías aéreas y en sangre periférica, así como la broncoconstricción mediada por el ejercicio.

#### ***Farmacocinética:***

Vía oral. Comprimidos recubiertos. La biodisponibilidad oral es del 64% obteniéndose la concentración plasmática máxima a las 3h. Los alimentos no modifican la biodisponibilidad oral. Comprimidos masticables: la biodisponibilidad oral es del 73% en ayunas y del 63% con la comida, obteniéndose la concentración plasmática máxima a las 2h. Su volumen aparente de distribución (Vd) es de 8-11L, siendo muy reducidas las cantidades de fármaco que alcanzan tejidos diferentes al respiratorio. El grado de unión a las proteínas plasmáticas es del 99%. Se metaboliza ampliamente en el hígado, originando metabolitos sin actividad farmacológica. El aclaramiento plasmático es de 45 mL/min en adultos sanos. Montelukast y sus metabolitos se excretan casi exclusivamente por heces. No es preciso modificar la dosis en ancianos o pacientes con insuficiencia hepática moderada. Se desconoce si es dializable (Storms, 2001) (Tabla I-5).



**Indicaciones aprobadas:**

Asma:

- Tratamiento del asma como terapia adicional en pacientes con asma persistente leve a moderada no controlados adecuadamente con corticoides inhalados y en quienes los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos de acción corta “a demanda” proporcionan un control clínico insuficiente del asma.
- Profilaxis del asma cuyo componente principal es la broncoconstricción inducida por el ejercicio.
- Tratamiento de la rinitis alérgica estacional.

**Posología:**

Vía oral, 1-2 horas después de las comidas

Adultos (>15 a): 10mg/24 h al acostarse

Niños (6-14 a) 5 mg/24 h al acostarse

Niños (2-5 a): 4 mg (1 comprimido masticable) /24 h al acostarse

En ensayos clínicos controlados con placebo, motelukast ha sido modestamente efectivo como tratamiento de mantenimiento en adultos y niños con asma intermitente o persistente. Se administra una vez al día por vía oral por la noche, con o sin comida. Como monoterapia es menos efectiva que los corticosteroides inhalados y no debe sustituir a la dicha terapia, pero la adición de montelukast permite una reducción en la dosis de corticoides necesarios (Muijers y Noble, 2002). Montelukast añadido a corticosteroides inhalados u orales puede mejorar los síntomas en los pacientes que presentan asma por intolerancia a la aspirina. Reduce significativamente el asma inducido por el ejercicio (Pearlman et al, 2006) y posee un efecto complementario de mejora en la calidad de vida de los pacientes al disminuir la inflamación (Biernacki, 2005).

También ha mostrado eficacia significativa frente a placebo en el tratamiento de la rinitis alérgica estacional (Patel et al., 2005)

Se ha descrito la aparición de una vasculitis de Churg-Strauss, aunque no se ha podido corroborar de forma absoluta la causalidad con el fármaco, ya que también podría tener su origen en una retirada brusca del tratamiento corticoideo.

Formulaciones aprobadas en España para su comercialización por los Laboratorios Merk-Sharp-Dhome:

Singulair<sup>®</sup> 10mg, 28 comprimidos (fecha de comercialización: 1.03.1998)

Singulair<sup>®</sup> 5mg, 28 comprimidos masticables (fecha de comercialización: 1.03. 1998)

Singulair<sup>®</sup> 4mg 28 comprimidos masticables (fecha de comercialización: 16.08.2001)

Singulair<sup>®</sup> 4mg granulado, 28 sobres (fecha de comercialización: 11.06.2003)

### **Zafirlukast**

#### **Acción y mecanismo:**

Zafirlukast es un péptido activo por vía oral, competitivo y altamente selectivo como antagonista del receptor de los leucotrienos LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>. Los estudios “*in vitro*” han mostrado que zafirlukast antagoniza la actividad contráctil de los tres péptido-leucotrienos (leucotrienos C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> y E<sub>4</sub>) en el mismo grado, sobre el músculo liso de las vías respiratorias en humanos.

#### **Farmacocinética:**

Vía oral. Se absorbe rápidamente, alcanzando la concentración plasmática máxima de 568ng/mL a las 3 horas. La ingesta conjunta con la comida disminuye su biodisponibilidad de forma muy marcada (un 40%). El efecto terapéutico es evidente a los 3-14 días. Se metaboliza extensamente en el hígado, con participación del citocromo P450 (CYP2C9), originando derivados hidroxilados con actividad 90 veces menor que el fármaco de origen. La teofilina administrada conjuntamente puede disminuir su efecto. Hay un único caso publicado en el que la toma conjunta con teofilina dio lugar a la presencia de concentraciones plasmáticas tóxicas de esta última. El zafirlukast aumenta las concentraciones séricas de los anticoagulantes orales y puede dar lugar a hemorragias. Los metabolitos de zafirlukast son eliminados mayoritariamente por las heces (89%) y el resto por la orina. La semivida plasmática es de 10h (Dunn y Goa, 2001) (Tabla I-5).

#### **Indicaciones aprobadas:**

- Zafirlukast está indicado en la profilaxis y tratamiento crónico del asma como terapia adicional de mantenimiento en pacientes asmáticos en los que los β-agonistas de acción corta “a demanda” no proporcionan suficiente control clínico del asma, así como en pacientes con asma persistente leve o moderada no adecuadamente controlados con corticoides inhalados.

**Posología:**

Vía oral, una hora antes o dos horas después de las comidas.

Adultos y niños mayores de 12 a: 20 mg/12 h.

En ancianos ajustar la dosis según tolerancia.

Zafirlukast ha mostrado una eficacia moderada como monoterapia de mantenimiento de los pacientes con asma leve o moderada. Es menos efectivo que los corticoides inhalados (Laitinen et al., 2005)

Como efectos adversos poco frecuentes se podría citar la cefalea, molestias gastrointestinales y aumento de AST. En un paciente se ha comunicado la aparición de un lupus inducido por el fármaco. También se ha comunicado vasculitis de Churg-Strauss en relación al uso de zafirlukast, aunque no se ha establecido con certeza la causalidad del fármaco.

Formulaciones aprobadas en España para su comercialización por los Laboratorios Astra-Zeneca:

Accolate<sup>®</sup> 20mg, 60 comprimidos recubiertos (fecha de comercialización: 1.03.1999)

**Pranlukast****Acción y mecanismo:**

Es un antagonista selectivo de los leucotrienos C<sub>4</sub>/D<sub>4</sub>/E<sub>4</sub> que actúa sobre los receptores LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub> principalmente y menos sobre el receptor de LTC<sub>4</sub>.

**Farmacocinética:**

Su absorción tras administración oral puede ser influenciada por la administración de alimentos, aunque se desconoce en qué proporción. Se alcanzan las concentraciones máximas a las 3 horas de su administración (5 h con alimentos). Se une en un 99% a las proteínas plasmáticas y se presume que presenta metabolismo hepático (no hay datos en humanos). El tiempo de semivida de eliminación oscila entre 1,7 y 9 horas en función de la pauta de dosificación y dosis administrada (Keam et al, 2003) (Tabla I-5).

**Indicaciones aprobadas en Japón y México:**

Profilaxis y el tratamiento crónico del asma bronquial. No ha sido aprobado, hasta la fecha, por la FDA ni por la EMEA.

**Posología:**

Adultos: 225-450 mg /dos veces al día.

No hay datos en niños.

En ancianos, se recomienda una dosis de inicio de 112 mg/dos veces al día.

Ha mostrado actividad clínica moderada para reducir el volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV1) así como los síntomas de asma, reduciendo la dosis requerida de corticosteroides inhalados. Su combinación con agonistas  $\beta$ -adrenérgicos inhalados, ha mostrado que permite la reducción de la aplicación de estos últimos aunque no ha mostrado una mayor eficacia. En un estudio ha mostrado disminuir el asma inducida por el ejercicio.

Aunque sea muy poco frecuente (incidencia menor al 0,1%), se ha comunicado la aparición de angeitis granulomatosa alérgica, con eosinofilia, leucocitosis e infiltración pulmonar y cardíaca. Otros síntomas de carácter infrecuente son las alteraciones de los parámetros analíticos hepáticos o la cefalea.

Pranlukast no se encuentra comercializado en España.

**Tabla I-5:** Características farmacocinéticas de los antagonistas de los leucotrienos y de la 5-LOX.

Principio activo	Dosis Pauta (mg)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	t <sub>max</sub> (h)	Biodisponibilidad	U PP (%)	Metabolismo	t <sub>1/2</sub> (h)	Vd (L)	Eliminación
Montelukast	10 /d	350	3	64 (No mod por alimentos)	99	CYP450, 3A4,2A6, 2C9 Met inact	2,7-5	8-11	Heces
Zafirlukast	20/2xd	568	3	↓ el 40% con alimentos	99	CYP 2C9 Met inact.	10		Heces 89% Orina
Pranlukast	225-450/ 2xd	446-700	3-4	Comida ↑la absorción	99	¿?	1,7-9		¿Heces?
Zileuton	600/4xd		1-3	No influencia alimentos	93	CYP3A4 Isómeros estereo selectivos	2,1-2,5	1,2	Renal 7mL/min/kg

U PP: unión a proteínas plasmáticas. Met inact: metabolito inactivo

**Zileuton*****Acción y mecanismo:***

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la 5-LOX <sup>(Werz, 2002)</sup>.

***Farmacocinética:***

Su absorción se produce por vía oral, no siendo influida por la presencia de alimentos. Alcanza su concentración máxima entre 1-3 h de la administración. Se une a las proteínas plasmáticas en un 93%, alcanzando un volumen de distribución de 1,2L. Se metaboliza a través del citocromo P450 3A4, 1A2 y 2C9. Se transforma en isómeros estereoselectivos que presentan todavía una elevada actividad farmacológica. Administrado conjuntamente, puede disminuir la eliminación de la teofilina y aumentar sus concentraciones plasmáticas, así como las de warfarina y propranolol <sup>(Awni et al., 1997a)</sup>. Está contraindicada su administración conjunta con fármacos ergóticos. Su eliminación es fundamentalmente por vía renal, con un aclaramiento de 7mL/min. Su semivida de eliminación oscila entre las 2,1-2,5 horas <sup>(McGill y Busse, 1992)</sup>. Zileuton es bien tolerado en los pacientes con insuficiencia renal moderada, severa y también en pacientes hemodializados <sup>(Awni et al., 1997b)</sup>.

***Indicaciones aprobadas*** (en EEUU):

- Profilaxis y tratamiento crónico del asma bronquial en pacientes a partir de 12 años.

***Posología:***

Via oral.

600 mg cuatro veces al día (2400 mg/día)

Contraindicado en pacientes con alteraciones renales activas, aumento de los enzimas hepáticos 3 veces superior al límite de normalidad e hipersensibilidad a zileuton o sus excipientes. Se debe administrar con precaución a pacientes que tengan antecedentes de enfermedad hepática, junto con la ingesta de alcohol o durante las crisis agudas de asma.

Zileuton ha mostrado eficacia como tratamiento de mantenimiento del asma, aunque ha de ser administrado en cuatro tomas diarias y se debe monitorizar el perfil hepático de los pacientes. En un estudio de comparación directo con teofilina, los resultados mostraron que zileuton era igualmente efectivo en el tratamiento del asma persistente pero con un inicio de la acción más lento. No existen estudios controlados de comparación con corticoides inhalados.

Cuando se añade zileuton al tratamiento con corticoides por vía inhalatoria, se produce un mayor control del asma y de los síntomas nasales en los pacientes que presentan asma inducida por la aspirina (Sharma y Mohammed, 2006).

Zileuton no se encuentra comercializado en España.

### 1.3.3.- Seguridad de los antileucotrienos

Estos fármacos están comercializados hace 10 años, y actualmente se empiezan a conocer los efectos a largo plazo en pacientes afectos de asma crónica.

Generalmente la tolerabilidad de estos fármacos es buena, siendo el efecto secundario más frecuentemente observado la cefalea, aunque su frecuencia de aparición es comparable a la que aparece en los pacientes que han tomado placebo (Israel et al., 1993; Spector et al., 1994; Reiss et al., 1996; Kohrogi et al., 1997).

Se han retirado diversos antileucotrienos debido a su toxicidad hepática. En el caso de zileuton, se ha descrito un aumento de las transaminasas de 3 veces su valor basal en un 2-5% de los pacientes y en ocasiones puede producir ictericia (Med Letter, 1997). Todos estos efectos desaparecieron al interrumpir la administración del fármaco.

Los antagonistas de los receptores de los leucotrienos presentan un riesgo de teratogenia durante el embarazo de categoría B y pueden ser utilizados en las pacientes asmáticas embarazadas cuando el tratamiento sea claramente necesario para el control de su enfermedad. En el caso de zileuton, al igual que los corticoides y los agonistas  $\beta_2$ , está catalogado en la categoría C, por lo que sólo debe utilizarse cuando el beneficio obtenido pueda justificar los riesgos potenciales que puede sufrir el feto.

El Grupo de Trabajo de los Antileucotrienos (“Antileukotriene Working Group”) (Spector, 2001), ha estado revisando y evaluando los resultados de los ensayos clínicos publicados y también de resultados obtenidos en la práctica clínica habitual en referencia a la utilización de los antileucotrienos, para valorar de una forma real el perfil de tolerabilidad y seguridad de estos fármacos. En la tabla I-6 se pueden observar los resultados de este trabajo de

investigación, donde consta el número de pacientes que han participado en los distintos estudios así como el porcentaje de acontecimientos adversos aparecidos que fuesen > al 2% y mayor numéricamente al compararlo con placebo.

**Tabla I-6:** Acontecimientos adversos más comunes de los antileucotrienos.

Fármaco	Acontecimiento adverso	Antileucotrienos (% de pacientes)	Placebo (%)
zafirlukast (n= 4058) vs placebo (n= 2032)	Cefalea	12,9	11,7
	Infección	3,5	3,4
	Náuseas	3,1	2,0
	Diarrea	2,8	2,1
montelukast (n=1955) vs placebo (n=1180)	Cefalea	18,4	18,1
	Gripe	4,2	3,9
	Dolor abdominal	2,9	2,5
	Tos	2,7	2,4
	Dispepsia	2,1	1,1
zileuton (n=475) vs placebo (n=491)	Cefalea	24,6	24
	Dispepsia	8,21	2,9
	Dolor no especificado	7,8	5,3
	Náuseas	5,5	3,7
	Dolor abdominal	4,6	2,4
	Astenia	3,8	2,4
	Lesión accidental	3,4	2
Mialgia	3,2	2,9	

La revisión exhaustiva realizada por este grupo de trabajo refiere que el porcentaje de aparición de Síndrome de Churg-Strauss en pacientes que reciben el tratamiento con antileucotrienos es comparable al que aparece en la población asmática global, y que podría ser, que el tratamiento con estos fármacos desenmascarase un proceso vasculítico de base ya preexistente.

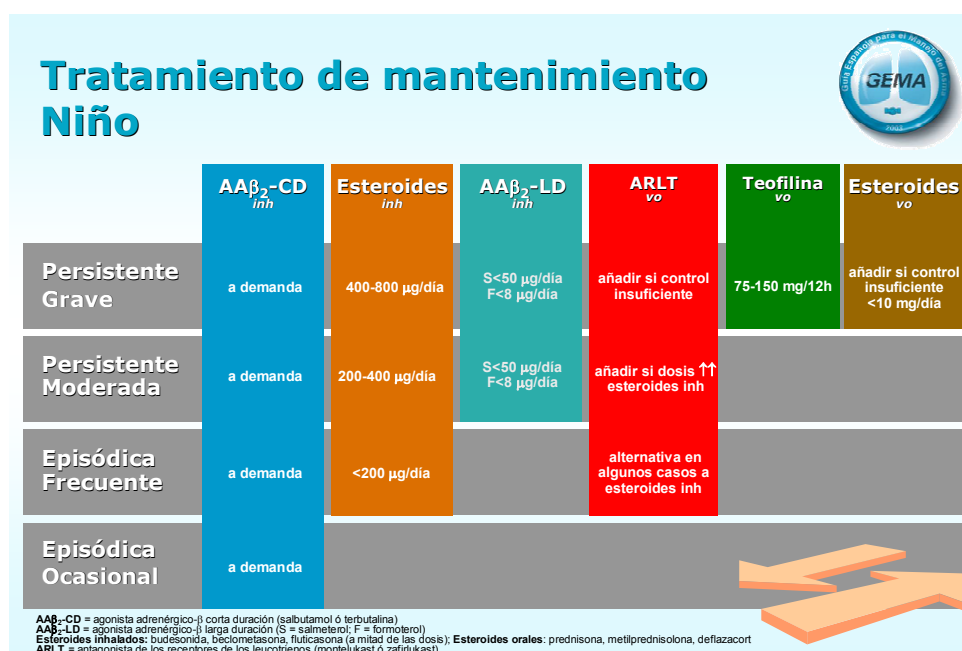
#### 1.3.4.- Posición en terapéutica

En EEUU, las directrices más recientes para el tratamiento del asma bronquial fueron publicadas en 2002 por el Programa Nacional de Educación y Prevención del Asma, Panel de Expertos 2 junto con NIH (Instituto Nacional de Salud, Instituto de Corazón, Pulmón y Sangre) <sup>(NIH, 2002)</sup>. En dichas guías se recomienda, en el caso de los niños menores de 5 años, la administración de antileucotrienos como una alternativa en combinación con los corticoides

inhalados a dosis bajas o media en pacientes con asma moderada persistente así como tratamiento alternativo en monoterapia en niños con asma leve persistente. En el caso de los niños mayores de 5 años y los adultos afectos de asma moderada persistente, se recomienda la utilización de antileucotrienos como tratamiento alternativo asociado a los corticoides inhalados a dosis bajas o medias. En el caso de asma leve persistente, se pueden utilizar en monoterapia como alternativa al tratamiento con corticoides inhalados a dosis bajas.

En España se publicó en el 2003 la Guía Española para el Manejo del Asma <sup>(GEMA, 2003)</sup> cuyo contenido viene avalado por las distintas sociedades implicadas en el manejo del asma bronquial, como son la Sociedad Española de Médicos de Atención Primaria (SEMERGEN), la Sociedad de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR), el Grupo de Respiratorio de Atención Primaria (GRAP), la Sociedad de Neumología Pediátrica (SENP) y la Associació Asmatològica Catalana (AAC). En las figuras I-5 e I-6 se puede observar gráficamente la posición de cada una de las opciones terapéuticas de mantenimiento recomendadas para cada una de las formas clínicas de asma en niños y adultos. En dicha guía, la recomendación de utilización de los antileucotrienos es coincidente con las recomendaciones de la guía anteriormente citada del NIH.

**Figura I-5:** Opciones terapéuticas de tratamiento de mantenimiento en niños, recomendadas por la Guía Española para el tratamiento del Asma (GEMA).





**Figura I-6:** Opciones terapéuticas de tratamiento de mantenimiento en adultos, recomendadas por la Guía Española para el tratamiento del Asma (GEMA).

**Tratamiento de mantenimiento Adulto**

	AA $\beta_2$ -CD <i>inh</i>	Esteroides <i>inh</i>	AA $\beta_2$ -LD <i>inh</i>	ARLT <i>vo</i>	Teofilina <i>vo</i>	Esteroides <i>vo</i>
<b>Persistente Grave</b>	a demanda	>1.000 $\mu$ g/día	S=50-100 $\mu$ g/día F=9-36 $\mu$ g/día	añadir si control insuficiente	100-300 mg/12h	añadir si control insuficiente ajustando a mínima dosis
<b>Persistente Moderada</b>	a demanda	200-1.000 $\mu$ g/día	S=50-100 $\mu$ g/día F=9-36 $\mu$ g/día	añadir si dosis $\uparrow$ esteroides inh (>800 $\mu$ g/día)		
<b>Persistente Leve</b>	a demanda	<500 $\mu$ g/día		alternativa en algunos casos a esteroides inh		
<b>Intermitente</b>	a demanda					

AA $\beta_2$ -CD = agonista adrenérgico- $\beta$  corta duración (salbutamol o terbutalina)  
AA $\beta_2$ -LD = agonista adrenérgico- $\beta$  larga duración (S = salmeterol; F = formoterol)  
Esteroides inhalados: budesonida, beclometasona, fluticasona (a mitad de las dosis); Esteroides orales: prednisona, metilprednisolona, deflazacort  
ARLT = antagonista de los receptores de los leucotrienos (montelukast o zafirlukast)

En la mayoría de pacientes, los efectos terapéuticos de los antileucotrienos en el asma bronquial son como mínimo comparables a los del cromoglicato (Sahn et al., 1997), nedocromil (Hofstra et al., 1997) y dosis bajas de corticoides inhalados (Schwartz et al., 1995). Diversos estudios han demostrado que su empleo conjuntamente con los corticoides inhalados consigue una reducción de la dosis de corticoides utilizada (Tamaoki et al., 1997; Virchow et al., 1997; Malmstrom et al., 1999; Lofdahl et al., 1999). Montelukast ha mostrado ser eficaz para el tratamiento de la rinitis alérgica en niños desde los 6 meses de edad por lo que ha sido aprobada esta indicación por la FDA en Julio de 2005 (Patel et al., 2005).

No están indicados para el tratamiento de las exacerbaciones agudas del asma y deben ser siempre prescritos en combinación con agonistas  $\beta_2$  inhalados de acción corta. En caso de que se produzca un deterioro clínico del paciente, se deberán añadir, si es necesario, corticoides inhalados o sistémicos al tratamiento.

Son la primera generación de fármacos con acción específica sobre la diana terapéutica, pero lo importante en el futuro será conseguir determinar, *a priori*, los pacientes respondedores a los mismos.

Su utilización debería ser considerada en las siguientes circunstancias:

- Pacientes afectados de asma leve o moderada en los que los corticoides no sean de primera elección.
- Terapia preventiva en pacientes afectados de asma inducida por alérgenos, ejercicio o AAS.
- Terapia adicional en pacientes mal controlados con corticoides inhalados.

El médico debe esperar una mejoría en el 50% de los pacientes. Si no se produce mejoría clínica en 14 días, se debe interrumpir el tratamiento, ya que probablemente se trata de un paciente no respondedor.

### 1.3.5.- Futuro del desarrollo de nuevos antileucotrienos

- **Nuevos antileucotrienos en desarrollo para el asma bronquial**

El ABT-761 (Abbot) es un inhibidor de la 5-LOX que presenta una potencia 150 veces superior a la de zileuton. A pesar de llegar a la fase III de desarrollo para la indicación de asma bronquial <sup>(Reid, 2001)</sup>, en la actualidad todavía no ha sido aprobado por las agencias reguladoras.

- **Antileucotrienos en patologías distintas al asma**

Debido al conocimiento cada vez mayor del origen, producción, metabolismo e implicaciones fisiopatológicas de los leucotrienos, así como su participación en diversas patologías, es de prever que se procedan a realizar estudios con los compuestos actualmente comercializados o se inicie la búsqueda de nuevos compuestos activos en esta vía metabólica para ser utilizados en la prevención y tratamiento de ciertos cánceres, tratamiento de la dermatitis atópica y otras patologías que presentan prurito asociado así como para la enfermedad inflamatoria intestinal y la psoriasis, entre otras.

Actualmente se encuentran en fases iniciales de desarrollo inhibidores duales que interfieren simultáneamente en diversas vías de la inflamación. El derivado natural de la *Isatis tinctoria*, tripantrina (ZE550), ha mostrado capacidad de inhibir la COX2 y la producción de LTB<sub>4</sub> con

una potencia similar a la de zileuton en diversas líneas celulares <sup>(Danz et al., 2002)</sup>. Otro inhibidor dual de la COX1 y de la 5-LOX es la denominada hiperforina, derivado natural del *Hypericum perforatum*. Esta sustancia se ha utilizado en medicina natural para el tratamiento de la depresión leve. Por otra parte, ha mostrado propiedades antibacterianas <sup>(Schempp et al., 1999; Fiebisch et al., 1999; Albert et al., 2002)</sup>, inhibición de la proliferación de células mononucleares y células tumorales así como inducción de apoptosis <sup>(Schempp et al., 2000; Albert et al., 2002)</sup>. Es un extracto químicamente inestable y que en ocasiones desencadena fotosensibilidad y presenta interacciones farmacológicas con otras sustancias, por lo que, a pesar de haber iniciado su desarrollo con intención de mostrar eficacia para el tratamiento de enfermedades cutáneas alérgicas o inflamatorias, difícilmente pasará a fases subsiguientes.

El LDP-392 es un antagonista dual del factor activador de las plaquetas (PAF) con una potencia similar al MK280 (antagonista del PAF) y de la 5-lipoxigenasa con una potencia 17,9 veces la de zileuton. Sus características farmacológicas se han probado *ex vivo* mostrando inhibición de la producción de LTB<sub>4</sub> e “*in vivo*” disminuyendo el edema inducido en la oreja de ratón y también el eritema provocado por la aplicación de luz UV en el cobaya. Se inició el desarrollo clínico para el tratamiento de la psoriasis y la dermatitis atópica <sup>(Quian et al., 2001)</sup>, pero todavía no ha concluido. Otro inhibidor dual, en este caso de la 5-lipoxigenasa (5 veces más potente que zileuton) y de la TXA<sub>2</sub> sintetasa es el E3040. Ha mostrado inhibir la producción de LTB<sub>4</sub> y tromboxano B<sub>2</sub> en células peritoneales de rata y en células sanguíneas humanas <sup>(Oketani et al., 2001)</sup> y su desarrollo se ha iniciado con idea de obtener un nuevo principio activo para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal. Por el momento no se ha iniciado la fase clínica. Por último, se han iniciado estudios preclínicos “*in vivo*” con el SC-57461 A, el primer inhibidor selectivo de la leucotrieno A<sub>4</sub> hidrolasa. Ha mostrado ser eficaz tanto oral como tópicamente en la reducción del edema de la oreja de ratón inducida por ácido araquidónico <sup>(Kachur et al., 2002)</sup>.

A pesar de que ninguna de estas sustancias haya terminado el desarrollo clínico, las vías metabólicas derivadas de la activación del ácido araquidónico es un campo terapéutico altamente interesante, en el que se requiere el desarrollo de nuevos compuestos con actividad sobre ellas, particularmente sobre la lipoxigenasa y sus compuestos biológicos activos. En todo caso, el descubrimiento de las implicaciones de estas sustancias biológicas en la señalización de los procesos de proliferación y de apoptosis celular amplían considerablemente el campo de posible actuación de los antileucotrienos y renuevan el interés en su desarrollo como medicamentos.

## 2.- DESARROLLO CLÍNICO DE NUEVOS FÁRMACOS

El desarrollo clínico de los fármacos se inicia tras finalizar la fase preclínica, en que el principio activo ha debido demostrar datos de eficacia farmacológica en estudios “*in vitro*”, *ex vivo*, y/o, “*in vivo*”, así como datos de ausencia de toxicidad en estudios de toxicidad aguda y crónica en, al menos, dos especies animales distintas.

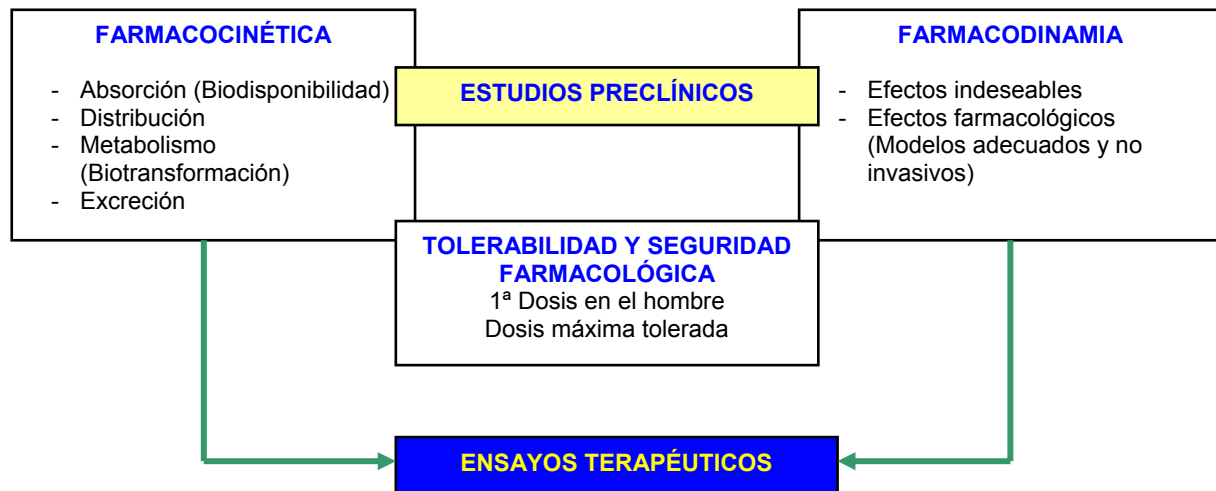
Tras esta fase, el laboratorio promotor tiene la obligación de preparar un amplio informe con todos los datos preclínicos disponibles y el plan de desarrollo clínico de un producto, que se debe presentar a la Agencia Española del Medicamento junto con el protocolo del primer ensayo clínico para que dé su aprobación para empezar los estudios en seres humanos. En España esta calificación es conocida como PEI, producto en fase de investigación clínica (RD223/04).

La Ley 29/2006 de Garantía y Uso Racional del Medicamento<sup>(L29/2006)</sup> utiliza la siguiente definición de ensayo clínico: a los efectos de esta Ley, se entiende por ensayo clínico toda investigación efectuada en seres humanos, con el fin de determinar o confirmar los efectos clínicos, farmacológicos y/o demás efectos farmacodinámicos, y/o de detectar las reacciones adversas, y/o de estudiar la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de uno o varios medicamentos en investigación con el fin de determinar su seguridad y/o su eficacia.

El desarrollo clínico se inicia con el primer estudio en humanos y está constituido por 4 fases sucesivas distintas que presentan cada una sus características y objetivos particulares y que se exponen a continuación.

### 2.1.- Ensayos clínicos de fase I

La fase I, que algunos autores han sugerido que se denomine “farmacología humana” es una prolongación natural de la investigación preclínica y constituye un puente de unión entre la investigación básica en animales y la investigación terapéutica que se inicia con la fase II. El objetivo principal de esta fase consiste en establecer la eventual dosis máxima tolerada y el perfil de seguridad clinicobiológico del compuesto en investigación. También se investiga en esta fase clínica el comportamiento farmacocinético del mismo y se intentan valorar los efectos farmacológicos en el hombre (figura I-7).

**Figura I-7:** Ilustración gráfica de los distintos componentes de los estudios de fase I.

En general en los ensayos de fase I, los principios activos se administran a voluntarios sanos, a excepción de determinados compuestos altamente tóxicos como los inmunosupresores o antineoplásicos, que se administran directamente a pacientes. Sin embargo, el desarrollo de un fármaco no siempre sigue la secuencia clásica establecida entre las fases I, II y III. Así por ejemplo, la evaluación de bioequivalencia entre diferentes formulaciones de un fármaco ya comercializado (fase IV) se realiza de hecho en voluntarios sanos (fase I). Igualmente sucede cuando se realizan estudios farmacodinámicos y/o de interacción con fármacos ya registrados.

El número de sujetos por estudio suele ser bastante pequeño, entre 8 y 36, y en toda la fase I suelen participar un total de 30 a 100 voluntarios sanos. En cuanto al diseño, los estudios de fase I pueden ser controlados o no controlados, aleatorizados o no aleatorizados, abiertos, simple ciego o doble ciego. La duración total de la fase I suele ser de 9 a 18 meses. Cada ensayo de fase I se suele realizar en un solo centro, ya que el número de sujetos es pequeño y así se reduce la variabilidad <sup>(Bakke et al.,1994)</sup>.

Si bien el concepto de voluntario es fácil de entender desde el punto de vista ético, ya que el libre consentimiento informado es un requerimiento imprescindible previo a su participación en el estudio, no es tan simple definir el concepto de voluntario sano bajo criterios médicos. Según el Royal Collage of Physicians <sup>(Royal Coll Phys,1986)</sup>, un voluntario sano es un sujeto que, según la información disponible, no padece ninguna enfermedad significativa con relevancia para el estudio propuesto, cuyas proporciones corporales y peso están dentro de los límites

normales, y que tiene un estado mental que le permite comprender y otorgar su consentimiento válido para el estudio. Otros autores añaden que es un sujeto que no va a obtener ningún beneficio terapéutico de su participación en el ensayo clínico<sup>(ABPI,1989)</sup>.

Los principales motivos por los que los estudios de fase I se realizan en voluntarios sanos son los siguientes<sup>(Bakke et al., 1994b)</sup>:

- Los datos preclínicos no suelen ser buenos indicadores de un efecto terapéutico en pacientes.
- Es difícil justificar una monitorización intensiva y a veces molesta en pacientes.
- Los sujetos sanos tienen mayor autonomía para expresar su consentimiento libremente.
- Las enfermedades pueden producir alteraciones farmacocinéticas imprevisibles.
- En pacientes, los efectos de los fármacos se pueden confundir con síntomas de la enfermedad
- Finalmente, el objetivo de estos estudios es disponer de suficiente información sobre seguridad y posología antes de administrar el fármaco a pacientes necesitados de tratamiento.

Los motivos por los que los sujetos sanos participan en los ensayos clínicos es la compensación económica, aunque existen otros como el interés científico, la curiosidad, la búsqueda de nuevas experiencias, el altruismo o para ayudar al equipo investigador. Los sujetos que participan en ensayos clínicos en fase I suelen tener ciertas características de personalidad, suelen ser extrovertidos, optimistas, con más autoconfianza, desinhibidos, susceptibles al aburrimiento, y les gusta el riesgo y las nuevas sensaciones<sup>(Pieters et al., 1992; Farré et al., 1995)</sup>.

En la actualidad los requisitos técnico-sanitarios de las unidades donde se llevan a cabo ensayos clínicos con medicamentos sin finalidad terapéutica para los sujetos que participan en ellos está legislado en Cataluña desde la Direcció General de Recursos Sanitaris de la Generalitat<sup>(<http://gencat.es>)</sup> y se especifica el tipo de personal con el que se debe contar, el tipo de instalaciones necesarias, la sistemática de trabajo, que implica la utilización de procedimientos normalizados de trabajo (PNTs) y el equipo y aparataje requerido. Por otra parte también incluye especificaciones en relación a la gestión de los datos obtenidos en los ensayos.

### 2.1.1. Riesgo de los ensayos de fase I

Para que los estudios de fase I se puedan realizar en voluntarios sanos el riesgo debe ser mínimo <sup>(Royal Coll Phys, 1989)</sup>. En cuanto a la magnitud del riesgo, se ha calculado que el riesgo de complicación menor es de 1 a 100 por mil, y el riesgo de complicación grave de 0,01 a 1 por mil <sup>(Bakke et al., 1994c)</sup>. Pero debemos considerar que puede existir otro riesgo desconocido, especialmente cuando se trata de la primera vez que se administra un fármaco a seres humanos.

Al revisar los acontecimientos adversos (AA) que se han descrito en la literatura en ensayos clínicos de fase I, podemos concluir que el riesgo para los sujetos es muy bajo. En un análisis de 524 ensayos realizados de 1985 a 1995 en 1015 voluntarios se encontró una incidencia de AA de 12,8% (13,7% entre los sujetos que recibieron fármaco y 7,9% en los que recibieron placebo <sup>(Sibille et al., 1998)</sup>). No hubo ningún caso de muerte, y únicamente el 3% de los AA notificados fueron de intensidad severa. En un estudio realizado en el Centro donde se ha desarrollado el presente proyecto (CIM-Sant Pau) en el que se analizaron 15 ensayos clínicos de fase I, se pudo observar que los acontecimientos adversos son más frecuentes en estudios de dosis repetida, en mujeres y en voluntarios que han participado más de una vez <sup>(Antonijuan et al., 2000)</sup>.

### 2.1.2.- Estudios de seguridad y tolerabilidad

Estos estudios constituyen sin duda la primera etapa en la investigación de un fármaco en el hombre. A partir de la información preclínica se deben determinar la primera dosis a administrar, sus incrementos subsiguientes y la frecuencia de administración <sup>(Vaidya y Vaidya, 1981)</sup>. Aunque se han sugerido numerosos métodos para tomar estas decisiones, todos ellos tienen en común el objetivo de garantizar la máxima seguridad a los participantes en el estudio. Es importante destacar que la dosis máxima que se evaluará, si no parecen efectos sobre ninguno de los parámetros estudiados, debe ser determinada *a priori*.

En estos estudios se suelen evaluar los cambios inducidos por las dosis administradas en los signos vitales, con la ayuda de cuestionarios, sobre síntomas (subjetivos), y sobre variables de laboratorio que incluyen pruebas habituales hematológicas y bioquímicas en sangre y en orina.

Si bien existe una amplia variabilidad en los diseños que se utilizan en estos estudios, es una práctica habitual que las primeras evaluaciones sean abiertas, reservándose los diseños a simple y doble ciego para ensayos posteriores con finalidad confirmatoria de los hallazgos obtenidos en las fases más tempranas. Sin embargo, mientras no exista un claro consenso sobre la forma de tomar decisiones, solo la experiencia de los investigadores puede valorar, en su verdadero alcance, los resultados obtenidos.

### 2.1.3.- Estudios farmacocinéticos

El objetivo de estos estudios se centra en obtener información sobre los procesos de absorción, distribución, metabolización y excreción de fármacos. La exigencia de disponer de un método analítico (cromatografía líquido-líquido, de gases, técnicas inmunológicas, espectrometría de masas, e incluso utilización de sustancias con maracador radioactivo) que sea suficientemente sensible, preciso, exacto y reproducible es condición obligada para determinar los niveles del fármaco y/o sus metabolitos en líquidos biológicos <sup>(Toon et al., 1990)</sup>.

Los estudios farmacocinéticos se realizan en general en condiciones abiertas, a no ser que interese evaluar paralelamente la tolerabilidad de una nueva forma de dosificación frente a una ya conocida. En estos casos se debe utilizar la técnica de doble ciego e incluso de doble enmascaramiento. Los tiempos de muestreo se decidirán según la información obtenida a partir de datos previos existentes sobre el perfil cinético del fármaco. Si estos no existen, se deberá realizar un estudio piloto para decidir los tiempos de recogida de muestras de sangre y/u orina. Para cada exponencial que se requiera para caracterizar adecuadamente la curva de los niveles plasmáticos del fármaco en estudio, se precisará disponer por lo menos de 3 puntos experimentales. Asimismo, se deberá efectuar un seguimiento de los niveles plasmáticos del fármaco hasta transcurridas como mínimo tres semividas biológicas <sup>(Torrent et al., 1990)</sup>.

Por último, se deberá disponer de programas informáticos que permitan ajustar los datos experimentales a modelos compartimentales usando para ello técnicas de regresión lineal y no lineal y que también permitan el cálculo amodelístico de los parámetros cinéticos <sup>(Torrent et al., 1988; Obach, 1989)</sup>. Actualmente la tendencia es la de utilizar programas informáticos que permitan integrar el tratamiento simultáneo de los parámetros cinéticos y dinámicos y de esta forma permitan describir el modelo cinético-dinámico al que mejor se ajustan los datos obtenidos <sup>(Colburn, 1986)</sup>.



### **2.1.3.1.- Tipos de estudios farmacocinéticos en fase I**

#### ***Estudios farmacocinéticos tras administración de dosis únicas***

- Caracterización de parámetros cinéticos por vía oral, intramuscular, endovenosa, rectal y tópica.
- Estudios de linealidad cinética
- Cálculo de la biodisponibilidad absoluta y relativa
- Estudios de bioequivalencia
- Obtención de perfiles de liberación “*in vivo*” de las formulaciones retardadas

#### ***Estudios farmacocinéticos tras la administración de dosis repetidas***

- Caracterización de parámetros representativos de las concentraciones en estado de equilibrio estacionario “steady state”.
- Bioequivalencia (datos obtenidos a partir de concentraciones plasmáticas de un intervalo en equilibrio estacionario).
- Linealidad cinética (administración de regímenes posológicos diferentes)
- Estudios de predicción de niveles en equilibrio estable a partir de los datos obtenidos tras una dosis única.

#### ***Estudios de interacciones farmacocinéticas***

- Coadministración de dos fármacos a dosis únicas o repetidas.
- Pretratamiento continuado y administración aguda de otro fármaco.
- Interacción con otros factores: ayuno/comida, edad (adultos, jóvenes, ancianos), tabaco, alcohol.

### **2.1.4.- Estudios farmacodinámicos: evaluación del efecto farmacológico**

La evaluación de los efectos que los fármacos inducen en el hombre es, sin duda, el campo más atractivo y desafiante de los estudios en fase I. Sin embargo, no hay que olvidar que la

eficacia clínica, propiamente dicha, de cualquier sustancia sólo se puede establecer en los grupos en que su acción es potencialmente necesaria, es decir, en los pacientes afectados de la patología correspondiente (Bakke et al., 1994b).

En la práctica clínica habitual son muchos los factores que influyen en la eficacia de la terapéutica farmacológica. Se podrían resumir en los siguientes puntos:

- a. Fármaco: composición y forma de prescripción (vía, dosis, intervalo de dosificación)
- b. Efecto placebo: depende de la patología, del fármaco y de factores externos.
- c. Interacciones farmacológicas positivas o negativas por la coadministración de fármacos.
- d. Factores ambientales
- e. Factores impredecibles
- f. Evolución espontánea de la enfermedad

En los estudios farmacodinámicos que se realizan en individuos sanos en las unidades de fase I se intenta determinar el efecto farmacológico que posee el fármaco en estudio para intentar determinar el efecto que poseerá en los pacientes (Torrent et a., 1990).

Pueden acontecer diversas situaciones:

- No se observan efectos ni en los sujetos sanos ni en los pacientes: se puede deber a que el fármaco sea inactivo, o bien que la vía de administración elegida no es la adecuada por lo que el fármaco no alcanza la biofase, la dosis puede ser insuficiente o bien que la variable evaluada sea irrelevante.
- No se observa ningún signo de actividad en los sujetos sanos: es una situación frecuente y se debe a que el fármaco sólo actúa sobre un sistema alterado. Para obviar esta situación se diseñan modelos farmacológicos para imitar la patología observada en la población de pacientes. En algunos casos no implica grandes dificultades, pero en otros, como en los casos de los antiepilépticos o antidepresivos es muy difícil e incluso imposible el establecimiento de un modelo en humanos sanos.

- El fármaco es activo tanto en sistemas normales como alterados: en este caso son factibles las predicciones directas a partir de sujetos sanos. Este es el caso de los fármacos que actúan en una cascada bioquímica (IECAs) o bien en rutas metabólicas con retroalimentación (inhibidores de la HMG-Co A reductasa).
- El fármaco es activo sobre una determinada variable en sujetos sanos, pero es inactivo sobre esa misma variable en los pacientes: esto sugiere que el fármaco sólo es activo en un sistema reactivo. Se considerarían sistemas "no reactivos" los tejidos esclerosados o bien los déficits enzimáticos. Esta situación puede conllevar la predicción incorrecta de los efectos y/o una incorrecta estimación de la variabilidad en la relación dosis-efecto en los pacientes.
- En el caso de que la variable a estudiar pretenda evaluar el efecto preventivo de un fármaco sobre una determinada función biológica (por ejemplo antiagregantes plaquetarios) el valor predictivo a partir de los voluntarios sanos suele ser muy limitado.

Los componentes que se integran en la respuesta a un fármaco son la dosis, la concentración plasmática, la biofase, la interacción con el receptor, la respuesta y los mecanismos homeostáticos.

Como ya hemos visto anteriormente, la farmacodinamia va a permitir relacionar las concentraciones plasmáticas del fármaco con la respuesta. Es importante para explicar la variabilidad intra e interindividual. Es esencial definir la entidad química activa, ya sea el compuesto originario, un metabolito activo o un determinado isómero y también conocer la fracción libre del fármaco, es decir, no unida a proteínas. En los procesos farmacodinámicos a su vez influye el estado de los receptores, que no es estático sino que puede haber variaciones homeostáticas mediante fenómenos de desensibilización y supersensibilidad. Por otra parte, pueden ocurrir los denominados acontecimientos post-receptor, que implican cambios en determinadas funciones fisiológicas que pueden dar lugar a retrasos temporales en la respuesta. Finalmente, las propias respuestas generadas pueden retroalimentar todo el proceso, pudiendo producir variaciones en la disponibilidad del fármaco en el lugar de acción.

Debido a todo lo expuesto, se comprende que la medición del efecto y su interpretación es compleja y variable por lo que deben existir unos requerimientos básicos en relación a las variables a evaluar, la metodología a seguir y el análisis a aplicar.

Idealmente, las variables deben ser “*no invasivas*” para ser éticamente aceptables, *sensibles* a cambios de dosis y concentraciones cuando se consideran respuestas graduales, *reproducibles* intrasujeto e interinvestigadores, *selectivas* en relación a la función evaluada, *específicas* en relación al mecanismo de acción del fármaco, *robustas* en términos de facilidad en la ejecución y susceptibilidad a influencias externas. Las variables deben estar *validadas* en relación al fenómeno clínico objeto de interés.

El diseño experimental de los estudios farmacodinámicos es complejo e incluye todo lo siguiente: un período de entrenamiento previo, tanto para el voluntario como para el investigador. Se deben realizar mediciones de las variables objeto de estudio, pre y postratamiento. Debe existir control con placebo y con un estándar positivo (medicación de referencia) y evaluarse diferentes dosis del fármaco experimental. El diseño, en la medida de lo posible, debe ser cruzado y doble ciego, teniendo en cuenta el tiempo necesario que debe transcurrir entre la administración de los distintos tratamientos (período de blanqueo).

Debe hacerse especial énfasis en el sexo, edad y peso de los sujetos así como en la determinación de ciertas características que variarán en función del tipo de estudio particular, como criterios de inclusión adicionales. Se debe realizar un control estricto de determinadas condiciones que pueden influir sobre la variable que se evalúa, como son las horas de sueño, la ingesta de comida y bebida, el momento del día y de la semana, la situación ambiental, el orden en que se llevan a cabo las evaluaciones e incluso la propia actitud del investigador. No hay que olvidar que generalmente los participantes serán voluntarios sanos que percibirán remuneración económica <sup>(Bakke et al., 1994b)</sup>.

El cálculo del tamaño de la muestra en este tipo de estudios no se realiza de forma reglada, sino que se efectúa más basado en datos obtenidos de la experiencia previa. Debido a que se estudian de forma simultánea un gran número de parámetros y que se desconoce en ocasiones cuál de ellos es más relevante, no se pueden utilizar las estrategias de inferencia estadística habitual para interpretar los resultados. Por ello se ha desarrollado la aproximación denominada "análisis estadístico descriptivo" (AED), en que se obtiene un valor de p para

cada una de las comparaciones estadísticas individuales. Cada uno de estos valores de  $p$  indicará la probabilidad de obtener una discrepancia igual o mayor a la observada en la muestra cuando  $H_0$  es cierta. Se crea de esta forma un cierto patrón de valores en el que aquellas  $p$  menores serán indicativas de áreas donde las diferencias observadas, potencialmente podrán ser consecuencia real del efecto farmacológico. En ningún caso, sin embargo, pueden ser interpretadas como criterio de decisión para rechazar una hipótesis nula individual. De todas formas, adicionalmente, en la interpretación de los resultados del AED se debe tener en cuenta la relevancia biológica de los efectos observados y la secuencia temporal en la valoración de la respuesta.

En definitiva, los estudios farmacodinámicos en voluntarios sanos tienen como objetivo, por una parte, la predictibilidad de los efectos deseados y/o no deseados de los fármacos, estudio de potencia entre distintas dosis (relaciones dosis-respuesta), comparar distintas formulaciones (estudios de bioequivalencia) o comparar efectos entre fármacos de un mismo grupo terapéutico (relación de dosis clínicamente equivalentes). Mediante los estudios de fase I también es posible evaluar el curso temporal de los efectos de los fármacos, efectuar estimaciones del intervalo de dosificación y determinar si el efecto es debido al fármaco en estudio o bien a un metabolito activo. Otro objetivo de estudio de máximo interés en las investigaciones farmacodinámicas en fase I es la evaluación de interacciones, entre fármacos, con comida u otras circunstancias varias <sup>(Torrent et al., 1990)</sup>.

Como conclusión podríamos decir que los estudios en fase I, pueden generar resultados que proporcionen información relevante sobre efectos farmacodinámicos de un nuevo compuesto que sea de interés terapéutico. Estos estudios iniciales en voluntarios sanos, como se verá más adelante durante el desarrollo de este trabajo, pueden ser de gran ayuda en la toma de decisiones sobre las fases siguientes del desarrollo clínico de un fármaco, cuando se planifican los estudios en pacientes. Sin embargo, las limitaciones de las investigaciones farmacodinámicas no deben olvidarse, ya que la eficacia terapéutica de un fármaco sólo puede establecerse de forma incontrovertida allí donde se requiere, esto es, en pacientes. En cualquier caso, su correcta evaluación permitirá que los estudios sucesivos se lleven a cabo de forma más segura y eficiente, y por tanto más ética <sup>(Torrent et al., 1990)</sup>.

### 2.1.4.1.- Métodos farmacodinámicos disponibles en fase I

*Métodos que evalúan cambios directos inducidos por la administración de un fármaco sobre un determinado órgano o sistema:*

*Modelos fisiológicos (sin agente de provocación)*

- Registros continuos de la presión arterial y frecuencia cardíaca
- Registros continuos de ECG (Holter 24 h)
- Evaluación de parámetros cardiovasculares: Pletismografía digital, doppler, ecocardiografía, análisis computorizado de intervalos sistólicos, ECG automatizado y ortostatismo (mesa basculante).
- Cuantificación de la secreción ácida gástrica
- Registro de la motilidad gastrointestinal
- Estudio de la agregación plaquetar

*Métodos que evalúan cambios inducidos por el fármaco sobre un determinado órgano o sistema que previamente ha sido modificado (modelo farmacodinámico)*

*Modelos inducidos con provocación farmacológica o estímulo nocivo* (Bakke et al., 1994a)

<b>Variable</b>	<b>Provocación</b>
- Pápula cutánea	Inyección intradérmica de histamina
- Eritema cuáneo	Histamina, serotonina, irradiación ultravioleta
- Dolor	Electricidad, frío, presión mecánica
- Secreción gástrica de HCL	Pentagastrina
- Broncoespasmo	Histamina, metacolina
- Ansiedad	Estrés
- Actividad simpática	Esfuerzo físico, estrés psíquico

## 2.2.- Ensayos clínicos de fase II

Esta fase del desarrollo de un fármaco consiste en pequeños ensayos en sujetos que padecen la enfermedad a tratar (generalmente ensayos de 24 a 300 pacientes). Los objetivos de los estudios de fase II es comprobar el hipotético efecto terapéutico, identificar la población de pacientes a los que irá dirigido el tratamiento y en los que parece poseer efecto terapéutico y determinar un régimen de dosificación para estudios subsiguientes a gran escala (Bakke et al., 1994a).

Su objetivo es demostrar la eficacia del nuevo fármaco, delimitar un intervalo de dosis terapéuticas y la variabilidad individual dentro de ese intervalo, verificar la seguridad de dichas dosis y valorar la relación eficacia-efectos adversos. Para ello se utilizan los ensayos de búsqueda de dosis que pueden ser de dosis escalonada o titulación de dosis en que todos los pacientes empiezan con una dosis baja supuestamente eficaz y según la respuesta observada se aumenta la dosis hasta alcanzar la eficacia óptima o hasta que aparezcan efectos adversos. La otra modalidad es diseñar ensayos a dosis fijas, en que se administran distintas dosis a los pacientes que se mantienen constantes a lo largo del tiempo.

El paciente tiene siempre el derecho a retirarse del ensayo en cualquier momento. Se evitarán factores de confusión y se extremarán las precauciones, incluyendo a pacientes con una enfermedad bien definida y excluyendo a niños, embarazadas y ancianos. De forma excepcional pueden realizarse ensayos en fase II en estos grupos cuando el fármaco vaya a utilizarse prioritariamente en ellos.

Los ensayos de fase II se realizan en un número pequeño de pacientes (100-400), con estricta supervisión médica y del cumplimiento terapéutico, y suelen ser de corta duración usándose variables intermedias o subrogadas para obtener unos resultados más rápidos. Suele tratarse de ensayos clínicos aleatorizados, doble-ciego, controlados con placebo y con criterios de inclusión muy restrictivos para tener una muestra muy homogénea que nos permita comprobar la eficacia con un pequeño número de pacientes. Esta fase del desarrollo clínico suele durar de 1 a 3 años.

### 2.3.- Ensayos clínicos de fase III

Los estudios de fase III son ensayos clínicos destinados a evaluar la seguridad y eficacia del tratamiento experimental a corto y largo plazo, intentando reproducir las condiciones de uso habituales y considerando las alternativas terapéuticas disponibles en la indicación estudiada. Se realiza en una muestra de pacientes más amplia que en la anterior y representativa de la población general a la que iría destinado el medicamento. Además, se compara el nuevo fármaco con otros tratamientos en uso y se analizan otros datos, como número de tomas al día, preferencia del paciente y necesidad de controles clínicos o analíticos. Cuando la enfermedad es poco frecuente, suelen realizarse estudios multicéntricos que permiten reunir un número suficiente de casos en poco tiempo.

Los estudios de fase IIIa son los que se llevan a cabo una vez determinada la eficacia terapéutica, tras el envío a las autoridades reguladoras de la solicitud de aplicación del nuevo compuesto (New Drug Application (NDA)). Son estudios controlados, aleatorizados y enmascarados en gran número de pacientes con criterios de inclusión y de exclusión laxos (estudios de efectividad o pragmáticos) y constituyen la evidencia de efectividad terapéutica que las autoridades reguladoras exigen para la tramitación del expediente del nuevo compuesto. Por eso, con frecuencia son considerados como ensayos fundamentales (“pivotal trials”). Una vez aceptada la tramitación y antes de la aprobación y comercialización del nuevo compuesto, se realizan los llamados estudios de fase IIIb <sup>(Bakke et al., 1994a)</sup>.

Así pues, los ensayos clínicos de fase III son un eslabón fundamental en el desarrollo de la investigación de un fármaco. Es importante que las condiciones en que se realiza el ensayo se aproximen lo más posible a la situación real en que luego va a ser utilizado el fármaco y que la muestra elegida permita hacer una extrapolación amplia de los resultados que se obtengan. Los factores de error que pueden influir sobre los resultados en el fase III son muy numerosos. La mejor forma de paliarlos es recurrir a la realización de ensayos controlados, aleatorizados y ciegos.

La realización del ensayo en fase III exige: una dura justificación de la hipótesis de trabajo; una motivación suficiente; un protocolo financiero bien definido; una dotación técnica adecuada y el cumplimiento de los requisitos legales vigentes en España <sup>(RD223/04)</sup>.



## 2.4.- Ensayos clínicos de fase IV

Los estudios que se realizan con posterioridad a la comercialización del fármaco son los de fase IV. En las fases anteriores las poblaciones a estudio son restringidas y la exposición del paciente al fármaco es limitada. Por tanto, es importante continuar con estudios que amplíen el conocimiento sobre: 1) la eficacia del fármaco durante un uso prolongado, pues el curso natural de la enfermedad puede modificarse a lo largo de meses o años; 2) las reacciones adversas que ocurren menos frecuentemente o con el uso del tratamiento a largo plazo; 3) la información sobre datos comparativos a largo plazo; 4) las causas por las que algunos pacientes no responden al tratamiento; 5) la sobredosificación, mala utilización y abuso de fármacos; 6) las interacciones medicamentosas; y por último 7) la acción en poblaciones especiales (ancianos, niños, gestantes). En la fase IV se mezclan con frecuencia los objetivos técnicos y los comerciales y a veces es difícil trazar la línea de separación entre ambos. Actualmente se encuentran regulados por la Circular 15/2002 <sup>(15/2002)</sup>.

### 3.- INVESTIGACIÓN “*IN NUMERO*”: APROXIMACIÓN POBLACIONAL

Durante mucho tiempo, las áreas farmacológicas de la farmacocinética y la farmacodinamia fueron consideradas como disciplinas separadas. La farmacocinética se limitaba a la descripción del curso temporal de las concentraciones plasmáticas en los distintos fluidos corporales y la farmacodinamia a la caracterización de la intensidad del efecto. Sin embargo, al considerarse por separado, la información proporcionada por ambas disciplinas es limitada. El modelado farmacocinético/farmacodinámico (PK/PD) constituye el puente entre esas dos disciplinas clásicas de la farmacología. Relaciona el cambio temporal de las concentraciones plasmáticas evaluado farmacocinéticamente, con la relación, en la mayoría de los casos estática, entre la concentración en el lugar del efecto y la intensidad de la respuesta observada, establecida mediante la farmacodinamia. Así, los modelos resultantes, los denominados modelos PK/PD permiten la descripción completa del curso temporal de los efectos, deseados o no deseados, como respuesta a un régimen de dosificación (Derendorf et al., 1999).

#### 3.1.- Estudios “*in numero*”

El modelado PK/PD pasa a ser considerado un “*estudio in número*” en oposición/complemento a los tradicionales “*estudios in vivo*” (experimentales) (Aarons et al., 2001). Un estudio “*in número*” es una investigación particular llevada a cabo utilizando técnicas matemáticas, estadísticas y numéricas en un entorno informático. Su objetivo es responder a una pregunta específica pertinente en relación con el fármaco en cuestión, con la intención de, por ejemplo, justificar la selección de un régimen terapéutico de dosificación, proporcionar argumentos para la toma de decisiones en el proceso de desarrollo o justificar la demanda de cierto etiquetaje del compuesto. Se puede llevar a cabo en la población general de pacientes, en poblaciones especiales o en sujetos sanos. Puede plantearse de forma prospectiva como parte del plan estratégico de desarrollo clínico o iniciarse como reacción a resultados inesperados procedentes de uno o varios ensayos clínicos. A priori, un estudio “*in número*” no requiere un nuevo ensayo clínico sino que se basa en (incluso de forma más precisa, consiste en) el modelado matemático y análisis estadístico de datos ya existentes, seleccionados en función de los objetivos planteados. En general, el análisis será combinado e implicará la

reunión de datos procedentes de diferentes estudios. Un protocolo del estudio “*in número*” debe consensuarse antes de iniciar el análisis para explicitar los objetivos, las etapas a llevar a cabo en el modelado incluyendo los criterios de selección de los datos y los resultados esperados, y las etapas a efectuar en los procesos de validación y simulación, en caso de que se consideren necesarios.

En la tabla siguiente se exponen las características fundamentales de ambos tipos de estudios.

**Tabla I-7:** Estudios “*in vivo*” frente a estudios “*in número*”: dimensiones de ambos tipos de estudio.

	Estudio “ <i>in vivo</i> ”	Estudio “ <i>in número</i> ”
Diseño	Especificado en el protocolo clínico	Especificado en el protocolo de M&S
Recolección de datos	Totalmente detallado	Selección de estudios, datos totalmente especificados
Calidad	BPC,BPL, PNTs	BPP, M&S Buenas Practicas
Objetivos	Preestablecidos	Preestablecidos
Análisis	Preestablecido ( <u>exploratorio/confirmatorio</u> )	Preestablecido ( <u>exploratorio/confirmatorio</u> )
Informe	Informe del estudio según guías	Informe según guías (no memorando)
Prioridad	Alta y rigurosa	Alta y rigurosa
Promotor	Identificable	Identificable
Investigador	Grupo clínico y otros definidos	Grupo de evaluación definido
Costes/presupuesto	Aprobado/fijo	Aprobado/fijo

Tabla adaptada de Aarons et al, 2001. M&S: modelado y simulación. BPC: Buenas prácticas clínicas. BPL: buenas prácticas de laboratorio; PNTs: procedimientos normalizados de trabajo. BPP: mejor predicción posible (“best posible prediction”).

### 3.2.- Aproximación poblacional

Mayoritariamente el objetivo que se plantea en la investigación consiste en conocer el comportamiento de una determinada población, entendiendo por población el conjunto de elementos que comparten unas determinadas características. En general a partir de la información obtenida en una muestra se pretende describir las características de la población, esto es: (i) ¿cuál es el comportamiento medio?, (ii) ¿qué factores influyen en ese comportamiento y (iii) ¿qué grado de incertidumbre está asociado a ese comportamiento?.

Existen diferentes métodos de análisis para aproximarnos a esos objetivos según el procedimiento que se utilice en el manejo de los datos. Se pueden llegar a describir seis distintos <sup>(Barbanoj al., 2006)</sup>.

- a) Aproximación de mezcla inocente de datos (“Naive pooled data approach”), donde se obtiene un modelo sin variabilidad entre sujetos (VES) ni variabilidad entre ocasiones (VEO) a partir de la mezcla de los datos de todos los individuos.
- b) Aproximación de promediado inocente de datos (“Naive averaged data approach”), donde el modelo se obtiene, también sin VES ni VEO a partir de los datos promedio de todos los individuos.
- c) Aproximación estándar en dos etapas (“Standard two-stage approach”) que implica la existencia de dos fases para obtener los estimados finales. En la primera etapa se estiman los parámetros para cada individuo a partir de sus datos y en la segunda etapa se calcula la media y la varianza poblacional de cada parámetro y se explora su posible relación con covariables.
- d) Aproximación en tres etapas (“Three stage analysis”). Las dos primeras etapas son idénticas a las de la aproximación estándar en dos etapas y en la tercera etapa se selecciona el mejor modelo de distribución aleatoria para VES basándose en diferencias en el valor de la función objetiva. Solo es aplicable a datos en los que los individuos se hayan caracterizado de manera intensiva, provenientes de diseños experimentales con un elevado nivel de control, balanceados y sin pérdida de valores.
- e) Estimación bayesiana (“Bayesian estimation”). Se utilizan la distribución previa de los estimados de los parámetros y los datos obtenidos para estimar la distribución posterior de los parámetros. El método es aplicable a datos provenientes de diseños observacionales (datos oportunistas), sin embargo, es necesario un consenso sobre los estimados previos y su variabilidad, dependiendo la calidad de los resultados de la incertidumbre de los priores.

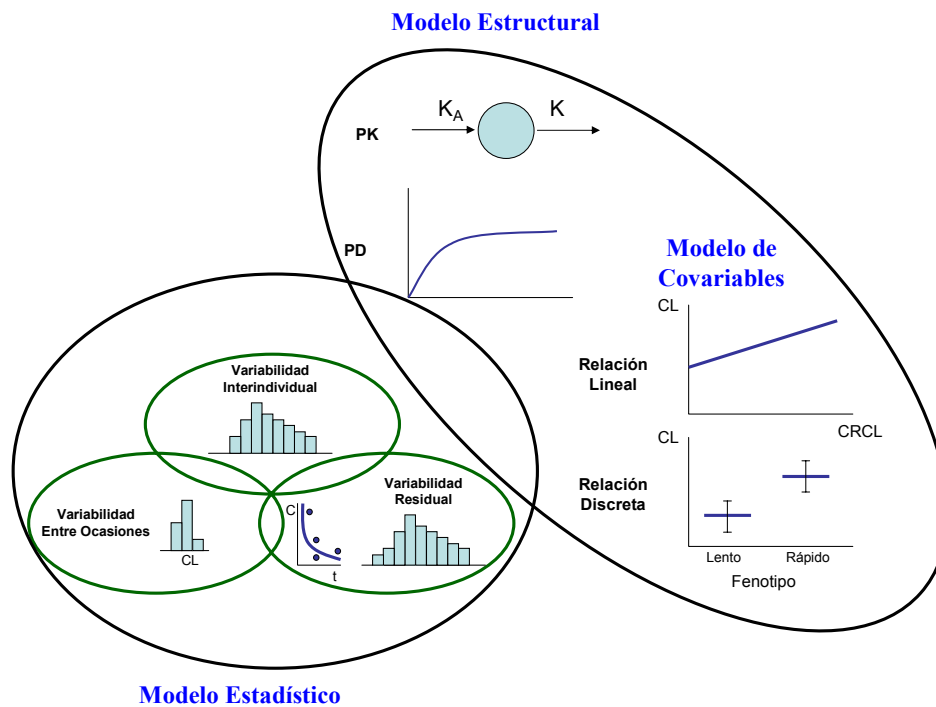
- f) Análisis en una etapa (“Linear and non-linear mixed effects modelling”). En estos métodos todos los individuos son analizados simultáneamente, se explora la relación entre las covariables y posteriormente, los parámetros individuales pueden obtenerse utilizando estimados bayesianos empíricos. Se pueden estimar las variabilidades entre-sujetos (VES), entre-ocasiones (VEO) e intra-sujeto (VIS), tanto a partir de datos provenientes de diseños observacionales (con bajo número de muestras por individuo y escasa información por muestra) como de diseños experimentales con elevado nivel de control.

Mayoritariamente en el área del modelado PK/PD se plantea como equivalente el llevar a cabo una aproximación poblacional y el utilizar el método de análisis en una etapa. En estos análisis la estimación de los parámetros se realiza generalmente mediante el principio de máxima probabilidad (“maximum likelihood”), habiéndose publicado y experimentado varios tipos de aproximaciones a la estimación de la máxima probabilidad (NONMEM: aproximación no-lineal, NPLM: aproximación no-paramétrica, POPKAN: aproximación bayesiana). Sin embargo, el claro dominio de la aplicación de NONMEM (modelos no lineales de efectos mixtos) como programa para llevar a cabo los cálculos ha conllevado, en la práctica, su conversión como sinónimo de aplicar estos métodos de análisis.

### **3.2.1.- Estructura básica de un modelo poblacional**

Un modelo poblacional consiste en la integración de dos modelos, los denominados modelo estructural y modelo estadístico (figura I-8).

**Figura I-8:** Representación esquemática de un modelo poblacional en que se puede observar la integración entre el modelo estructural y el estadístico.



El modelo estructural es el que define el comportamiento PK/PD en el individuo típico (medio) de la población en función de ciertos factores capaces de alterarlo. Estará compuesto por un modelo PK/PD y un modelo de Covariables. El modelo PK/PD será el que identificará los parámetros que caracterizan el comportamiento medio y el modelo de Covariables será el que identificará los factores que afectan a ese comportamiento medio del fármaco a través de un cambio en alguno de los parámetros PK/PD. Las covariables potencialmente a tener en cuenta podrían clasificarse en: demográficas (sexo, peso, talla, edad, superficie corporal, raza), hábitos (consumo de alcohol, tabaco, dieta), de laboratorio (creatinina sérica, bilirrubina, albúmina, genotipos, fenotipos), o fisiopatológicas (co-medicaciones, duración de la enfermedad, severidad de la enfermedad). Los parámetros del modelo estructural reciben el nombre de parámetros fijos (“fixed parameters”) al ser comunes a todos los individuos.

El modelo estadístico es el que cuantifica el grado de incertidumbre en los parámetros y en las observaciones y está compuesto, como mínimo, por dos términos: la variabilidad interindividual (VII) y la variabilidad residual.

La variabilidad interindividual cuantifica las desviaciones de los parámetros de cada individuo respecto al valor típico poblacional  $\theta$ . Para un determinado parámetro, el conjunto de todas las desviaciones ( $\eta$ ) forma una variable al azar denominada “random effect parameter” caracterizada por un valor medio = 0 y una varianza =  $\omega^2$ . Para un número n de individuos de un estudio, un determinado parámetro  $\theta_1$  acontecerá que:

$$\begin{aligned} \theta_{1\ i=1} &= \theta_1 \times e^{\eta_{\theta_1, i=1}} \\ \theta_{1\ i=2} &= \theta_1 \times e^{\eta_{\theta_1, i=2}} \\ &\dots\dots\dots \\ \theta_{1\ i=n} &= \theta_1 \times e^{\eta_{\theta_1, i=n}} \end{aligned}$$

Presentando,  $\eta_{\theta_1, i=1}; \eta_{\theta_1, i=2}; \dots; \eta_{\theta_1, i=n}$ , una distribución con un valor medio = 0 y una varianza =  $\omega^2$

La variabilidad intraindividual (residual) cuantifica las desviaciones de las predicciones de cada respuesta (concentraciones plasmáticas o efecto) respecto al valor observado. Para una determinada respuesta el conjunto de todas las desviaciones ( $\varepsilon$ ) forma también una variable al azar (“random effect”) caracterizada por un valor medio = 0 y una varianza =  $\sigma^2$ . Para un número n de observaciones de un estudio:

$$\begin{aligned} C_1 &= \hat{C}_1 + \varepsilon_1 \\ C_2 &= \hat{C}_2 + \varepsilon_2 \\ &\dots\dots\dots \\ C_n &= \hat{C}_n + \varepsilon_n \end{aligned}$$

Siendo  $\hat{C}_{1, \dots, n}$  predicciones individuales del modelo (función del modelo estructural, VII) y presentando,  $\varepsilon_1, \varepsilon_2, \dots, \varepsilon_n$ , una distribución con un valor medio = 0 y una varianza =  $\sigma^2$ .

Considerese, entonces,  $OBS_{ij}$  una observación (nivel plasmático, o valor de respuesta farmacológica) obtenida en el individuo  $i$  al tiempo  $j$ . Ese valor es función (o está determinado) de una serie de factores, como por ejemplo el valor de la dosis administrada a ese individuo  $D_i$ , el valor del aclaramiento, volumen de distribución,  $E_{MAX}$ ,  $C_{50}$  para ese individuo,  $CL_i$ ,  $V_i$ ,  $E_{MAXi}$ ,  $C_{50i}$ , respectivamente, sus características demográficas  $X_i$ , y por aquellos errores que se hayan cometido durante la extracción de muestras, su determinación, etc.

Si englobamos el conjunto de parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos del individuo  $i$  dentro del vector PK/PD $_i$  tendremos <sup>(Boeckmann et al., 1994)</sup>.

$$\text{OBS}_{ij} = f(D_i, \text{PK/PD}_i, X_i) + \varepsilon_{ij},$$

donde “ $f$ ” representa la estructura del modelo seleccionado, que puede ser cualquiera de los distintos modelos farmacocinéticos/farmacodinámicos desarrollados.  $\varepsilon_{ij}$  hace referencia a la diferencia entre  $\text{OBS}_{ij}$  y el valor predicho por el modelo  $f(D_i, \text{PK/PD}_i, X_i)$ . Se asume en general que los valores  $\varepsilon_{ij}$  son independientes entre sí (individuo independientes) y forman parte de una variable al azar simétricamente distribuida alrededor del valor 0 y con varianza  $\sigma^2$ .

### 3.3.- Recuerdo histórico

En los últimos 40 años el modelado PK/PD ha evolucionado desde el concepto básico de la relación dosis-respuesta hasta modelos sofisticados que permiten profundizar en el conocimiento de los mecanismos subyacentes a la acción de los fármacos. Este cambio se ha producido, principalmente ante la mejora de los métodos de cuantificación de fármacos, los avances en las posibilidades informáticas, el creciente interés de las agencias reguladoras y de la academia, y el continuo desarrollo de modelos farmacodinámicos basados en mecanismos fisiológicos.

A pesar de que la farmacología y las matemáticas por separado, tienen una larga historia, su integración en el modelado PK/PD es un área de conocimiento reciente, siendo inexistente hasta inicios del siglo XX. <sup>(Hochhaus et al., 2000)</sup>.

En 1924, Widmar y Tandberg <sup>(Widmar y Tandberg, 1924)</sup> fueron los primeros en aplicar ecuaciones matemáticas para describir la eliminación de fármacos y fue en 1937, en que Teorell <sup>(Teorell, 1937)</sup> estableció los fundamentos de la farmacocinética (PK) moderna. En 1953 en una publicación de Dost <sup>(Dost, 1965)</sup>, apareció por primera vez la palabra farmacocinética y en 1962 se celebró el primer Simposium en Farmacocinética en Alemania. El período entre 1960 y 1980 resultó en una explosión de estudios farmacocinéticos e importantes avances en este



campo, básicamente debido a la disponibilidad de mejores recursos para los cálculos (calculadoras de bolsillo, ordenadores) y la disponibilidad de técnicas analíticas más sensibles (cromatografía de gases y líquidos). Se inicia la subespecialidad de farmacocinética clínica debido a la importancia que le empieza a dar la comunidad médica al impacto directo sobre la individualización terapéutica.

Las características farmacocinéticas y farmacodinámicas (PK/PD) de los fármacos se empezaron a relacionar entre sí mediante la utilización conjunta de modelos compartimentales farmacocinéticos y modelos farmacodinámicos lineales y log-lineales hacia 1950. En 1964, Levy<sup>(Levy y Nelson, 1964)</sup> realizó los primeros estudios sistemáticos relacionando la farmacocinética con la respuesta farmacológica. Con el avance de la informática, en el año 1969 apareció el programa NONLIN, que facilitó en gran manera los cálculos farmacocinéticos. Entre 1980 y el año 2000, diversos autores contribuyeron a consolidar los conocimientos de PK/PD. Así, se debe a Lewis Sheiner<sup>(Galeazzi et al, 1976)</sup> el dilucidar el problema de la histéresis, situación en la que las concentraciones plasmáticas no eran descriptor directo del efecto, introduciendo el concepto de compartimento del efecto. Jusko y Boudinot crearon en 1986<sup>(Boudinot et al, 1986; Boudinot y Jusko, 1986)</sup> los modelos fisiológicos de efecto indirecto, pero no fue hasta 1992 que Peck<sup>(Peck et al, 1992)</sup> integró estos conceptos en el desarrollo de fármacos. Mediante modelos matemáticos de PK/PD se sentaron las bases para la definición y validación de variables subrogadas utilizadas en los ensayos clínicos y se debe a Pauli y Evans el que en 1998 se integraran estas técnicas en la práctica clínica asistencial.

Paralelamente, desde el año 1977, Lewis Sheiner<sup>(Sheiner et al, 1977)</sup> sentó las bases de la aproximación poblacional en farmacocinética, definiendo y plasmando los conceptos básicos en su libro “Estimation of population characteristics of PK parameters from routine clinical data”. Esta aproximación se pudo desarrollar gracias a la aparición del programa informático NONMEN. En principio, esta aproximación poblacional se utilizó fundamentalmente para optimizar la monitorización de los fármacos, pero posteriormente se vio su utilidad en el desarrollo de nuevos compuestos, mediante diseños farmacodinámicos poblacionales o bien diseñando ensayos clínicos mediante simulación. En 1999 la FDA publicó la primera Guía para la industria denominada “Population Pharmacokinetics” y las últimas directrices sobre buenas prácticas de modelado y farmacocinética, fueron publicadas en el año 2000 por Holford<sup>(Holford et al, 2000)</sup>.

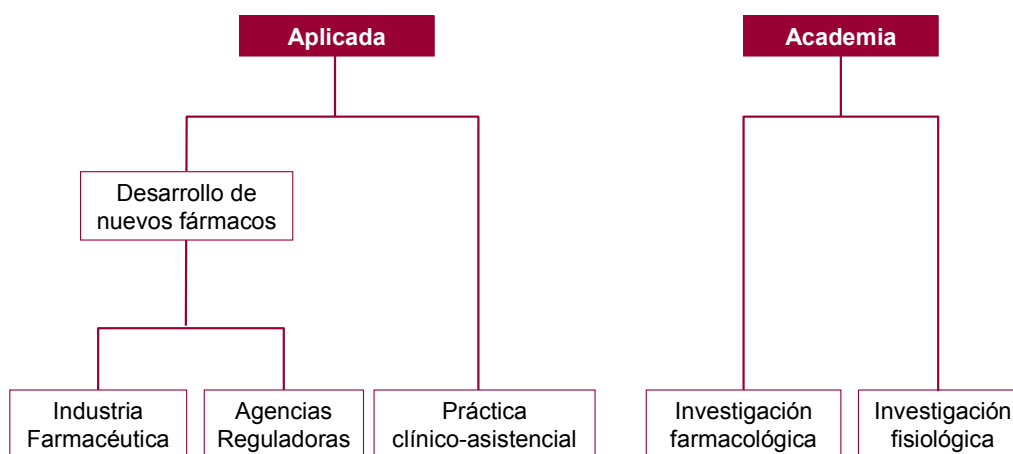
De esta forma, se inició una etapa de la farmacología, en la que, en la actualidad van adquiriendo cada vez una mayor relevancia los estudios basados en cálculos matemáticos (estudios “*in numero*”) frente a los estudios farmacológicos clásicos “*in vivo*”. Sin embargo, a pesar de los avances significativos en los últimos años en la aplicación del modelado PK/PD en farmacología clínica y terapéutica, su importancia no ha sido universalmente aceptada. Todavía hay cierto escepticismo sobre los beneficios que puede ofrecer, posiblemente debido, entre otras, a las siguientes razones: (i) la aproximación continúa siendo un misterio para muchos; la metodología es relativamente nueva y no bien entendida por muchos potenciales usuarios. (ii) El proceso puede parecer costoso y consumidor de tiempo; la recolección de datos y su análisis consumen dinero y tiempo, no estando claro si los beneficios compensarán ese esfuerzo. (iii) Existe el peligro de que los resultados de un análisis PK/PD poblacional susciten cuestiones nuevas y la consiguiente necesidad de darles respuesta. En cualquier caso, su utilización y rentabilidad en el futuro se verán sin duda reforzadas y aumentadas. En este futuro se producirá la integración de aspectos relacionados con la biología molecular (Evans y Relling, 1999) y la incorporación de nuevos conceptos en el planteamiento de los ensayos clínicos (Sheiner y Steimer, 2000).

La introducción de los avances de las ciencias básicas (genómica, farmacogenética, proteómica) puede, por un lado proporcionar avances significativos en la identificación de biomarcadores, todavía necesarios, y la subsiguiente utilización clínica de su modelado PK/PD, mediante la provisión de biomarcadores más predictivos, y por otro lado, puede proporcionar avances significativos en el campo del análisis poblacional mediante el aporte de conocimiento mecanístico y explicación sobre la variabilidad farmacodinámica en los pacientes, por ejemplo, al identificar polimorfismos genéticos que pueden afectar la respuesta terapéutica. Los ensayos “de aprendizaje” (estudios “*in numero*”) irán tomando protagonismo frente a los ensayos “confirmatorios” (estudios “*in vivo*”). Cada vez se dispondrá de mayor cantidad de argumentos para evitar/limitar, los ensayos “confirmatorios” definidos por el paradigma tradicional sobre la “puesta a prueba de hipótesis” en favor de los ensayos “de aprendizaje” plenamente enraizados en el análisis modelístico.

### 3.4.- Áreas de utilidad de los estudios “*in numero*”

Muchas y variadas son las áreas de la farmacología en que los estudios “*in numero*” han mostrado ya su utilidad y relevancia (Figura I-9).

**Figura I-9:** Áreas de la farmacología en las que los estudios “*in numero*” han mostrado su utilidad y relevancia.



#### 3.4.1.- Aplicada

##### 3.4.1.1.- Desarrollo de nuevos fármacos

###### *Industria Farmacéutica*

Considerando la complejidad, el riesgo y el coste implicados en el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos, es imperativo que las compañías adopten estrategias que faciliten la identificación y desarrollo rápidos de nuevos fármacos que presenten características optimizadas en relación con su seguridad y eficacia. Así, velocidad, información, integración y calidad en el desarrollo farmacológico son ingredientes clave para garantizar la competitividad en el mercado farmacéutico. Esto puede alcanzarse mediante la incorporación del modelado y la simulación PK/PD. Tal incorporación permitirá al promotor definir apropiadamente y caracterizar el perfil clínico de un compuesto durante las fases iniciales "de

aprendizaje" del desarrollo (fases 0, I y IIa), eliminando tempranamente candidatos no prometedores cuando los costes del desarrollo son relativamente bajos e identificando candidatos con una elevada probabilidad de éxito clínico. La creación de una buena base de datos PK/PD durante las fases posteriores "confirmatorias" del desarrollo de un compuesto puede proporcionar un marco esencial para un refinamiento y mejoría continuados a lo largo del uso del fármaco post-comercialización.

Hay numerosos elementos a lo largo del proceso de desarrollo donde el modelado y la simulación PK/PD pueden aportar un valor añadido.

A parte de paradigma tradicional consistente en utilizar fracciones de las dosis no clínicamente tóxicas en animales para diseñar los primeros esquemas de dosificación en el hombre, la utilización del modelado PK/PD durante el desarrollo pre-clínico inicial permitiría definir de forma más precisa las relaciones dosis-concentración-efectos farmacológicos y dosis-concentración-toxicidad. La extrapolación de estos resultados al hombre utilizando una combinación de datos "*in vitro*" e "*in vivo*" podría ser particularmente útil para determinar el régimen de dosificación en los estudios de fase I y para guiar el escalado de dosis con el objetivo de alcanzar rápidamente aquellas concentraciones sistémicas, en el hombre, que se espera estén asociadas con efecto farmacológico. Además, los estudios PK/PD pre-clínicos pueden sugerir una serie de importantes estudios mecanísticos para explorar cualquier disociación entre las concentraciones plasmáticas y la duración del efecto farmacológico. La aplicación del modelado PK/PD en los estudios pre-clínicos también puede ayudar en la generación de información sobre los efectos del fármaco que en el hombre sería difícil de obtener (por ejemplo, la utilización de microdialisis "*in vivo*" para muestrear o administrar el fármaco en la biofase). Además, la utilización de aproximaciones mecanísticas, utilizando los nuevos avances tecnológicos en la validación de las "dianas terapéuticas" (biología funcional, proteómica, genómica, monitorización de expresión génica) y la correlación de estos efectos con el estado patológico o los efectos tóxicos, puede ser relevante para ampliar el conocimiento disponible acerca de los procesos patológicos o toxicológicos, para mejorar la predictibilidad de los datos farmacológicos y toxicológicos pre-clínicos en humanos y para proporcionar una definición temprana de posibles marcadores farmacodinámicos y variables surrogadas adecuados para su utilización en los estudios PK/PD tanto pre-clínicos como propiamente clínicos. Un ejemplo de la rentabilidad de la aplicación del modelado PK/PD en los estudios preclínicos puede evidenciarse en Kawai y cols.: a partir de un modelo

farmacocinético fisiológico de ciclosporina A desarrollado en ratas se pudo predecir el perfil farmacocinético en humanos, tras administración endovenosa en sujetos sanos y tras administración oral repetida en pacientes con trasplante renal (Kawai et al., 1998).

La aplicación del modelado PK/PD en los estudios de fase I es importante para entender la relación dosis-concentración-efecto, tanto farmacológico como toxicológico, en voluntarios sanos. La aplicación del modelado PK/PD en los estudios de fase I también es importante en la caracterización de la farmacocinética y la farmacodinamia en poblaciones especiales y para indagar el efecto de las interacciones fármaco/fármaco y fármaco/trastorno que podrían esperarse que perturbaran la relación PK/PD del compuesto. Una importante decisión para que los datos obtenidos sean tan útiles como sea posible en la predicción de los efectos farmacológicos en pacientes, es la selección de variables farmacodinámicas apropiadas a monitorizar. En algunos casos, la relación entre el marcador farmacodinámico o la variable surrogada de un efecto farmacológico y su capacidad predictiva respecto a los mecanismos de la enfermedad, al efecto del fármaco en pacientes, o en última instancia, al resultado final terapéutico esperado, puede no estar totalmente esclarecida. Sin embargo, a pesar de estas posibles incertidumbres, hay unos objetivos mínimos plenamente alcanzables en estos estudios PK/PD clínicos iniciales, a destacar, la verificación de la actividad biológica en la pretendida diana "*in vivo*" y la garantía de que la acción en la diana es de intensidad y duración adecuada con relación al intervalo de dosificación. Chaikin y cols. muestran como a partir del modelado PK/PD de un compuesto administrado en sujetos sanos en el que se evidencia la presencia del fármaco y de un metabolito activo con distinto perfil temporal de concentraciones plasmáticas y distinta potencia simulan la respuesta farmacodinámica en equilibrio estacionario alcanzable para distintos regímenes de dosificación en estudios de fase II (Chaikin et al., 2000).

Información obtenida en el modelado PK/PD en estudios iniciales en fase I puede ser útil en la determinación inicial de los regímenes de dosificación a utilizar en los ensayos de fase II diseñados con el objetivo de obtener evidencia inequívoca del efecto terapéutico deseado en el grupo de pacientes de interés ("prueba de concepto"). Sin embargo, debería tenerse en cuenta que la predictibilidad de respuesta en los pacientes puede ser menor que en sujetos normales sanos, debido, entre otras razones, a posibles diferencias en los mecanismos de control fisiológico, cambios en la sensibilidad de los receptores o a la presencia de medicaciones concomitantes. Así, la aplicación del modelado PK/PD en estos ensayos de fase II con un

elevado nivel de control es esencial para confirmar y/o adicionalmente explorar la relación entre dosis-concentración-efecto y para examinar una variedad de dianas terapéuticas con el objetivo de identificar aquella que podría ser más satisfactoria para el modelado. La base de datos PK/PD generada durante los estudios de fase I y fase II puede ser muy útil como guía en el diseño de los regímenes de dosificación a utilizar en los estudios de fase III. Además, la simulación de estudios clínicos basada en la información obtenida en los estudios de fase I y II puede aplicarse en la predicción de la distribución de probabilidad de resultados procedentes de estudios clínicos adicionales, en la exploración de la sensibilidad de esos resultados debida a factores no controlados, y en el escrutinio de las ventajas de los diseños y análisis a llevar a cabo. La no disponibilidad de esta información puede conllevar la realización de un desarrollo con una mayor potencial frecuencia de efectos adversos inaceptables, una evidencia de efectividad marginal, o una falta de información sobre cómo individualizar las dosis para mantener unos resultados terapéuticos óptimos. Un ejemplo de la aplicación del modelado y simulación PK/PD a partir de datos obtenidos en estudios de fase II para predecir aquello que sucederá cuando se lleve a cabo un estudio de fase III y su comparación con los datos empíricos obtenidos, concretamente con un agente antiesquizofrénico puede encontrarse en Kimko y cols. <sup>(Kimko et al., 2000)</sup>.

La planificación prospectiva del análisis poblacional y correlaciones PK/PD en los ensayos clínicos de las últimas fases del desarrollo debería complementar los estudios PK tradicionales en subpoblaciones al identificar grupos con o sin problemas. El modelado y simulación PK/PD puede convertirse en esencial, en las etapas finales del desarrollo clínico, momento en el que hay una clara necesidad de un mejor conocimiento de la relación régimen de dosificación-concentración-eficacia/toxicidad en un grupo de pacientes más amplio. El resultado de este tipo de análisis puede tener un fuerte impacto en la aprobación del nuevo compuesto y en las decisiones finales de su etiquetaje en relación a la individualización de la dosis para alcanzar un efecto terapéutico óptimo y balancear convenientemente el cociente beneficio/riesgo. Un ejemplo de optimización de la disponibilidad de datos obtenidos en ensayos clínicos efectuados en etapas finales del desarrollo farmacológico en los que se dispone de información de pacientes con datos farmacocinéticos completos (antes y 2 horas post-administración en distintos días durante el régimen de administración repetida), pacientes con datos farmacocinéticos incompletos y pacientes sin datos farmacocinéticos y con diferentes combinaciones respecto a la disponibilidad de información farmacodinámica, puede encontrarse en Wade y Sambol <sup>(Wade y Sambol, 1995)</sup>. Los autores tras efectuar el análisis

correspondiente evidenciaron un efecto de la edad sobre la farmacocinética y la farmacodinámica de un antihipertensivo, recomendando una dosis de inicio determinada, especialmente en la población de gente mayor.

Así, conceptos derivados del modelado y simulación PK/PD tienen la potencialidad de poder ser utilizados como instrumentos de ayuda en la toma de decisiones, tanto científicas como estratégicas, en todas las etapas del desarrollo de un fármaco, al sugerir los diseños experimentales óptimos en cada situación y por tanto reducir los costos y el tiempo del proceso. Sin embargo, aunque hay numerosos ejemplos del efecto beneficioso que supone la aplicación de los conceptos PK/PD y su consecuencia en el ahorro de tiempo en el desarrollo de nuevos compuestos, posiblemente serían necesarias investigaciones adicionales sobre su supuesto beneficio económico para consolidar de forma más fehaciente su papel en ese proceso de desarrollo.

### ***Agencias Regulatoras***

Los conceptos del modelado y simulación PK/PD también permiten su utilización con el objetivo de proporcionar ayuda en las decisiones a tomar por las agencias reguladoras, tanto aportando mayor certidumbre en las decisiones sobre seguridad o eficacia como aportando información de apoyo en el proceso de aprobación, por ejemplo con relación a los ajustes de dosis y regímenes de dosificación o en decisiones relativas al etiquetaje final.

En algunas situaciones, los datos PK/PD pueden utilizarse como apoyo a la comercialización sin necesitar datos clínicos de eficacia adicionales. A) Para fármacos genéricos, la bioequivalencia de su formulación con relación a la formulación de referencia puede establecerse en función de la similitud de sus perfiles cinéticos, asumiendo que perfiles cinéticos similares conllevarán farmacodinamia similar. Tal aproximación también puede utilizarse para justificar el acceso al mercado de una formulación distinta a la previamente utilizada en la realización de los ensayos clínicos donde se evidenció la eficacia. Sin embargo, algunas veces los límites de confianza del 90% en estos estudios de bioequivalencia son superiores a los límites establecidos del 80%-125%. Entonces, antes que reformular el compuesto o repetir el estudio de bioequivalencia, el promotor puede plantear, basándose en evidencia PK/PD, que unos límites más amplios no son indicativos de riesgo en la seguridad

ni una pérdida de efectividad. B) Datos PK/PD pueden apoyar el acceso al mercado de una nueva presentación galénica (por ejemplo, una formulación de liberación sostenida) cuando el patrón farmacocinético es intencionadamente distinto del correspondiente al producto aprobado (por ejemplo, una formulación de liberación inmediata). La relación PK/PD evidenciada puede determinar el significado clínico de la magnitud de la diferencia en la exposición farmacocinética y determinar si son necesarios datos de eficacia clínica adicionales. C) Información PK/PD puede utilizarse para tomar decisiones regulatorias en relación a nuevos esquemas de dosificación (de dos veces al día a una única toma al día) con o sin cambios en la formulación. Los datos PK/PD pueden evidenciar el rango de concentraciones alcanzado con esos cambios y si esos cambios son suficientemente grandes o pequeños para conllevar una respuesta clínica insatisfactoria. D) Menos frecuentemente se utilizan los datos PK/PD para aprobar una dosis que no ha sido evaluada en ensayos clínicos. Normalmente, la dosis aprobada se encuentra dentro del rango de dosis evaluado clínicamente, siendo difícil aplicar esta aproximación para expandir el rango de dosis aprobado más allá del estudiado sin datos de eficacia y seguridad adicionales. E) Utilidad en la identificación de covariables demográficas y/o patofisiológicas relevantes (por ejemplo, asumiendo unos criterios de inclusión amplios en los estudios de fase III), disminuyendo la necesidad de ejecutar estudios de farmacología clínica tradicionales en grupos de pacientes más amplios, por ejemplo, en determinado subgrupo con cierta característica común (Veyrat-Follet et al., 2000), o con el objetivo de recomendar ajustes de dosis en grupos especiales de pacientes.

En algunas situaciones, los datos PK/PD pueden apoyar ciertos etiquetajes que el promotor desea incorporar con relación al significado clínico de los cambios en la exposición sistémica del fármaco como consecuencia de factores extrínsecos e intrínsecos. A) Irrelevancia de los cambios observados tras la administración conjunta con alimentos a partir de un estudio de bioequivalencia cuando los intervalos de confianza del 90% superan los márgenes de 80%-125%. B) Sugerencias respecto al ajuste de dosis en pacientes con determinadas características (interacciones fármaco/fármaco, trastorno renal, hepático, sexo, edad, raza). Tanto en recomendaciones específicas con relación a la dosis de inicio y/o a la dosis de mantenimiento, como argumentando la no necesidad de llevar a cabo ajustes de dosis a pesar de haber evidenciado cambios estadísticamente significativos en la farmacocinética.

En otras ocasiones, los datos PK/PD pueden ayudar en dilucidar cuestiones y requerimientos con relación a la seguridad y eficacia de los fármacos. A) Cuestiones relativas a la seguridad



de un compuesto relacionadas con la presentación de respuestas anormales en algunos pacientes, para las que los datos PK/PD podrían ser útiles aportando explicación de las observaciones. B) Cuando la patofisiología de un trastorno y el mecanismo de acción terapéutico son bien conocidos, en ciertas condiciones, se podría permitir el acceso de un compuesto al mercado basándose en variables surrogadas validadas y apoyándose en relaciones PK/PD (aprobación acelerada: “fast-track regulations”), como ha sucedido con ciertos retrovirales. C) La información PK/PD es especialmente útil en fármacos con un índice terapéutico estrecho y con una relación dosis-exposición impredecible dada una elevada variabilidad inter e intra pacientes, en los que su administración segura y eficaz sólo es asumible si se monitorizan los niveles plasmáticos y/o los efectos.

Para la agencia reguladora, las relaciones PK/PD proporcionan una comprensión mecanista de la relación dosis-concentración-respuesta que ayuda en el establecimiento de los límites de la equivalencia, al entender mejor las distintas interrelaciones. Las evaluaciones PK/PD, conjuntamente con los datos tradicionales derivados de los ensayos clínicos llevados a cabo, proporcionan evidencia adicional para argumentar el uso seguro y efectivo de un fármaco (Williams y Ette, 2000)

### **3.4.1.2.- Práctica clínico-asistencial**

La utilidad de las técnicas del modelado y simulación PK/PD en el entorno clínico-asistencial se centran de forma más importante en la definición de estrategias para individualizar los regímenes de dosificación para asegurar un resultado terapéutico óptimo.

A partir de la identificación de la denominada concentración-diana o del efecto-deseado se lleva a cabo una predicción de los requerimientos sobre la pauta de administración que en un caso particular serán necesarios para alcanzarlos. La base para efectuar tal predicción es un modelo PK/PD de las mencionadas concentraciones/efectos. Los parámetros que describen el modelo pueden utilizarse, bien para estimar los requerimientos de dosificación iniciales, bien para guiar los cambios subsiguientes tras derivar información de los resultados obtenidos tras la primera administración efectuada (monitorización utilizando métodos bayesianos de retroalimentación). Por ejemplo, la aplicación de estas técnicas a los datos obtenidos en neonatos tras administración de cafeína permitió identificar como covariables significativas el

peso actual (g) y la edad postnatal (días) para el aclaramiento y el peso actual (g), la edad postnatal (días) y la edad gestacional (semanas) para el volumen de distribución, de tal manera que se determinaron las dosis de cafeína (mg/24 horas) requeribles para alcanzar unas concentraciones en equilibrio estable de 35mg/L (concentración que se identifica como deseable en la estimulación respiratoria en neonatos con apnea recurrente), lógicamente en función del peso, de la edad postnatal y de forma específica para una edad gestacional  $\leq$  a 28 semanas (Lee et al., 1997).

La integración del modelado y simulación PK/PD en clínica también se ha producido en otros ámbitos distintos a la tradicional monitorización terapéutica. Como ejemplos comentar su uso para cuantificar la toxicidad hematológica en pacientes que reciben etopósido con el objetivo de estimar las consecuencias previsibles ante la administración de diferentes estrategias de dosificación (Karlsson et al., 1995), para diseñar pautas de administración que reduzcan el desarrollo de tolerancia frente a la nitroglicerina (Bauer et al., 1997) o para optimizar el diseño galénico de los sistemas de dispensación de principios activos (Hochhaus et al., 2000).

Una situación clínica donde el uso del modelado y la simulación PK/PD ha adquirido una especial relevancia es en el campo de la anestesia permitiendo la utilización del EEG como medida de la profundidad del estado anestésico (Stanski, 1992). Se han relacionado parámetros derivados del EEG con la respuesta clínica a estímulos nociceptivos, con el despertar y con la concentración de fármacos anestésicos, tanto opioides (alfentanil), benzodiazepinas (midazolam) o propofol. Una aplicación peculiar de estos estudios PK/PD puede encontrarse en Schwilden y cols. (Schwilden et al., 1987) en la que utilizando un algoritmo de retroalimentación en base a un modelo PK/PD relacionando la administración de un fármaco y el efecto, construyen un sistema de control de lazo-cerrado para controlar “automáticamente” la profundidad anestésica.

### 3.4.2.- Academia

El modelo y simulación PK/PD también ha dado sus frutos cuando se ha aplicado con el objetivo de obtener información con finalidad no aplicada sino más básica, en la investigación, tanto en el campo más específico de la farmacología como en el más general de la fisiología.

### 3.4.2.1.- Investigación farmacológica

Se han estudiado, por ejemplo, las propiedades de la interacción con el receptor “*in vivo*”, tanto en benzodiazepinas como en opioides utilizando la cuantificación de la relación concentración en plasma/efecto sobre EEG. Se ha evidenciado una gran variabilidad entre los distintos ligandos benzodiazepínicos en relación a su potencia,  $CE_{50}$  y a su eficacia intrínseca ( $E_{max}$ ) (Mandema y Danhof, 1992). La  $CE_{50}$  se situó siempre en el mismo rango de concentraciones requerido para producir el 50% de ocupación del receptor “*in vitro*”, esto es, se obtiene una excelente correlación ( $r= 0.993$ ;  $n= 6$ ) entre la  $CE_{50}$  y los valores de afinidad al receptor ( $ki$ ). Además, las importantes diferencias en el efecto sobre el EEG máximo entre agonistas, agonistas parciales, antagonistas y agonistas inversos se corresponden con las conocidas diferencias en eficacia intrínseca de estos compuestos sobre el complejo receptor BZD-GABA-Cl<sup>-</sup>. También se ha comparado la potencia entre distintos opioides (Scott et al., 1991). Alfentanilo, fentanilo y sulfentanilo producen el mismo efecto máximo, pero las  $CE_{50}$  se sitúan entre 520 $\mu$ g/L para el alfentanilo, 6,9 $\mu$ g/L para el fentanilo y 0,68 $\mu$ g/L para el sulfentanilo. Además, en relación con la velocidad de equilibrio entre el plasma y el compartimento del efecto se encontró que para el alfentanilo era más rápida (tiempo de semivida,  $t_{1/2}= 1,1$ min) que para el fentanilo y el sulfentanilo ( $t_{1/2}=6,4$  y 6,2min, respectivamente), de tal manera que el retraso entre el plasma y el compartimento del efecto era 6 veces mayor para el fentanilo en relación con el alfentanilo. Esto, conjuntamente con el menor volumen de distribución inicial del alfentanilo explicaría porque la relación de potencia clínica de un bolus entre el alfentanilo y el fentanilo está más próxima a 7:1 que a 75:1 como cabría esperar de la relación de  $CE_{50}$ .

También se ha estudiado el mecanismo de las interacciones entre distintos fármacos, entre un compuesto y sus metabolitos o entre los enantiómeros que constituyen un racémico. Por ejemplo, se confirmó un modelo de interacción competitivo entre midazolam y concentraciones crecientes de flumacénil al observarse un desplazamiento en paralelo hacia la derecha de la curva que relaciona concentraciones y efecto sobre el EEG (Breimer et al., 1991). Tras la administración de midazolam, éste es metabolizado a distintos compuestos, algunos de los cuales tienen actividad biológica. La caracterización PK/PD llevada a cabo permitió establecer que los parámetros farmacodinámicos del midazolam y del  $\alpha$ -hidroxi-midazolam no presentaban diferencias estadísticamente significativas, concluyendo que el metabolito  $\alpha$ -

hidroxi es tan potente como el fármaco administrado y contribuye de forma significativa a los efectos observados cuando la vía y el régimen de dosificación condicionan la presencia de concentraciones relevantes del metabolito <sup>(Mandema et al., 1992)</sup>. Schüttler y cols <sup>(Schüttler et al., 1987)</sup> evaluaron los efectos de ketamina tras su administración endovenosa en humanos usando el cambio en la frecuencia media del EEG como variable farmacodinámica. La relación concentración-efecto EEG del racemato y de los dos enantiómeros pudo describirse siguiendo un modelo sigmoide  $E_{max}$ . El efecto máximo para el enantiómero R fue significativamente menor que el observado para el enantiómero S, sugiriendo que el primero presentaba una actividad como agonista parcial.

### 3.4.2.2.- Investigación fisiológica

La aplicación del análisis PK/PD también puede aportar información relevante en otras áreas del conocimiento distintas a la propia farmacología, por ejemplo, en el modelado del estado alterado subyacente en cualquier trastorno/enfermedad, como se lleva a cabo en los estudios en los que se pretende caracterizar un marcador biológico como variable surrogada <sup>(Colburn, 2000)</sup>.

Otra posibilidad consiste en utilizar a un determinado fármaco como elemento diseccionador con el objetivo de revelar distinto funcionalismo de ciertos sistemas de receptores como explicación de posibles diferencias observadas en los sujetos sanos o en los pacientes. En este contexto Urbano y cols. <sup>(Urbano et al., 2001)</sup> utilizando una aproximación PK/PD poblacional tras una administración endovenosa y oral de una benzodiazepina y evaluando los efectos a nivel neurofisiológico (EEG), conductual (atención) y subjetivo (sedación) han podido constatar diferencias en la sensibilidad (potencia- $CE_{50}$ ) y/o eficiencia (actividad intrínseca- $E_{max}$ ) del sistema receptor GABA-BZD-Cl<sup>-</sup> entre individuos sanos clasificados psicométricamente mediante cuestionarios en sujetos con personalidad ansiosa alta, normal o baja.

## 4.- AM-24

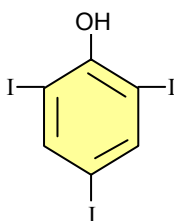
AM-24 es un nuevo compuesto sintetizado en el Servicio de Farmacia del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona.

### 4.1.- Características fisico-químicas

El producto AM-24 es el 2,4, 6-Triyodofenol que se obtiene por síntesis.

Su peso molecular es de 471,800 daltons.

Su fórmula desarrollada es la siguiente:



Es un producto sólido, cristalino, de color blanco y olor característico que recuerda al yodo.

En el análisis químico del producto, éste presenta un punto de fusión por DSC (colorimetría diferencial de barrido) con un pico máximo de 162°C e inicio a los 158,5°C. La pureza obtenida en dicho análisis fue del 99,5% con una presencia de impurezas inferior al 1%.

Tras ser sometido a pruebas de estabilidad, el AM-24 no presentó modificaciones en sus características organolépticas, ni aparecieron productos de degradación. A partir de estos análisis de estabilidad se determinó que las condiciones de almacenamiento no debían ser particularmente estrictas, ya que el sustrato no es sensible a los factores habituales que determinan la caducidad o la pérdida de actividad de los medicamentos, como son la humedad, el calor o la sensibilidad a la luz.

Es un producto insoluble en agua y soluble en medio básico.

## 4.2.-Toxicología

### 4.2.1.- Pruebas “*in vitro*”

#### Ensayo de inhibición de la bioluminescencia:

Se somete a la bacteria marina bioluminescente *Photobacterium Phosphoreum* a diluciones progresivas de la sustancia de ensayo o de su extracto acuoso. Se mide la inhibición de la luz tras una exposición de 15 min y se calcula la concentración que produce el 50% de inhibición respecto al lixiviado. Resultado: CE<sub>50</sub> 500.000 mg/L. No ecotóxico.

### 4.2.2.- Pruebas “*in vivo*”

#### 4.2.2.1.- Toxicidad crónica a 6 meses en rata por vía oral

En este estudio se evaluó el efecto tóxico de AM-24 en 120 ratas Wistar, cepa ICO WI (IOPS AF/Han), 60 machos y 60 hembras. Se les administró el fármaco en estudio mezclado con el pienso alimentario por vía oral, 6 días a la semana durante 6 meses. Como dosis más baja (25 mg/kg) se tomó una dosis superior a la prevista para uso terapéutico en la especie humana (1-4 mg/kg) y se le administró a 30 animales (15 machos y 15 hembras). A los otros 3 grupos de 30 animales (siempre 15 machos y 15 hembras por grupo) se les administró 125 mg/kg, 300 mg/kg y 0 mg/kg (grupo control), respectivamente. Durante el ensayo se evaluó el peso corporal, el consumo de alimento, dosis de la sustancia a ensayar y así mismo se procedió a practicar pruebas hematológicas, de coagulación, bioquímicas e histopatológicas.

Los resultados mostraron que AM-24 provocaba congestión de la cavidad abdominal que se relacionaba directamente con la dosis administrada. En los machos que recibieron la dosis más alta se produjo un aumento de neutrófilos segmentados así como presencia de cristales aciculares en el sedimento urinario.

Dado que la dosis terapéutica para uso humano se establece entre 1-4 mg/kg, se puede concluir que la sustancia de ensayo presenta una excelente relación dosis activa/dosis tóxica.

#### **4.2.2.2.- Dosis máxima tolerada oral en perro beagle (4 semanas)**

En este ensayo se evaluaron los efectos tóxicos de AM-24 en 4 perros Beagle (2 machos y 2 hembras) a los que se les administraron, por vía oral, dosis crecientes del mismo, partiendo de una dosis de 200 mg/kg/d hasta alcanzar los 2000 mg/kg/día durante como mínimo 27 días y como máximo 94 días de tratamiento.

La administración de la dosis de 2000 mg/kg/d durante 27 días no produjo mortalidad entre los animales tratados ni alteraciones clínicas, hematológicas o histopatológicas destacables, por lo que se puede concluir que AM-24, a estas dosis, carece de efecto tóxico relevante.

#### **4.2.3.- Pruebas de mutagenicidad**

##### ***Mutagénesis en Salmonella typhimurium. Test de Ames***

Se valoró el potencial mutagénico de AM-24 en cuatro cepas de *Salmonella typhimurium* auxótrofas para la histidina, en presencia y ausencia de un sistema de activación metabólica (s-9) obtenido mediante inducción con Aroclor 1254 en hígado de rata. La mutagenicidad se detecta por un incremento significativo en el número de revertientes respecto al nivel espontáneo de reversiones. El sistema de activación metabólico se utiliza para determinar si la sustancia necesita ser metabolizada para que se produzcan mutaciones.

Se realizó un ensayo previo para valorar la toxicidad de AM-24 sobre las bacterias, observándose que la dosis de 3000 µg/mL era la primera, a dosis decreciente, que no producía la muerte de todas las bacterias, sino únicamente de una parte de ellas. Así pues, las concentraciones de ensayo se determinaron a partir de la concentración de 3000 µg/mL y haciendo diluciones ½ hasta una dilución mínima de 94 µg/mL.

Los resultados de este ensayo permiten concluir que AM-24 no posee actividad mutagénica, en ninguna de las cuatro cepas bacterianas utilizadas, a las concentraciones estudiadas.

### **4.3.- Estudios farmacológicos pre-clínicos**

#### **4.3.1.- Estudios “*in vitro*” del efecto antiinflamatorio de AM-24**

##### **4.3.1.1.- Estudio comparativo del efecto de AM-24 sobre la biosíntesis de derivados del ácido araquidónico vía 5- lipoxigenasa en leucocitos polimorfonucleares**

La actividad inhibidora de la 5-lipoxigenasa se comprobó en polimorfonucleares humanos mediante sustrato radiactivo suministrado exógenamente, lo que comporta una mayor especificidad sobre la 5-LOX que la utilización de sustrato endógeno generado a partir de la esterificación de los lípidos de membrana.

La concentración de 50µM inhibe totalmente la producción de los eicosanoides producidos por la vía de la 5-lipoxigenasa, es decir el LTB<sub>4</sub>, los dos isómeros 6-trans-LTB<sub>4</sub>, el 5-HETE y el LTB<sub>4</sub> ω-oxidado en suspensiones de leucocitos polimorfonucleares. Esta inhibición es concentración dependiente y más potente que la producida por el ketoconazol y el benoxaprofeno.

##### **4.3.1.2.- Estudio del efecto del AM-24 sobre la inhibición de la ciclooxigenasa en suspensiones de plaquetas lavadas**

En este ensayo, AM-24 mostró un ligero efecto de inhibición de la ciclooxigenasa plaquetar que puede contribuir al efecto antiinflamatorio observado para esta molécula, no siendo en ningún caso su mecanismo principal de acción.



#### **4.3.2.- Estudios en animales**

##### **4.3.2.1.- Modelos de inflamación**

###### ***Modelo murino de inflamación cutánea inducida por ácido araquidónico***

En este ensayo se usaron ratones Balb/c hembra de 6-8 semanas de edad, con pesos comprendidos entre los 17-23g que se repartieron en 3 grupos; un grupo control, uno tratado con indometacina y otro tratado con AM-24. A todos ellos, se les aplicó ácido araquidónico de forma tópica a nivel de la cara interna del pabellón auricular derecho e inmediatamente después se procedió a la administración del fármaco por vía oral. Al cabo de una hora, tras sacrificar a los animales, se extrajeron discos de tejido de ambas orejas, comparándose sus pesos respectivos para valorar el grado de inflamación. El grado de inhibición de la inflamación se obtuvo mediante la comparación de los pesos medios de cada grupo con el peso medio del respectivo grupo control.

Este estudio permitió conocer la dosis por debajo de la cual no se observan efectos adversos (NOAEL=non observed adverse effects level) para AM-24, estableciéndose en 0,5mg/kg. A dosis equimolares de indometacina (10mg/kg) y de AM-24 (13,5mg/kg), la inhibición producida por AM-24 es del 54.8% frente a la producida por indometacina (41.1%), lo que evidencia un mayor poder antiinflamatorio.

Según este ensayo, se considera que la dosis óptima de AM-24 para los modelos animales de inflamación cutánea es la de 5mg/kg, ya que consigue una inhibición de la inflamación del 49,5%.

###### ***Prueba de la carragenina***

Se realizó en 3 grupos de ratas Wistar del mismo sexo (control, tratadas con indometacina vía oral (v.o.) y tratadas con AM-24 (v.o.) e intramuscular (i.m.)), con pesos entre los 180 y 200g. Se indujo la inflamación mediante la inyección subplantar de solución de carragenina al 1% en la pata posterior derecha e inmediatamente se procedió a administrar los distintos tratamientos. Tanto indometacina como AM-24 se administraron a dosis de 10mg/kg

suspendidos o disueltos adecuadamente para la administración oral o intramuscular. La inhibición de la inflamación se calculó respecto al incremento de volumen medio de los animales control. La administración de AM-24, tanto por vía oral como intramuscular, mostró una actividad antiinflamatoria igual a la de la indometacina. A la dosis de 5mg/kg v.o., se obtienen resultados muy semejantes para ambos fármacos (ver tabla I-8).

**Tabla I-8:** Actividad antiinflamatoria comparativa de indometacina y AM-24 evidenciada mediante la prueba de la carragenina efectuada en ratas Wistar, tras administración oral de los fármacos.

<b>Tiempo</b>	<b>1h</b>	<b>3h</b>	<b>5h</b>
% inhibición indometacina 5mg/kg v.o.	83%	79%	81%
% inhibición AM-24, 5mg/kg v.o.	75%	74%	81%

v.o.: vía oral. h: horas

#### **4.3.2.2.- Modelos de dolor**

##### ***Actividad analgésica: writing test***

Se utilizaron 16 ratones para este ensayo a los que se les administraron 10 mg/kg por v.o. de AM-24 (n=5), 3 mg/kg de indometacina por v.o. (n=5) y 6 de ellos no recibieron tratamiento alguno. Tras 1 hora se administró ácido acético por vía intraperitoneal y se valoró el grado de inhibición sobre el número de contracciones que se producían, concluyéndose que AM-24 presenta un moderado efecto analgésico (50,3% de inhibición de las contracciones) en comparación con indometacina (89%) aunque dichos resultados eran estadísticamente significativos respecto al grupo control.

#### **4.4.- Estudios farmacocinéticos pre-clínicos**

##### **4.4.1.- Estudio farmacocinético en la rata**

Se ensayó AM-24 en ratas Wistar hembra de 180-250g de peso a las que se les administró una solución que contenía 0,5g de AM-24 por vía oral e intravenosa a razón de 0,1mL por cada 100g, lo que corresponde a una dosis de 5mg/kg, extrayéndose posteriormente 8 muestras de sangre venosa hasta los 180 minutos tras la administración intravenosa (i.v.) y hasta los 240

minutos tras la administración oral. Dichas muestras se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para la caracterización farmacocinética se aplicaron varios modelos, de los cuales el bicompartimental presentaba un mejor ajuste, según los criterios de MAICE (“Minimum Akaike Information Criterion Estimates”) y en el estudio amodelístico presentaba igualmente una relación  $\alpha/\beta$  de 13,7. Se obtuvieron concentraciones máximas ( $C_{\max}$ ) de  $5,73 \pm 0,43$  mg/L a los 44,9 minutos de su administración. Presentó una biodisponibilidad en magnitud del 73,4%. La semivida biológica de este fármaco fue relativamente larga, si se tiene en cuenta el animal de experimentación utilizado. El estudio de las constantes de absorción y eliminación permitieron prever que no había problemas en la absorción (Peraire et al., 1988).

#### 4.4.2.- Estudio farmacocinético en el perro

Para este estudio se utilizaron 7 perras de raza Beagle de 9-10 meses de edad, a las que se les administró AM-24 a dosis de 5mg/kg i.v. y tras 10 días de descanso, por v.o. En ambos períodos experimentales se extrajeron 13 muestras de sangre venosa hasta las 48h de la dosis administrada. Dichas muestras se analizaron por HPLC y permitieron la obtención de los parámetros farmacocinéticos: tras la administración oral el  $C_{\max}$  promedio fue de  $4,8 \pm 1,6$  mg/L con una biodisponibilidad en magnitud de  $0,91 \pm 0,33$  con coeficiente de variación de 36,5%, lo que muestra la gran variabilidad interindividual existente. El fármaco presenta características bicompartimentales. El tiempo de semivida de eliminación ( $t_{1/2\beta}$ ) es de  $7,8 \pm 1,17$  h.

#### 4.4.3.- Estudio farmacocinético en el caballo

En este estudio se administró AM-24 a dosis de 5mg/kg por vía oral e intravenosa a 3 yeguas de 4-10 años de edad y con un peso aproximado de 400kg. Posteriormente se realizaron 15 extracciones de sangre venosa hasta las 48h postadministración para cada vía estudiada y para el estudio farmacocinético a dosis repetidas se continuaron administrando dosis diarias de 5 mg/kg hasta 23 días después del inicio del estudio. Durante este período se procedió a la obtención de muestras plasmáticas y de líquido sinovial para valorar la farmacocinética a dosis repetida. Las concentraciones de AM-24 en las muestras plasmáticas y de líquido

sinovial se cuantificaron por HPLC. El modelado farmacocinético de los resultados obtenidos mostró que AM-24 se ajusta mejor a un modelo bicompartimental de acuerdo a los valores de Índice de Akaike (AIC)<sup>(Yamaoka et al. 1978)</sup> obtenidos.

Tras la administración por vía oral a dosis única se alcanzaron concentraciones plasmáticas máximas promedio ( $C_{max}$ ) de  $2,27 \pm 0,57 \mu\text{g/mL}$  a las  $12,54 \pm 2,30 \text{h}$  de su administración ( $t_{max}$ ). Esto contrasta con los valores mucho más altos obtenidos tras la administración a dosis repetida ( $C_{min}$   $4,5 \pm 3,6$  y  $C_{max}$   $25,28 \pm 4,01 \mu\text{g/mL}$ ), lo cual era difícil de predecir. El  $t_{1/2}$  obtenido tras administración i.v. es relativamente largo ( $24,9 \pm 8,1 \text{h}$ ), lo que facilitaría su administración en tratamientos crónicos.

La biodisponibilidad en magnitud es del  $23,12 \pm 8.69\%$ , valor muy bajo que se podría explicar por una absorción incompleta del fármaco o bien a que existe un fenómeno de primer paso.

## 4.5.- Conclusiones

AM-24 es un compuesto con alta estabilidad química, ausencia de toxicidad, potente actividad antiinflamatoria (inhibiendo la 5-LOX no selectivamente, ya que también inhibe parcialmente, aunque con menor potencia, la ciclooxigenasa) y vida media larga. Ante estas características se decidió iniciar el desarrollo clínico del producto planteándose la realización del primer ensayo en humanos.

## OBJETIVOS E HIPÓTESIS



## **1.- OBJETIVOS**

### **1.1.- Objetivo principal**

Proponer la pauta de dosificación de un compuesto, AM-24, a utilizar en pacientes (fase II), esto es, una pauta de dosificación que proporcionara unos niveles plasmáticos asociados con actividad farmacológica.

### **1.2.- Objetivos intermedios**

- a) Determinar la Dosis Máxima Tolerada tras administración única.
- b) Determinar las características farmacocinéticas tras administración oral única
- c) Determinar si el compuesto presenta linealidad cinética al incrementar la dosis
- d) Determinar la existencia de una relación entre niveles plasmáticos y efecto farmacológico.
  
- e) Determinar la tolerabilidad del compuesto tras administración repetida
- f) Determinar las características farmacocinéticas tras administración oral repetida
- g) Determinar si el compuesto presenta linealidad cinética tras administración repetida.

## 2.- HIPÓTESIS

La disponibilidad de información obtenida en voluntarios sanos jóvenes (fase I) relativa a la tolerabilidad, a la farmacocinética de distintas dosis de un compuesto (tras administración única y tras administración repetida), y a la eventual relación entre concentraciones plasmáticas y efecto farmacológico, permitirá proponer una pauta de dosificación a utilizar en pacientes (fase II).

a) La dosis máxima tolerada tras administración única:

Se determinará cuando se alcance la Dosis Mínima Intolerada, o en su defecto, se establecerá en la dosis más alta evaluada.

b) Las características farmacocinéticas tras administración oral única:

Se determinarán describiendo parámetros amodelísticos que caracterizan la biodisponibilidad en magnitud y en velocidad, la distribución y la eliminación.

c) La linealidad cinética al incrementar la dosis:

Se determinará contrastando la hipótesis nula ( $H_0$ ) de igualdad en los parámetros amodelísticos entre las distintas dosis únicas administradas. Aquellos que deberían ser dependientes de la dosis, corregidos por la dosis administrada y aquellos que no deberían ser dependientes de la dosis, directamente.

d) La existencia de una relación entre niveles plasmáticos y efecto farmacológico:

Se determinará describiendo los parámetros farmacodinámicos que se deriven del modelo que se seleccione que mejor describa la relación entre las concentraciones plasmáticas de AM-24 y las concentraciones plasmáticas de LTB<sub>4</sub>.

e) La tolerabilidad del compuesto tras administración repetida

Se determinará describiendo el perfil de tolerabilidad clínico-biológico (acontecimientos adversos, constantes vitales, parámetros electrocardiográficos, parámetros clínicos de laboratorio, hormonas tiroideas y sangre oculta en heces).



f) Las características farmacocinéticas tras administración oral repetida:

Se determinarán describiendo parámetros amodelísticos que caracterizan el estado de equilibrio estacionario.

g) La linealidad cinética tras administración repetida:

Se determinará contrastando la hipótesis nula ( $H_0$ ) de igualdad de parámetros amodelísticos que caracterizan la biodisponibilidad en magnitud y en velocidad, la distribución y la eliminación, obtenidos tras administración única y los obtenidos tras administración repetida.

### 3.- DESARROLLO

En función de la hipótesis subyacente y con la finalidad de alcanzar los objetivos propuestos se ha planteado el presente proyecto de investigación con las siguientes etapas secuenciales:

- a) Determinación de la primera dosis a administrar en voluntarios sanos.
  
- b) Estudio experimental en voluntarios sanos tras administración oral única de AM-24 en el rango de dosis de 6 a 1200 mg.

Para dar respuesta a los objetivos intermedios:

- Determinar la Dosis Máxima Tolerada tras administración única.
- Determinar las características farmacocinéticas tras administración oral única
- Determinar si el compuesto presenta linealidad cinética al incrementar la dosis
- Determinar la existencia de una relación entre niveles plasmáticos y efecto farmacológico.

- c) Determinación de la pauta de dosificación a evaluar para caracterizar la administración repetida (estudio de simulación)

- d) Estudio experimental en voluntarios sanos tras administración oral repetida de AM-24 a las dosis de 240, 350 y 500 mg (una vez al día durante 6 días) y controlado con placebo

Para dar respuesta a los objetivos intermedios:

- Determinar la tolerabilidad del compuesto tras administración repetida
- Determinar las características farmacocinéticas tras administración oral repetida
- Determinar si el compuesto presenta linealidad cinética tras administración repetida.

- e) Determinación de la pauta de dosificación a proponer para continuar con el desarrollo del compuesto en pacientes (estudio de simulación).

# VOLUNTARIOS Y MÉTODO



---

## 1.- INVESTIGACIÓN “*IN VIVO*”

### 1.1.- Diseño de los estudios

Se ha planteado la realización de dos estudios, cada uno con su propio diseño en función de los objetivos a alcanzar:

**Estudio 1:** ensayo clínico de fase I de tolerabilidad en el sujeto sano, aleatorizado, simple ciego, dosis únicas, dosis crecientes (9 dosis) y paralelo.

**Estudio 2:** ensayo clínico de fase I de tolerabilidad en el sujeto sano, aleatorizado, doble ciego, dosis únicas y repetidas, comparativo de 3 dosis controlado con placebo y paralelo.

#### Determinación del tamaño de la muestra

En ambos estudios no se procedió al cálculo formal del tamaño de la muestra, ya que se trataba de los primeros estudios en humanos con el objetivo principal de valorar la tolerabilidad del compuesto, aportando datos iniciales de farmacocinética (niveles plasmáticos) y de farmacodinamia (cuantificación “*ex vivo*” de la producción de LTB<sub>4</sub>).

Según la tradición en la realización de estos estudios se consideró como adecuado y suficiente para alcanzar los objetivos propuestos un tamaño muestral de:

**Estudio 1:** 46 voluntarios (n= 4/grupo en los 4 grupos primeros y n=6/grupo en los 5 grupos siguientes.)

**Estudio 2:** 32 voluntarios (n=8 voluntarios/grupo).

## 1.2.- Población a estudiar

En ambos estudios se incluyeron voluntarios sanos, jóvenes, de sexo masculino (ya que se trataba de una primera administración del fármaco en humanos) que debían cumplir todos los criterios de inclusión exigidos para su participación en el estudio y ninguno de exclusión.

En los dos estudios los criterios de inclusión fueron los mismos: varones entre 18-45 años, con un peso corporal dentro del rango de la normalidad (índice de Quetelet entre 19 y 26 kg/m<sup>2</sup>), con historia clínica, exploración física por aparatos y pruebas complementarias dentro de la normalidad y sin evidencia de enfermedad significativa, orgánica o psiquiátrica. Las pruebas de laboratorio (hemograma y bioquímica incluyendo TSH) debían estar dentro del rango de la normalidad, de acuerdo con los valores normales de referencia del laboratorio del Centre d'Investigació del Medicament (CIM), PNT FASE I. Doc/015 (ver Anexo I), admitiéndose variaciones según criterio del investigador. Las constantes vitales (presión arterial, frecuencia cardíaca y temperatura) así como el registro ECG debían estar dentro de la normalidad. Los voluntarios no debían haber participado en otro ensayo clínico durante los 2 meses anteriores al inicio del estudio actual ni debían haber donado sangre en las 4 semanas previas. Para poder participar, debían aceptar libremente dando su consentimiento por escrito.

Los motivos de exclusión en ambos estudios incluían los antecedentes de alergia, idiosincrasia, hipersensibilidad a fármacos, incluidos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), así como los antecedentes de intolerancia digestiva tras la ingesta de ácido acetilsalicílico (AAS) o AINEs. Tampoco podían participar los voluntarios que presentaran historia o evidencia clínica de patología cardiovascular, respiratoria, renal, hepática, endocrina, gastrointestinal, hematológica, neurológica u otras enfermedades crónicas. Se excluyeron igualmente aquellos que habían sido intervenidos quirúrgicamente durante los 6 meses anteriores, los que habían tomado cualquier medicación en los 15 días anteriores al ensayo o los que presentaron serología positiva para hepatitis B, C o para el virus HIV. Asimismo, se excluyeron los que presentaban alcoholismo o drogodependencias, los consumidores de más de 450 cc de alcohol a la semana, los fumadores de más de 10 cigarrillos al día, los consumidores importantes de bebidas estimulantes (más de 5 cafés, bebidas de cola o té al día) y aquellos que presentaron positividad en las pruebas de detección de drogas en orina (cannabis, cocaína, anfetaminas, benzodiacepinas y opiáceos).

### 1.3.- Tratamientos

En el **estudio 1** la medicación de estudio fue el AM-24 en formulación en cápsulas a dosis únicas y crecientes de 6 a 1200 mg (total 9 dosis distintas). La duración del estudio fue distinta en función de la dosis administrada, siendo de 24h para los voluntarios 1 a 18 (dosis de 6mg a 120mg), de 48h para los voluntarios 19 a 28 (dosis de 240mg y 350mg) y de 72h para los voluntarios 29 a 46 (dosis de 500mg a 1.200mg).

La dosis de inicio se determinó según el procedimiento de cálculo mediante un factor (ver Resultados, Parte I de esta tesis doctoral) y fue de 6mg.

A partir de aquí los niveles de dosis siguientes se seleccionaron siguiendo la progresión de Fibonacci modificada, eliminando algunas dosis intermedias en el tramo inferior de la escalada de dosis. Se escogieron las dosis de 6mg, 30mg, 60mg, 120mg, 240mg, 350mg, 500mg, 700mg y 1.200mg. La dosis presuntamente terapéutica debía oscilar alrededor de los 5 mg/kg según la información contenida en el PEI <sup>(PEI, 1996)</sup>, lo que se corresponde con una dosis de 350mg en humanos. Por ello se eligió una escalada de dosis que alcanzase una dosis máxima equivalente a 3 veces la presuntamente terapéutica.

En el estudio se incluyeron 4 voluntarios sanos por cada dosis en las 4 primeras dosis (6mg, 30mg, 60mg y 120mg) y 6 voluntarios sanos en las 5 dosis restantes (240mg, 350mg, 500mg, 700mg y 1.200mg). Cada una de las dosis se administró inicialmente a 2 voluntarios y, tras comprobar su buena tolerabilidad tras una única administración, se completó la muestra con 2 ó 4 voluntarios según el nivel de dosis considerado, tal como se puede observar en la tabla M-1.

**Tabla M-1:** Esquema del número y distribución de los sujetos del ensayo según el nivel de dosis (Estudio 1).

Grupo	A 6 mg	B 30 mg	C 60 mg	D 120 mg	E 240 mg	F 350 mg	G 500 mg	H 700 mg	I 1200 mg
1	2								
2	2	2							
3		2	2						
4			2	2					
5				2	2				
6					4	2			
7						4	2		
8							4	2	
9								4	2
10									4

En este estudio estaba prevista la utilización de placebo en caso de aparición de problemas de tolerabilidad. Para su evaluación se adjuntó una tabla de criterios de gravedad grados I a III según propuesta de la OMS (WHO. Adverse Reaction Dictionary, 1986).

En caso de aparecer una intolerancia de grado I, se tendría que administrar esa misma a dosis a 3 voluntarios más y concomitantemente placebo a otros 3 voluntarios. En caso de aparición de un efecto con un grado de intolerancia II o III o bien la aparición de una alteración de grado I en más de 6 sujetos y en ninguno tras placebo, se debería suspender la escalada de dosis.

En el **estudio 2** la medicación de estudio fue el AM-24 en formulación en cápsulas a dosis de 240mg, 350mg y 500mg y también cápsulas de placebo.

Se establecieron cuatro condiciones de tratamiento: placebo, AM-24 240mg, AM-24 350mg ó AM-24 500mg. Se evaluó una administración oral única (día 0) y posteriormente en los mismos participantes se inició un régimen de administración repetida (día 7) (una administración oral/día durante 6 días). La duración del estudio fue de 19 días para cada sujeto incluido. Se incluyeron 8 voluntarios sanos por cada tratamiento. La asignación de cada voluntario al tratamiento correspondiente se hizo siguiendo el orden establecido mediante una tabla de aleatorización. Este esquema de aleatorización se generó mediante una tabla de números aleatorios forzándose la obtención final de una tabla equilibrada en bloques de 4 (Tabla M-2).



**Tabla M-2:** Tabla de aleatorización de los voluntarios a los distintos tratamientos (Estudio 2).

Voluntario	Tratamiento*	Voluntario	Tratamiento*
1	D	17	A
2	C	18	B
3	B	19	C
4	A	20	D
5	B	21	D
6	C	22	A
7	A	23	B
8	D	24	C
9	C	25	D
10	B	26	A
11	A	27	B
12	D	28	C
13	D	29	A
14	A	30	D
15	B	31	B
16	C	32	C

\*A = placebo; B = AM-24 240 mg; C = AM-24 350 mg; D = AM-24 500 mg.

## 1.4.- Variables objeto de estudio

### 1.4.1.- Tolerabilidad

#### 1.4.1.1.- Cuestionario de acontecimientos adversos sugeridos

Cuestionario politómico en el que los participantes debían asignar uno de los siguientes descriptores: nada, un poco, mucho o fuerte a una lista de 24 ítems.

Los ítems incluidos eran:

Boca seca, visión borrosa, cara ruborizada, dolor de cabeza, mareo al incorporarse, vértigo, palpitaciones, ardor, molestias gástricas, náuseas, diarrea, estreñimiento, acorchamiento de extremidades, calambres, cansancio general, falta de fuerza en las extremidades, marcha inestable, temblores, somnoliento, insomnio, intranquilo, deprimido, sensación de embriaguez, desconectado.

Tiempos de evaluación en el **Estudio 1**: basal (premedicación), +15min, +30min, +45min, +1h, +1,5h, +2h, +2,5h, +3h, +4h, +6h, +8h, +10h, +12h y +24h.

Tiempos de evaluación en el **Estudio 2**: Días 0 y +12: basal, +2h, +4h, +5h, +12h, +24h, +48h (día +2, día +14), +72h (día +3, día +15), +96h (día +4, día +16), + 120h (día +5, día +17) y + 144h (día +6, día +18). A tiempo premedicación los días +7 a +11.

**1.4.1.2.- Registro de acontecimientos adversos reportados espontáneamente por los voluntarios y/o alteraciones analíticas evaluados según las recomendaciones de la OMS (WHO, 1986)**

La posibilidad de anotar AA reportados de forma espontánea estuvo presente a lo largo de la realización experimental de los correspondientes estudios, debiéndose registrar en el formulario de descripción de AA. Así mismo se consideraron como AA y se registraron todas las alteraciones analíticas de aquellos parámetros que rebasaran los límites, tanto superior como inferior, aceptados por el CIM (PNT Fase I. Doc/015) y aquellos no incluidos en el PNT correspondiente (Anexo I) e incluidos en la tabla de criterios de gravedad grados I a III según propuesta de la OMS <sup>(WHO,1986)</sup>(Anexo II).

En el registro de cualquier acontecimiento adverso debían constar todos los parámetros siguientes y ser evaluados según se describe a continuación para cada uno de ellos (independientemente de la relación de causalidad imputada):

1. Descripción del acontecimiento adverso (Grave: sí o no)
2. Fecha y hora en que se informa
3. Fecha y hora de la ingesta de la última dosis
4. Fecha y hora de inicio del acontecimiento adverso
5. Fecha y hora de remisión
6. Duración y evaluación del acontecimiento adverso
7. Intensidad:

Leve: No interfiere con la vida cotidiana del sujeto

Moderada: Interfiere pero no impide la actividad habitual

Severa: Interfiere en algún aspecto importante de la vida cotidiana e incluso obliga a abandonar el tratamiento

8. Frecuencia definida como: puntual, recurrente o persistente

9. Relación con el fármaco objeto de estudio:

Cierta: Existe una secuencia temporal razonable en relación con la administración del fármaco o con las concentraciones plasmáticas o tisulares del mismo. La manifestación observada coincide con el esquema de reacciones adversas conocidas del fármaco implicado. Mejora al interrumpir la administración del fármaco y reaparece al administrarlo de nuevo.

Probable: Secuencia temporal razonable. Coincide con el esquema de reacciones adversas conocidas. Mejora al interrumpir la administración del fármaco y no se explica por la situación clínica del sujeto.

Posible: Secuencia temporal razonable. Coincide con el esquema de reacciones adversas conocidas. Puede ser debida a la situación clínica del sujeto o a otros fármacos administrados concomitantemente.

Improbable: Secuencia temporal razonable. No coincide con el esquema de reacciones adversas conocidas y no puede ser explicada por la situación clínica del sujeto.

No relacionada: No cumple ninguno de los criterios mencionados.

#### 1.4.1.3.- Exploración física

Esta evaluación incluyó un examen de la apariencia general, piel y mucosas, ojos, garganta-nariz-oidos, sistema cardiovascular, respiratorio, digestivo, locomotor, nervioso y linfático.

El examen del tracto genital, urinario y rectal no se efectuó de forma rutinaria.

- Tiempos de evaluación en el **Estudio 1**: basal (premedicación) del día del ensayo y a +24h tras la administración de la dosis única.
- Tiempos de evaluación en el **Estudio 2**: basal (premedicación) del día 0 (dosis única) y día +18, al finalizar el estudio.

#### 1.4.1.4.- Constantes vitales

Se realizaron registros de constantes vitales. La presión arterial (sistólica y diastólica) y la frecuencia cardíaca se registraron mediante el sistema DINAMAP CRITIKON 8100 en posición de decúbito supino (manteniendo el brazo a una altura próxima a la del corazón y tras 5 minutos de sedestación). La temperatura se tomó con termómetro de mercurio tras cinco minutos de colocación axilar.

- Tiempos de evaluación en el **Estudio 1**: basal (premedicación), +15min, +30min, +45min, +1h, +1,5h, +2h, +2,5 h,+3h, +4h, +6h, +8h, +10h, +12h y a +24h de la toma de la medicación.
- Tiempos de evaluación en el **Estudio 2**: Días 0 y +12: basal, +2h, +4h, +5h, +12h, +24h, +48h (día +2, día +14), +72h (día +3, día +15), +96h (día +4, día +16), + 120h (día +5, día +17) y + 144h (día +6, día +18). A tiempo premedicación los días +7 a +11.

#### 1.4.1.5.- Electrocardiograma

Se realizaron ECGs, mediante un aparato Siemens (SICARD 460) con 12 derivaciones evaluándose los siguientes parámetros: frecuencia ventricular, onda P, intervalo QRS, intervalo PR, intervalo QT e intervalo QTc.

- Tiempos de evaluación en el **Estudio 1**: basal y a +24h de la administración de medicación.
- Tiempos de evaluación en el **Estudio 2**: a tiempo basal (premedicación) los días 0 (administración única), día +1 (+24h dosis única), día +9 (premedicación 3ª dosis administración repetida), día +12 (premedicación 6ª dosis, última de la administración repetida), día +13 (+24h última dosis repetida) y día +18 (al finalizar el estudio, +144h de última administración repetida).

Además, en el Estudio 1, se efectuó una registro limitado a la derivación DII: en los siguientes tiempos: + 30min,+1h, +2h, +4h, +6h, +8h y +12 h horas de la toma de medicación.

#### 1.4.1.6.- Parámetros de laboratorio

Todos los parámetros de laboratorio evaluados lo fueron:

- **Estudio 1:** basal (premedicación) y +24h postmedicación.
- **Estudio 2:** basal (premedicación) día 0 (dosis única) y día +18, al finalizar el estudio.

#### *Hematología*

Se evaluaron los siguientes parámetros analíticos:

Leucocitos, fórmula leucocitaria, hematíes, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (V.C.M), hemoglobina corpuscular media (H.C.M), concentración corpuscular media de hemoglobina (C.C.M.H), amplitud de distribución de los hematíes (R.D.W.), plaquetas, plaquetocrito, volumen plaquetario medio (M.P.V).

#### *Bioquímica*

Se evaluaron los siguientes parámetros analíticos estándar:

A nivel sanguíneo: Proteínas totales, glucosa, urea, creatinina, bilirrubina total, bilirrubina directa, triglicéridos, colesterol, aspartato-aminotransferasa (AST), alanina-aminotransferasa (ALT), fosfatasas alcalinas y gamma-glutamyl-transpeptidasa (GGT).

A nivel urinario: pH, albúmina, glucosa, cuerpos cetónicos, urobilinógeno, pigmentos biliares, hematíes.

Adicionalmente, se evaluaron los niveles plasmáticos de hormona tireotropa (TSH), ante la presencia de yodos en la estructura molecular del compuesto; y se verificó la posibilidad de sangre oculta en heces, ante el eventual mecanismo de acción como inhibidor de la síntesis de PGs.

Niveles de TSH: se determinaron por inmunoanálisis quimioluminométrico, presentando el método un límite de detección de 0,03 mUI/L.

Sangre oculta en heces: se determinó mediante el método consistente en la reacción de oxígeno liberado por la peroxidasa tras el contacto de la hemoglobina con el guayaco.

### ***Sedimento urinario***

Se evaluaron los siguientes parámetros analíticos:

Detección de: células de descamación epitelial, leucocitos, hematíes, tinción de Gram: presencia de gérmenes.

## **1.4.2.- Farmacocinética**

### **1.4.2.1.- Obtención de las muestras**

Tras la toma de la medicación y en cada uno de los tiempos experimentales, se extrajeron 3 mL de sangre, siempre con anticoagulante (heparina lítica). Tras la centrifugación de los tubos a temperatura ambiente y a 3500r.p.m. durante 15 minutos, se procedió a la separación del sobrenadante introduciéndolo en tubos de polipropileno. Las muestras de plasma se congelaron tan pronto como fue posible a  $-40\pm 5^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del análisis.

**Estudio 1:** Los tiempos de toma de muestras de sangre para la determinación de AM-24 en plasma se detallan a continuación y que se reflejan en la Tabla M-3:

Dosis de 6mg, 30mg, 60mg y 120mg (2 voluntarios): a tiempo basal, +1h y +2h

Dosis de 120mg (2 voluntarios) y 240mg (2 voluntarios): a tiempo basal, +30min, +1h, +1,5h, +2h, +4h, +6h, +8h, +10h, +12h y +24h.

Dosis de 240mg (4 voluntarios) y 350mg: a tiempo basal, +30min, +1h, +1,5h, +2h, +4h, +6h, +8h, +10h, +12h, +24h y +48h.

Dosis de 500mg, 700mg y 1200mg: a tiempo basal, +1h, +1,5h, +2h, +4h, +6h, +8h, +10h, +12h, +24h, +48h y +72h.

**Tabla M-3:** Distribución temporal de puntos de extracción en cada voluntario en función del nivel de dosis administrada (Estudio 1).

Nº voluntario	Dosis (mg)	Nivel	Nº puntos	Basal	+30'	+1h	+1,5h	+2h	+4h	+6h	+8h	+10h	+12h	+24h	+48h	+72h
1 a 4	6	A	3	X		X		X								
5 a 8	30	B	3	X		X		X								
9 a 12	60	C	3	X		X		X								
13, 14	120	D	3	X		X		X								
15, 16	120	D	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
17, 18	240	E	11	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
19 a 22	240	E	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
23 a 28	350	F	12	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
29 a 32,35,36	500	G	12	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
33,34,37 a 40	700	H	12	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
41 a 46	1200	I	12	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Las dosis utilizadas para caracterizar la farmacocinética fueron las de 240mg, 350mg, 500mg, 700mg y 1200mg (zonas sombreadas en la Tabla M-3), ya que en las dosis inferiores el número de puntos de extracción fue claramente insuficiente para valorar dicho objetivo.

**Estudio 2:** Los tiempos de toma de muestras de sangre para la determinación de AM-24 en plasma se detallan a continuación y se reflejan en la Tabla M-4:

Dosis única: Basal, +2h, +4h, +4,5h, +5h, +5,5h, +6h, +12h, +24h (día +1), +48h (día +2), +72h (día +3), +96h (día +4), +120 (día +5), +144h (día +6).

Dosis repetida: +168h (basal, día +7), +192h (pre, día +8), +216h (pre, día +9), +240h (pre, día +10), +264h (pre, día +11), +288h (pre, día +12, última dosis), +290h (+2h), +292h (+4h), +292,5h (+4,5h), +293h (+5h), +293,5h (+5,5h), +294h (+6h), +300h (+12h), +312h (día +13), +336h (día +14), +360h (día +15), +384h (día +16), +408h (día +17) y +432h (día +18).

En la tabla M-4 se puede observar esquemáticamente la distribución de las extracciones plasmáticas.

**Tabla M-4:** Distribución temporal de las extracciones para el estudio farmacocinético a dosis única y repetida (Estudio 2).

**FARMACOCINÉTICA DE DOSIS ÚNICA**

Día 0									Día +1	Día +2	Día +3	Día +4	Día +5	Día +6
Basal	+2h	+4h	+4,5 h	+5h	+5,5h	+6h	+12h	+13h	+24h	+48h	+72h	+96h	+120h	+144h
X	•	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

**FARMACOCINÉTICA DE DOSIS REPETIDA**

Día +7 +168h	Día +8 +192h	Día +9 +216h	Día +10 +240h	Día +11 +264h	Día +12 +288h									Día +13 (+24h) +312h	Día +14 (+48h) +336h	
•	•	•	•	•	•	+2h	+4h	+4,5h	+5h	+5,5h	+6h	+12h	+13h			
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X

Día +15 (+72h) +360h	Día +16 (+96h) +384h	Día +17 (+120h) +408h	Día +18 (+144h) +432h
X	X	X	X

•: Toma de medicación. X: extracción sanguínea para estudio farmacocinético.

**1.4.2.2.- Método analítico**

Las determinaciones de las concentraciones plasmáticas de AM-24 se efectuaron mediante HPLC en fase reversa. El método utilizado es el descrito por L García-Capdevila y cols. <sup>(García-Capdevila et al., 1998)</sup> desarrollado en el Laboratorio de Síntesis del Institut de Recerca del HSCSP. El método fue validado para plasma humano dentro de un rango de concentraciones adecuado a los niveles plasmáticos del fármaco en este estudio.

El equipo cromatográfico utilizado fue de Waters, S.A. y estaba compuesto por dos bombas modelo 510, un inyector automático Ultrawisp 715, un detector ultravioleta modelo 486 y un sistema de integración y tratamiento de datos, Maxima 820 Chromatography Data Station. La separación se realizó mediante una columna Nova-Pak C<sub>18</sub> de 4 µm de tamaño de partícula, 150mm de longitud y 3.9mm de diámetro interno.

La fase móvil utilizada fue una mezcla de acetonitrilo: agua (68:38). La mezcla se filtró y desgasificó a través de un filtro Millipore de 0,45 µm y la cromatografía se realizó a 20°C con un flujo de 1,0 mL/min y una presión de la columna de aproximadamente 1.500p.s.i. Los picos de AM-24 y MDF (estándar interno) se detectaron por absorción al ultravioleta a una longitud de onda de 277nm y el volumen de inyección fue de 10µL.



La preparación de las muestras se hizo por extracción líquido-líquido con acetato de etilo. Las muestras de plasma se descongelaron a temperatura ambiente y se tomaron alícuotas de 100µL para el análisis. Se añadieron 100µL del estándar interno por 100µL del plasma (muestra o estándar). Para la extracción se empleó 1mL del disolvente, agitándose vigorosamente y separándose la fase orgánica por centrifugación (5min a 2.000r.p.m.). La fase orgánica se evaporó en corriente de nitrógeno o argón y se reconstituyó el residuo con 50µL de fase móvil. La muestra así preparada se traspasó a un microvial de inyección, cromatografiándose 10µL.

Para la cuantificación se utilizaron las curvas de calibrado. El cálculo se realizó a partir de la relación de alturas de los picos de AM-24 y de MDF (fármaco/estándar interno). Se ajustó el logaritmo de la concentración en µg/mL frente al logaritmo de la relación de alturas. La concentración de AM-24 en las muestras se obtuvo directamente con el programa Maxima por interpolación de la relación de alturas en la curva de calibrado como dato primario, no sufriendo los resultados ninguna transformación o manipulación. Se eligió un ajustado logarítmico debido a que, al haber recibido los voluntarios distintas dosis del fármaco, el margen de concentraciones plasmáticas era muy amplio y este ajustado ofrecía una mayor exactitud.

Los límites de detección y de cuantificación se establecieron a partir de la respuesta observada en los blancos y de los resultados de los estándares más bajos de las curvas de calibrado. Se tomó como límite de detección la concentración de AM-24 más baja que tuviera una respuesta igual a la del ruido observado en los blancos más tres veces su desviación estándar y que fue de 0,05mg/L.

El método analítico descrito fue aplicado para la cuantificación del AM-24 en los 2 estudios descritos anteriormente, tomándose en ambos casos como límite de cuantificación el estándar más bajo de la validación, que en el primer estudio (búsqueda de DMT) fue de 0,1mg/L y en el segundo (estudio de dosis única y dosis repetidas) fue de 0,25 mg/L. En ambos casos esta cifra correspondió a la concentración más baja que se incluyó en la calibración y para la que se conocían su precisión y su exactitud.

### 1.4.2.3.- Evaluación de los resultados

Se utilizó la aproximación amodelística para caracterizar la curva farmacocinética de forma individual para cada voluntario por separado. Se aplicó el modelo no compartimental tras administración extravasal mediante el programa de farmacocinética Winnonlin, versión 2.0<sup>(Winnonlin)</sup>.

- **Estudio 1**

Para cada una de las siguientes dosis orales de AM-24: 240mg, 350mg, 500mg, 700mg y 1200mg se calcularon los siguientes parámetros, tras administración única:

a. - Parámetros que caracterizan la biodisponibilidad en magnitud:

-  $AUC_0^\infty$  ((mg/L)\*h): área bajo la curva de concentración vs tiempo desde 0 hasta infinito.

-  $AUC_0^\infty/D$  (h/L): área bajo la curva de concentración vs tiempo desde 0 hasta infinito en relación a la dosis administrada.

b. - Parámetros que caracterizan la biodisponibilidad en velocidad:

-  $C_{max}$  (mg/L): concentración plasmática máxima.

-  $C_{max}/D(L^{-1})$ : concentración plasmática máxima en relación a la dosis administrada.

-  $t_{max}$  (h): tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima.

c. - Parámetro que caracteriza la distribución:

-  $Vd/F$  (L): volumen de distribución aparente

d. - Parámetros que caracterizan la eliminación:

-  $Cl/F$  (L/h): aclaramiento plasmático total

-  $k_e$ : constante de eliminación

-  $t_{1/2}$  (h): tiempo de semivida de eliminación

- **Estudio 2**

Para cada una de las siguientes dosis orales de AM-24: 240mg, 360mg y 500mg se calcularon los siguientes parámetros:

Tras administración única:

a. - Parámetros que caracterizan la biodisponibilidad en magnitud:

-  $AUC_0^\infty$  ((mg/L)\*h): área bajo la curva de concentración vs tiempo desde 0 hasta infinito.

b. - Parámetros que caracterizan la biodisponibilidad en velocidad:

-  $C_{max}$  (mg/L): concentración plasmática máxima.

-  $t_{max}$  (h): tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima.

c. - Parámetro que caracteriza la distribución:

-  $Vd/F$  (L): volumen de distribución aparente

d. - Parámetros que caracterizan la eliminación:

-  $Cl/F$  (L/h): aclaramiento plasmático total

-  $k_e$ : constante de velocidad de eliminación

-  $t_{1/2}$  (h): tiempo de semivida de eliminación

Tras administración repetida (6 días):

a.- Parámetros que caracterizan la biodisponibilidad:

$AUC_\tau^{EE}$  ((mg/L)\*h): área bajo la curva de concentración vs tiempo durante un intervalo de dosificación en estado de equilibrio estacionario.

$C_{min}^{EE}$ , (mg/L): concentración plasmática mínima en estado de equilibrio estacionario

$C_{max}^{EE}$ , (mg/L): concentración plasmática máxima en estado de equilibrio estacionario

$C_{av}^{EE}$ , (mg/L): concentración plasmática promedio en estado de equilibrio estacionario

$t_{max}$ , (h): tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima.

PTF (%): índice de fluctuación pico-valle

b.- Parámetro que caracteriza la distribución:

Vd/F (L): volumen de distribución aparente

c.- Parámetros que caracterizan la eliminación:

Cl/F (L/h), : aclaramiento plasmático total aparente

$k_e$  : constante de velocidad de eliminación

$t_{1/2}$  (h): tiempo de semivida de eliminación

En todos los casos, los parámetros relacionados con las concentraciones ( $C_{max}$ ,  $C_{min}^{EE}$ ,  $C_{max}^{EE}$ ,  $C_{av}^{EE}$  y el tiempo en que se alcanzan las concentraciones máximas ( $t_{max}$ ) se obtuvieron directamente de los datos originales. El tiempo de semivida de eliminación ( $t_{1/2}$ ) se calculó de la siguiente forma:  $t_{1/2}=0,693/k_e$ , donde  $k_e$  es la pendiente de la parte terminal de la curva de concentración vs tiempo obtenida por regresión lineal tras transformación semilogarítmica. La selección de los puntos para calcular  $k_e$  fue proporcionada automáticamente por el programa informático utilizado (Winnonlin Pro 2.0). Las áreas bajo la curva de concentración vs tiempo se calcularon siguiendo el método log–trapezoidal. El  $AUC_0^\infty$  se calculó de la siguiente forma:  $AUC_0^\infty = AUC_0^{t_x} + C_{t_x} / k_e$ , donde  $t_x$  es el tiempo con la última concentración de AM-24 ( $C_{t_x}$ ) superior al límite de cuantificación. El volumen de distribución aparente se calculó de la siguiente forma:  $Vd/F = D / (k_e * AUC_0^\infty)$ , donde D es la dosis y F es la biodisponibilidad oral. El aclaramiento plasmático total se calculó de la siguiente forma:  $Cl/F = D / AUC_0^\infty$  y el índice de fluctuación pico-valle,  $PTF\% = 100 (C_{max}^{EE} - C_{min}^{EE} / C_{av}^{EE})$ .

En la tabla M-5 se puede observar un resumen de los parámetros farmacocinéticos estudiados.

**Tabla M-5:** Parámetros farmacocinéticos estudiados. Para cada uno de los parámetros se calculó la media, desviación estándar, mínimo y máximo.

Parámetros farmacocinéticos	Dosis única	Dosis repetida
Biodisponibilidad	$AUC_0^\infty, C_{max}, t_{max}$	$AUC_\tau^{EE}, C_{min}^{EE}, C_{max}^{EE}, C_{av}^{EE}, t_{max}, PTF(\%)$
Distribución	Vd/F	Vd/F
Eliminación	Cl/F, $k_e, t_{1/2}$	Cl/F, $k_e, t_{1/2}$

### 1.4.3.- Farmacodinamia

#### 1.4.3.1.- Obtención de las muestras

Para la caracterización “ex vivo” del perfil farmacodinámico del AM-24 en el hombre (relación entre los niveles plasmáticos del fármaco y la inhibición de la producción de LTB<sub>4</sub>), se extrajeron muestras adicionales de sangre de 5 ml a los voluntarios sanos participantes en el Estudio 1.

En la tabla M-6 los tiempos marcados con una X corresponden a las extracciones realizadas para la caracterización farmacocinética (AM-24) y han sido descritos con anterioridad en este texto, mientras que los marcados con \* y sombreados, son aquéllos en los que se procedió a extraer sangre adicional para la caracterización farmacodinámica (LTB<sub>4</sub>). Esta caracterización se realizó para las dosis de 120mg a 1200mg a tiempo basal y a las dos horas tras la administración del fármaco. Así pues las concentraciones utilizadas para caracterizar la farmacodinamia fueron las resultantes de la administración de las dosis de 120mg, 240mg, 350mg, 500mg, 700mg y 1200mg.

**Tabla M-6:** Distribución temporal de puntos de extracción sanguínea para la caracterización farmacodinámica.

Nº voluntario	Dosis (mg) Nivel	Nº puntos	Basal	+30'	+1h	+1h30	+2h	+4h	+6h	+8h	+10h	+12h	+24h	+48h	+72h
1 a 4	6 A	3	X		X		X								
5 a 8	30 B	3	X		X		X								
9 a 12	60 C	3	X		X		X								
13, 14	120 D	3	X		X		X								
15, 16	120 D	11	X*	X	X	X	X*	X	X	X	X	X	X	X	
17, 18	240 E	11	X*	X	X	X	X*	X	X	X	X	X	X	X	
19 a 22	240 E	12	X*	X	X	X	X*	X	X	X	X	X	X	X	X
23 a 28	350 F	12	X*	X	X	X	X*	X	X	X	X	X	X	X	X
29 a 32,35,36	500 G	12	X*		X	X	X*	X	X	X	X	X	X	X	X
33,34,37 a 40	700 H	12	X*		X	X	X*	X	X	X	X	X	X	X	X
41 a 46	1200 I	12	X*		X	X	X*	X	X	X	X	X	X	X	X

Las muestras de sangre total se congelaron a -20°C hasta ser remitidas al Centro Analítico para su procesamiento y análisis.

### 1.4.3.2.- Método analítico para determinar la actividad de la enzima 5- LOX

Tras la descongelación de las muestras mediante su incubación en un baño de agua agitado a 37°C se obtuvieron alícuotas por duplicado de 0,5 ml que se incubaron a 37°C durante 10min. A continuación se estimularon con ionóforo cálcico A23187 (30µM, concentración final) durante 30min a 37°C, lo que produce la activación de la 5-LOX, centrifugándose a 2.500 giros durante 2min. El plasma resultante se separó y se procedió a su inmediato análisis. En estas muestras se determinó la concentración de LTB<sub>4</sub> mediante inmunoensayo enzimático (EIA: Amersham), obteniéndose de esta forma las concentraciones de LTB<sub>4</sub> a los distintos tiempos de extracción.

### 1.4.3.3.- Evaluación de los resultados

Los resultados de las concentraciones de LTB<sub>4</sub> obtenidos a los distintos tiempos de extracción se introdujeron en el programa WinNonlin Pro 2.0 y se procedió a un análisis del efecto de inhibición en la producción de LTB<sub>4</sub> en relación a las concentraciones plasmáticas obtenidas de AM-24 a los mismos tiempos, mediante el modelo farmacodinámico de efecto inhibitorio de tipo sigmoide con efecto residual por encima de la línea basal (Modelo 108 del programa WinNonlin. Pro 2.0) (Figura M-1).

**Figura M-1:** Modelo farmacodinámico de efecto inhibitorio de tipo sigmoide con efecto residual por encima de la línea basal.

Efecto inhibitorio sigmoide:

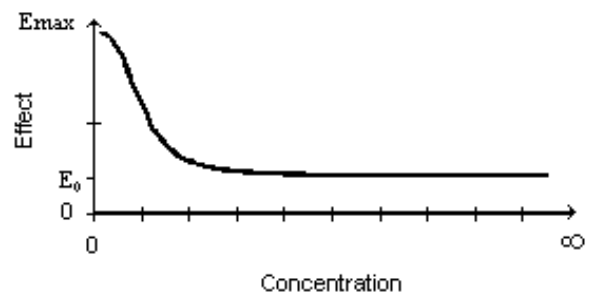
$$E = E_{\max} - (E_{\max} - E_0) * (C^\gamma / (C^\gamma + CE_{50}^\gamma))$$

$E_{\max}$ : efecto máximo

$E_0$ : efecto a  $C = \infty$

$CE_{50}$ : concentración del efecto inhibitorio 50%.

$\gamma$ : sigmoidicidad de la curva



Con estos cálculos se pretendía obtener el valor aproximado de concentración plasmática a que se alcanza la concentración inhibitoria 50% (CI<sub>50</sub>) (mg/L), es decir, una concentración plasmática a la cual el efecto inhibitorio producido es igual a la mitad del efecto máximo.

La estrategia de cálculo aplicada fue la aproximación de mezcla inocente de datos (“Naive pooled data approach”). Mediante esta aproximación los parámetros farmacodinámicos se obtuvieron a partir de la mezcla de los datos de todos los individuos.

## **1.5.- Desarrollo de los estudios**

### **1.5.1.- Screening pre-estudio**

Los sujetos fueron examinados (en ayunas de 10 horas) dentro de las tres semanas previas al inicio del correspondiente estudio. Se recogieron y consignaron los datos que se relacionaron en la correspondiente hoja de seguimiento individual de cada voluntario, incluyéndose: datos personales, historia médica detallada, exploración física general y por aparatos, constantes vitales, electrocardiograma, examen analítico incluyendo bioquímica, hematología, urianálisis, sedimento de orina, serologías para el virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC) y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) así como pruebas toxicológicas de detección drogas en orina descritas anteriormente.

Durante el screening pre-estudio, la presión sistólica, diastólica y frecuencia cardiaca se registraron primeramente en posición ortostática y seguidamente, tras 5 minutos de sedestación, en decúbito supino.

### **1.5.2.- Institucionalización y supervisión de los sujetos**

- **Estudio 1**

Los voluntarios llegaron al CIM del Institut de Recerca de l’Hospital de la Santa Creu i Sant Pau hacia las 7.00 h de la mañana del día de estudio, tras ayuno de 10 horas para alimentos sólidos y líquidos. Según la dosis administrada, los voluntarios permanecieron hospitalizados un número de horas distintas. Así pues, para las dosis iniciales (6mg, 30mg, 60mg y 120mg),

los voluntarios permanecieron en el CIM únicamente 13h mientras que para las dosis posteriormente analizadas (240mg, 350mg, 500mg, 700mg y 1200mg), lo hicieron durante 24h (voluntarios 17 a 46), volviendo para una extracción a las 48h (voluntarios 19 a 46) y también a las 72h (voluntarios 29 a 46).

- **Estudio 2**

Los días 0 y 12 (administración de la dosis única y último día de la administración farmacológica repetida, respectivamente) los voluntarios acudieron al CIM del Institut de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau hacia las 7.00h de la mañana del día de estudio, tras ayuno de 10 horas para alimentos sólidos y líquidos y permanecieron ingresados hasta +24h postmedicación. Los días en los que se realizó seguimiento de la dosis única (días 2 a 6) los voluntarios acudieron al CIM, siempre a la misma hora, para realizar los pertinentes controles. Seguidamente, se procedió a la administración farmacológica repetida (días 7 a 12) y se realizó asimismo el seguimiento tras administración repetida (días 14 a 18), durante el cual, los voluntarios acudieron igualmente en ayunas a la misma hora a los controles pertinentes.

- **En ambos estudios**

Las distintas variables de la tolerabilidad: cuestionarios estandarizados de acontecimientos adversos sugeridos, constantes vitales (presión arterial sistólica y diastólica, frecuencia cardíaca y temperatura), ECG, las analíticas, y las exploraciones físicas se realizaron a los tiempos previamente descritos. Asimismo, en caso de experimentar algún acontecimiento adverso en tiempos distintos a los citados o de detectarse alguna alteración analítica relevante, también se notificaba en una hoja de recogida de AA espontáneos.

Durante el tiempo de ingreso en el CIM se les insertó una cánula en una vena antecubital, provista de mandriles heparinizados intercambiables, para permitir la extracción repetida de muestras sanguíneas con el objetivo de determinar los niveles plasmáticos del fármaco a distintos tiempos (estudio 1 y 2), su actividad “ex vivo” (estudio 1), así como para la práctica de analíticas a tiempo basal y final del período experimental (estudios 1 y 2). Así mismo, en ambos estudios, a tiempo basal y final se recogieron muestras de heces para realizar el “test de sangre oculta en heces” y muestras de orina para la práctica de urianálisis y sedimento.



Cuando en un punto temporal coincidían determinaciones de tolerabilidad y extracciones de sangre, estas se efectuaban coincidiendo con el tiempo establecido y las evaluaciones de tolerabilidad se realizaban 5 minutos después.

Cuando la medicación era administrada debía ingerirse con 125ml de agua, dejando 5 minutos de intervalo entre cada voluntario que participaba en el mismo día experimental.

El día experimental (estudio 1) y los días 0 y +12 (estudio 2), los voluntarios recibieron un desayuno, comida y cena estándar a +2h, +6h y +13h post-medicación respectivamente, permitiéndose la toma de agua de forma libre durante todo el período experimental.

## **1.6.- Análisis estadístico**

Todos los análisis estadísticos se efectuaron mediante el programa SPSS 8.0<sup>(SPSS,1998)</sup>.

### **1.6.1.- Tolerabilidad**

#### **1.6.1.1.- Evaluación individualizada**

A parte de efectuar el registro y evaluación de cualquier acontecimiento adverso según los parámetros que se han descrito previamente (ver Material y Métodos, punto 1.4.1.2) (independientemente de la relación de causalidad imputada), las diferentes variables cuantificadas: exploraciones físicas, constantes vitales, ECG y pruebas de laboratorio fueron clasificadas individualmente como normales o con alteraciones clínicamente relevantes, siguiendo los valores aceptados por el CIM (PNT FaseI. Doc/015) (Anexo I) o bien, siguiendo una tabla de criterios de gravedad según propuesta de la OMS<sup>(WHO Adverse Reaction Dictionary, 1986)</sup> (Anexo II) en aquellos casos que no se encontraban incluidos en el PNT anteriormente citado.

Se consideraron como valores normales en las constantes vitales, cifras dentro de los siguientes intervalos:

Presión arterial sistólica: 90-140 mmHg

Presión arterial diastólica: 50-90 mmHg

Frecuencia cardiaca: > 40 < 100 pulsaciones/minuto

Temperatura axilar: 35-37°C

O en el ECG cifras por debajo de los siguientes límites:

Onda P <120 ms

PR < 220ms

QRS <120ms

QT < 440ms

QTc <440 ms

### **1.6.1.2.- Estadística descriptiva**

Las variables continuas se describieron mediante estadígrafos cuantitativos, presentando la media y DS de los valores obtenidos. Las variables no-continuas se describieron mediante estadígrafos discretos, presentando estadígrafos de orientación central (mediana, moda) y estadígrafos de dispersión (rango, máximo y mínimo) cuando la escala de medida era ordinal, y tabulación de frecuencias cuando la escala de medida era nominal.

### **1.6.1.3.- Estadística inferencial**

Los parámetros obtenidos en el momento final se compararon mediante un test de t de datos apareados, con relación a los valores obtenidos en el momento basal.

En todos los análisis se consideró un nivel de significación  $\alpha=0,05$  (bilateral).

## 1.6.2.- Farmacocinética

### 1.6.2.1.- Estadística descriptiva

Las características farmacocinéticas tras administración única y tras administración repetida fueron descritas mediante estadígrafos cuantitativos, presentando la media y DS de los valores obtenidos en los distintos voluntarios en las distintas variables calculadas.

### 1.6.2.2.- Estadística inferencial

#### *Linealidad cinética al incrementar la dosis*

Para que exista linealidad cinética se debe cumplir el principio de superposición entre las distintas dosis, es decir, que los parámetros farmacocinéticos enumerados a continuación no deberían variar con el aumento de la dosis:  $AUC_0^\infty/D$ ,  $C_{max}/D$ ,  $t_{max}$ ,  $Vd/F$ ,  $Cl/F$ ,  $k_e$  y  $t_{1/2}$ . En cambio, los parámetros  $AUC_0^\infty$  y  $C_{max}$  sí deberían variar con el aumento de la dosis siguiendo una relación lineal.

Se procedió a someter los parámetros mencionados a un análisis de la varianza (ANOVA) de un sólo factor, en relación a las 5 dosis analizadas, tras realizar un test de Levene y comprobar la homogeneidad de las varianzas. Si el resultado de la ANOVA resultaba estadísticamente significativo se procedió a realizar un test de Duncan (subconjuntos homogéneos) para valorar entre qué dosis existían diferencias. En los casos en los que no había homogeneidad de las varianzas, los parámetros se sometieron al test no paramétrico de comparación de rangos de Kruskal Wallis (KW)<sup>(Conover, 1980; SPSS, 1998)</sup> y así mismo a la prueba de Jonckheere-Terpstra; <sup>(Hollander, 1973; SPSS, 1998)</sup> la segunda mencionada, no es tan conocida, pero es más potente y además detecta diferencias tanto en localización (también la de KW) como en la forma. En los casos en los que el test de KW resultó estadísticamente significativo, se procedió a valorar entre qué dosis existían las diferencias mediante el método de Conover, realizado con una hoja de cálculo <sup>(MS.Excel,1997; SPSS, 1998)</sup>.

### ***Linealidad cinética tras administración repetida***

Para que exista linealidad cinética se debe cumplir el principio de superposición entre la primera dosis (o dosis única) y esa misma dosis en un intervalo de dosificación en estado estacionario tras administración repetida, es decir, que los parámetros farmacocinéticos enumerados a continuación no deberían variar con la administración repetida:  $AUC_0^{\infty}$ ,  $AUC_{\tau}^{EE}$ ,  $Vd/F$ ,  $Cl/F$ ,  $k_e$  ni  $t_{1/2}$ .

Se procedió a someter los parámetros mencionados, separadamente para cada uno de los tres niveles de dosis, a un test de t de medidas repetidas.

En todos los análisis se consideró un nivel de significación  $\alpha=0,05$  (bilateral).

### **1.6.3.- Farmacodinamia**

#### **1.6.3.1.- Estadística descriptiva**

Las características farmacodinámicas fueron descritas mediante los valores de los parámetros modelados y su intervalo de confianza estimado.

### **1.7.- Condiciones éticas y legales**

Ambos estudios se llevaron a cabo según las recomendaciones éticas para la realización de ensayos clínicos e investigación en humanos (Declaraciones de Helsinki y Tokio) y en conformidad con la legislación española vigente en el momento de realizar los estudios en materia de ensayos clínicos (Real Decreto 561/1993, de 16 de abril de 1993)<sup>(RD 561/93)</sup>. Antes de incluir a cualquiera de los sujetos en los estudios realizados, el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y la Agencia Española del Medicamento aprobaron los protocolos, la información que se dió a los voluntarios y el modelo de consentimiento informado que se utilizó. Todos los sujetos fueron informados de la naturaleza, objetivos y riesgos del estudio, dando su consentimiento por escrito e informándoles que hubieran podido suspender su participación en el mismo en el momento en que lo hubieran deseado. También se les especificó la cuantía económica que recibirían como contraprestación por su participación.

---

## 2.- INVESTIGACIÓN “IN NÚMERO”: SIMULACIONES

### 2.1.- Desarrollo de los modelos para describir las concentraciones plasmáticas

#### 2.1.1.- Pauta de dosificación a evaluar para caracterizar la administración repetida

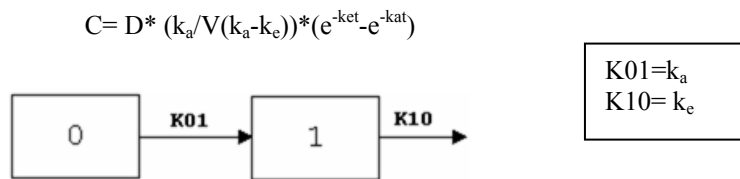
Para determinar la pauta de administración repetida, se procedió a ajustar las concentraciones plasmáticas obtenidas en el estudio 1 a distintos modelos farmacocinéticos con el objetivo de determinar aquel que mejor las describía y a partir de los parámetros que lo caracterizaban proceder a simular aquellas concentraciones que se alcanzarían tras administración repetida, asumiendo un comportamiento lineal.

Se aplicaron dos aproximaciones para la identificación del modelo farmacocinético: la estrategia de promediado simple y la estrategia de promediado en dos etapas. Mediante la estrategia de promediado simple los parámetros farmacocinéticos se obtienen a partir de las concentraciones plasmáticas medias para cada dosis, mientras que mediante la estrategia en dos etapas se obtienen primeramente los parámetros farmacocinéticos individuales para cada voluntario y en una segunda fase se realiza la media de cada uno de los parámetros para cada una de las dosis administradas.

Se utilizaron los siguientes modelos para ajustar la curva farmacocinética, efectuándose los cálculos mediante el programa Winnonlin Pro 2.0 <sup>(Winnonlin, 1998)</sup>:

- Modelo monocompartimental con eliminación lineal (Modelo 3) (Figura M-2)
- Modelo bicompartimental con eliminación lineal (Modelo 11) (Figura M-3)
- Modelo monocompartimental con eliminación de Michaelis-Menten (Modelo 303) (Figura M-4)

**Figura M-2:** Modelo monocompartimental con eliminación lineal.



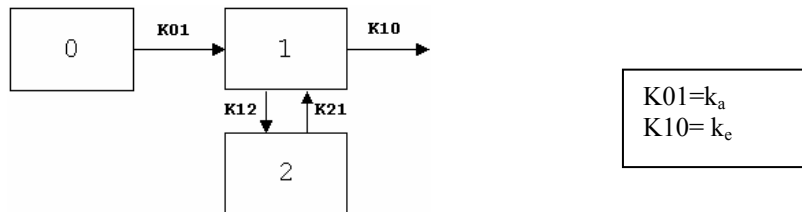
Los parámetros que caracterizan al modelo monocompartimental con eliminación lineal son:

- $AUC_0^\infty$  ((mg/L)\*h): área bajo la curva desde tiempo 0 hasta infinito
- $AUC_0^\infty/D$  (h/L): área bajo la curva desde tiempo 0 hasta infinito en relación a la dosis administrada
- $C_{max}$  (mg/L): concentración plasmática máxima
- $C_{max}/D(L^{-1})$ : concentración plasmática máxima, en relación a la dosis administrada
- $t_{max}$  (h): tiempo a que se alcanza la concentración plasmática máxima
- $Vd/F$  (L): volumen de distribución en relación a la biodisponibilidad
- $Cl$  (L/h): aclaramiento
- $k_e$  ( $h^{-1}$ ): constante de eliminación
- $t_{1/2}$  (h): tiempo de semivida de eliminación desde el compartimento 1
- $k_a$ : constante de absorción
- $t_{1/2 ka}$ : tiempo de semivida del paso del compartimento 0 al 1

No se proporcionaron estimas iniciales para estos parámetros.

**Figura M-3:** Modelo bicompartimental con eliminación lineal.

$$C=A*e^{-\alpha t} + B* e^{-\beta t} + C*e^{-k_e t}$$



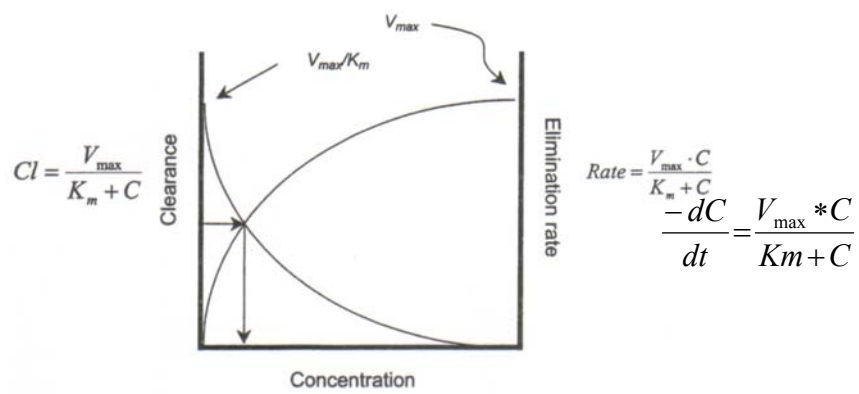
Los parámetros que caracterizan al modelo bicompartimental con eliminación lineal son:

- $AUC_0^\infty$  ((mg/L)\*h): área bajo la curva desde tiempo 0 hasta infinito
- $AUC_0^\infty/D$  (h/L): área bajo la curva desde tiempo 0 hasta infinito en relación a la dosis administrada.
- $C_{max}$  (mg/L): concentración plasmática máxima
- $C_{max}/D(L^{-1})$ : concentración plasmática máxima, en relación a la dosis administrada
- $t_{max}$  (h): tiempo a que se alcanza la concentración plasmática máxima
- $Vd/F$  (L): volumen de distribución en relación a la biodisponibilidad
- $Cl$  (L/h): aclaramiento
- $k_e$ : constante de eliminación
- $t_{1/2}$  (h): tiempo de semivida de eliminación desde el compartimento 1
- $k_a$ : constante de absorción
- $t_{1/2 k_a}$ : tiempo de semivida del paso del compartimento 0 al 1
- $k_{12}$ : microconstante de velocidad de paso del compartimento central al periférico
- $t_{1/2 k_{12}}$ : tiempo de semivida en relación a la  $k_{12}$
- $k_{21}$ : microconstante de velocidad de paso del compartimento periférico al compartimento central
- $t_{1/2 k_{21}}$ : tiempo de semivida en relación a la  $k_{21}$
- $\alpha$ : constante de disposición rápida del modelo bicompartimental
- $\beta$ : constante de disposición lenta del modelo bicompartimental
- $t_{1/2 \alpha}$ : tiempo de semivida en relación a alfa
- $t_{1/2 \beta}$ : tiempo de semivida en relación a beta

- A (mg/L): intercepción con el eje Y del segmento exponencial de la curva, relacionado con la fase de distribución
- B (mg/L): intercepción con el eje Y del segmento exponencial de la curva, relacionado con la fase de eliminación

No se proporcionaron estimas iniciales para estos parámetros.

**Figura M-4:** Modelo monocompartimental con eliminación de Michaelis-Menten.



Los parámetros que caracterizan al modelo monocompartimental con eliminación de Michaelis-Menten son:

- $V_d/F$  (L): Volumen de distribución en relación a la biodisponibilidad
- $V_{max}$ : velocidad máxima de metabolización del fármaco.
- $K_m$ : concentración plasmática del fármaco a la que la velocidad de metabolización se corresponde con la mitad de la velocidad máxima.
- $k_a$ : microconstante de velocidad de paso desde el lugar de absorción al compartimento 1 ó central.
- $t_{1/2}k_a$ : tiempo de semivida del paso del compartimento 0 al 1



Las estimas de los valores iniciales de la  $V_{max}$  y de la  $K_m$ , propios del modelo monocompartimental con eliminación de Michaelis-Menten, se le debieron proporcionar externamente al programa Winnonlin. Debido a que no existían datos previos sobre los valores de estas constantes, se revisó en la bibliografía distintos valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  (Noe et al., 1990; Berg et al., 1992) y se consideraron límites válidos para iniciar el ajuste farmacocinético un valor de 0 como límite inferior para ambas constantes y 150mg/L\*h y 500mg/L como límite superior para la  $V_{max}$  y la  $K_m$ , respectivamente.

### **2.1.2.- Pauta de dosificación a proponer para continuar con el desarrollo del compuesto en pacientes**

Para determinar la pauta de dosificación a proponer para continuar con el desarrollo del compuesto en pacientes se procedió a ajustar las concentraciones plasmáticas obtenidas en el estudio 2 a distintos modelos farmacocinéticos con el objetivo de determinar aquel que mejor las describía y a partir de los parámetros que lo caracterizaban poder simular aquellas concentraciones que se alcanzarían tras pautarlo en las subsiguientes fases del desarrollo clínico.

Se aplicó una única aproximación para la identificación del modelo farmacocinético: análisis en una etapa o análisis poblacional (“Linear and non-linear mixed effects modelling”). Mediante este método todos los individuos son analizados simultáneamente, pudiéndose, los parámetros individuales obtenerse utilizando estimados bayesianos empíricos. Este tipo de análisis permite describir tendencias típicas (medias) poblacionales y además los perfiles individuales dando también unas estimas de variabilidad interindividual. El software empleado fue NONMEM (version V, level 1,1, GloboMax LLC, Hanover MD, USA) (Beal y Sheiner, 1992). La nomenclatura y los conceptos utilizados en el proceso llevado a cabo pueden encontrarse en Trocóniz (Troconiz, 1996). Se aplicó el método de estimación condicional de primer orden con la opción de INTERACTION.

La estrategia seguida para desarrollar el modelo fue comenzar desde el modelo más simple (monocompartimental, absorción de primer orden) para ir incorporando complejidades hasta llegar a una descripción satisfactoria de las observaciones. Se exploraron 58 modelos farmacocinéticos distintos.

Para describir el proceso de absorción se valoró:

- (1) la posibilidad de una dependencia, tanto en la absorción en magnitud como en velocidad, de la dosis de fármaco administrada
- (2) mecanismos de absorción distintos del clásico 1<sup>er</sup> orden, como por ejemplo orden 0, cinéticas mixtas, la existencia de partes diferenciadas dentro del tracto gastrointestinal donde diferentes fracciones de la dosis administrada se absorben con diferente velocidad, etc.

En relación a la disposición del fármaco en el plasma:

- (1) se testaron modelos de uno o varios compartimentos
- (2) la presencia de varias rutas de eliminación
- (3) la no-linealidad en el proceso de eliminación.

Dos parámetros influyen el AUC: la biodisponibilidad (F) y el Cl. Ambos pueden ser modificados por un cambio en la actividad enzimática intrínseca (CL<sub>INT</sub>), entre otros factores. Considerando el modelo “de compartimentos bien agitados” (well-stirred model) de eliminación hepática (Pang y Rowland, 1977), las siguientes ecuaciones representan el modelo utilizado para relacionar el aclaramiento hepático (CL<sub>H</sub>) y la F relativa con el CL<sub>INT</sub>:

$$(1) \text{CL}_H = \frac{Q * \text{CL}_{INT} * f_L}{Q + \text{CL}_{INT} * f_L}$$
$$(2) F = \frac{Q}{Q + \text{CL}_{INT} * f_L}$$

donde Q y f<sub>L</sub> representan el flujo plasmático hepático y la fracción libre en plasma, respectivamente. Durante el análisis, Q fue uno de los parámetros estimados por el modelo, y de forma estricta, el CL<sub>INT</sub> representa el producto entre la actividad enzimática intrínseca y f<sub>L</sub> (CL<sub>INT</sub>\*f<sub>L</sub>).

Se exploraron los siguientes modelos para explicar la no-linealidad, esto es, los decrementos en CL<sub>INT</sub> ocasionados por el fármaco: (i) saturación de la actividad enzimática debida a altas concentraciones de fármaco, modelándose dicha saturación mediante una cinética de

Michaelis-Menten, (ii) posibilidad de un metabolito competitivo, asumiendo la producción de un metabolito hipotético que compite con AM-24 por el lugar de unión del enzima responsable de su eliminación, (iii) inhibición reversible de la formación del enzima metabolizador, (iv) estimulación reversible de la degradación del enzima metabolizador y (v) pérdida irreversible de cantidad del enzima metabolizador.

Todos los modelos se evaluaron también con las versiones extremas del  $CL_H$ , esto es, no solo utilizando las ecuaciones previamente descritas que relacionan  $CL_H$  y la F relativa y el  $CL_{INT}$ , sino con las expresiones correspondientes a un aclaramiento restrictivo ( $CL_H = CL_{INT} \times f_L$  y  $F=1$ ) y a un aclaramiento no-restrictivo ( $CL_H= Q$  y  $F= Q/CL_{INT} \times f_L$ ).

También se estudió sobre qué parámetros farmacocinéticos, la inclusión de variabilidad interindividual mejoraba significativamente el ajustado. La variabilidad interindividual se modeló exponencialmente. La variabilidad residual, reflejando la diferencia entre las observaciones y las predicciones del modelo, se modeló inicialmente con un modelo de error combinado, aditivo y proporcional.

## 2.2.- Selección del modelo final

### Aproximación de promediado simple y en dos etapas (datos del estudio 1)

Para valorar la bondad del ajuste a cada uno de los modelos y seleccionar el óptimo, se utilizó el criterio de AIC (Yamakoa, 1978) así como el índice de correlación. Igualmente se valoró para cada uno de los parámetros la plausibilidad de las estimaciones mediante los intervalos de confianza obtenidos, siendo desestimadas las observaciones en las que dicho intervalo incluía el valor 0.

El criterio de AIC se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$AIC = N \ln R_e + 2p$$

en donde N corresponde al número de puntos experimentales, p es el número de parámetros estimados en cada modelo y  $R_e$  corresponde a la suma de cuadrados de los residuales. Este

criterio es una forma de expresar numéricamente una cantidad de información con la ventaja de que dicha información, en nuestro caso la bondad de ajuste calculada como suma de cuadrados, se relativiza, en función del número de puntos y del número de parámetros (esto es, el número de exponenciales) implicados. La ecuación que presenta el mínimo AIC se considera como el mejor modelo que explica la relación concentración-tiempo y por tanto se corresponde con el modelo más ajustado. Este método es pues una buena medida de la bondad del ajuste.

### **Aproximación en una etapa o análisis poblacional (datos del estudio 2)**

Para seleccionar el modelo más apropiado se siguieron los siguientes criterios:

- La exploración gráfica de las figuras donde observaciones y predicciones, tanto medias como individuales, son representadas en función del tiempo.
- Los valores de los estimados medios muestrales o poblacionales y de su variabilidad interindividual. Estos estimados tenían que tener un valor razonable o esperado; por ejemplo, no sería aceptable un volumen de distribución aparente más pequeño que el volumen de agua plasmática (3L). Sería también cuestionable que para un determinado parámetro en esta muestra tan homogénea, la variabilidad interindividual fuera estimada en un 200%.
- Los coeficientes de variación de los estimados. Su valor no debería superar el 50%.

El criterio de comparación que utiliza el valor mínimo de la función objetiva suministrado por NONMEN (-2 LL) se utilizó sólo de manera orientativa, cuando las predicciones, estimados y coeficientes de variación eran aceptables. Un modelo se acepta que es superior a otro modelo anidado cuando -2LL se reduce en 3,84 puntos ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, algunos de los modelos comparados no eran anidados. En esos casos se utilizó el valor de AIC, computorizado como  $-2LL - 2 + Np$ , donde  $Np$  se corresponde con el número de parámetros del modelo. Se seleccionó aquel que presentaba un valor de AIC más bajo, siempre que la precisión de los parámetros del modelo y la descripción de los datos fuesen adecuados.

## 2.3.- Validación del modelo seleccionado

Con el fin de obtener ciertas garantías acerca de la capacidad predictiva del modelo seleccionado en nuevas administraciones del fármaco a nuevos individuos pertenecientes a la misma población que la muestra estudiada debería realizarse una validación interna y una externa del modelo.

En la modelización de las concentraciones plasmáticas del estudio 1 no se llevaron a cabo tales evaluaciones, dado que el desarrollo “*in vivo*” del estudio 2 permitía evaluar convenientemente la capacidad predictiva del modelo seleccionado en la modelización de las concentraciones plasmáticas del estudio 1.

### Modelización concentraciones plasmáticas del estudio 2

#### 2.3.1.- Validación interna

Para cada dosis (240, 350 ó 500 mg) se simularon, utilizando los tiempos de extracción originales, y el modelo y sus estimados finales, 1000 perfiles de concentración plasmática en función del tiempo. Cada uno de estos 1000 perfiles virtuales eran distintos ya que fueron creados en base a los valores de los estimados medios poblacionales (iguales para todos) y un valor de  $\eta_i$  extraído de la distribución caracterizada por media 0 y varianza  $\omega^2$  (pueden extraerse cuantos valores distintos se quieran de tal distribución, no tienen porqué ser iguales, sólo cumplir la condición de pertenecer a una distribución de media 0 y varianza el estimado del  $\omega^2$  para un determinado parámetro). Una vez obtenidos los perfiles simulados, se calculó el perfil correspondiente a la mediana en cada tiempo además de los percentiles 5 y 95. Posteriormente, se representaron gráficamente los percentiles 5 y 95, mediana y la totalidad de las observaciones. Este procedimiento permite valorar si las distribuciones de variabilidad interindividual están centradas alrededor del valor medio 0 y si sus estimados son reflejo de la variabilidad en los datos observados.

### **2.3.2.- Validación externa**

Con la estructura del modelo seleccionado y los estimados de los parámetros poblacionales se simuló los perfiles medios que se obtendrían tras la administración oral de una dosis única a voluntarios sanos en las dosis previamente administradas en el estudio de dosis única (estudio 1). Gráficamente se representaron los perfiles simulados junto con las observaciones obtenidas en ese ensayo.

## **2.4.- Simulación**

### **2.4.1.- Pauta de dosificación a evaluar para caracterizar la administración repetida**

La pauta de dosificación para caracterizar la administración repetida se generó a partir del modelo seleccionado tras la administración de una dosis única de AM-24 (datos estudio 1), asumiendo un comportamiento lineal.

Se procedió a la simulación de los perfiles farmacocinéticos que se obtendrían tras la administración de 6 dosis orales de 240mg, 350mg y 500mg de AM-24 respectivamente, con un intervalo de dosificación de 24h. Para ello se aplicó el modelo que se escogió como representativo de la farmacocinética tras la dosis oral única, incorporándole los estimados iniciales de los parámetros previamente calculados. De esta forma se obtuvieron las curvas farmacocinéticas hasta + 408h para cada una de estas tres dosis (817 puntos, uno cada media hora).

### **2.4.2.- Pauta de dosificación a proponer para continuar con el desarrollo del compuesto en pacientes**

Ante la necesidad de proponer la posible pauta de dosificación para continuar con el desarrollo del compuesto en pacientes se planteó abordar si ante el comportamiento farmacocinético que AM-24 presentaba era posible alcanzar un estado de equilibrio estacionario tras una administración repetida, y si fuera ese el caso, describir el régimen de dosificación que cabría plantear para alcanzar y mantener una concentraciones en plasma de

AM-24 dentro de un margen óptimo. En base a los datos de farmacodinamia obtenidos en el estudio 1, donde se había estimado la  $CI_{50}$ , se consideró un determinado intervalo de concentración plasmática como óptimo.

Las distintas simulaciones fueron realizadas con los estimados poblacionales variando la dosis y el intervalo de dosificación.

**Tabla M-7:** Tabla resumen de los estudios 1 y 2.

		Estudio 1	Estudio 2
<b>Título</b>		Estudio de tolerabilidad de Bobel-24 tras la administración oral a dosis únicas crecientes para determinar la dosis máxima tolerada (DMT) en el voluntario sano	Ensayo clínico aleatorizado, paralelo, doble ciego y controlado con placebo para evaluar la tolerabilidad y la farmacocinética de tres distintas dosis de AM-24 tras su administración única y repetida, en el voluntario sano
<b>CARACTERÍSTICAS GENERALES</b>			
<b>Objetivos</b>		Tolerabilidad, farmacocinética, farmacodinamia	Tolerabilidad y farmacocinética
<b>Diseño</b>		Ensayo de fase I, simple ciego, dosis crecientes y paralelo	Ensayo de fase I, paralelo, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo
<b>Muestra de estudio</b>	<b>N</b>	46	32
	<b>Edad (años) <math>\bar{x}</math></b>	$\bar{x}=24,17 \pm 3,44$	$\bar{x} = 25,69 \pm 3,05$
	<b>Peso (kg)</b>	$\bar{x}=70,96 \pm 6,92$	$\bar{x} = 72,25 \pm 9,14$
	<b>Talla (cm)</b>	$\bar{x}=175,3 \pm 6,28$	$\bar{x} = 178,88 \pm 7,89$
	<b>I. Quetelet (<math>kg/m^2</math>)</b>	$\bar{x} = 23,11 \pm 1,41$	$\bar{x} = 23,50 \pm 1,70$
<b>Tratamientos</b>	<b>Dosis utilizadas (mg)</b>	6, 30, 60, 120, 240, 350, 500, 700, 1200.	240, 350, 500
	<b>Nº dosis administradas</b>	1	DU: 1 (día 0). DM: 1/24 horas/6 días (días +7 a +12)
	<b>Muestras</b>	PK: 3 ml; tubos con heparina lítica PD: 5 ml sangre total	3 ml; tubos con heparina lítica
<b>EVALUACIONES DE TOLERABILIDAD</b>			
<b>Cuestionario de Acontecimientos Adversos</b>		Basal, +15min, +30 min, +45min, +1h, +1,5h, +2h, +2,5h, +3h, +4h, +6h, +8h, +10h, +12h, +24h.	Días 0 y +12: basal, +2h, +4h, +5h, +12h, +24h, +48h (día +2, día +14), +72h (día +3, día +15), +96h (día +4, día +16), +120h (día +5, día +17) y +144h (día +6, día +18). A tiempo premedicación los días +7 a +11.
<b>Exploración física</b>		Basal y final (+24h)	Días 0 basal. Día +18 final.
<b>Constantes vitales (PAS/PAD; FC; Tª)</b>		Basal, +15min, +30min, +45min, +1h, +1,5h, +2h, +2,5h, +3h, +4h, +6h, +8h, +10h, +12h, +24h.	Días 0 y +12: basal, +2h, +4h, +5h, +12h, +24h, +48h (día +2, día +14), +72h (día +3, día +15), +96h (día +4, día +16), +120h (día +5, día +17) y +144h (día +6, día +18). A tiempo premedicación los días +7 a +11.
<b>Electrocardiograma</b>		12 derivaciones: basal, +24h Tira de DII: +30min, +1h, +2h, +4h, +6h, +8h, +12h.	A tiempo basal (premedicación) los días 0 (administración única), día +1 (+24h dosis única), día +9 (premedicación 3ª dosis administración repetida), día +12 (premedicación 6ª dosis, última de la administración repetida), día +13 (+24h última dosis repetida) y día +18 (al finalizar el estudio, +144h de última administración repetida)
<b>Analíticas (Hematología, bioquímica, sedimento orina, test de bencidina)</b>		Basal y +24 h	Día 0 basal, día +18 final.

... (continúa)

...(continuación)

	<b>Estudio 1</b>	<b>Estudio 2</b>
<b>Título</b>	Estudio de tolerabilidad de Bobel-24 tras la administración oral a dosis únicas crecientes para determinar la dosis máxima tolerada (DMT) en el voluntario sano	Ensayo clínico aleatorizado, paralelo, doble ciego y controlado con placebo para evaluar la tolerabilidad y la farmacocinética de tres distintas dosis de AM-24 tras su administración única y repetida, en el voluntario sano
<b>EVALUACIONES FARMACOCINÉTICAS</b>		
<b>Tiempos de extracción: Dosis única</b>	Basal, + 30min, +1h, +1,5h, +2h, +4h, +6h, +8h, +10h, +12h, +24h (+48h ó +72h en función de la dosis administrada)	Basal, +2h, +4h, +4,5h, +5h, +5,5h, +6h, +12h, +24h (día +1), +48h (día +2), +72h (día +3), +96h (día +4), +120 (día +5), +144h (día +6)
<b>Tiempos de extracción: Dosis repetida</b>	n.p.	+168h (basal, día +7), +192h (pre, día +8), +216h (pre, día +9), +240h (pre, día +10), +264h (pre, día +11), +288h (pre, día +12, última dosis), +290h (+2h), +292h (+4h), +292,5h (+4,5h), +293h (+5h), +293,5h (+5,5h), +294h (+6h), +300h (+12h), +312h (día +13), + 336h (día +14), +360h (día +15), +384h (día +16), +408h (día +17) y +432h (día +18)
<b>Procesamiento de muestras</b>	Centrifugación a temperatura ambiente -3500r.p.m. durante 15 minutos -separación del sobrenadante Congelación a -40±5°C	Centrifugación a temperatura ambiente -3500r.p.m. durante 15 minutos -separación del sobrenadante Congelación a -40±5°C
<b>Método analítico: Cuantificación de AM-24</b>	García-Capdevila L et al. High performance liquid chromatography analysis of "Bobel-24 in biological samples for pharmacokinetic, metabolic and tissue distribution studies. J Chromatography 1998;B,708: 169-175	García-Capdevila L et al. High performance liquid chromatography analysis of "Bobel-24 in biological samples for pharmacokinetic, metabolic and tissue distribution studies. J Chromatography 1998;B,708: 169-175
<b>Límite cuantificación</b>	0,1 mg/L	0,25 mg/L
<b>Análisis de los resultados</b>		
<b>" in vivo"</b>	Cálculo amodelístico	Cálculo amodelístico
<b>In número</b>	Aproximación de promediado simple: absorción de 1 <sup>er</sup> orden, monocompartmental, con eliminación lineal  Simulación de administración de DU y DM de 1 dosis cada 24 h hasta + 6d.	Aproximación de análisis poblacional: Absorción de 1er orden, monocompartmental, eliminación por 2 vías, lineal y no lineal por inhibición reversible de la formación de enzima responsable de la metabolización. Simulación de administración de DU y DM de 1 dosis cada 24 h
<b>EVALUACIONES FARMACODINÁMICAS</b>		
<b>Tiempos de extracción: Dosis única</b>	Vol 17-46: Basal, +2h.	n.p.
<b>Tiempos de extracción: Dosis repetida</b>	n.p.	n.p.
<b>Procesamiento de muestras</b>	Congelación sangre total, tras extracción. -20° C Incubación en baño de agua agitado a 37°C durante 10 min Estimulación con ionóforo de Ca (A23187; 30µM, concentración final) Centrifugado a 2500g durante 2min	n.p.
<b>Método analítico: Cuantificación de LTB<sub>4</sub></b>	Determinación de la concentración de LTB <sub>4</sub> mediante inmunoensayo enzimático (EIA:Amersham)	n.p.
<b>Análisis de los resultados</b>	Aproximación de mezcla inocente de datos: Modelo farmacodinámico de efecto inhibitorio sigmoide	n.p.

n.p.: no procede



## RESULTADOS



## **PARTE I: DETERMINACIÓN DE LA PRIMERA DOSIS A ADMINISTRAR EN VOLUNTARIOS SANOS**

La primera administración en humanos es el primer paso en el desarrollo clínico de cualquier molécula que ha mostrado posible actividad terapéutica en evaluaciones preclínicas. El objetivo principal del estudio en que se lleva a cabo esa primera administración en humanos es evaluar la tolerabilidad del nuevo compuesto tras administración a dosis única y generar alguna información inicial/preliminar sobre la farmacocinética y farmacodinamia (si es posible) del fármaco en humanos.

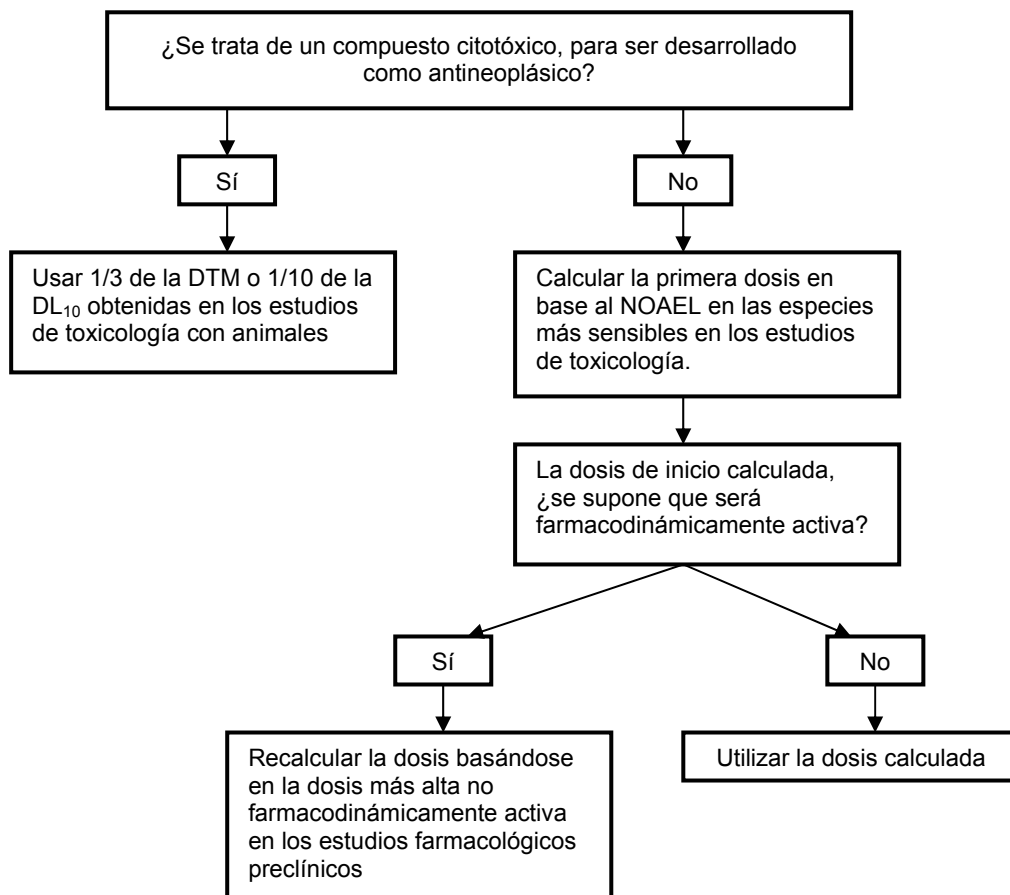
Un elemento esencial de este tipo de ensayos es el cálculo de la dosis de inicio, es decir de la primera dosis que se administrará al ser humano. La determinación de esa dosis es una actividad muy común e importante y sin embargo hay poca uniformidad o estandarización en el tipo de procedimientos a seguir. El cálculo de la dosis de inicio se puede realizar de múltiples formas, incluso de forma empírica y el método utilizado depende en gran medida de la experiencia de los investigadores participantes y del contexto industrial o académico. En cualquier caso es importante hallar una dosis de inicio lo suficientemente baja como para ser segura en los humanos pero no tan conservadora que requiera posteriormente un proceso de escalado de dosis excesivamente costoso y con gran consumo de tiempo. La dosis inicial deseable sería aquella que es segura, que no presenta efectos farmacodinámicos pero que se encuentra próxima a una dosis que sí los genera. Las dosis excesivamente bajas suponen una utilización excesiva de tiempo y recursos, mientras que una dosis demasiado alta compromete la seguridad de los sujetos o bien puede impedir la observación de ciertas consideraciones clínicas para dosis inferiores.

La estimación de la primera dosis en humanos es complicada y representa un nuevo reto cada vez que se realiza, ya que la extrapolación de las dosis desde los animales a los humanos está basada en múltiples asunciones en relación al comportamiento del compuesto en las distintas especies, que pueden variar entre ellas y entre los distintos compuestos. La FDA publicó en 2005 unas directrices sobre la forma de estimar la dosis inicial más segura en ensayos clínicos con voluntarios sanos <sup>(FDA, 2005)</sup> en las que se incluyen las recomendaciones que sugiere dicha Agencia sobre este tema, sin tratarse, en ningún momento de un requisito regulatorio. El

cálculo de la dosis de inicio es un proceso que se requiere para todas las moléculas en el momento inicial de su desarrollo.

De forma general, la forma de elegir una dosis de inicio, se puede decidir siguiendo el algoritmo representado en la figura RI-1

**Figura R-I-1:** Árbol de decisión para el cálculo de la dosis de inicio.



Adaptado de Reigner y Blesch, 2002. DTM: dosis tóxica mínima. DL10: dosis letal 10%. NOAEL: "Non-Observed Adverse Effect Dose Level", dosis a la que no se observan efectos adversos.

En el caso de los compuestos oncológicos, se plantea que la dosis inicial se puede hallar a partir de la denominada dosis tóxica mínima (DTM) o de la denominada dosis letal 10% (DL<sub>10</sub>) que es la dosis que produce la muerte a un 10% de los animales que no presentan tumor. Así, esa primera dosis podría derivarse como un tercio de la dosis tóxica mínima en animales grandes (perro, mono) o bien, como una décima parte de la dosis letal 10% en el ratón.

En el caso de los compuestos no oncológicos la dosis inicial suele plantearse a partir de la denominada NOAEL (“Non-Observed Adverse Effect Dose Level”). La NOAEL consiste en identificar la dosis más elevada (expresada generalmente en mg/kg/día) que no presenta efectos tóxicos en los animales más sensibles en los que ha sido probado el fármaco en estudios desde 4 semanas a 13 semanas.

Se han utilizado distintas aproximaciones para calcular la dosis de inicio que según Reigner (Reigner y Blesch, 2002) podrían clasificarse en cuatro grupos: 1) cálculo de la dosis mediante un factor, que es el que finalmente ha tenido una mayor aceptación en el entorno de las directrices publicadas por la FDA (FDA, 2005), 2) cálculo de la dosis a partir de fármacos similares, 3) cálculo de la dosis guiado farmacocinéticamente y 4) cálculo de la dosis comparativo. En general, hay una tendencia progresiva en transformar el cálculo de la dosis de inicio desde una aproximación eminentemente empírica a una aproximación más mecánica basada en la farmacocinética y la farmacodinamia del compuesto.

### 1.1.- Cálculo de la dosis mediante un factor

Una vez identificada la NOAEL, consistiría en disminuir la dosis mediante un factor de sensibilidad. Este factor se deriva de las diferencias interespecie en la sensibilidad a la toxicidad de los fármacos publicada en 2005 en EEUU por la FDA (FDA, 2005). De acuerdo con esta normativa la dosis de inicio sería la menor de las siguientes tres dosis:

1/10 de la mayor dosis sin efecto adverso en roedores

1/6 de la mayor dosis sin efecto adverso en perros

1/3 de la mayor dosis sin efecto adverso en primates.

Las dosis determinadas en las distintas especies animales pueden, previamente convertirse en las denominadas HED (“Human Equivalent Dose”), habiéndose descrito en la directriz de la FDA (FDA, 2005) también distintos procedimientos para llevar a cabo esta conversión, como por ejemplo factores de conversión basados en el área de superficie corporal (0,162 para los roedores o 0,541 para los perros) o factores de conversión basados en el peso corporal y un exponente alométrico (0,33), derivándose en este último caso la siguiente ecuación:

$$\text{HED} = \text{NOAEL animal en mg/kg} * (\text{peso animal en kg / peso humano en kg}) * 0,33$$

Si por cualquier razón, se intuye que pueda haber problemas de seguridad con la dosis calculada, se puede reducir adicionalmente la dosis utilizando un factor arbitrario.

### **Valoración crítica**

Se han utilizado múltiples variaciones de esta aproximación que permiten la obtención de resultados más o menos conservadores. Esta es una aproximación clásica que ha sido utilizada ampliamente y que generalmente proporciona dosis de inicio seguras para los estudios de primera administración en humanos. Ha sido criticada por ser demasiado empírica y simplista, pero de todas formas, ha sido incluida en las últimas directrices de la FDA sobre búsqueda segura de la dosis de inicio en voluntarios sanos<sup>(FDA, 2005)</sup>. Por otra parte, en general, proporciona dosis de inicio muy conservadoras que requieren posteriormente excesivos escalados de dosis hasta alcanzar dosis farmacodinámicamente activas o la dosis máxima tolerada.

### **1.2.- Cálculo de la dosis a partir de fármacos similares**

Esta aproximación es aplicable cuando existen datos de seguridad en humanos disponibles de algún fármaco similar al fármaco en investigación que pudiesen servir como punto de referencia para estimar la dosis de inicio.

### **Valoración crítica**

Este método no es nuevo, tiene un componente intuitivo importante y proporciona dosis de inicio seguras. La principal limitación es que se debe asumir que las variaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas entre los animales y el hombre son las mismas para ambos compuestos.

### 1.3.- Cálculo de la dosis guiado farmacocinéticamente

Este método se está utilizando cada vez con más frecuencia en las compañías farmacéuticas y en las instituciones <sup>(Bonate y Howard, 2000)</sup>. Utiliza la exposición sistémica, en vez de la dosis, para la extrapolación desde el animal al hombre, un concepto que ya había sido propuesto originariamente en 1967 por Brodie y Reid <sup>(Brodie y Reid, 1967)</sup>. La dosis de inicio se calcula a partir de un parámetro farmacocinético de exposición sistémica (p.ej, el AUC) en la especie en la que su valor es menor. Este valor se correspondería con la exposición sistémica a la dosis NOAEL. El aclaramiento para calcular la dosis inicial por este método, se predice utilizando un escalado alométrico <sup>(Mahmood, 1999; Mahmood y Balian, 1999; Lave et al., 1999)</sup>.

#### Valoración crítica

Los métodos estándar, obtienen resultados más fiables en fármacos que presentan excreción renal, ya que los métodos alométricos son menos fiables para los fármacos que se eliminan primariamente por metabolismo hepático. Sin embargo, últimamente se ha evidenciado que las predicciones pueden ser acertadas en más del 80% de los casos cuando se combina la utilización de datos “*in vivo*” en animales e “*in vitro*” en hepatocitos humanos <sup>(Lave et al., 1999)</sup>. Esta aproximación farmacocinética puede incorporar, a demás, complejidades adicionales. Las concentraciones plasmáticas a determinar son las de fármaco libre, ya que son las concentraciones que producen el efecto farmacodinámico. En general se asume una farmacocinética lineal, por lo que en casos de no linealidad del compuesto esta eventualidad puede incorporarse en la aproximación, así como la presencia de posibles metabolitos activos.

### 1.4.- Cálculo de la dosis comparativo

Esta aproximación consiste en estimar la dosis de inicio utilizando como mínimo dos, pero a ser posible los tres, métodos descritos y comparar posteriormente los resultados e interpretar las diferencias para llegar de forma crítica a la dosis de inicio óptima.

### Valoración crítica

Es un método poco utilizado y ha sido descrito por primera vez en la literatura en el artículo de Reigner y Blesch <sup>(Reigner y Blesch, 2002)</sup>. Se podría criticar este método por considerar que conlleva un excesivo consumo de tiempo. Los autores, sin embargo, opinan que la importancia de obtener una dosis de inicio óptima que sea segura y eficiente justifica el esfuerzo. Por otra parte, el guiarse únicamente del resultado de una de las aproximaciones debería ser cuestionado.

### 1.5.- Determinación de la primera dosis de AM-24 a administrar en voluntarios sanos

La dosis de inicio se determinó según el procedimiento de cálculo mediante un factor.

La NOAEL en la especie más sensible fue la obtenida en el ratón, en particular en un estudio realizado en ratones Balb C, determinándose en 0,5 mg/kg (ver Introducción, punto 4.3.2.1).

Se aplicó el factor correspondiente a los roedores (1/10) resultando en 0,05 mg/kg, con lo que se planteó que para voluntarios entre 60 y 80kg de peso la dosis correspondiente oscilaría entre 3 y 4 mg.

Teniendo en cuenta que la Dosis Eficaz 50 (DE<sub>50</sub>) obtenida en el ratón se situó en 5 mg/kg (correspondiente a dosis entre 300 y 400 mg en el hombre), y para evitar excesivos escalados de dosis se planteó que la primera dosis de AM-24 a administrar en voluntarios sanos fuera 6 mg.



## PARTE II: INVESTIGACIÓN “IN VIVO”: ESTUDIO EXPERIMENTAL EN VOLUNTARIOS SANOS TRAS ADMINISTRACIÓN ORAL ÚNICA DE AM-24 EN EL RANGO DE DOSIS DE 6 mg A 1200 mg

### 1.- DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN PARTICIPANTE

#### 1.1.- Datos demográficos

Se incluyeron un total de 46 voluntarios varones sanos de raza blanca caucásica. La edad de los mismos osciló entre los 18 y 31 años ( $\bar{x}=24,17\pm 3,44$ ), el peso entre 56,7 y 85kg ( $\bar{x}=70,96\pm 6,92$ ) y la talla entre 161 y 190cm ( $\bar{x}=175,3\pm 6,28$ ). Presentaron un índice de Quetelet (I de Quetelet=peso (kg) / talla<sup>2</sup> (m)) que osciló entre 19,90 y 25,86 kg/m<sup>2</sup> ( $\bar{x}=23,11\pm 1,41$ ).

En la tabla R-II-1 se muestran los valores de la media y desviación estándar de los parámetros demográficos de los voluntarios sanos, para cada una de las dosis administradas.

**Tabla R-II-1:** Medias y desviación estándar (DE) de los parámetros demográficos de los voluntarios sanos que recibieron medicación, para cada una de las dosis administradas.

Dosis		Edad (años)	Peso (kg)	Talla (cm)	Índice de Quetelet (kg/m <sup>2</sup> )
6mg	Media	26,25	75,90	179,50	23,25
	DE	4,11	10,03	9,68	1,89
30mg	Media	24,75	68,90	172,25	23,00
	DE	3,30	10,69	6,65	2,00
60mg	Media	21,25	73,50	175,50	23,50
	DE	1,71	5,82	3,00	1,73
120mg	Media	22,75	69,30	175,75	22,75
	DE	1,26	5,61	5,32	1,50
240mg	Media	22,17	71,83	174,00	24,00
	DE	4,88	5,89	6,32	1,10
350mg	Media	24,17	67,10	171,83	22,83
	DE	1,94	5,73	6,01	1,33
500mg	Media	24,33	68,32	174,33	22,50
	DE	3,33	7,16	7,76	1,38
700mg	Media	26,67	70,83	176,33	22,83
	DE	3,93	6,18	4,68	1,17
1200mg	Media	24,33	74,18	178,83	23,50
	DE	2,94	6,03	5,64	0,84

## 1.2.- Anamnesis y exploración física

En el momento de la selección, los resultados de la anamnesis de los voluntarios sanos, antecedentes patológicos, médicos y quirúrgicos, mostró como dato más significativo la elevada frecuencia de las enfermedades típicas de la infancia. Se anotaron también como datos relevantes distintas intervenciones quirúrgicas.

En relación con los antecedentes familiares destacó la presencia de enfermedades cardiovasculares, oncológicas y neurológicas.

Hábitos tóxicos: 28 de los 46 voluntarios no eran fumadores. Los 18 restantes fumaban como máximo 10 cigarrillos diarios. En cuanto a la ingesta de alcohol, 8 voluntarios no eran consumidores y el resto no excedía un volumen de 304cc por semana, tampoco eran consumidores importantes de bebidas estimulantes (más de 5 cafés, bebidas de cola o té al día) y ninguno de ellos presentó positividad en las pruebas de detección de drogas en orina (cannabis, cocaína, anfetaminas, benzodiazepinas y opiáceos).

Antes de la realización del estudio, los voluntarios no tomaron fármacos, salvo dos sujetos, en los que se verificó la toma ocasional de vitaminas con fecha anterior a 15 días del inicio del estudio.

Todas las exploraciones físicas realizadas a los voluntarios por sistemas en el momento de la selección (piel y mucosas, ojos, oídos, nariz y garganta, sistema cardiovascular, respiratorio, digestivo, locomotor, nervioso y linfático) fueron normales.

## 1.3.- Constantes vitales

En la tabla R-II-2 se recogen la media y la desviación estándar (DE) de las constantes vitales obtenidas en los voluntarios en el momento de la selección, en particular de la presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y frecuencia cardíaca (FC), tanto en decúbito supino como en ortostatismo y de la temperatura axilar (T).

**Tabla R-II-2:** Valores medios ( $\pm$ DE) de las constantes vitales (PAS, PAD, FC y T), obtenidos en los voluntarios sanos en el momento de la selección, para cada una de las dosis posteriormente administradas.

Dosis Parámetro	6mg (n=4) Media $\pm$ DE	30mg (n=4) Media $\pm$ DE	60mg (n=4) Media $\pm$ DE	120mg (n=4) Media $\pm$ DE
Presión arterial sistólica <sup>a</sup> (mmHg)	120,25 $\pm$ 7,93	122,25 $\pm$ 6,65	129,25 $\pm$ 4,27	117,00 $\pm$ 14,12
Presión arterial diastólica <sup>a</sup> (mm Hg)	66,00 $\pm$ 5,72	64,50 $\pm$ 8,26	64,75 $\pm$ 9,00	61,00 $\pm$ 5,35
Presión arterial sistólica <sup>b</sup> (mm Hg)	119,00 $\pm$ 5,72	121,00 $\pm$ 2,11	128,00 $\pm$ 8,16	118,75 $\pm$ 7,50
Presión arterial diastólica <sup>b</sup> (mm Hg)	71,50 $\pm$ 6,35	68,5 $\pm$ 0,8	74,25 $\pm$ 6,85	70,75 $\pm$ 5,19
Frecuencia cardíaca <sup>a</sup> (min <sup>-1</sup> )	68,50 $\pm$ 5,74	57,25 $\pm$ 10,14	70,75 $\pm$ 5,85	56,25 $\pm$ 10,05
Frecuencia cardíaca <sup>b</sup> (min <sup>-1</sup> )	76,00 $\pm$ 7,53	79,75 $\pm$ 12,12	76,00 $\pm$ 15,90	57,00 $\pm$ 6,32
Temperatura axilar (°C)	36,05 $\pm$ 0,17	36,2 $\pm$ 0,50	36,30 $\pm$ 0,59	36,20 $\pm$ 0,22

Dosis Parámetro	240mg (n=6) Media $\pm$ DE	350mg (n=6) Media $\pm$ DE	500mg (n=6) Media $\pm$ DE	700mg (n=6) Media $\pm$ DE	1200mg (n=6) Media $\pm$ DE
Presión arterial sistólica <sup>a</sup> (mmHg)	118,50 $\pm$ 0,78	123,50 $\pm$ 10,13	118,67 $\pm$ 11,79	111,67 $\pm$ 6,59	119,33 $\pm$ 6,09
Presión arterial diastólica <sup>a</sup> (mm Hg)	66,67 $\pm$ 10,37	62,83 $\pm$ 12,46	65,17 $\pm$ 7,63	61,17 $\pm$ 7,68	68,67 $\pm$ 9,65
Presión arterial sistólica <sup>b</sup> (mm Hg)	122,67 $\pm$ 8,82	127,17 $\pm$ 11,16	124,00 $\pm$ 11,64	118,67 $\pm$ 12,40	127,17 $\pm$ 8,50
Presión arterial diastólica <sup>b</sup> (mm Hg)	67,33 $\pm$ 8,29	70,17 $\pm$ 11,51	74,17 $\pm$ 9,50	63,33 $\pm$ 5,50	77,00 $\pm$ 7,51
Frecuencia cardíaca <sup>a</sup> (min <sup>-1</sup> )	63,50 $\pm$ 9,87	62,00 $\pm$ 8,07	68,00 $\pm$ 9,70	65,00 $\pm$ 4,94	64,00 $\pm$ 4,94
Frecuencia cardíaca <sup>b</sup> (min <sup>-1</sup> )	73,83 $\pm$ 11,14	66,33 $\pm$ 12,24	77,67 $\pm$ 12,23	75,50 $\pm$ 5,21	77,50 $\pm$ 7,48
Temperatura axilar (°C)	36,17 $\pm$ 0,24	36,02 $\pm$ 0,31	36,33 $\pm$ 0,28	36,03 $\pm$ 0,08	36,10 $\pm$ 0,25

a: decúbito supino; b: ortostatismo

## 1.4.- Electrocardiograma

En la tabla R-II-3 se recogen la media y la desviación estándar (DE) de los parámetros derivados del electrocardiograma de los voluntarios en el momento de la selección.

**Tabla R-II-3:** Valores medios ( $\pm$ DE) de los principales parámetros electrocardiográficos (ECG de 12 derivaciones) obtenidos en los voluntarios sanos en el momento de la selección, para cada una de las dosis posteriormente administradas.

Dosis Parámetro	6mg (n=4) Media $\pm$ DE	30mg (n=4) Media $\pm$ DE	60mg (n=4) Media $\pm$ DE	120mg (n=4) Media $\pm$ DE
Frecuencia cardiaca (min <sup>-1</sup> )	56,25 $\pm$ 8,42	57,25 $\pm$ 10,81	62,50 $\pm$ 13,80	53,25 $\pm$ 9,60
Onda P (ms)	101,50 $\pm$ 5,74	95,00 $\pm$ 12,38	99,00 $\pm$ 11,49	89,50 $\pm$ 11,59
Intervalo QRS (ms)	88,50 $\pm$ 3,00	101,00 $\pm$ 8,08	101,00 $\pm$ 8,25	94,00 $\pm$ 6,93
Intervalo PR (ms)	160,00 $\pm$ 8,00	133,00 $\pm$ 22,42	164,50 $\pm$ 18,57	149,00 $\pm$ 25,38
Intervalo QT (ms)	401,00 $\pm$ 13,22	389,00 $\pm$ 30,31	378,00 $\pm$ 25,87	398,00 $\pm$ 31,54
Intervalo QTC (ms)	393,50 $\pm$ 17,62	382,75 $\pm$ 13,96	381,00 $\pm$ 12,19	385,00 $\pm$ 17,11

Dosis Parámetro	240 mg (n=6) Media $\pm$ DE	350 mg (n=6) Media $\pm$ DE	500 mg (n=6) Media $\pm$ DE	700 mg (n=6) Media $\pm$ DE	1200 mg (n=6) Media $\pm$ DE
Frecuencia cardiaca (min <sup>-1</sup> )	59,83 $\pm$ 8,93	56,17 $\pm$ 8,89	59,83 $\pm$ 7,60	61,83 $\pm$ 5,38	60,50 $\pm$ 5,99
Onda P (ms)	94,33 $\pm$ 9,91	94,00 $\pm$ 14,31	101,33 $\pm$ 9,77	100,33 $\pm$ 12,23	100,00 $\pm$ 10,35
Intervalo QRS (ms)	94,33 $\pm$ 4,46	86,00 $\pm$ 4,56	98,67 $\pm$ 7,34	91,00 $\pm$ 9,36	95,33 $\pm$ 12,88
Intervalo PR (ms)	132,33 $\pm$ 8,33	138,33 $\pm$ 20,99	149,00 $\pm$ 15,38	153,00 $\pm$ 15,89	145,00 $\pm$ 21,04
Intervalo QT (ms)	373,33 $\pm$ 14,29	397,33 $\pm$ 21,23	388,67 $\pm$ 16,67	387,67 $\pm$ 34,05	391,00 $\pm$ 24,75
Intervalo QTC (ms)	371,83 $\pm$ 6,31	390,17 $\pm$ 10,38	387,33 $\pm$ 12,37	389,83 $\pm$ 31,49	390,67 $\pm$ 22,24

min: minutos. ms: milisegundos.

## 1.5.- Parámetros de laboratorio

### 1.5.1.- Hematología

En la tabla R-II-4 se recogen la media y la desviación estándar (DE) de los parámetros hematológicos de los voluntarios en el momento de la selección.

**Tabla R-II-4:** Valores medios ( $\pm$ DE) de los parámetros hematológicos obtenidos en los voluntarios sanos en el momento de la selección, para cada una de las dosis posteriormente administradas.

<b>Dosis</b>	<b>6mg (n=4)</b>	<b>30mg (n=4)</b>	<b>60mg (n=4)</b>	<b>120mg (n=4)</b>
<b>Parámetro</b>	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Hemoglobina (g/dl)	152,75 $\pm$ 8,50	147 $\pm$ 15,73	144,50 $\pm$ 1,91	143,50 $\pm$ 8,89
Hematocrito (L/L)	0,45 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,05	0,41 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,01
Hematíes (X10E12/L)	4,86 $\pm$ 0,36	4,83 $\pm$ 0,64	4,69 $\pm$ 0,30	4,84 $\pm$ 0,33
VCM (fL)	93,92 $\pm$ 3,71	89,92 $\pm$ 2,82	88,53 $\pm$ 4,43	87,35 $\pm$ 7,80
CCMH (g/L)	335,00 $\pm$ 9,52	339,00 $\pm$ 11,78	348,50 $\pm$ 9,68	336,75 $\pm$ 10,97
HCM (pg)	31,45 $\pm$ 0,81	30,47 $\pm$ 1,88	30,88 $\pm$ 2,07	29,47 $\pm$ 3,09
RDW (%)	13,92 $\pm$ 0,63	13,65 $\pm$ 0,68	14,85 $\pm$ 1,02	14,47 $\pm$ 1,33
Plaquetas (X10E9/L)	225,75 $\pm$ 30,63	166,00 $\pm$ 42,67	193,25 $\pm$ 26,89	218,25 $\pm$ 38,06
VPM (fL)	8,63 $\pm$ 0,45	9,80 $\pm$ 1,27	9,13 $\pm$ 0,72	8,27 $\pm$ 0,82
Plaquetocrito (%)	0,20 $\pm$ 0,00	0,18 $\pm$ 0,05	0,20 $\pm$ 0,00	0,20 $\pm$ 0,00
Leucocitos (X10E9/L)	7,23 $\pm$ 0,86	5,53 $\pm$ 0,94	4,99 $\pm$ 0,39	4,70 $\pm$ 0,87
Neutrófilos seg. ( X10E9/L)	3,76 $\pm$ 0,82	3,39 $\pm$ 0,51	2,78 $\pm$ 0,30	2,74 $\pm$ 0,75
Eosinófilos (X10E9/L)	0,22 $\pm$ 0,14	0,22 $\pm$ 0,08	0,15 $\pm$ 0,07	0,14 $\pm$ 0,05
Basófilos (X10E9/L)	0,06 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,02
Monocitos (X10E9/L)	0,48 $\pm$ 0,10	0,32 $\pm$ 0,05	0,39 $\pm$ 0,17	0,25 $\pm$ 0,04
Linfocitos (X10E9/L)	2,71 $\pm$ 0,65	1,56 $\pm$ 0,53	1,63 $\pm$ 0,26	1,54 $\pm$ 0,26

<b>Dosis</b>	<b>240mg (n=6)</b>	<b>350mg (n=6)</b>	<b>500mg (n=6)</b>	<b>700mg (n=6)</b>	<b>1200mg (n=6)</b>
<b>Parámetro</b>	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Hemoglobina (g/dl)	150,50 $\pm$ 9,33	149,50 $\pm$ 10,71	147,50 $\pm$ 10,03	147,17 $\pm$ 9,56	150,17 $\pm$ 5,60
Hematocrito (L/L)	0,44 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,04	0,44 $\pm$ 0,02
Hematíes (X10E12/L)	5,14 $\pm$ 0,31	5,08 $\pm$ 0,24	5,18 $\pm$ 0,46	4,98 $\pm$ 0,29	5,08 $\pm$ 0,37
VCM (fL)	85,72 $\pm$ 3,68	85,97 $\pm$ 6,05	84,45 $\pm$ 4,78	88,32 $\pm$ 4,54	87,58 $\pm$ 4,42
CCMH (g/L)	341,67 $\pm$ 9,46	343,17 $\pm$ 7,36	338,00 $\pm$ 7,80	335,83 $\pm$ 10,91	338,67 $\pm$ 9,35
HCM (pg)	29,30 $\pm$ 1,11	29,48 $\pm$ 2,16	28,53 $\pm$ 1,44	29,62 $\pm$ 0,77	29,65 $\pm$ 1,56
RDW (%)	14,35 $\pm$ 0,83	14,40 $\pm$ 1,03	14,52 $\pm$ 0,73	14,20 $\pm$ 1,20	14,22 $\pm$ 1,10
Plaquetas (X10E9/L)	192,83 $\pm$ 29,42	229,33 $\pm$ 52,82	235,50 $\pm$ 60,79	212,83 $\pm$ 46,92	230,67 $\pm$ 39,16
VPM (fL)	8,92 $\pm$ 0,78	8,47 $\pm$ 0,65	8,77 $\pm$ 1,02	8,17 $\pm$ 0,87	8,63 $\pm$ 1,05
Plaquetocrito (%)	0,20 $\pm$ 0,00	0,22 $\pm$ 0,04	0,22 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,04	0,20 $\pm$ 0,06
Leucocitos (X10E9/L)	5,68 $\pm$ 0,89	6,35 $\pm$ 1,16	6,28 $\pm$ 1,19	6,80 $\pm$ 1,41	5,72 $\pm$ 1,07
Neutrófilos seg. ( X10E9/L)	3,13 $\pm$ 0,97	3,57 $\pm$ 0,92	3,42 $\pm$ 1,20	3,92 $\pm$ 0,70	3,27 $\pm$ 0,95
Eosinófilos (X10E9/L)	0,17 $\pm$ 0,10	0,16 $\pm$ 0,11	0,14 $\pm$ 0,04	0,26 $\pm$ 0,12	0,16 $\pm$ 0,11
Basófilos (X10E9/L)	0,04 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,02
Monocitos (X10E9/L)	0,43 $\pm$ 0,06	0,39 $\pm$ 0,12	0,56 $\pm$ 0,27	0,36 $\pm$ 0,09	0,30 $\pm$ 0,09
Linfocitos (X10E9/L)	1,91 $\pm$ 0,64	2,17 $\pm$ 0,80	2,13 $\pm$ 0,65	2,21 $\pm$ 0,68	1,95 $\pm$ 0,11

## 1.5.2.- Bioquímica

### 1.5.2.1.- Estándar

#### *Sangre*

En la tabla R-II-5 se recogen la media y la desviación estándar (DE) de los parámetros bioquímicos estándar en sangre de los voluntarios en el momento de la selección.

**Tabla R-II-5:** Valores medios ( $\pm$ DE) de los parámetros bioquímicos obtenidos en los voluntarios sanos en el momento de la selección, para cada una de las dosis posteriormente administradas.

Dosis Parámetro	6mg (n=4) Media $\pm$ DE	30mg (n=4) Media $\pm$ DE	60mg (n=4) Media $\pm$ DE	120mg (n=4) Media $\pm$ DE
Glucosa (mmol/L)	4,00 $\pm$ 0,29	4,20 $\pm$ 0,34	4,38 $\pm$ 0,21	4,45 $\pm$ 0,37
Urea (mmol/L)	5,35 $\pm$ 1,35	5,45 $\pm$ 0,51	5,48 $\pm$ 1,88	5,27 $\pm$ 0,33
Creatinina (Umol/L)	97,25 $\pm$ 10,14	93,75 $\pm$ 11,56	90,75 $\pm$ 8,92	101,50 $\pm$ 3,11
Bilirrubina total (Umol/L)	11,75 $\pm$ 6,90	14,75 $\pm$ 4,57	12,00 $\pm$ 5,10	11,50 $\pm$ 7,14
Bilirrubina directa (Umol/L)	4,50 $\pm$ 2,38	5,50 $\pm$ 1,73	5,25 $\pm$ 2,06	4,75 $\pm$ 2,99
Triglicéridos (mmol/L)	0,94 $\pm$ 0,43	1,12 $\pm$ 0,68	0,60 $\pm$ 0,16	0,63 $\pm$ 0,21
Colesterol total (mmol/L)	5,04 $\pm$ 1,27	4,40 $\pm$ 0,72	3,66 $\pm$ 0,38	4,10 $\pm$ 0,32
ASAT (UI/L)	18,00 $\pm$ 3,37	18,25 $\pm$ 5,25	16,25 $\pm$ 3,77	19,00 $\pm$ 3,92
ALAT (UI/L)	18,75 $\pm$ 7,80	17,00 $\pm$ 3,46	16,00 $\pm$ 5,77	13,75 $\pm$ 5,44
Fosfatasa alcalina (UI/L)	156,50 $\pm$ 26,79	143,50 $\pm$ 23,42	128,50 $\pm$ 30,82	126,75 $\pm$ 23,51
GGT (UI/L)	21,75 $\pm$ 11,15	17,00 $\pm$ 2,94	16,25 $\pm$ 4,79	13,50 $\pm$ 3,32
Proteínas totales (g/L)	72,90 $\pm$ 4,42	74,78 $\pm$ 4,39	71,10 $\pm$ 3,24	71,10 $\pm$ 2,79

Dosis Parámetro	240mg (n=6) Media $\pm$ DE	350mg (n=6) Media $\pm$ DE	500mg (n=6) Media $\pm$ DE	700mg (n=6) Media $\pm$ DE	1200mg (n=6) Media $\pm$ DE
Glucosa (mmol/L)	4,45 $\pm$ 0,34	4,18 $\pm$ 0,33	4,02 $\pm$ 0,43	4,57 $\pm$ 0,23	4,17 $\pm$ 0,44
Urea (mmol/L)	4,90 $\pm$ 0,42	6,27 $\pm$ 0,49	5,75 $\pm$ 1,27	5,85 $\pm$ 1,23	5,02 $\pm$ 0,80
Creatinina (Umol/L)	96,00 $\pm$ 6,07	100,67 $\pm$ 13,79	103,17 $\pm$ 10,89	95,50 $\pm$ 6,50	95,83 $\pm$ 9,28
Bilirrubina total (Umol/L)	13,33 $\pm$ 1,97	9,17 $\pm$ 3,25	12,83 $\pm$ 5,64	14,50 $\pm$ 7,71	14,17 $\pm$ 2,23
Bilirrubina directa (Umol/L)	4,83 $\pm$ 1,47	3,67 $\pm$ 1,37	3,50 $\pm$ 1,76	4,17 $\pm$ 2,23	5,33 $\pm$ 1,63
Triglicéridos (mmol/L)	0,59 $\pm$ 0,28	0,96 $\pm$ 0,42	0,81 $\pm$ 0,41	0,87 $\pm$ 0,44	0,68 $\pm$ 0,15
Colesterol total (mmol/L)	3,85 $\pm$ 0,93	4,79 $\pm$ 1,11	4,66 $\pm$ 1,23	4,58 $\pm$ 0,92	4,21 $\pm$ 0,37
ASAT (UI/L)	17,83 $\pm$ 4,83	20,83 $\pm$ 4,54	20,33 $\pm$ 5,28	17,83 $\pm$ 3,19	17,50 $\pm$ 2,43
ALAT (UI/L)	16,83 $\pm$ 11,96	22,17 $\pm$ 8,33	20,50 $\pm$ 9,52	18,00 $\pm$ 4,60	15,00 $\pm$ 3,85
Fosfatasa alcalina (UI/L)	152,17 $\pm$ 45,32	144,50 $\pm$ 32,75	142,00 $\pm$ 13,33	123,50 $\pm$ 34,97	133,33 $\pm$ 2,73
GGT (UI/L)	17,67 $\pm$ 5,13	18,33 $\pm$ 8,76	14,00 $\pm$ 2,00	13,67 $\pm$ 5,13	13,33 $\pm$ 2,73
Proteínas totales (g/L)	73,78 $\pm$ 3,54	75,58 $\pm$ 5,45	73,07 $\pm$ 3,14	73,82 $\pm$ 4,04	73,05 $\pm$ 3,48

## Orina

Los valores obtenidos en los parámetros del urianálisis en los voluntarios sanos en el momento de la selección estuvieron en todos los casos dentro de la normalidad.

### 1.5.2.2.- Específica

#### *Niveles de TSH*

En la tabla R-II-6 se recogen la media y la desviación estándar (DE) de las concentraciones de TSH en plasma de los voluntarios en el momento de la selección.

**Tabla R-II-6:** Valores medios ( $\pm$  DE) de los niveles de TSH obtenidos en los voluntarios sanos en el momento de la selección, para cada una de las dosis posteriormente administradas.

Dosis	6mg (n=4)	30mg (n=4)	60mg (n=4)	120mg (n=4)
Parámetro	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Tirotropina (mUI/L)	1,79 $\pm$ 0,40	2,04 $\pm$ 0,62	1,11 $\pm$ 0,20	1,15 $\pm$ 0,39

Dosis	240mg (n=6)	350mg (n=6)	500mg (n=6)	700mg (n=6)	1200mg (n=6)
Parámetro	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Tirotropina (mUI/L)	2,68 $\pm$ 0,97	2,24 $\pm$ 0,78	1,78 $\pm$ 0,66	1,90 $\pm$ 0,51	2,28 $\pm$ 0,68

#### *Sangre oculta en heces*

El análisis de sangre oculta en heces efectuado en el momento de la selección fue negativo en todos los casos.

### 1.5.3.- Sedimento urinario

Los valores obtenidos en el análisis microbiológico del sedimento de orina en los voluntarios sanos en el momento de la selección estuvieron en todos los casos dentro de la normalidad.

### **1.6.- Otras evaluaciones efectuadas en el momento de la selección**

Los resultados de la serología realizada para los virus de la hepatitis C, hepatitis B y VIH fueron negativos en todos los casos.

El screening urinario de drogas fue negativo para todas las drogas testadas en el período de selección en todos los voluntarios.



## **2.- TOLERABILIDAD**

Todos los sujetos acudieron a las visitas hospitalarias establecidas en el protocolo y completaron la fase experimental del ensayo. Consecuentemente, todos los datos pudieron ser considerados para la tolerabilidad y la aceptabilidad del producto.

Los voluntarios tomaron la medicación del estudio en presencia de un miembro del equipo investigador. El cumplimiento fue del 100% para todas las dosis de tratamiento.

Aunque estaba permitida la toma de paracetamol y metamizol (Nolotil®) excepcionalmente y a criterio del investigador, durante el estudio no fue necesaria su administración en ningún caso.

Debido a que durante el desarrollo del estudio no se produjo ninguna de las eventualidades mencionadas en el apartado de material y métodos (intolerancia grados I, II ó III), no fue necesaria la utilización de placebo y se pudieron administrar todas las dosis inicialmente previstas en el protocolo.

### **2.1.- Cuestionario de acontecimientos adversos sugeridos**

En la tabla R-II-7 se recoge el número de individuos que reportan cada uno de los AA sugeridos que se registraron durante el estudio para cada una de las dosis administradas. Los voluntarios podían reportar más de un acontecimiento adverso.

**Tabla R-II-7:** Número de individuos que reportan cada uno de los acontecimientos adversos sugeridos, expresado por tipo de acontecimiento adverso y por tratamiento administrado, en orden de frecuencia.

Nº de ítem. Efecto	6 mg	30 mg	60 mg	120 mg	240 mg	350 mg	500 mg	700 mg	1200 mg	Total	% sobre el total de voluntarios
20. Somnoliento, con modorra	3	2	3	3	6	3	2	1	1	24/46	52,17
1. Boca seca	3	1	2	1	4	3	3	4	2	23/46	50
15. Cansancio general	2	1	1	1	4	0	1	2	1	13/46	28,26
4. Dolor de cabeza	2	0	2	0	4	0	0	2	0	10/46	21,73
9. Molestias gástricas	1	0	2	0	3	3	0	0	0	9/46	19,56
5. Mareado al incorporarse	1	0	1	0	2	1	0	0	0	5/46	10,86
3. Cara ruborizada	3	0	0	0	1	0	0	0	0	4/46	8,69
8. Ardor (malestar epigástrico)	1	0	0	0	1	1	0	1	0	4/46	8,69
2. Visión borrosa	0	0	0	0	2	0	0	0	1	3/46	6,52
12. Estreñimiento	0	1	1	0	1	0	0	0	0	3/46	6,52
22. Intranquilo, nervioso	1	0	0	0	2	0	0	0	0	3/46	6,52
7. Palpitaciones	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2/46	4,34
14. Calambres	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2/46	4,34
21. Insomnio	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2/46	4,34
10. Náuseas	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1/46	2,17
13. Acorchamiento de extremidades	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1/46	2,17
17. Falta de fuerza en extremidades	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1/46	2,17
18. Marcha inestable	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1/46	2,17
19. Temblores	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1/46	2,17
25. Desconectado	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1/46	2,17
26. Otros	0	1 Sequedad mucosa nasal	0	0	0	0	0	0	0	1/46	2,17
6. Vértigo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/46	0
11. Diarrea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/46	0
16. Falta de fuerza en caderas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/46	0
23. Deprimido, triste	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/46	0
24. Sensación de embriaguez	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/46	0
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>6</b>	<b>13</b>	<b>6</b>	<b>39</b>	<b>11</b>	<b>6</b>	<b>11</b>	<b>5</b>		

\* Los voluntarios podían señalar más de un acontecimiento adverso.

De los 26 ítems contenidos en el cuestionario de AA referidos, el que señalaron más voluntarios fue el de “somnoliento, con modorra” (52,17% de los voluntarios participantes), seguido de “boca seca” 50%, “cansancio general” 28,26%, “dolor de cabeza” 21,73%, “molestias gástricas” 19,56%, “mareado al incorporarse” un 10,86% y los ítems “cara ruborizada” y “ardor, malestar epigástrico” en un 8,69 % de los voluntarios. Notificaron “visión borrosa”, “estreñimiento” e “intranquilo, nervioso” un 6,52% y los ítems, “palpitaciones”, “insomnio” y “calambres” un 4,34%. Los ítems “náuseas”, “acorchamiento

de extremidades”, “falta de fuerza en la cadera”, “marcha inestable” y “desconectado” fueron señalados mucho menos frecuentemente (2,17%). Un voluntario en la dosis de 30 mg refirió sequedad de la mucosa nasal. Ninguno de los voluntarios señaló en el cuestionario los ítems “vértigo”, “diarrea”, “sensación de embriaguez” ni “deprimido, triste”.

En la tabla R-II-8 se puede observar el número total de AA sugeridos reportados durante todo el estudio, desglosados en función del acontecimiento adverso por orden de frecuencia, de la dosis administrada y del momento de su notificación (basal/final).

**Tabla R-II-8:** Número total de ocasiones en las que se reportan acontecimientos adversos sugeridos en orden de frecuencia con relación al tratamiento administrado y al momento de notificación (basal/final).

Dosis	6mg		30mg		60mg		120mg		240mg		350mg		500mg		700mg		1200mg		Nº AA (%)
	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	
20. Somnoliento, con modorra	2	18	2	9	3	10	2	14	4	58	2	27	1	11	1	5	0	1	170 (31,07)
1. Boca seca	3	4	1	7	2	13	1	9	2	15	1	13	2	12	1	27	1	14	128(23,40)
15. Cansancio general	1	12	1	1	0	8	1	2	4	29	0	0	0	1	1	11	0	2	74 (13,53)
4. Dolor de cabeza	0	6	0	0	1	11	0	0	0	19	0	0	0	0	0	3	0	0	40 (7,31)
5. Mareado al incorporarse	0	1	0	0	0	1	0	0	1	22	0	5	0	0	0	0	0	0	30 (5,48)
9. Molestias gástricas	1	2	0	0	0	3	0	0	0	3	0	4	0	0	0	0	0	0	13 (16,45)
19. Temblores	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	12 (2,19)
25. Desconectado	0	0	0	0	0	0	1	1	1	8	0	0	0	0	0	0	0	0	11 (2,01)
21. Insomnio	1	1	0	0	0	0	0	0	1	7	0	0	0	0	0	0	0	0	10 (1,83)
8. Ardor (malestar epigástrico)	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	5	0	0	0	1	0	0	9 (1,64)
12. Estreñimiento	0	0	0	1	1	4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	7 (1,28)
3. Cara ruborizada	0	4	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	6 (1,1)
13. Acorchamiento de extremidades	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	6(1,1)
22. Intranquilo, nervioso	0	1	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	6(1,1)
2. Visión borrosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	2	5(0,91)
14. Calambres	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	5(0,91)
26. Otros (Sequedad mucosa nasal)	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5(0,91)
7. Palpitaciones	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	4 (0,73)
17. Falta de fuerza en extremidades	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3 (0,55)
10. Nauseas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (2,38)
18. Marcha inestable	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0,18)
6. Vértigo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11. Diarrea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16. Falta de fuerza en caderas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23. Deprimido, triste	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24. Sensación de embriaguez	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>50</b>	<b>4</b>	<b>23</b>	<b>7</b>	<b>53</b>	<b>5</b>	<b>26</b>	<b>18</b>	<b>197</b>	<b>3</b>	<b>54</b>	<b>3</b>	<b>24</b>	<b>4</b>	<b>48</b>	<b>1</b>	<b>19</b>	<b>547</b>

B:basal. F: final. AA: acontecimientos adversos

El número total posible de AA sugeridos, en el caso de que cada uno de los voluntarios hubiese anotado cada uno de los ítems sugeridos en cada uno de los tiempos de registro, hubiese sido de 17.940 AA sugeridos.

El número total real de AA tras cuestionario fue de 547. El más frecuentemente notificado fue el ítem “somnoliento” con una frecuencia del 31,07%, seguido de “boca seca” con 23,40%, “cansancio general” en un 13,53%, “dolor de cabeza” en un 7,31%, “mareado al incorporarse” en un 5,48%, “molestias gástricas” en un 2,38%, “temblores” en un 2,19%, “desconectado” en un 2,01% e “insomnio” en un 1,83 %. Con menor frecuencia se notificó “estreñimiento” (1,28%) “cara ruborizada”, “acorchamiento de extremidades” e “intranquilo” (1,1%), “visión borrosa”, “calambres” y “otros” (0,91%), “palpitaciones” (0,73%), “falta de fuerza” (0,55%), “náuseas” (0,36%) y “marcha inestable” (0,18%).

Si se analiza la frecuencia de aparición de AA adversos sugeridos en relación al tratamiento administrado, se puede observar que la dosis a la que se notificaron más AA fue la de 240mg (39,39 %) con una gran diferencia respecto al resto de tratamientos administrados. Le siguieron en frecuencia los tratamientos con 60mg, 6mg, 350mg y 700mg tras los que se notificaron un 13,13%, 10,60%, 10,42% y 9,51% de los AA, respectivamente. Seguidamente, fue igual el porcentaje de AA notificados para la dosis de 500mg y 30mg (9,51%) y del 3,66% para la dosis de 1200mg.

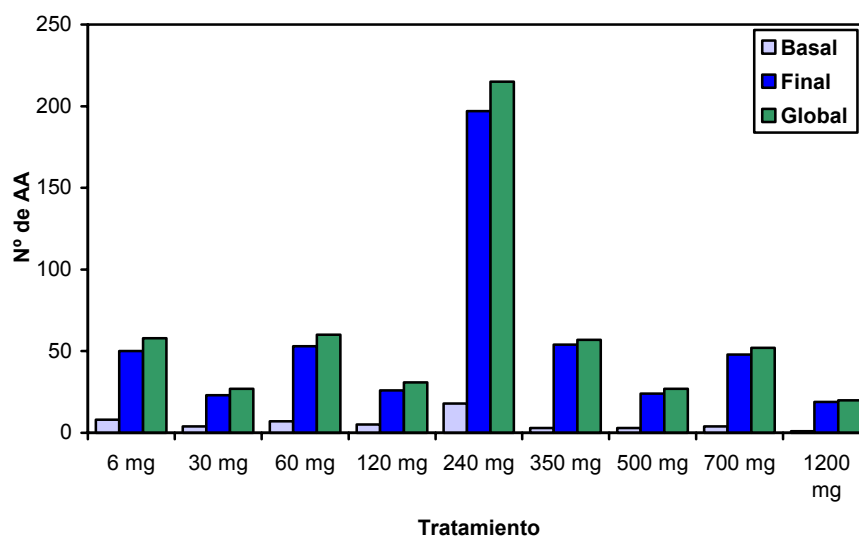
De las 15 ocasiones en las que se facilitaba a los voluntarios el cuestionario de AA para ser contestado, únicamente 1 se realizaba en el momento basal y las 14 restantes a lo largo del estudio, quedando englobadas dichas anotaciones como registro en el momento final del estudio.

Así, en el momento basal aparecieron un total de 53 AA lo que representa un 9,69% de los AA sugeridos señalados. En el momento final del estudio aparecieron globalmente 494 AA tras cuestionario, lo que representa un 90,31% del los AA notificados por esta vía (Tabla R-II-9).

Así, el análisis de los AA según el momento de su notificación (basal/final) y en función de los tratamientos administrados muestra que de los 215 AA reportados para la dosis de 240mg, el 8,37% (18 AA) fue en el momento basal y el 91,62% (197AA) en el momento final. Esta

tendencia se repite para el resto de tratamientos administrados tal como se puede observar en los datos contenidos en la tabla R-II-9 y en la figura R-II-1, donde se encuentran representados gráficamente el número de AA notificados para cada uno de los tratamientos administrados y desglosados en función del momento de la notificación (basal/final).

**Figura R-II-1:** Número de AA notificados en el cuestionario de acontecimientos sugeridos en función del tratamiento administrado y desglosado según el momento de la notificación (basal/final).



**Tabla R-II-9:** Tabla resumen del número de AA sugeridos desglosados por tratamiento y momento de la notificación (basal/final).

Momento de Notificación	6 mg	30 mg	60 mg	120 mg	240 mg	350 mg	500 mg	700 mg	1200 mg	Total	% sobre el total
Basal	8	4	7	5	18	3	3	4	1	53	9,69
Final	50	23	53	26	197	54	24	48	19	494	90,31
<b>Total (%)</b>	<b>58</b> (10,60)	<b>27</b> (4,94)	<b>60</b> (13,13)	<b>31</b> (5,67)	<b>215</b> (39,39)	<b>57</b> (10,42)	<b>27</b> (4,94)	<b>52</b> (9,51)	<b>20</b> (3,66)	<b>547</b>	<b>100%</b>

Así pues, en cuanto a los AA sugeridos, se aprecian diferencias notables en su notificación únicamente tras la dosis de 240 mg. Este hecho no parece relacionado con el fármaco en estudio ya que no se evidencia una tendencia a la aparición de problemas de tolerabilidad dosis-dependiente. El número limitado de voluntarios por dosis (n=6) y algún factor ligado al día de estudio podrían explicar esta diferencia que no se repite con las dosis subsiguientes. A pesar de que se notificaron muchos más acontecimientos en el momento final que en el momento basal, este hecho era de esperar, ya que dicha evaluación contiene la mayoría de ocasiones de notificación de AA y a demás ocurrió de forma similar para todos los tratamientos administrados, incluso para las dosis más bajas.

## 2.2.- Acontecimientos adversos reportados espontáneamente por los voluntarios y/o alteraciones analíticas evaluadas según las recomendaciones de la OMS <sup>(WHO,1986)</sup>

En la tabla R-II-10 se recogen los acontecimientos adversos espontáneos y/o alteraciones analíticas que presentaron los voluntarios participantes en el estudio.

**Tabla R-II-10:** Acontecimientos adversos notificados espontáneamente por los voluntarios sanos y/o alteraciones analíticas evidenciadas durante el estudio.

Vol.	Acontecimiento	Dosis	Tiempo desde la administración	Intensidad	Causalidad	Duración del acontecimiento	Acción tomada
1. IBH	Hipercolesterolemia	6mg	--	Leve	NR	--	--
3. JMB	Pirosis	6mg	2h 15'	Leve	Posible	5h	--
12. OSN	Mucosidad sanguinolenta Flatulencia	60mg 60mg	12h 50' 6h 50'	Leve Leve	Posible Posible	1 seg 16h	-- --
14. GBD	Rotura parcial de ligamento izq.	120mg	13h 50'	Moderada	N R	33 días	Vendaje compresivo y reposo
18. FRP	Distensión abdominal	240mg	47h 10'	Leve	Posible	30'	--
19. JMB	Herpes Labial	240mg	2h 30'	Leve	N R	10 días	--
22. GAF	Odontalgia	240mg	2h 15' 10h 15'	Moderada Moderada	N R N R	5h 30' 12h 30'	-- Agua con clorhexidina
23. JAG	Anemia	350mg	--	Leve	Posible	84 días	--
35. RBR	Dolor región dorsal muslo derecho	500mg	34h	Leve	N R	19h	--
41. CJ	Mal sabor de boca Olor extraño en orina	1200mg 1200mg	2h 20' 12h	Leve Leve	Posible Posible	48h 60h	-- --
43. JFV	Hematomas simétricos en cara interna de antebrazo	1200mg	56h	Leve	Posible	13 días 16h	--
44. ORF	Epigastralgia	1200mg	29h 20'	Leve	Posible	30'	--

Se notificaron un total de 14 AA de forma espontánea y 2 alteraciones analíticas relevantes en 12 de los 46 voluntarios participantes en el estudio (26,09%). Se constató que durante la administración de la dosis de 1200mg se notificaron 4 acontecimientos, tras la dosis de 240mg, se notificaron 3 de los 13, 2 acontecimientos tras las dosis de 60mg y únicamente un acontecimiento adverso espontáneo tras las dosis de 6, 120 y 500mg. Las alteraciones analíticas se notificaron tras las dosis de 6 y 350mg.

Todos ellos fueron distintos e incluyeron alteraciones clínicas como pirosis, mucosidad sanguinolenta, flatulencia, rotura parcial del ligamento lateral izquierdo, distensión abdominal, herpes labial, odontalgia, dolor en región dorsal del muslo derecho, mal sabor de boca, olor extraño de la orina, epigastralgia o hematomas simétricos en la cara interna del antebrazo. Así mismo, se registraron alteraciones analíticas como un caso de hipercolesterolemia (Grado I (leve): 6,5-8 mmol/L) y otro de anemia (Grado I (leve): 125-130 g/L), que no presentaron expresión clínica.

Al evaluar el tiempo transcurrido entre la aparición del AA y la toma de medicación, éste fue muy variable, con una media de 13 horas y 40 minutos acompañado de una amplia dispersión (mínimo: 2 horas 15 minutos; máximo: 2 días y 8 horas).

En cuanto a su intensidad, un 80% de los 15 AA notificados espontáneamente fueron catalogados de leves y un 20% de moderados, no notificándose ninguno de intensidad grave.

Al analizar la causalidad atribuida a los 15 AA notificados espontáneamente, en un 60% de los casos se consideró que su relación con el tratamiento del estudio podía ser posible y en un 40% de los casos se consideró que no presentaba ninguna relación.

La duración media de dichos acontecimientos fue de unas 271h (11días y 8 horas) con un intervalo muy amplio que osciló desde 1 segundo a 84 días.

En un 13,33% de los casos, se debieron tomar las medidas oportunas para corregir dichos AA.

### **2.3.- Exploración física**

Todas las exploraciones físicas realizadas a los voluntarios por sistemas (piel y mucosas, ojos, oídos, nariz y garganta, sistemas cardiovascular, respiratorio, digestivo, locomotor, nervioso y linfático) fueron normales tanto a nivel basal (antes de la toma de medicación) como al final del estudio (+24h).

## 2.4.- Constantes vitales

### 2.4.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación)

En la tabla R-II-11 se recogen la media y desviación estándar (DE) de las constantes vitales obtenidas en el periodo basal (premedicación), en particular de la presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y frecuencia cardíaca (FC), en decúbito supino y de la temperatura axilar (T).

**Tabla R-II-11:** Valores medios ( $\pm$ DE) de los principales parámetros hemodinámicos (PAS, PAD, FC y T) obtenidos en el periodo basal (premedicación), para cada una de las dosis administradas.

Dosis Parámetro	6mg (n=4) Media $\pm$ DE	30mg (n=4) Media $\pm$ DE	60mg (n=4) Media $\pm$ DE	120mg (n=4) Media $\pm$ DE
Presión arterial sistólica <sup>a</sup> (mmHg)	114,75 $\pm$ 4,92	116,25 $\pm$ 11,98	120,75 $\pm$ 10,81	118,50 $\pm$ 7,77
Presión arterial diastólica <sup>a</sup> (mm Hg)	62,00 $\pm$ 5,94	68,00 $\pm$ 6,32	67,50 $\pm$ 12,40	64,25 $\pm$ 13,74
Frecuencia cardíaca <sup>a</sup> (min <sup>-1</sup> )	62,50 $\pm$ 8,23	61,50 $\pm$ 7,55	67,50 $\pm$ 3,30	59,50 $\pm$ 8,81
Temperatura axilar (°C)	36,30 $\pm$ 0,24	36,03 $\pm$ 0,35	36,00 $\pm$ 0,39	36,07 $\pm$ 0,38

Dosis Parámetro	240mg (n=6) Media $\pm$ DE	350mg (n=6) Media $\pm$ DE	500mg (n=6) Media $\pm$ DE	700mg (n=6) Media $\pm$ DE	1200mg (n=6) Media $\pm$ DE
Presión arterial sistólica <sup>a</sup> (mmHg)	117,50 $\pm$ 5,96	118,00 $\pm$ 9,19	109,67 $\pm$ 8,36	114,33 $\pm$ 5,82	122,00 $\pm$ 11,05
Presión arterial diastólica <sup>a</sup> (mm Hg)	62,33 $\pm$ 9,97	61,83 $\pm$ 7,73	58,50 $\pm$ 8,12	61,67 $\pm$ 9,89	64,33 $\pm$ 8,14
Frecuencia cardíaca <sup>a</sup> (min <sup>-1</sup> )	64,17 $\pm$ 11,55	57,83 $\pm$ 7,68	59,50 $\pm$ 12,21	58,67 $\pm$ 8,73	57,83 $\pm$ 6,15
Temperatura axilar (°C)	36,25 $\pm$ 0,43	36,28 $\pm$ 0,29	36,23 $\pm$ 0,21	36,12 $\pm$ 0,34	35,93 $\pm$ 0,24

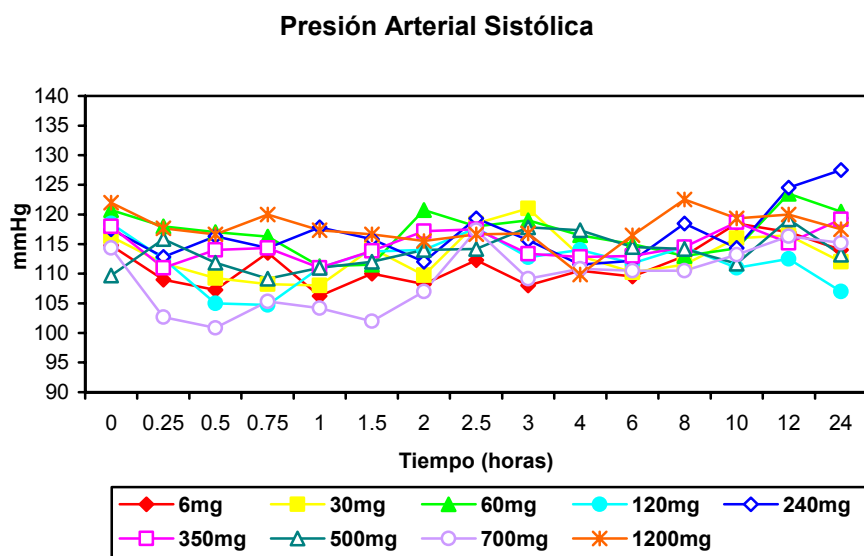
a: decúbito supino

### 2.4.2.- Evolución tras administración de la medicación

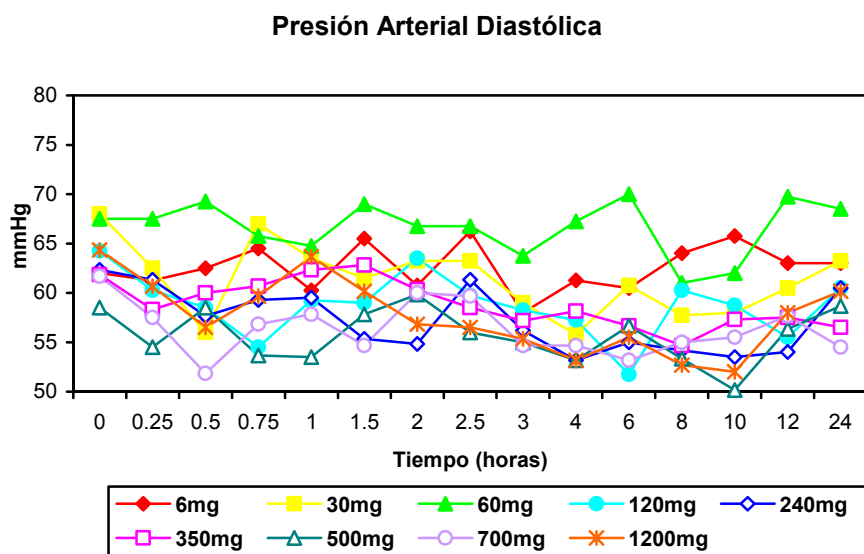
En las figuras R-II-2, R-II-3, R-II-4 y R-II-5 se representa gráficamente la evolución en el tiempo tras la administración de la medicación de las medias de las constantes vitales, en particular de la presión arterial sistólica (PAS), la presión arterial diastólica (PAD), la frecuencia cardíaca (FC), todas ellas en decúbito supino, y de la temperatura axilar (T), respectivamente.



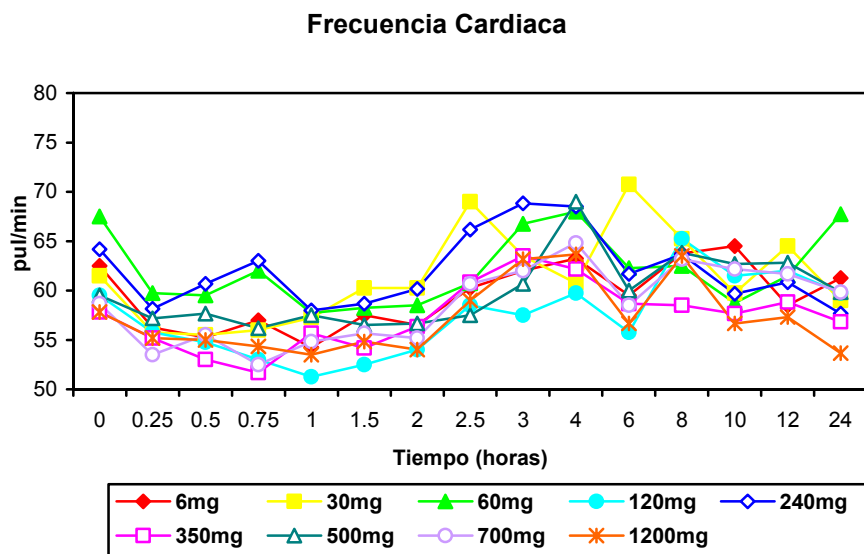
**Figura R-II-2:** Representación gráfica de los valores medios de la presión arterial sistólica obtenidos para cada una de las dosis administradas.



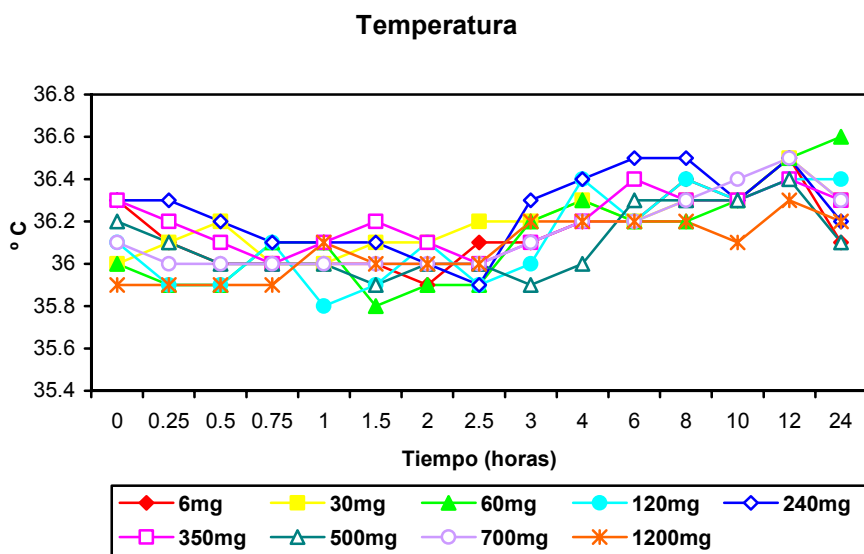
**Figura R-II-3:** Representación gráfica de los valores medios de la presión arterial diastólica obtenidos para cada una de las dosis administradas.



**Figura R-II-4:** Representación gráfica de los valores medios de la frecuencia cardiaca obtenidos para cada una de las dosis administradas.



**Figura R-II-5:** Representación gráfica de los valores medios de la temperatura axilar obtenidos para cada una de las dosis administradas.



No se observaron alteraciones clínicamente relevantes en ninguna evaluación individual de las distintas constantes vitales registradas.

Los valores medios de la PAS en función de la dosis se mantuvieron siempre dentro de los límites de la normalidad (90-140mmHg), así como los de la PAD, (50-90mmHg), la FC (40-100 latidos/minuto), y T (< 37°C).

## 2.5.- Electrocardiograma

### 2.5.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación)

En la tabla R-II-12 se recogen la media y desviación estándar (DE) de los parámetros obtenidos a partir del electrocardiograma en el periodo basal (premedicación).

**Tabla R-II-12:** Valores medios ( $\pm$  DE) de los principales parámetros electrocardiográficos (ECG de 12 derivaciones) obtenidos en los voluntarios sanos en el periodo basal (premedicación), para cada una de las dosis administradas.

Dosis Parámetro	6mg (n=4) Media $\pm$ DE	30mg (n=4) Media $\pm$ DE	60mg (n=4) Media $\pm$ DE	120mg (n=4) Media $\pm$ DE
Frecuencia cardiaca (min <sup>-1</sup> )	63,00 $\pm$ 6,38	58,00 $\pm$ 9,201	65,25 $\pm$ 15,46	58,00 $\pm$ 7,39
Onda P (ms)	104,00 $\pm$ 7,83	93,50 $\pm$ 5,978	97,00 $\pm$ 14,38	98,00 $\pm$ 10,71
Intervalo QRS (ms)	91,00 $\pm$ 9,31	103,00 $\pm$ 8,08	106,50 $\pm$ 12,79	90,50 $\pm$ 5,74
Intervalo PR (ms)	168,00 $\pm$ 12,65	134,00 $\pm$ 18,55	160,50 $\pm$ 13,89	165,50 $\pm$ 26,45
Intervalo QT (ms)	384,00 $\pm$ 34,29	395,00 $\pm$ 23,80	374,50 $\pm$ 32,92	385,50 $\pm$ 22,41
Intervalo QTC (ms)	388,75 $\pm$ 25,50	391,25 $\pm$ 13,72	382,25 $\pm$ 6,24	381,00 $\pm$ 11,05

Dosis Parámetro	240mg (n=6) Media $\pm$ DE	350mg (n=6) Media $\pm$ DE	500mg (n=6) Media $\pm$ DE	700mg n=6) Media $\pm$ DE	1200mg (n=6) Media $\pm$ DE
Frecuencia cardiaca (min <sup>-1</sup> )	61,33 $\pm$ 12,36	57,17 $\pm$ 7,36	55,17 $\pm$ 8,33	58,50 $\pm$ 6,38	57,67 $\pm$ 3,56
Onda P (ms)	99,33 $\pm$ 11,00	92,00 $\pm$ 12,33	103,33 $\pm$ 15,21	105,00 $\pm$ 16,19	98,00 $\pm$ 13,275
Intervalo QRS (ms)	95,00 $\pm$ 7,56	89,00 $\pm$ 4,56	99,33 $\pm$ 3,50	91,67 $\pm$ 7,94	98,00 $\pm$ 13,39
Intervalo PR (ms)	134,67 $\pm$ 9,27	138,67 $\pm$ 24,29	156,33 $\pm$ 17,55	154,97 $\pm$ 17,05	148,67 $\pm$ 20,73
Intervalo QT (ms)	377,33 $\pm$ 20,85	386,33 $\pm$ 26,82	399,00 $\pm$ 28,08	395,33 $\pm$ 24,94	400,33 $\pm$ 21,67
Intervalo QTC (ms)	379,83 $\pm$ 14,15	380,67 $\pm$ 15,81	390,83 $\pm$ 18,64	393,00 $\pm$ 29,16	396,50 $\pm$ 17,20

min: minutos. ms: milisegundos.

### 2.5.2.- Evolución tras administración de la medicación

En la tabla R-II-13 se identifican aquellos parámetros obtenidos a partir del electrocardiograma que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +24 horas tras administración de la medicación.

**Tabla R-II-13:** Parámetros obtenidos a partir del electrocardiograma que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +24 horas tras administración de la medicación.

Parámetro	Unidades	Dosis (mg)	Basal Media ± DE	+24h Media ± DE	Valor de p (vs. basal)	Sentido del cambio
QRS	ms	120	90,50±5,74	95,50±7,55	0,03	↑
PR	ms	240	134,67±9,27	139,67±10,69	0,014	↑
QT	ms	350	386,33±26,82	401,33±25,79	0,040	↑
Frec Ventr	Lat/min	1200	57,67±3,56	52,00±4,38	0,007	↓

ms: milisegundos. Lat/min: latidos por minuto.

No se observaron alteraciones clínicamente relevantes en ninguna evaluación individual de los distintos parámetros derivados.

Los valores medios de la frecuencia ventricular se mantuvieron dentro de los límites de la normalidad (40-80 lat/min), así como los de la onda P (<120), los del intervalo QRS (<120 ms), los del intervalo PR (<220 ms), los del intervalo QT (<440 ms) y los del intervalo QTC (<440). Las diferencias estadísticamente significativas encontradas carecieron de relevancia clínica.

Así mismo, no se detectó ningún cambio con relevancia significativa en los registros de la derivación DII efectuados a +30min, +1h, +2h, +4h, +6h, +8h y +12h de la toma de medicación en ninguna de las dosis únicas evaluadas.

## 2.6.- Parámetros de laboratorio

### 2.6.1.- Hematología

#### 2.6.1.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación)

En la tabla R-II-14 se recogen la media y desviación estándar (DE) de los parámetros hematológicos obtenidos en el periodo basal (premedicación).

**Tabla R-II-14:** Valores medios ( $\pm$ DE) de los parámetros hematológicos obtenidos en los voluntarios sanos en el periodo basal (premedicación), para cada una de las dosis.

<b>Dosis</b>	<b>6mg (n=4)</b>	<b>30mg (n=4)</b>	<b>60mg (n=4)</b>	<b>120mg (n=4)</b>
<b>Parámetro</b>	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Hemoglobina (g/dl)	142,25 $\pm$ 9,91	147 $\pm$ 14,13	143 $\pm$ 7,70	138,75 $\pm$ 10,08
Hematocrito (L/L)	0,41 $\pm$ 0,03	0,40 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,02	0,41 $\pm$ 0,03
Hematíes (X10E12/L)	4,50 $\pm$ 0,48	4,67 $\pm$ 0,61	4,85 $\pm$ 0,19	4,79 $\pm$ 0,16
VCM (fL)	91,40 $\pm$ 5,25	85,75 $\pm$ 3,43	85,92 $\pm$ 4,00	85,65 $\pm$ 7,02
CCMH (g/L)	347,50 $\pm$ 5,97	342,25 $\pm$ 2,75	342,75 $\pm$ 2,87	338,75 $\pm$ 7,18
HCM (pg)	31,77 $\pm$ 2,38	29,35 $\pm$ 1,21	29,43 $\pm$ 1,21	29,02 $\pm$ 2,60
RDW (%)	13,98 $\pm$ 0,79	15,20 $\pm$ 1,44	15,28 $\pm$ 1,38	14,47 $\pm$ 0,74
Plaquetas (X10E9/L)	204,75 $\pm$ 54,06	163,75 $\pm$ 40,67	186,75 $\pm$ 28,30	220,75 $\pm$ 38,43
VPM (fL)	8,63 $\pm$ 0,33	9,63 $\pm$ 1,50	9,35 $\pm$ 0,81	7,60 $\pm$ 1,42
Plaquetocrito (%)	0,18 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,06	0,18 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,06
Leucocitos (X10E9/L)	6,95 $\pm$ 1,69	5,94 $\pm$ 1,69	6,05 $\pm$ 0,82	6,06 $\pm$ 1,38
Neutrófilos seg. (X10E9/L)	3,37 $\pm$ 0,92	3,54 $\pm$ 1,34	3,13 $\pm$ 0,55	3,24 $\pm$ 1,10
Eosinófilos (X10E9/L)	0,25 $\pm$ 0,15	0,32 $\pm$ 0,22	0,17 $\pm$ 0,08	0,19 $\pm$ 0,07
Basófilos (X10E9/L)	0,06 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,02
Monocitos (X10E9/L)	0,44 $\pm$ 0,20	0,37 $\pm$ 0,15	0,45 $\pm$ 0,06	0,41 $\pm$ 0,08
Linfocitos (X10E9/L)	2,83 $\pm$ 0,73	1,69 $\pm$ 0,56	2,25 $\pm$ 0,36	2,19 $\pm$ 0,66

<b>Dosis</b>	<b>240mg (n=6)</b>	<b>350mg (n=6)</b>	<b>500mg (n=6)</b>	<b>700mg (n=6)</b>	<b>1200mg (n=6)</b>
<b>Parámetro</b>	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Hemoglobina (g/dl)	144,00 $\pm$ 9,55	141,83 $\pm$ 11,03	143,83 $\pm$ 8,08	142,67 $\pm$ 5,85	146,56 $\pm$ 5,56
Hematocrito (L/L)	0,43 $\pm$ 0,03	0,43 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,03	0,45 $\pm$ 0,02
Hematíes (X10E12/L)	5,01 $\pm$ 0,28	4,85 $\pm$ 0,24	5,07 $\pm$ 0,36	4,80 $\pm$ 0,24	4,84 $\pm$ 0,29
VCM (fL)	85,23 $\pm$ 3,14	88,32 $\pm$ 6,74	82,92 $\pm$ 3,63	91,65 $\pm$ 5,88	93,25 $\pm$ 4,06
CCMH (g/L)	337,33 $\pm$ 3,83	331,83 $\pm$ 9,04	342,67 $\pm$ 4,23	325,17 $\pm$ 11,18	324,00 $\pm$ 3,58
HCM (pg)	28,75 $\pm$ 1,24	29,25 $\pm$ 1,86	28,40 $\pm$ 1,37	29,77 $\pm$ 0,95	30,22 $\pm$ 1,09
RDW (%)	14,88 $\pm$ 0,85	13,70 $\pm$ 1,51	14,90 $\pm$ 0,74	13,65 $\pm$ 0,60	13,30 $\pm$ 0,55
Plaquetas (X10E9/L)	187,33 $\pm$ 29,69	213,17 $\pm$ 40,77	214,83 $\pm$ 55,66	217,00 $\pm$ 59,10	214,67 $\pm$ 38,19
VPM (fL)	8,43 $\pm$ 0,42	8,18 $\pm$ 0,66	9,02 $\pm$ 0,70	8,63 $\pm$ 0,62	8,95 $\pm$ 0,73
Plaquetocrito (%)	0,170 $\pm$ 0,05	0,18 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,04	0,22 $\pm$ 0,04	0,18 $\pm$ 0,04
Leucocitos (X10E9/L)	6,00 $\pm$ 0,71	6,15 $\pm$ 0,63	5,95 $\pm$ 1,33	6,01 $\pm$ 0,80	6,13 $\pm$ 1,01
Neutrófilos seg. (X10E9/L)	2,94 $\pm$ 0,47	3,37 $\pm$ 0,54	3,18 $\pm$ 1,19	2,93 $\pm$ 0,40	2,90 $\pm$ 0,66
Eosinófilos (X10E9/L)	0,19 $\pm$ 0,08	0,17 $\pm$ 0,10	0,21 $\pm$ 0,08	0,33 $\pm$ 0,19	0,19 $\pm$ 0,13
Basófilos (X10E9/L)	0,03 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,02
Monocitos (X10E9/L)	0,48 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,09	0,36 $\pm$ 0,11	0,45 $\pm$ 0,07	0,37 $\pm$ 0,10
Linfocitos (X10E9/L)	2,37 $\pm$ 0,70	2,45 $\pm$ 0,48	2,16 $\pm$ 0,42	2,26 $\pm$ 0,44	2,64 $\pm$ 0,54

### 2.6.1.2.- Evolución tras administración de la medicación

En la tabla R-II-15 se identifican aquellos parámetros hematológicos que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +24 horas tras administración de la medicación.

**Tabla R-II-15:** Parámetros hematológicos que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +24 horas tras administración de la medicación.

Parámetro	Unidades	Dosis (mg)	Basal Media ± DE	+ 24 h Media ± DE	Valor de p (vs. basal)	Sentido del cambio
Hematocrito	%	60	0,42±0,002	0,45±0,01	0,022	↑
Hematocrito	%	240	0,43±0,03	0,45±0,01	0,014	↑
Hematocrito	%	1200	0,45±0,02	0,46±0,01	0,031	↑
Hematíes	X10E12/L	60	4,85±0,19	5,14±0,19	0,004	↑
Hematíes	X10E12/L	240	5,01±0,28	5,20±0,20	0,037	↑
Hematíes	X10E12/L	1200	4,84±0,29	5,02±0,29	0,028	↑
Hemoglobina	g/dL	240	144,00±9,55	150,0±5,93	0,023	↑
Hemoglobina	g/dL	1200	146,17±5,56	150,33±3,50	0,019	↑
VCM	fL	700	91,65±5,88	90,53±4,84	0,044	↓
VPM	fL	240	8,43±0,42	9,55±0,40	0,001	↑
VPM	fL	700	8,63±0,62	8,05±0,62	0,0005	↓
VPM	fL	1200	8,95±7,73	8,08±0,66	0,005	↓
Leucocitos	X10E9/L	500	5,95±1,33	6,21±1,28	0,034	↑
Leucocitos	X10E9/L	700	6,01±0,80	7,07±1,13	0,006	↑
Linfocitos	X10E9/L	120	2,19±0,61	1,70±0,41	0,025	↓
Neutrófilos	X10E9/L	500	3,18±1,19	3,43±1,15	0,022	↑
Neutrófilos	X10E9/L	700	2,93±0,40	3,79±0,42	0,006	↓
Basófilos	X10E9/L	240	0,03±0,01	0,04±0,01	0,020	↑
Eosinófilos	X10E9/L	700	0,33±0,19	0,38±0,16	0,044	↑

En un voluntario que recibió la dosis de 350mg, en la analítica final se evidenció la presencia de anemia de grado I (leve: 95-109g/dL), que no presentó expresión clínica y que revirtió espontáneamente a los 83 días de la finalización del estudio. Este hecho se notificó como acontecimiento adverso, tal como se puede observar en el apartado 2.2 de la parte II de resultados de esta tesis doctoral.

Los valores medios de los distintos parámetros hematológicos se mantuvieron dentro de los límites de la normalidad descritos en el PNT correspondiente. Las diferencias estadísticamente significativas encontradas carecieron de relevancia clínica.

## 2.6.2.- Bioquímica

### 2.6.2.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación)

#### *Estándar*

#### Sangre

En la tabla R-II-16 se recogen la media y desviación estándar (DE) de los parámetros bioquímicos estándar en sangre obtenidos en el periodo basal (premedicación).

**Tabla R-II-16:** Valores medios ( $\pm$  DE) de los parámetros bioquímicos obtenidos en los voluntarios sanos en el periodo basal (premedicación), para todas las dosis administradas.

Dosis	6mg (n=4)	30mg (n=4)	60mg (n=4)	120mg (n=4)
Parámetro	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Glucosa (mmol/L)	3,87 $\pm$ 0,22	3,95 $\pm$ 0,17	4,50 $\pm$ 0,51	4,50 $\pm$ 0,42
Urea (mmol/L)	5,35 $\pm$ 1,35	5,45 $\pm$ 1,20	5,50 $\pm$ 1,36	6,58 $\pm$ 1,01
Creatinina (Umol/L)	95,00 $\pm$ 12,49	91,25 $\pm$ 12,28	95,25 $\pm$ 8,50	111,50 $\pm$ 9,75
Bilirrubina total (Umol/L)	8,50 $\pm$ 2,38	9,75 $\pm$ 4,11	14,50 $\pm$ 9,18	9,75 $\pm$ 5,91
Bilirrubina directa (Umol/L)	3,25 $\pm$ 0,96	3,25 $\pm$ 1,50	5,00 $\pm$ 3,46	4,00 $\pm$ 2,45
Triglicéridos (mmol/L)	1,10 $\pm$ 0,74	1,02 $\pm$ 0,53	0,92 $\pm$ 0,31	1,02 $\pm$ 0,43
Colesterol total (mmol/L)	4,79 $\pm$ 1,19	4,22 $\pm$ 0,64	3,80 $\pm$ 0,49	4,45 $\pm$ 0,47
ASAT (UI/L)	17,00 $\pm$ 3,47	18,75 $\pm$ 4,27	14,25 $\pm$ 3,30	18,00 $\pm$ 2,16
ALAT (UI/L)	18,50 $\pm$ 11,27	18,00 $\pm$ 4,24	14,75 $\pm$ 9,95	13,50 $\pm$ 3,11
Fosfatasa alcalina (UI/L)	156,75 $\pm$ 31,87	150,50 $\pm$ 34,38	127,00 $\pm$ 28,15	125,25 $\pm$ 29,67
GGT (UI/L)	21,75 $\pm$ 12,74	16,00 $\pm$ 1,83	14,00 $\pm$ 3,56	12,50 $\pm$ 1,73
Proteínas totales (g/L)	69,83 $\pm$ 2,38	72,60 $\pm$ 2,27	69,13 $\pm$ 2,03	73,05 $\pm$ 4,48

Dosis	240mg n=6	350mg (n=6)	500mg n=6	700mg (n=6)	1200mg (n=6)
Parámetro	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Glucosa (mmol/L)	4,77 $\pm$ 0,43	4,25 $\pm$ 0,46	3,97 $\pm$ 0,58	4,50 $\pm$ 0,37	4,20 $\pm$ 0,06
Urea (mmol/L)	4,73 $\pm$ 0,39	5,93 $\pm$ 1,38	4,38 $\pm$ 0,95	6,38 $\pm$ 0,56	5,60 $\pm$ 0,98
Creatinina (Umol/L)	89,33 $\pm$ 8,19	98,50 $\pm$ 10,13	100,67 $\pm$ 9,27	96,17 $\pm$ 7,19	95,67 $\pm$ 11,52
Bilirrubina total (Umol/L)	12,20 $\pm$ 4,02	6,83 $\pm$ 2,64	13,50 $\pm$ 2,07	7,33 $\pm$ 1,51	11,67 $\pm$ 7,92
Bilirrubina directa (Umol/L)	4,75 $\pm$ 1,50	2,50 $\pm$ 0,84	4,33 $\pm$ 0,82	2,33 $\pm$ 0,52	4,17 $\pm$ 2,79
Triglicéridos (mmol/L)	0,67 $\pm$ 0,44	0,86 $\pm$ 0,19	0,71 $\pm$ 0,33	0,86 $\pm$ 0,50	0,65 $\pm$ 0,19
Colesterol total (mmol/L)	3,57 $\pm$ 0,86	4,57 $\pm$ 0,92	4,17 $\pm$ 1,02	4,10 $\pm$ 0,54	3,71 $\pm$ 0,25
ASAT (UI/L)	18,83 $\pm$ 4,31	18,17 $\pm$ 2,71	17,83 $\pm$ 2,79	26,00 $\pm$ 24,17	16,00 $\pm$ 6,07
ALAT (UI/L)	13,67 $\pm$ 8,73	19,83 $\pm$ 4,36	17,50 $\pm$ 6,19	16,33 $\pm$ 7,84	11,00 $\pm$ 3,41
Fosfatasa alcalina (UI/L)	135,67 $\pm$ 45,17	137,00 $\pm$ 24,85	131,00 $\pm$ 20,54	117,17 $\pm$ 31,73	124,17 $\pm$ 27,52
GGT (UI/L)	15,67 $\pm$ 4,93	17,00 $\pm$ 8,90	11,83 $\pm$ 2,79	11,17 $\pm$ 2,79	17,17 $\pm$ 10,97
Proteínas totales (g/L)	68,62 $\pm$ 3,13	69,82 $\pm$ 4,56	68,18 $\pm$ 2,67	69,10 $\pm$ 4,43	68,08 $\pm$ 3,21

## Orina

Los valores obtenidos en los parámetros del urianálisis realizados en el periodo basal (premedicación) estuvieron en todos los casos dentro de la normalidad.

### *Específica*

#### Niveles de TSH

En la tabla R-II-17 se recogen la media y desviación estándar (DE) de los niveles de TSH obtenidos en el periodo basal (premedicación).

**Tabla R-II-17:** Valores medios ( $\pm$  DE) de los niveles plasmáticos de TSH obtenidos en los voluntarios sanos en el periodo basal (premedicación) para todas las dosis administradas.

Dosis	6 mg (n=4)	30 mg (n=4)	60 mg (n=4)	120 mg (n=4)
Parámetro	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Tirotropina (mUI/L)	2,83 $\pm$ 0,72	2,76 $\pm$ 0,81	1,41 $\pm$ 0,45	1,95 $\pm$ 0,35

Dosis	240 mg (n=6)	350 mg (n=6)	500 mg (n=6)	700 mg (n=6)	1200 mg (n=6)
Parámetro	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Tirotropina (mUI/L)	3,10 $\pm$ 1,08	1,96 $\pm$ 0,68	1,78 $\pm$ 0,28	1,77 $\pm$ 0,59	3,29 $\pm$ 2,46

## Sangre oculta en heces

El análisis de la sangre oculta en heces efectuado en el periodo basal (premedicación) fue negativo en todos los casos.

### 2.6.2.2.- Evolución tras administración de la medicación

#### 2.6.2.2.1.- Estándar

##### Sangre

En la tabla R-II-18 se identifican aquellos parámetros bioquímicos estándar en sangre que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +24 horas tras administración de la medicación.



**Tabla R-II-18:** Parámetros bioquímicos que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +24 horas tras administración de la medicación.

Parámetro	Unidades	Dosis (mg)	Basal Media ± DE	+ 24 h Media ± DE	Valor de p (vs. basal)	Sentido del cambio
Colesterol	mmol/l	240	3,57±0,86	3,84±0,88	0,0002	↑
Proteínas Totales	g/L	240	68,62±3,13	72,48±4,07	0,003	↑
Proteínas Totales	g/L	1200	68,08±3,21	71,07±2,76	0,031	↑
ASAT	UI/L	500	17,83±2,79	16,50±2,17	0,025	↓
GGT	UI/L	240	15,67±4,93	17,33±4,59	0,020	↑
Fosfatasa Alcalina	UI/L	700	117,17±31,73	124,17±31,53	0,034	↑

En un voluntario que había recibido la dosis de 6mg, al final del estudio se evidenció la presencia de hipercolesterolemia que no se manifestó clínicamente y que revirtió espontáneamente al finalizar el estudio. Este hecho se notificó como acontecimiento adverso, tal como se refleja en el apartado 2.2 de la parte II de resultados de esta tesis doctoral.

Los valores medios de los distintos parámetros bioquímicos estándar en sangre se mantuvieron dentro de los límites de la normalidad descritos en el PNT correspondiente. Las diferencias estadísticamente significativas encontradas carecieron de relevancia clínica.

## Orina

Los valores obtenidos en los parámetros del urianálisis realizados a +24 horas tras administración de la medicación estuvieron en todos los casos dentro de la normalidad.

## *Específico*

### Niveles de TSH

En la tabla R-II-19 se identifican aquellas observaciones de los niveles de TSH que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +24 horas tras administración de la medicación.

**Tabla R-II-19:** Observaciones de los niveles de TSH que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +24 horas tras administración de la medicación.

<b>Parámetro</b>	<b>Unidades</b>	<b>Dosis (mg)</b>	<b>Basal (Media±DE)</b>	<b>+24h (Media±DE)</b>	<b>Valor de p (vs. basal)</b>	<b>Sentido del cambio</b>
Tirotropina	mUI/L	240	3,10±1,08	2,07±0,61	0,028	↓
Tirotropina	mUI/L	500	1,78±0,28	1,01±0,41	0,001	↓
Tirotropina	mUI/L	700	1,77±0,59	1,05±0,52	0,001	↓
Tirotropina	mUI/L	1200	3,29±2,46	1,93±1,70	0,013	↓

No se observaron alteraciones clínicamente relevantes en ninguna evaluación individual de los niveles de TSH.

Los valores medios obtenidos tras la administración de las distintas dosis se mantuvieron dentro de los límites de la normalidad (0,25-5,0mUI/L). Las diferencias estadísticamente significativas encontradas carecieron de relevancia clínica.

### **Sangre oculta en heces**

El análisis de sangre oculta en heces efectuado +24 horas tras administración de la medicación fue negativo en todos los casos.

### **2.6.3.- Sedimento urinario**

#### **2.6.3.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación)**

Los valores obtenidos en el análisis microbiológico del sedimento de orina en el periodo basal (premedicación) estuvieron en todos los casos dentro de la normalidad.

#### **2.6.3.2.- Evolución tras administración de la medicación**

Los valores obtenidos en el análisis microbiológico del sedimento de orina +24 horas tras administración de la medicación estuvieron en todos los casos dentro de la normalidad.

### 3.- FARMACOCINÉTICA

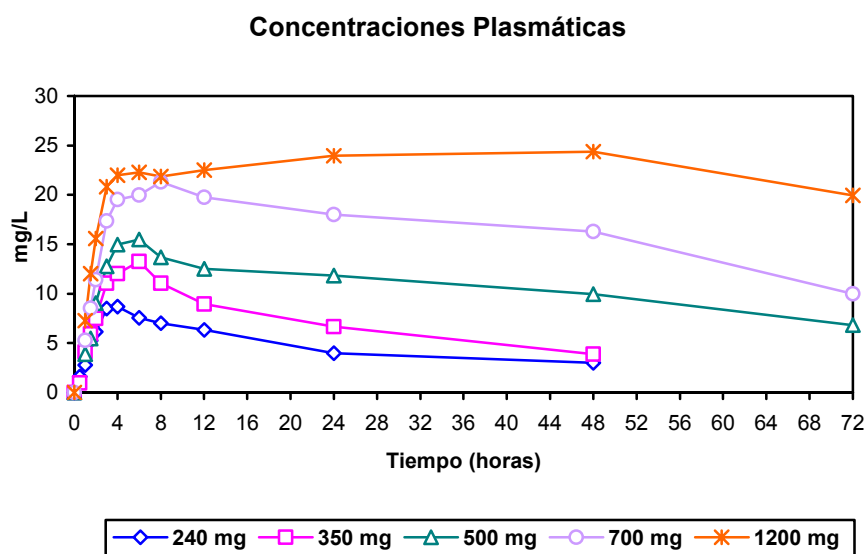
De los nueve niveles de dosis administrados, únicamente fueron caracterizados farmacocinéticamente 5 de ellos (240mg, 350mg, 500mg, 700mg y 1.200mg) debido a que para las dosis de 6, 30, 60 y 120mg el número de puntos de extracción era insuficiente para poder llevar a cabo los procedimientos planteados.

#### 3.1.- Concentraciones plasmáticas

Los valores basales aportados por el centro responsable del análisis para todos los sujetos fueron en todos los casos de no detectables, considerándose como tal toda concentración inferior a 0,05 mg/L (límite de detección).

En la figura R-II-6 se muestran los valores medios de las concentraciones plasmáticas del fármaco a lo largo del tiempo, comparando las cinco dosis analizadas (240mg, 350mg, 500mg, 700mg y 1.200mg).

**Figura R-II-6:** Valores medios de las concentraciones plasmáticas de AM-24 a lo largo del tiempo tras una única administración oral de distintas dosis.



### 3.2.- Parámetros farmacocinéticos: aproximación amodelística

En la dosis de 240 mg sólo se han tenido en cuenta los 4 voluntarios de los que se obtuvieron datos hasta + 48 h post-dosis. En 1 voluntario sobre 6 para la dosis de 500mg y en 3 voluntarios sobre 6 para la dosis de 1200mg no se pudo calcular ninguno de los siguientes parámetros farmacocinéticos:  $AUC_0^\infty$ ,  $Vd/F$ ,  $Cl/F$ ,  $k_e$  ni  $t_{1/2}$ . Ello fue debido a que estos voluntarios presentaban un  $t_{max}$  de 48h, siendo imposible por tanto, calcular la fase de eliminación de la curva.

Los resultados obtenidos para los parámetros que caracterizan la biodisponibilidad en magnitud y en velocidad, la distribución y la eliminación tras una única dosis oral se encuentran en las tablas R-II-20 y R-II-21.

**Tabla R-II-20:** Descriptivos de los parámetros farmacocinéticos que caracterizan la biodisponibilidad (magnitud y velocidad): media (desviación estándar).

Parámetro	240mg	350mg	500mg	700mg	1200mg
$AUC_0^\infty$ (mg/L)*h (DE)	327,69 (59,52)	513,66 (116, 13)	1348,92 (906,06)	2165,94 (769,36)	3265,53 (49,08)
$AUC_0^\infty/D$ (hL) (DE)	1,36 (2,480)	1,47 (3,32)	2,70 (1,81)	3,09 (1,10)	2,72 (49,08)
$C_{max}$ (mg/L) (DE)	9,54 (1,58)	14,09 (4,86)	16,17 (3,77)	24,26 (8,44)	29,02 (30,90)
$C_{max}/D$ (L <sup>-1</sup> ) (DE)	0,04 (0,06)	0,04 (0,01)	0,03 (0,07)	0,03 (0,01)	0,02 (0,03)
$t_{max}$ (h) (DE)	4,67 (3,66)	5,17 (1,83)	12,67 (17,32)	5,67 (59,76)	29,17 (75,25)

**Tabla R-II-21:** Descriptivos de los parámetros farmacocinéticos que caracterizan la distribución y la eliminación: media (desviación estándar).

Parámetro	240mg	350mg	500mg	700mg	1200mg
<b>Distribución</b>					
Vd/F (L) (DE)	29,59 (7,11)	29,32 (9,87)	32,04 (8,74)	35,89 (16,97)	46,65 (9,19)
<b>Eliminación</b>					
Cl/F (L/h) (DE)	0,75 (0,14)	0,72 (0,22)	0,49 (0,24)	0,38 (0,22)	n.p.
$k_e$ ( $h^{-1}$ ) (DE)	0,03 (0,007)	0,03 (0,009)	0,02 (0,008)	0,01 (0,004)	n.p.
$t_{1/2}$ (h) (DE)	27,48 (5,72)	30,00 (13,51)	64,34 (60,16)	69,76 (29,56)	n.p.

Es de destacar que para las dosis estudiadas, en todos los casos el porcentaje medio de extrapolación desde el último tiempo experimental hasta el infinito es superior al 32% (Tabla R-II-22).

**Tabla R-II-22:** Media (desviación estándar) del porcentaje de extrapolación del AUC desde el último punto experimental hasta el infinito, según la dosis administrada.

Dosis (mg)	n	% de extrapolación Media (DE)
240	6	40,43 (7,49)
350	6	32,42 (15,09)
500	5	35,37 (22,26)
700	6	45,23 (14,61)
1200	3	54,15 (16,44)
<b>Total</b>	26	40,30 (15,78)

### 3.3.- Linealidad cinética al incrementar la dosis

De los parámetros evaluados,  $C_{max}/D$ , Vd/F, Cl/F,  $k_e$ , no pudo rechazarse la hipótesis nula de homogeneidad de varianzas, por lo que se les aplicó la aproximación paramétrica (ANOVA). Los parámetros  $AUC_{0^\infty}/D$  y  $t_{1/2}$  no presentaron varianzas homogéneas por lo que se les aplicó la aproximación no paramétrica (test de comparación de rangos de Kruskal-Wallis y prueba de Jonckheere-Terpstra) (Conover, 1970; Hollander, 1973) (Tabla R-II-23).

No se hallaron diferencias estadísticamente significativas para el  $C_{max}/D$  ni para el  $Vd/F$  tras realizar el ANOVA de un solo factor.

A los parámetros que presentaron diferencias estadísticamente significativas tras la ANOVA de un solo factor,  $Cl/F$  y  $k_e$ , se les aplicó un test post hoc de Duncan que mostró que, tanto para el  $Cl/F$  como para el  $k_e$ , las dosis de 240mg y 350mg eran claramente diferentes de las dosis de 700mg y 1200mg, mientras que para la dosis de 500mg no existieron diferencias significativas en relación al resto de dosis estudiadas.

Los parámetros que no presentaron varianzas homogéneas se sometieron al test de comparación de rangos de Kruskal-Wallis <sup>(Conover, 1970)</sup> y a la prueba de Jonckheere-Terpstra <sup>(Hollander, 1973)</sup>, mostrando de esta forma que existían diferencias estadísticamente significativas entre las dosis administradas. Siguiendo el método de Conover, se puso de manifiesto que para el  $t_{1/2}$  las dosis de 240 mg y 350mg se diferenciaban claramente de las de 700mg y 1200mg. No se encontraron diferencias en cuanto a la dosis de 500mg en relación a las de 350mg, 700mg ni 1200mg pero sí en relación a la dosis de 240mg. Para el  $AUC_0^\infty/D$ , se observó la existencia de diferencias estadísticamente significativas de la dosis de 240mg en relación a las de 500mg, 700mg y 1200mg, así como entre las dosis de 350mg y 700mg.

**Tabla R-II-23:** Valores de “p” tras la realización del ANOVA de un solo factor, del Test de Kruskal-Wallis o de la Prueba de Jonckheere-Terpstra (Homogeneidad de las varianzas comprobada mediante el test de Levene).

Parámetro	p ANOVA de un solo factor	p tras Test de Kruskal-Wallis	p tras Prueba de Jonckheere-Terpstra	Homogeneidad de varianzas*
$AUC_0^\infty/D$ (h/ml)	-----	0,0602	<b>0,005</b>	<b>0,015</b>
$C_{max}/D$ (ml)	0,0598	-----	-----	0,424
$Vd/F$ (ml)	0,2158	-----	-----	0,113
$Cl/F$ (ml/min)	<b>0,0183</b>	-----	-----	0,743
$k_e$ ( $h^{-1}$ )	<b>0,0020</b>	-----	-----	0,548
$t_{1/2}$ (h)	-----	<b>0,0066</b>	<b>0,0001</b>	<b>0,031</b>

\*significación de p:  $p \leq 0.05$

En la figura R-II-7 se presenta una representación gráfica de los resultados obtenidos en aquellas variables en las que la comparación estadística mostró la no presencia de la linealidad cinética tras distintas dosis orales únicas.

**Figura R-II-7:** Parámetros farmacocinéticos en que se han hallado diferencias estadísticamente significativas en relación a las diferentes dosis administradas, tras aplicar el test de Duncan o de Conover, según la homogeneidad de las varianzas comprobada.

Parámetro	Dosis*				
AUC <sub>0<sup>∞</sup></sub> /D (h/L)	1	2	3	4	5
Cl/F (L/h)	1 2		3	4 5	
K <sub>e</sub> (h <sup>-1</sup> )	1 2		3	4 5	
t <sub>1/2</sub> (h)	1	2	3	4	5

\*Dosis: 1= 240 mg, 2= 350 mg, 3= 500 mg, 4= 700 mg y 5 = 1200 mg

#### 4.- FARMACODINAMIA

Las muestras obtenidas de los voluntarios n° 27, 37, 39, 40, 41, 44 y 45 (28%) no presentaron evidencia de inhibir la producción de LTB<sub>4</sub>, por lo que no fueron incluidos en los cálculos, incluyéndose los 18 voluntarios restantes (72%). La media de las concentraciones plasmáticas en el análisis fue de  $9,75 \pm 6,38$  mg/L, presentando los sujetos unos niveles medios de LTB<sub>4</sub> de  $8,37 \pm 5,54$  µg/L a nivel basal y postadministración de  $4,16 \pm 3,10$  µg/L (Tabla R-II-24).

**Tabla R-II-24:** Número de voluntario, dosis administrada, tiempo de extracción final (ya que el tiempo basal siempre fue 0), concentraciones plasmáticas de AM-24 en mg/L obtenidas a tiempo final (a tiempo basal son todas igual a 0), concentración basal y final de LTB<sub>4</sub> en µg/L (LTB<sub>4</sub>B y LTB<sub>4</sub>F, respectivamente).

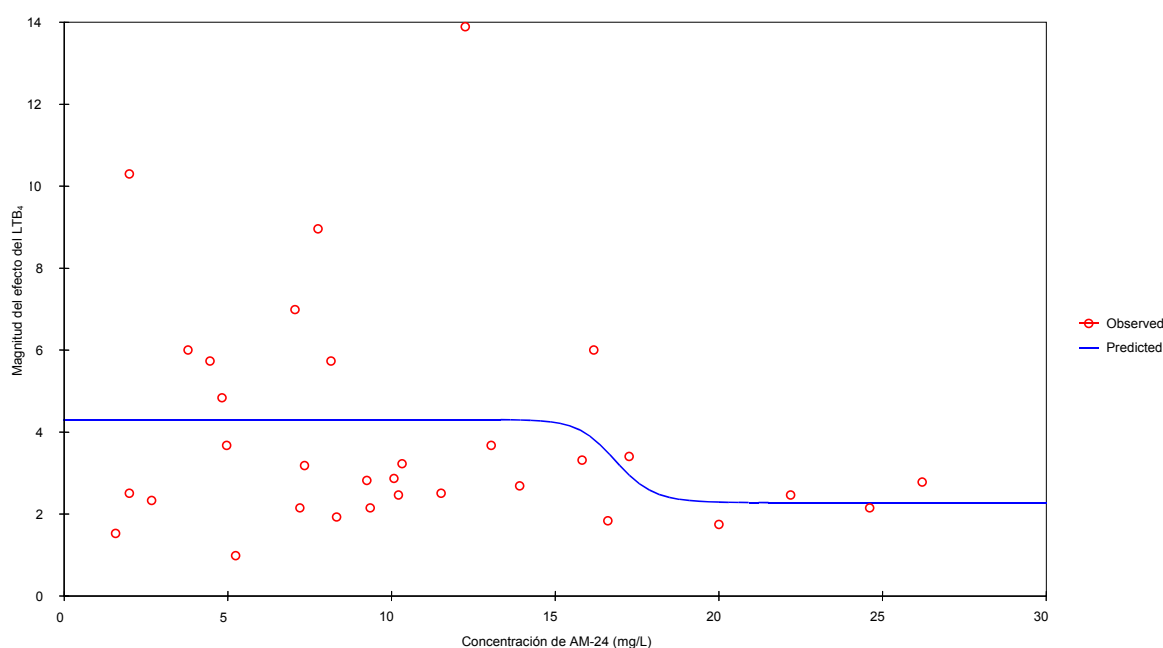
VOL	DOSIS (mg)	TIE (h)	CON (mg/L)	LTB <sub>4</sub> B (µg/L)	LTB <sub>4</sub> F (µg/L)
15	120	2	4,45	14,3360	5,7344
16	120	2	3,78	8,6016	6,0032
17	240	2	8,15	13,8880	5,7344
18	240	2	7,75	12,9920	8,9600
19	240	2	1,57	3,9424	1,5232
20	240	2	5,24	1,5232	0,9856
21	240	2	4,96	4,8384	3,6736
22	240	2	9,24	3,6736	2,8224
23	350	2	1,99	12,9920	10,3040
24	350	2	10,32	4,2112	3,2256
25	350	2	1,99	4,0768	2,5088
26	350	3	22,19	3,3152	2,4640
28	350	3	7,20	4,0320	2,1504
29	500	2	16,61	3,7632	1,8368
30	500	2	7,05	10,9760	6,9888
31	500	2	4,82	16,1280	4,8384
32	500	2	8,32	3,0464	1,9264
35	500	3	17,26	15,2320	3,4048
36	500	2	7,34	10,7520	3,1808
33	700	2	12,25	17,9200	13,8880
34	700	2	20,00	17,4720	1,7472
38	700	2	9,35	2,9568	2,1504
42	1200	2	11,51	2,5088	2,5088
43	1200	2	24,61	12,5440	2,1504
46	1200	2	15,82	3,5840	3,3152
		<b>Media</b>	9,7508	8,3722	4,1610
		<b>DE</b>	6,38	5,542499	3,102846
		<b>EEM</b>	1,95016	1,108499	0,6205692

Vol: voluntario. Tie: tiempo. Con: concentración. LTB<sub>4</sub>B: concentración basal de LTB<sub>4</sub>. LTB<sub>4</sub>F: concentración final de LTB<sub>4</sub>. DE: desviación estándar. EEM: error estándar de la media.



Los resultados de la aplicación del modelo farmacodinámico inhibitorio de tipo sigmoide (modelo 108) siguiendo una estrategia de cálculo consistente en la mezcla inocente de datos se recogen en la Tabla R-II-25 y su representación gráfica en la Figura R-II-8. El AIC del modelo fue de 14,180, el índice de correlación de 0,2944 e incluyó el 0 en el intervalo de confianza (IC) de los parámetros  $E_0$  y gamma.

**Figura R-II-8:** Representación gráfica de la relación entre las distintas concentraciones plasmáticas de AM-24 y la magnitud del efecto sobre las concentraciones finales de  $LTB_4$ .



**Tabla R-II-25:** Parámetros farmacodinámicos finales.

Parámetro	Valor	Error Estándar	CV %	IC Univar. inferior	IC Univar. superior
$E_{max}$	4,646	0,773	16,64	3,038	6,253
$CI_{50}$	<b>16,563</b>	6,335	38,25	3,388	29,738
$E_0$	1,880	3,260	173,34	-4,899	8,660
Gamma	9,968	48,772	489,29	-91,458	111,394

CV: coeficiente de variación. IC Univar. inferior: límite inferior del intervalo de confianza univariante. IC Univar. superior: límite superior del intervalo de confianza univariante.  $E_{max}$ : efecto máximo de  $LTB_4$ .  $CI_{50}$ : concentración inhibitoria 50% de AM-24.  $E_0$ : efecto a  $C = \infty$ . Gamma: sigmoidicidad de la curva.

## **PARTE III: INVESTIGACIÓN “IN NUMERO”: DETERMINACIÓN DE LA PAUTA DE DOSIFICACIÓN A EVALUAR PARA CARACTERIZAR LA ADMINISTRACIÓN REPETIDA.**

### **1.- DESARROLLO Y SELECCIÓN DEL MODELO**

Se procedió a ajustar las concentraciones plasmáticas obtenidas en el Estudio 1 a los modelos previamente descritos:

- Modelo monocompartimental con eliminación lineal.
- Modelo bicompartimental con eliminación lineal.
- Modelo monocompartimental con eliminación de Michaelis-Menten.

Se aplicó como estrategia de cálculo, tanto la aproximación de promediado simple como la aproximación de promediado en dos etapas.

La valoración de la bondad del ajuste y la selección del modelo óptimo se llevó a cabo mediante la evaluación del AIC <sup>(Yamaoka, 1978)</sup>, el índice de correlación y el IC de los parámetros obtenidos.

#### **1.1.- Criterio de AIC**

Bajo la estrategia del promediado simple, el ajuste para las dosis inferiores (240mg y 350mg) fue mejor para el modelo bicompartimental, mientras que para las dosis de 500mg y 1200mg fue mejor para el modelo monocompartimental con eliminación lineal e igual para los dos modelos anteriormente mencionados para la dosis de 700mg (Tabla R-III-1). En ninguna dosis se consiguió un mejor ajuste al aplicar el modelo monocompartimental con eliminación de Michaelis-Menten.

Bajo la estrategia de dos etapas, de forma global, se observó un mejor ajuste para el modelo bicompartimental para la dosis de 240mg. Para el resto de dosis el ajuste fue mejor para el modelo monocompartimental con eliminación lineal (Tabla R-III-1). Sin embargo, evaluado el criterio sujeto por sujeto, para la dosis de 240mg, 4 de los 6 voluntarios se ajustaron mejor al modelo monocompartimental; para la dosis de 350mg lo hicieron igualmente 4 de los 6 voluntarios, mientras que a partir de la dosis de 500mg el perfil farmacocinético mejor para todos los voluntarios fue el modelo monocompartimental con eliminación lineal. En ninguno de los casos se consiguió un mejor ajuste al aplicar el modelo monocompartimental con eliminación de Michaelis-Menten.

**Tabla R-III-1:** Comparación del AIC en las distintas estrategias de cálculo y en los distintos modelos farmacocinéticos.

	Dosis	Monocomp	Mono+MM	Bicompart
<b>Promediado simple</b>	240mg	29,88	31,94	27,81
	350mg	37,18	39,24	36,50
	500mg	42,00	44,01	46,00
	700mg	44,28	46,27	44,28
	1200mg	43,43	45,42	47,43
<b>Dos etapas</b>	240mg	34,98	37,01	32,19
	350mg	46,52	48,56	51,26
	500mg	42,80	44,82	54,92
	700mg	56,74	58,75	75,02
	1200mg	59,23	61,24	78,69

Monocomp: modelo monocompartimental. Mono+MM: modelo monocompartimental con cinética de Michaelis-Menten. Bicompart: modelo bicompartimental.

mejor valor de ajuste.

igualdad en el valor de ajuste.

## 1.2.- Índice de Correlación

Bajo la estrategia de promediado simple, las dosis de 240mg y 350mg presentaron un ajuste mejor para la aproximación bicompartimental; la dosis de 500 mg presentó una bondad de ajuste igual para los modelos monocompartimental con eliminación lineal y bicompartimental, la dosis de 1200mg también presentó igualdad del ajuste entre ambos modelos monocompartimentales y para la dosis de 700mg el ajuste fue igual para los 3 modelos estudiados (Tabla R-III-2).

Bajo una estrategia de dos etapas, de forma global, se observó para la dosis de 240mg que el mejor ajuste lo fue para el modelo bicompartimental, para la dosis de 1200mg fue igual para el modelo monocompartimental con eliminación lineal y el monocompartimental con eliminación de Michaelis-Menten y para el resto de dosis, el ajuste fue mejor para el modelo monocompartimental con eliminación lineal (Tabla R-III-2). Sin embargo, evaluando el criterio sujeto por sujeto, para la dosis de 240mg, todos los voluntarios se ajustaron mejor al modelo bicompartimental; para la dosis de 350mg lo hicieron 1 de los 6 voluntarios al modelo monocompartimental con eliminación lineal; a partir de la dosis de 500mg, los resultados de ajuste obtenidos fueron también favorables al modelo monocompartimental con eliminación lineal excepto en 2 de los 6 casos para la dosis de 500mg, 2 de los 6 casos para la dosis de 700mg y 1 de los 6 casos para la dosis de 1200mg, en los que se ajustó mejor al modelo farmacocinética monocompartimental con eliminación de Michaelis-Menten.

**Tabla R-III-2:** Comparación del índice de Correlación en las distintas estrategias de cálculo y en los distintos modelos farmacocinéticos.

	Dosis (mg)	Monocomp	Mono+MM	Bicompart
<b>Promediado simple</b>	240mg	0,8563	0,8566	0,8723
	350mg	0,8765	0,8763	0,8877
	500mg	0,83	0,8299	0,83
	700mg	0,8459	0,8459	0,8459
	1200mg	0,8147	0,8147	0,8146
<b>Dos etapas</b>	240mg	0,7963	0,7960	0,8169
	350mg	0,8348	0,8345	0,8136
	500mg	0,8232	0,8231	0,7220
	700mg	0,7984	0,7983	0,6205
	1200mg	0,7925	0,7925	0,5973

Monocomp: modelo monocompartimental. Mono+MM: modelo monocompartimental con cinética de Michaelis-Menten. Bicompart: modelo bicompartimental.

mejor valor de ajuste.

Igualdad en el valor de ajuste.

### 1.3.- Inclusión de 0 en los IC de los distintos parámetros

Bajo la estrategia de promediado simple y la aproximación monocompartimental con eliminación lineal, únicamente incluyó el 0 el IC de la  $k_a$  para la dosis de 1200mg. En la aproximación monocompartimental con eliminación de MM, no se incluyó el 0 en los

parámetros  $V_d$  ni  $k_a$  para ninguna de las dosis, mientras que los parámetros  $V_m$  y  $K_m$  sí incluyeron el 0 en su IC para todas las dosis. Para la aproximación bicompartimental, todos los parámetros y para todas las dosis estudiadas incluyeron el 0 en sus IC (Tabla R-III-3).

Bajo la estrategia de dos etapas, en la aproximación monocompartimental con eliminación lineal, para el  $V_d$  en 1 caso sobre 6 para la dosis de 350mg y en 2 casos sobre 6 para la de 700mg, se incluyó el 0 en el IC. Para la  $k_a$ , el 0 fue incluido en 1 caso sobre 6 para la dosis de 350mg y 1 sobre 6 para la dosis de 700mg. Para la  $k_e$ , el 0 fue incluido en 3 casos sobre 6 para la dosis de 240mg, 2 casos sobre 6 para la de 350mg, 2 casos sobre 6 para la de 700mg y 4 casos sobre 6 para la de 1200mg.

Tras la aproximación monocompartimental con eliminación de Michaelis-Menten y para el  $V_d$ , presentaron inclusión de 0 en el IC 2 casos sobre 6 para la dosis de 240mg, 2 casos sobre 6 para la de 350mg, 1 sobre 6 para la dosis de 500mg y 2 casos sobre 6 para la dosis de 1200mg. El parámetro  $k_a$  incluyó el 0 en su IC en 5 casos sobre 6 para la dosis de 240mg, en 3 casos sobre 6 para la dosis de 350mg, en 1 caso sobre 6 para la dosis de 500mg, en 3 casos sobre 6 para la dosis de 700mg y en 2 casos sobre 6 para la dosis de 1200mg. Los parámetros  $V_m$  y  $K_m$  presentaron inclusión de 0 en el IC para todas las dosis y todos los sujetos.

En cuanto al modelo bicompartimental bajo esta misma estrategia presentó igualmente inclusión de 0 en el IC de todos los parámetros, para todas las dosis estudiadas y en todos los sujetos.

**Tabla R-III-3:** Comparación de la inclusión o no del 0 en los IC de los parámetros obtenidos en las distintas estrategias de cálculo y en los distintos modelos farmacocinéticos.

Dosis (mg)	Monocompartimental		Monocompartimental+MM		Bicompartmental	
	Parámetro	Incl de 0 en IC	Parámetro	Inc de 0 en IC	Parámetro	Incl de 0 en IC
<b>Promediado simple</b>						
240	Vd/F	no	Vd/F	no	Vd/F	sí
	$k_a$	no	$k_a$	no	$k_a$	sí
	$k_e$	no	$V_m$	sí	$k_e$	sí
			$K_m$	sí	$k_{12}$	sí
				$k_{21}$	sí	
350	Vd/F	no	Vd/F	no	Vd/F	sí
	$k_a$	no	$k_a$	no	$k_a$	sí
	$k_e$	no	$V_m$	sí	$k_e$	sí
			$K_m$	sí	$k_{12}$	sí
				$k_{21}$	sí	
500	Vd/F	no	Vd/F	no	Vd/F	sí
	$k_a$	no	$k_a$	no	$k_a$	sí
	$k_e$	no	$V_m$	sí	$k_e$	sí
			$K_m$	sí	$k_{12}$	sí
				$k_{21}$	sí	
700	Vd/F	no	Vd/F	no	Vd/F	sí
	$k_a$	no	$k_a$	no	$k_a$	sí
	$k_e$	no	$V_m$	sí	$k_e$	sí
			$K_m$	sí	$k_{12}$	sí
				$k_{21}$	sí	
1200	Vd/F	no	Vd/F	no	Vd/F	sí
	$k_a$	no	$k_a$	no	$k_a$	sí
	$k_e$	sí	$V_m$	sí	$k_e$	sí
			$K_m$	sí	$k_{12}$	*****
				$k_{21}$	*****	
<b>Dos etapas</b>						
240	Vd/F	no	Vd/F	sí	Vd/F	sí
	$k_a$	no	$k_a$	sí	$k_a$	sí
	$k_e$	sí=3	$V_m$	sí	$k_e$	sí
			$K_m$	sí	$k_{12}$	sí
				$k_{21}$	sí	
350	Vd/F	sí=1	Vd/F	sí	Vd/F	sí
	$k_a$	sí=1	$k_a$	sí	$k_a$	sí
	$k_e$	sí=2	$V_m$	sí	$k_e$	sí
			$K_m$	sí	$k_{12}$	sí
				$k_{21}$	sí	
500	Vd/F	no	Vd/F	sí	Vd/F	sí
	$k_a$	no	$k_a$	sí	$k_a$	sí
	$k_e$	no	$V_m$	sí	$k_e$	sí
			$K_m$	sí	$k_{12}$	sí
				$k_{21}$	sí	
700	Vd/F	sí=2	Vd/F	no	Vd/F	sí
	$k_a$	sí=1	$k_a$	sí	$k_a$	sí
	$k_e$	sí=2	$V_m$	sí	$k_e$	sí
			$K_m$	sí	$k_{12}$	sí
				$k_{21}$	sí	
1200	Vd/F	no	Vd/F	sí	Vd/F	sí
	$k_a$	no	$k_a$	sí	$k_a$	sí
	$k_e$	sí=4	$V_m$	sí	$k_e$	sí
			$K_m$	sí	$k_{12}$	sí
				$k_{21}$	sí	

Monocompartimental: modelo monocompartimental. Monocompartimental+MM: modelo monocompartimental con cinética de Michaelis-Menten. Bicompartmental: modelo bicompartmental. Incl de 0 en el IC: inclusión del 0 en el Intervalo de confianza.

peor valor de ajuste por inclusión de 0 en el IC

## 1.4.- Modelo seleccionado

Ante el ajuste individual de voluntarios a diferentes modelos para la misma dosis se decidió seleccionar como estrategia de cálculo la aproximación de promediado simple.

Ante los resultados obtenidos en el AIC, índice de correlación y la pausibilidad de las estimaciones de los parámetros se decidió seleccionar como modelo que presentaba una mayor bondad de ajuste el modelo monocompartimental con eliminación lineal.

Los parámetros que se obtuvieron que caracterizaban al modelo monocompartimental con eliminación lineal bajo la estrategia de promediado simple para las 3 dosis únicas en las que no se podía descartar que hubiera linealidad cinética se presentan en la tabla R-III-4.

**Tabla R-III-4:** Valores obtenidos para los parámetros farmacocinéticos calculados mediante el ajuste de un modelo farmacocinético monocompartimental con eliminación lineal bajo la estrategia de promediado simple.

Parámetro	Dosis Unidades	240mg		350mg		500mg	
		Valor	EEP	Valor	EEP	Valor	EEP
$AUC_{0-\infty}$	(mg/L)h	246,58	(27,85)	417,72	(19,08)	1240,19	(60,21)
$AUC_{0-\infty}/D$	(h/L)	1,03	(27,85)	1,19	(19,08)	2,48	(60,21)
$C_{max}$	(mg/L)	8,42	(18,74)	12,32	(35,93)	14,83	(22,28)
$C_{max}/D$	(L <sup>-1</sup> )	0,04	(18,74)	0,04	(35,93)	0,03	(22,28)
$t_{max}$	(h)	5,93	(56,40)	7,21	(44,59)	12,04	(66,09)
Vd/F	(L)	22,76	(20,28)	23,53	(50,88)	30,89	(20,89)
Cl/F	(L/h)	1,05	(32,73)	0,87	(25,21)	0,43	(70,69)
$K_e$	(h <sup>-1</sup> )	0,05	(30,27)	0,05	(51,33)	0,02	(69,61)
$t_{1/2}$	(h)	15,92	(30,73)	19,71	(62,29)	52,49	(0,77)
$k_a$	(h <sup>-1</sup> )	0,65	(77,48)	0,45	(60,69)	0,42	(32,23)
$t_{1/2}k_a$	(h)	1,75	(75,20)	1,44	(46,81)	1,78	(31,87)

EEP: error estándar del parámetro. Variabilidad dependiente del modelo farmacocinético al que se ajusta.

## 2.- SIMULACIONES

Para la simulación a dosis repetida se utilizó el modelo seleccionado (monocompartimental con eliminación lineal bajo estrategia del promediado simple) con los parámetros correspondientes, asumiendo un comportamiento lineal (Tabla R-III-5).

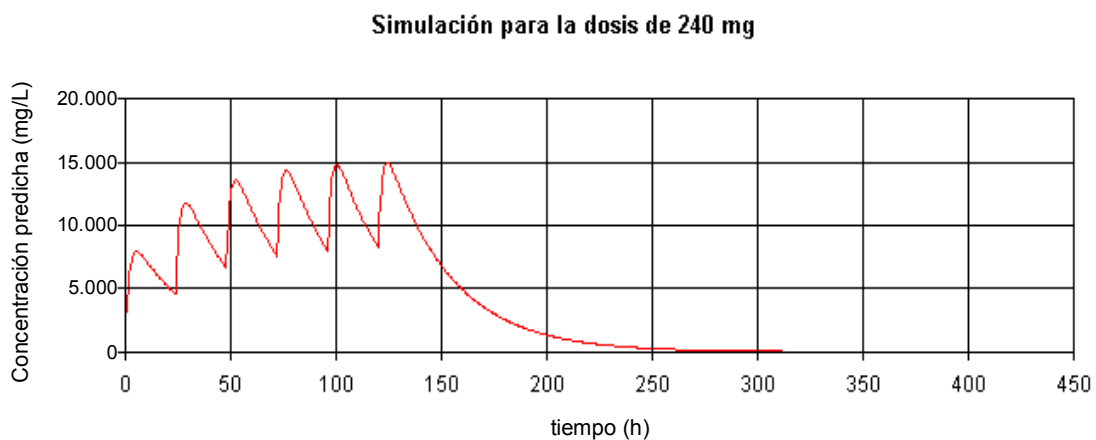
**Tabla R-III-5:** Parámetros empleados para las dosis de 240mg, 350mg y 500mg de AM-24.

Dosis (mg)	volumen/F (L)	$k_a$	$k_e$
240	22,76	0,65	0,05
350	23,53	0,45	0,05
500	30,89	0,42	0,02

### 2.1.- Dosis de 240mg/día durante 6 días

Para la dosis de 240mg, el  $C_{max}$  obtenido fue de 14,930mg/L el  $C_{min}$  de 8,216mg/L, el  $C_{av}$  de 11,876mg/L y la fluctuación equivalente a un 56,532%. (Figura R-III-1; Tabla R-III-6)

**Figura R-III-1:** Concentración (mg/L)-tiempo (h) de la simulación a dosis repetida para la dosis de 240 mg.

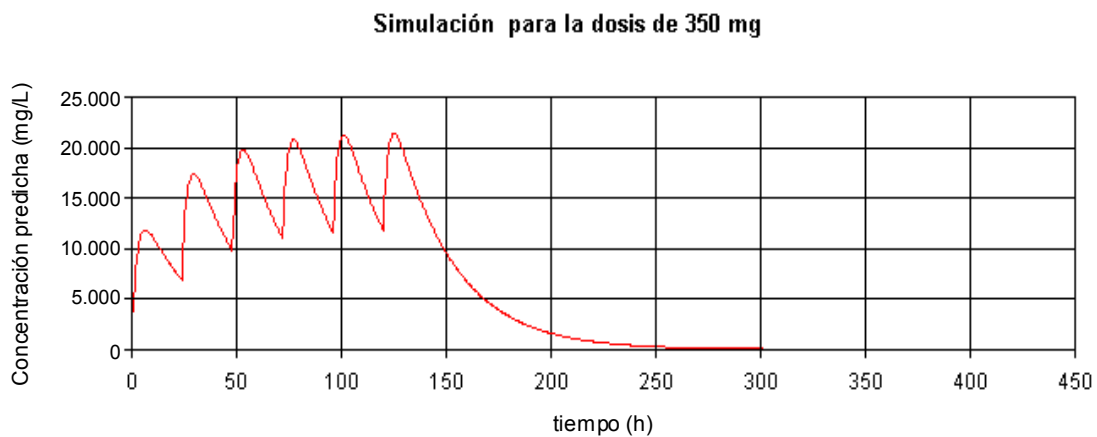




## 2.2.- Dosis de 350mg/día durante 6 días

Para la dosis de 350mg, el  $C_{max}$  obtenido fue de 21,420mg/L, el  $C_{min}$  de 11,810mg/L, el  $C_{av}$  de 17,210mg/L y la fluctuación equivalente a un 55,822% (Figura R-III-2; Tabla R-III-6).

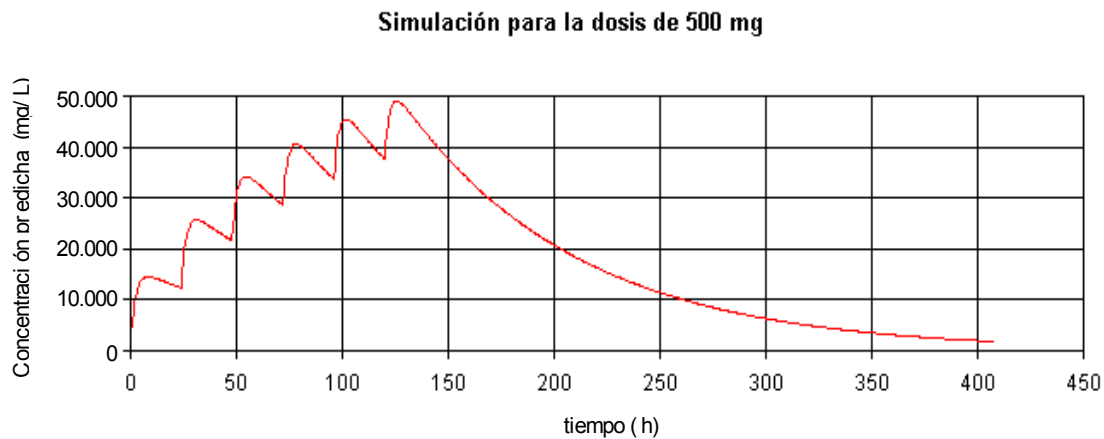
**Figura R-III-2:** Concentración (mg/L)-tiempo(h) de la simulación a dosis repetida para la dosis de 350mg.



## 2.3.- Dosis de 500mg/día durante 6 días

Para la dosis de 500mg, el  $C_{max}$  obtenido fue de 49,100mg/L, el  $C_{min}$  de 37,600mg/L, el  $C_{av}$  de 45,378mg/L y la fluctuación equivalente a un 25,342% (Figura R-III-3; Tabla R-III-6).

**Figura R-III-3:** Concentración (mg/L)-tiempo(h) de la simulación a dosis repetida para la dosis de 500mg.



**Tabla R-III-6:** Tabla resumen de los parámetros finales obtenidos tras la simulación a dosis repetida.

Dosis (mg)	C <sub>max</sub> (mg/L)	C <sub>min</sub> (mg/L)	C <sub>av</sub> (mg/L)	Fluctuación (%)
240	14,930	8,216	11,876	56,532
350	21,420	11,810	17,210	55,822
500	49,100	37,600	45,378	25,342

## 2.4.- Propuesta de diseño para la realización del estudio a dosis repetida

En vista de los resultados expuestos previamente, se cree que el diseño más apropiado para un estudio a dosis repetida sería el de un Ensayo Clínico de fase I, unicéntrico, aleatorizado, paralelo, doble ciego y controlado con placebo, en voluntarios sanos.

Debido a que el objetivo principal de ese ensayo sería la evaluación de la tolerabilidad, se considera indispensable la existencia de un tratamiento control con placebo. De forma secundaria se evaluaría la farmacocinética del fármaco.

Los resultados obtenidos en el estudio realizado “ex vivo” en el hombre en relación al grado de inhibición de la producción de LTB<sub>4</sub>, que a su vez indica el grado de inhibición de la enzima 5-LOX por el fármaco en estudio, AM-24, conjuntamente con los obtenidos a partir

de la simulación del perfil farmacocinético a dosis repetidas, nos indican que el régimen posológico que con mayor probabilidad permitiría alcanzar la concentración plasmática capaz de ejercer un efecto inhibitorio del 50% sería el de 350mg orales de AM-24 cada 24 horas. Por ello, para el protocolo de Ensayo Clínico se propusieron como dosis a evaluar, una inferior y una superior a la presuntamente terapéutica, es decir, las dosis de 240mg, 350mg y 500mg.

Se creyó que con 32 voluntarios sanos sería suficiente para alcanzar los objetivos planteados (n=8 por grupo experimental). El estudio tendría una duración total de 19 días. En un primer día experimental se procedería a la valoración farmacocinética tras administración de una dosis oral única y al que seguiría un período de seguimiento de 6 días. A continuación se administraría medicación, tras la realización de una extracción basal durante 6 días, procediéndose en este momento a realizar la valoración farmacocinética tras dosis repetida. Se continuaría con un período de seguimiento de 6 días, momento en que finalizaría el ensayo.

## PARTE IV: INVESTIGACIÓN “IN VIVO”: ESTUDIO EXPERIMENTAL EN VOLUNTARIOS SANOS TRAS ADMINISTRACIÓN ORAL REPETIDA DE AM-24 A LAS DOSIS DE 240, 350 Y 500 mg (UNA VEZ AL DÍA DURANTE 6 DÍAS)

### 1.- DESCRIPCIÓN DE LA POBALCIÓN PARTICIPANTE

#### 1.1.- Datos demográficos

Se incluyeron un total de 32 voluntarios varones sanos de raza blanca caucásica. La edad de los mismos osciló entre los 20 y 32 años ( $\bar{x} = 25,69 \pm 3,05$ ), el peso entre 54,1 y 92kg ( $\bar{x} = 72,25 \pm 9,14$ ) y la talla entre 157 y 194cm ( $\bar{x} = 178,88 \pm 7,89$ ). Presentaron un índice de Quetelet (I de Quetelet= peso (kg) / talla<sup>2</sup> (m)) que osciló entre 20 y 26kg/m<sup>2</sup> ( $\bar{x} = 23,50 \pm 1,70$ ).

En la tabla R-IV-1 se muestran los valores de la media y desviación estándar de los parámetros demográficos de los voluntarios sanos, para cada una de las dosis administradas.

**Tabla R-IV-1:** Medias y desviaciones estándar (DE) de los parámetros demográficos de los voluntarios sanos que participaron en el estudio, para cada una de las dosis administradas y para placebo.

Dosis		Edad (años)	Peso (kg)	Talla (cm)	Índice de Quetelet (Kg/m <sup>2</sup> )
Placebo	Media	24,38	66,03	171,25	22,50
	DE	2,56	7,79	8,36	1,60
240 mg	Media	27,25	74,00	175,75	23,88
	DE	2,12	7,23	5,28	1,81
350 mg	Media	24,88	76,82	176,88	24,50
	DE	3,04	7,16	8,04	1,20
500 mg	Media	26,25	72,16	175,63	23,13
	DE	3,88	11,57	9,58	1,73

## **1.2.- Anamnesis y exploración física**

Los resultados de la anamnesis de los voluntarios sanos, antecedentes patológicos, médicos y quirúrgicos, mostró que la mayor parte de ellos no presentaban antecedentes patológicos; en cuanto a aquellos voluntarios sanos incluidos que sí presentaban, el dato más relevante fue el antecedente de intervenciones quirúrgicas menores: apendicectomía, adenoidectomía, fimosis e intervenciones por causas traumatológicas.

En relación con los antecedentes familiares destaca la presencia de enfermedades oncológicas y cardiovasculares.

De los 32 voluntarios, 18 no eran fumadores y los 14 restantes fumaban como máximo 10 cigarrillos diarios. En cuanto a la ingesta de alcohol, 16 voluntarios no eran consumidores y el resto, 16, no excedía un volumen de 150c.c. por semana, tampoco eran consumidores importantes de bebidas estimulantes (más de 5 cafés, bebidas de cola o té al día) y ninguno de ellos presentó positividad en las pruebas de detección de drogas en orina (cannabis, cocaína, anfetaminas, benzodiazepinas y opiáceos). Los voluntarios no tomaban habitualmente ninguna medicación.

Todas las exploraciones físicas realizadas a los voluntarios por sistemas en el momento de la selección (piel y mucosas, ojos, oído, nariz y garganta, sistema cardiovascular, respiratorio, digestivo, genito-urinario, locomotor, nervioso y linfático) fueron normales, salvo en uno de los voluntarios, que, a la exploración ocular presentaba pterigion en el ojo izquierdo, que se consideró sin relevancia clínica.

## **1.3.- Constantes vitales**

En la tabla R-IV-2 se recogen la media y la desviación estándar (DE) de las constantes vitales obtenidas en los voluntarios en el momento de la selección, en particular de la presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y frecuencia cardíaca (FC), tanto en decúbito supino como en ortostatismo y de la temperatura axilar (T).

**Tabla R-IV-2:** Valores medios ( $\pm$ DE) de las constantes vitales (PAS, PAD, FC y T) obtenidos en los voluntarios sanos el momento de la selección, para cada una de las dosis que serían administradas posteriormente y placebo.

Dosis	Placebo (n=8)	240mg (n=8)	350mg (n=8)	500mg (n=8)
Parámetro	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Presión arterial sistólica <sup>a</sup> (mmHg)	118,13 $\pm$ 5,91	124,50 $\pm$ 10,98	119,38 $\pm$ 10,97	119,38 $\pm$ 9,77
Presión arterial diastólica <sup>a</sup> (mm Hg)	60,50 $\pm$ 5,32	64,75 $\pm$ 6,14	60,00 $\pm$ 7,05	61,63 $\pm$ 6,32
Presión arterial sistólica <sup>b</sup> (mm Hg)	117,25 $\pm$ 12,40	123,13 $\pm$ 5,82	117,38 $\pm$ 8,94	118,38 $\pm$ 9,38
Presión arterial diastólica <sup>b</sup> (mm Hg)	68,25 $\pm$ 6,65	72,25 $\pm$ 7,89	68,00 $\pm$ 8,59	70,75 $\pm$ 7,76
Frecuencia cardiaca <sup>a</sup> (min <sup>-1</sup> )	67,38 $\pm$ 8,86	71,00 $\pm$ 12,75	71,25 $\pm$ 12,31	71,63 $\pm$ 17,38
Frecuencia cardiaca <sup>b</sup> (min <sup>-1</sup> )	68,38 $\pm$ 16,32	71,75 $\pm$ 10,79	70,38 $\pm$ 12,84	70,88 $\pm$ 16,56
Temperatura axilar (°C)	35,94 $\pm$ 0,12	36,01 $\pm$ 0,17	35,91 $\pm$ 0,25	35,86 $\pm$ 0,16

a: decúbito supino; b: ortostatismo

## 1.4.- Electrocardiograma

En la tabla R-IV-3 se recogen la media y la desviación estándar (DE) de los parámetros derivados del electrocardiograma de los voluntarios en el momento de la selección.

**Tabla R-IV-3:** Valores medios ( $\pm$ DE) de los principales parámetros electrocardiográficos (ECG de 12 derivaciones) obtenidos en los voluntarios sanos en el momento de la selección, para cada una de las dosis que serían administradas posteriormente y placebo.

Dosis	Placebo (n=8)	240 mg (n=8)	350 mg (n=8)	500 mg (n=8)
Parámetro	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Frecuencia cardiaca (min <sup>-1</sup> )	56,00 $\pm$ 7,23	65,00 $\pm$ 9,53	60,75 $\pm$ 7,89	61,00 $\pm$ 15,08
Onda P (ms)	100,00 $\pm$ 10,25	99,75 $\pm$ 8,58	100,00 $\pm$ 7,41	98,25 $\pm$ 12,40
Intervalo QRS (ms)	96,25 $\pm$ 11,13	86,50 $\pm$ 5,53	96,50 $\pm$ 4,38	98,25 $\pm$ 13,11
Intervalo PR (ms)	149,75 $\pm$ 15,54	156,25 $\pm$ 22,54	153,50 $\pm$ 21,16	152,00 $\pm$ 26,79
Intervalo QT (ms)	390,50 $\pm$ 21,85	395,50 $\pm$ 29,85	386,50 $\pm$ 30,91	390,00 $\pm$ 41,29
Intervalo QTC (ms)	383,00 $\pm$ 15,00	402,88 $\pm$ 21,62	387,13 $\pm$ 21,01	391,25 $\pm$ 22,41

min: minutos. ms: milisegundos

## 1.5.- Parámetros de laboratorio

### 1.5.1.- Hematología

En la tabla R-IV-4 se recogen la media y la desviación estándar (DE) de los parámetros hematológicos de los voluntarios en el momento de la selección.

**Tabla R-IV-4:** Valores medios ( $\pm$ DE) de los parámetros hematológicos obtenidos en los voluntarios sanos en el momento de la selección, para cada una de las dosis que serían administradas posteriormente y placebo.

Dosis	Placebo (n=8)	240mg (n=8)	350mg (n=8)	500mg (n=8)
Parámetro	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Hemoglobina (g/dL)	147,13 $\pm$ 10,58	149,63 $\pm$ 9,29	141,75 $\pm$ 7,57	145,63 $\pm$ 7,91
Hematocrito (L/L)	0,43 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,03	0,42 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,01
Hematíes (X10E12/L)	4,96 $\pm$ 0,42	4,99 $\pm$ 0,20	4,81 $\pm$ 0,35	4,84 $\pm$ 0,16
VCM (fL)	86,17 $\pm$ 2,96	88,64 $\pm$ 3,87	86,55 $\pm$ 2,89	87,54 $\pm$ 3,02
CCMH (g/L)	344,38 $\pm$ 4,31	338,75 $\pm$ 7,17	341,63 $\pm$ 9,38	344,00 $\pm$ 14,46
HCM (pg)	29,66 $\pm$ 0,88	29,99 $\pm$ 1,03	29,56 $\pm$ 1,30	30,11 $\pm$ 1,54
RDW (%)	13,23 $\pm$ 1,69	15,24 $\pm$ 1,52	13,21 $\pm$ 2,52	13,46 $\pm$ 1,39
Plaquetas (X10E9/L)	204,75 $\pm$ 40,14	251,38 $\pm$ 35,94	215,13 $\pm$ 17,89	214,00 $\pm$ 39,63
VPM (fL)	8,73 $\pm$ 0,83	8,55 $\pm$ 0,67	8,70 $\pm$ 1,03	8,69 $\pm$ 0,93
Plaquetocrito (%)	0,15 $\pm$ 0,05	0,21 $\pm$ 0,04	0,20 $\pm$ 0,00	0,20 $\pm$ 0,05
Leucocitos (X10E9/L)	5,98 $\pm$ 1,73	6,24 $\pm$ 1,52	5,88 $\pm$ 1,21	5,49 $\pm$ 0,38
Neutrófilos seg. (X10E9/L)	3,30 $\pm$ 1,34	3,47 $\pm$ 1,18	3,32 $\pm$ 0,92	3,21 $\pm$ 0,51
Eosinófilos (X10E9/L)	0,20 $\pm$ 0,06	0,23 $\pm$ 0,13	0,14 $\pm$ 0,11	0,18 $\pm$ 0,10
Basófilos (X10E9/L)	0,03 $\pm$ 0,01	0,05 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,02
Monocitos (X10E9/L)	0,40 $\pm$ 0,15	0,44 $\pm$ 0,24	0,34 $\pm$ 0,07	0,34 $\pm$ 0,09
Linfocitos (X10E9/L)	2,04 $\pm$ 0,34	2,05 $\pm$ 0,47	2,03 $\pm$ 0,65	1,72 $\pm$ 0,20

## 1.5.2.- Bioquímica

### 1.5.2.1.- Estándar

#### *Sangre*

En la tabla R-IV-5 se recogen la media y la desviación estándar (DE) de los parámetros bioquímicos estándar en sangre de los voluntarios en el momento de la selección.

**Tabla R-IV-5:** Valores medios ( $\pm$ DE) de los parámetros bioquímicos obtenidos en los voluntarios sanos en el momento de la selección, para cada una de las dosis que serían administradas posteriormente y placebo.

Dosis	Placebo (n=8)	120mg (n=8)	240mg (n=8)	500mg (n=8)
Parámetro	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Glucosa (mmol/L)	4,54 $\pm$ 0,30	4,52 $\pm$ 0,16	4,60 $\pm$ 0,40	4,72 $\pm$ 0,32
Urea (mmol/L)	5,45 $\pm$ 1,22	5,64 $\pm$ 1,16	5,28 $\pm$ 1,09	5,25 $\pm$ 1,31
Creatinina (Umol/L)	107,00 $\pm$ 9,09	101,25 $\pm$ 8,21	99,50 $\pm$ 10,32	102,75 $\pm$ 8,88
Bilirrubina total (Umol/L)	13,50 $\pm$ 2,88	15,63 $\pm$ 5,45	11,75 $\pm$ 4,83	10,75 $\pm$ 3,58
Bilirrubina directa (Umol/L)	3,38 $\pm$ 0,92	3,88 $\pm$ 1,64	3,75 $\pm$ 1,58	3,25 $\pm$ 1,75
Triglicéridos (mmol/L)	0,73 $\pm$ 0,33	1,05 $\pm$ 0,44	0,61 $\pm$ 0,22	0,93 $\pm$ 0,48
Colesterol total (mmol/L)	4,69 $\pm$ 1,00	4,97 $\pm$ 0,87	3,90 $\pm$ 0,83	4,02 $\pm$ 0,95
ASAT (UI/L)	18,38 $\pm$ 4,78	17,13 $\pm$ 3,98	19,38 $\pm$ 5,63	14,13 $\pm$ 3,14
ALAT (UI/L)	16,00 $\pm$ 6,09	19,00 $\pm$ 9,06	17,50 $\pm$ 8,86	15,13 $\pm$ 7,59
Fosfatasa alcalina (UI/L)	153,88 $\pm$ 22,05	187,00 $\pm$ 45,65	146,50 $\pm$ 35,90	160,13 $\pm$ 26,93
GGT (UI/L)	14,75 $\pm$ 4,71	19,13 $\pm$ 6,77	11,50 $\pm$ 1,20	15,88 $\pm$ 6,06
Proteínas totales (g/L)	72,44 $\pm$ 4,66	74,43 $\pm$ 4,54	71,07 $\pm$ 2,83	71,75 $\pm$ 4,22

#### *Orina*

Los valores obtenidos en los parámetros del urianálisis en los voluntarios sanos en el momento de la selección estuvieron en todos los casos dentro de la normalidad.



### 1.5.2.2.- Específica

#### *Niveles de TSH*

En la tabla R-IV-6 se recogen la media y la desviación estándar (DE) de las concentraciones de TSH en plasma de los voluntarios en el momento de la selección.

**Tabla R-IV-6:** Valores medios ( $\pm$ DE) de los niveles de TSH obtenidos en los voluntarios sanos en el momento de la selección, para cada una de las dosis que serían administradas posteriormente y placebo.

Dosis	Placebo (n=8)	120mg (n=8)	240mg (n=8)	500mg (n=8)
Parámetro	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Tirotropina (mUI/L)	1,84 $\pm$ 0,99	1,92 $\pm$ 0,88	1,53 $\pm$ 0,53	1,28 $\pm$ 0,67

#### *Sangre oculta en heces*

El análisis de sangre oculta en heces efectuado en el momento de la selección fue negativo en todos los casos.

### 1.5.3.- Sedimento urinario

Los valores obtenidos en el análisis microbiológico del sedimento de orina en los voluntarios sanos en el momento de la selección estuvieron en todos los casos dentro de la normalidad.

## 1.6.- Otras evaluaciones efectuadas en el momento de la selección

Los resultados de la serología realizada para los virus de la hepatitis C, hepatitis B y VIH fueron negativos en todos los casos.

El screening urinario de drogas fue negativo para todas las drogas testadas en el período de selección en todos los voluntarios.

## 2.- TOLERABILIDAD

Todos los sujetos acudieron a las visitas hospitalarias establecidas en el protocolo y completaron la fase experimental del ensayo. Consecuentemente, todos los datos pudieron ser considerados para la tolerabilidad y la aceptabilidad del producto.

Los voluntarios tomaron la medicación del estudio en presencia de un miembro del equipo investigador. El cumplimiento fue del 100% para todas las dosis de tratamiento.

Durante el desarrollo del estudio estaba permitida la toma de paracetamol y metamizol (Nolotil<sup>®</sup>) excepcionalmente y a criterio del investigador. Todas las medicaciones concomitantes que necesitaron ser dispensadas durante todo el desarrollo del estudio fueron recogidas en los CRD correspondientes, y se detallan a continuación:

- Voluntario nº 26 (tratamiento A: placebo): Tomó 2 comprimidos de metamizol. Uno lo tomó el día 3 de estudio (seguimiento de la dosis única) y otro el día 7 de estudio (primera administración de la dosis repetida) a +2h30min de haber recibido la medicación en estudio. Ambos se administraron por la aparición de cefalea.
- El voluntario nº 2 (tratamiento C: AM-24 240mg) tomó dos comprimidos de paracetamol (500mg cada uno) el día 10 de estudio (administración de la dosis repetida) a +5 y +14 horas postadministración de la medicación, respectivamente. El motivo de la administración de dicho tratamiento concomitante fue por la aparición de un resfriado.
- El voluntario nº 13 (Tratamiento D: AM-24 350mg) debido a la aparición de un resfriado tomó 500mg de paracetamol a +7d de la administración de la dosis única.
- Voluntario nº 31 (Tratamiento B: AM-24 500mg): Debido a la aparición de un herpes labial se aplicó en dos ocasiones Aciclovir<sup>®</sup> el día 3 de estudio (seguimiento de la dosis única).

En ninguno de los casos descritos se produjo ninguna alteración o reacción compatible con una interacción farmacológica, por lo que se considera únicamente como datos descriptivos.

## 2.1.- Cuestionario de acontecimientos adversos sugeridos

En la tabla R-IV-7 se recoge el número de individuos que reportan cada uno de los AA sugeridos que se registraron durante el estudio para cada uno de los tratamientos administrados. Los voluntarios podían reportar más de un acontecimiento adverso.

**Tabla R-IV-7:** Número de individuos que reportan cada uno de los acontecimientos adversos sugeridos, expresado por tipo de acontecimiento adverso y por tratamiento administrado, en orden de frecuencia.

Nº de Item. Efecto	Placebo	240mg	350mg	500mg	Total	% sobre el total de voluntarios
20. Somnoliento, con modorra	4	4	6	4	18/32	56,25
1. Boca seca	6	4	3	3	16/32	50
4. Dolor de cabeza	5	4	3	1	13/32	40,62
15. Cansancio general	4	3	4	2	13/32	40,62
11. Diarrea	1	2	2	1	6/32	18,75
12. Estreñimiento	2	1	2	0	5/32	15,62
5. Mareado al incorporarse	1	1	2	0	4/32	12,5
21 Insomnio	1	2	1	0	4/32	12,5
22. Intranquilo, nervioso	1	1	0	1	3/32	9,37
2. Visión borrosa	1	0	1	0	2/32	6,25
3. Cara ruborizada	1	0	1	0	2/32	6,25
9. Molestias gástricas	2	0	0	0	2/32	6,25
13. Acorchamiento de extremidades	0	0	2	0	2/32	6,25
17. Falta de fuerza en (extremidades)	1	0	1	0	2/32	6,25
19. Temblores	0	1	1	0	2/32	6,25
25. Desconectado	1	0	1	0	2/32	6,25
6. Vértigo	0	0	1	0	1/32	3,12
16. Falta de fuerza en caderas	1	0	0	0	1/32	3,12
24. Sensación de embriaguez	0	0	1	0	1/32	3,12
7. Palpitaciones	0	0	0	0	0/32	0
8. Ardor (malestar epigástrico)	0	0	0	0	0/32	0
10. Nauseas	0	0	0	0	0/32	0
14. Calambres	0	0	0	0	0/32	0
18. Marcha inestable	0	0	0	0	0/32	0
23. Deprimido, triste	0	0	0	0	0/32	0
26. Otros	0	0	0	0	0/32	0
<b>Total *</b>	<b>32</b>	<b>23</b>	<b>32</b>	<b>12</b>		

\* Los voluntarios podían presentar más de un acontecimiento adverso.

## Resultados IV

De los 26 ítems contenidos en el cuestionario de AA referidos, el que notificaron más voluntarios fue el de “somnoliento, con modorra” (56,25% de los voluntarios participantes), seguido de “boca seca” 50%, “dolor de cabeza” y “cansancio general” 40,62%, “diarrea” 18,75% y los ítems “insomnio” y “mareado al incorporarse” en un 12,5% de los voluntarios. Notificaron “intranquilo, nervioso” un 9,37% y los ítems “visión borrosa”, “cara ruborizada”, “ardor”, “acorchamiento extremidades”, “falta de fuerza en extremidades”, “temblores”, y “desconectado” únicamente un 6,25% de los voluntarios. Ninguno de los voluntarios señaló en el cuestionario los ítems “palpitaciones”, “ardor epigástrico”, “náuseas”, “calambres”, “marcha inestable” ni “deprimido, triste”.

En la tabla R-IV-8 se puede observar el número total de AA sugeridos reportados durante todo el estudio desglosados en función del acontecimiento adverso por orden de frecuencia, el tratamiento administrado, del período del estudio (dosis única/dosis repetida) y del momento de su notificación (basal/final).

**Tabla R-IV-8:** Número total de ocasiones en las que se reportan acontecimientos adversos sugeridos en orden de frecuencia con relación al tratamiento administrado, al período del estudio (dosis única/dosis repetida) y al momento de notificación (basal/final).

Dosis Nº ítem. Efecto	Placebo				240 mg				350 mg				500 mg				Nº AA (%)
	DU		DM		DU		DM		DU		DM		DU		DM		
	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	
1. Boca seca	4	18	3	30	2	23	2	27	2	8	2	14	2	10	1	3	151 (34,32)
20. Somnoliento, con modorra	3	14	0	9	1	10	0	10	2	20	3	41	3	18	1	10	145 (32,95)
15. Cansancio general	1	7	1	2	0	7	0	5	1	5	1	4	1	8	0	1	44 (10)
4. Dolor de cabeza	1	3	0	5	1	3	0	16	1	0	1	3	0	1	0	0	35 (7,95)
11. Diarrea	0	0	0	2	0	1	1	1	0	4	0	3	0	0	0	2	14 (3,18)
12. Estreñimiento	1	0	0	1	0	2	0	0	0	2	0	3	0	0	0	0	9 (2,04)
9. Molestias gástricas	0	2	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8 (0,18)
5. Mareado al incorporarse	0	1	0	0	0	0	0	2	1	1	1	1	0	0	0	0	7 (1,59)
21. Insomnio	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	5 (1,14)
3. Cara ruborizada	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	4 (0,90)
22. Intranquilo, nervioso	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	4 (0,90)
2. Visión borrosa	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	3 (0,68)
13. Acorchamiento de extremidades	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2 (0,45)
17. Falta de fuerza en extremidades	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2 (0,45)
19. Temblores	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2 (0,45)
25. Desconectado	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	2 (0,45)
6. Vértigo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1 (0,22)
16. Falta de fuerza en caderas	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (0,22)

Dosis	Placebo				240 mg				350 mg				500 mg				N° AA (%)
	DU		DM		DU		DM		DU		DM		DU		DM		
	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	B	F	
24. Sensación de embriaguez	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1 (0,22)
7. Palpitaciones	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8. Ardor (malestar epigástrico)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10. Nauseas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14. Calambres	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18. Marcha inestable	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23. Deprimido, triste	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26. Otros	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>50</b>	<b>5</b>	<b>55</b>	<b>6</b>	<b>47</b>	<b>3</b>	<b>62</b>	<b>8</b>	<b>42</b>	<b>14</b>	<b>71</b>	<b>7</b>	<b>38</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>440</b>

DU: dosis única; DM: dosis repetida; B: basal; F: final. AA: acontecimientos adversos

El número total posible de acontecimientos adversos sugeridos, en el caso de que cada uno de los voluntarios hubiese anotado cada uno de los ítems sugeridos en cada uno de los tiempos de registro, hubiese sido de 26,208 AA sugeridos.

El número total real de AA tras cuestionario fue de 440. El más frecuentemente notificado fue el ítem “boca seca” con una frecuencia del 34,32%, seguido de “somnoliento” con 32,95%, “cansancio general” en un 10%, “dolor de cabeza” en un 7,95%, “diarrea” en un 3,18%, “estreñimiento” en un 2,4%, “molestias gástricas” en un 1,81%, “mareado al incorporarse” en un 1,59% y de “insomnio” en un 1,14%. Con menor frecuencia se notificó “cara ruborizada” e “intranquilo” (0,90%), “visión borrosa” (0,68%), “acorchamiento”, “falta de fuerza”, “temblores” y “desconectado” (0,45%) y “vértigo”, “falta de fuerza en las caderas” y “sensación de embriaguez” (0,22%).

Si se analiza la frecuencia de aparición de AA adversos referidos en relación al tratamiento administrado, se puede observar que la dosis a la que se notificaron más AA fue la de 350mg (30,68%). Es de señalar, que el tratamiento administrado que le siguió en frecuencia y tras el que se notificaron un 28,18% de los AA fue el placebo (15,32%). Seguidamente, el porcentaje de AA notificados para la dosis de 240 fue del 26,81% y del 14,32% para la dosis de 500mg.

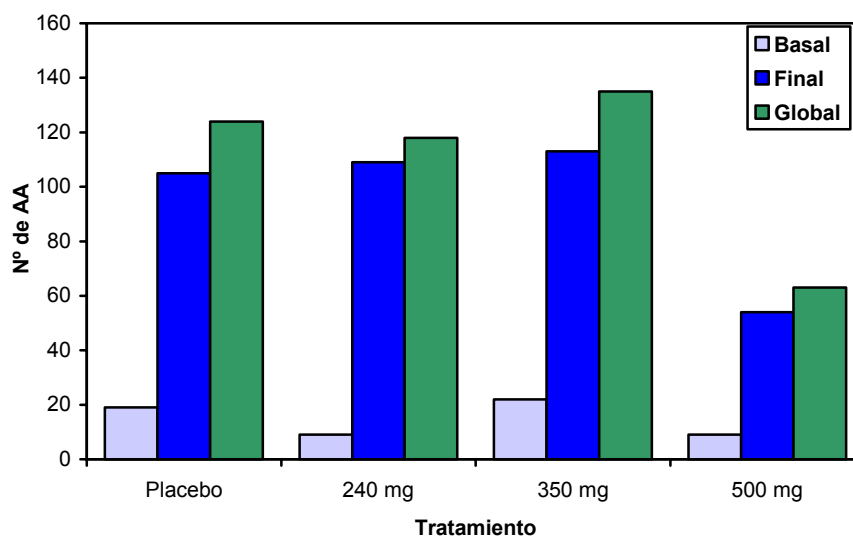
De las 27 ocasiones en las que se facilitaba a los voluntarios el cuestionario de AA para ser contestado, 2 se realizaba en el momento basal (uno antes de la administración de la dosis única y el otro antes del inicio de la administración de la dosis repetida) y las 25 restantes a lo largo del estudio (10 tras DU y 15 tras DM), quedando englobadas dichas anotaciones como registro en el momento final del estudio.

Así, en el momento basal aparecieron un total de 59 AA lo que representa un 13,41% de los AA notificados (59,32 % antes de la dosis única y 40,67 % antes de la dosis repetida). En el momento final de los distintos períodos del estudio aparecieron globalmente 381 AA tras cuestionario, lo que representa un 86,59 % del los AA notificados por esta vía (46,46% tras la dosis única y 53,54% tras la dosis repetida).

Así el análisis de los AA sugeridos, según el momento de su notificación (basal/final) y en función de los tratamientos administrados muestra que de los 135 AA reportados para la dosis de 350mg, el 16,30% (22 AA) fue en el momento basal y el 83,70% (113 AA) en el momento final. Esta tendencia se repite para el resto de tratamientos administrados. En el caso del placebo, se notificaron 124 AA, 19 (15,32%) en el momento basal y 105 (84,63%) al final del estudio. Seguidamente, el número de AA notificados para la dosis de 240 fue del 118, 9 de ellos (7,62%) a tiempo basal y 109 (92,38 %) a tiempo final. De los 63 AA notificados para la dosis de 500mg, 9 (14,29%) lo fueron a tiempo basal y los 54 restantes (85,71%) al final del estudio.

En la figura R-IV-1 se encuentran representados gráficamente el número de AA sugeridos notificados para cada uno de los tratamientos administrados y desglosados en función del momento de la notificación (basal/final).

**Figura R-IV-1:** Número de AA notificados en el cuestionario de acontecimientos sugeridos en función del tratamiento administrado y desglosado según el momento de la notificación (basal/final).

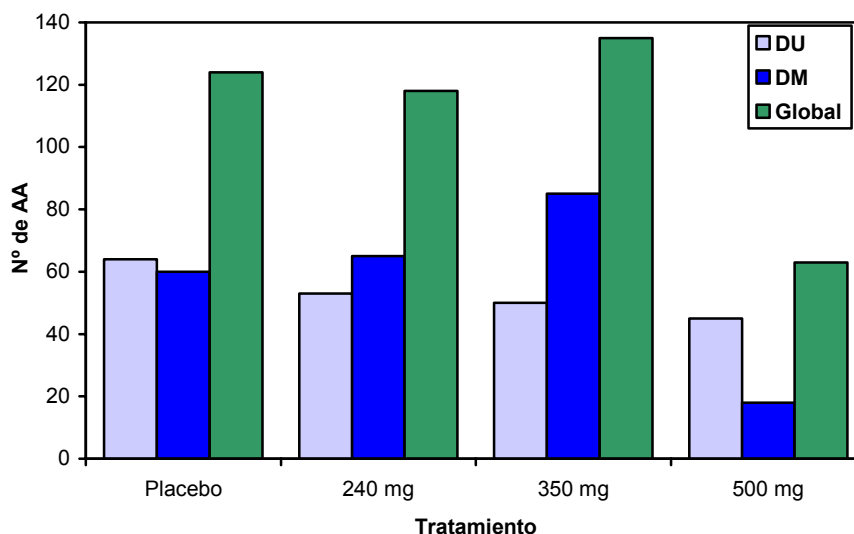


En los distintos periodos del estudio (dosis única/dosis repetida) la notificación global de AA sugeridos fue similar, siendo de 212 (48,18% del total) y 228 (51,82% del total) para la dosis única y repetida respectivamente.

Si se analiza la frecuencia de aparición de AA adversos referidos tras dosis única o repetida en relación al tratamiento administrado, se puede observar que a la dosis de 350mg, de los 135 AA notificados, 50 (37,03%) lo fueron tras la dosis única y 85 (62,96%) tras la dosis repetida. En el caso del placebo, de los 124 AA notificados, 64 (51,61%) fueron notificados tras dosis única y 60 (48,39%) tras dosis repetida. El resto de tratamientos administrados siguió la misma tendencia, siendo, para la dosis de 240mg, 53 de los 118 AA (44,91%) notificados tras la dosis única y 65 (55,08%) tras la dosis repetida. Finalmente, de los 63 AA referidos notificados tras la dosis de 500mg, un 71,42% (45 AA) fue tras dosis única y un 28,57% (18 AA) tras dosis repetida.

En la figura R-IV-2 se puede apreciar gráficamente el número de AA aparecidos tras dosis única o repetida en función del tratamiento administrado.

**Figura R-IV-2:** Número de AA notificados en el cuestionario de acontecimientos sugeridos en función del tratamiento administrado y desglosado en relación al período de tratamiento (dosis única/repetida).



La tabla R-IV-9 contiene una síntesis del número total de AA sugeridos notificados durante el estudio en función del tratamiento administrado, el momento de la notificación (basal-final) y el período del estudio (dosis única-dosis repetida).

**Tabla R-IV-9:** Tabla resumen del número de AA sugeridos desglosados por tratamiento, momento de la notificación (basal/final) y períodos del estudio (dosis única/dosis repetida).

Momento de Notificación	Periodo	Placebo	240 mg	350 mg	500 mg	Total	% sobre el total	% B/F	% DU/DM sobre B/F
Basal	DU	14	6	8	7	35	7,95	13,41	59,32
	DM	5	3	14	2	24	5,45		40,67
Final	DU	50	47	42	38	177	40,23	86,59	46,46
	DM	55	62	71	16	204	46,36		53,54
<b>Total (%)</b>		124 (28,18)	118 (26,82)	135 (30,68)	63 (14,32)	440	100	100	

DU: dosis única; DM: dosis repetida; B:basal; F:final

Así pues, en cuanto a los AA sugeridos, no se aprecian diferencias notables en su notificación en función de los distintos tratamientos administrados. No se evidencia una tendencia a la aparición de problemas de tolerabilidad dosis-dependiente y, a pesar de que se notificaron muchos más acontecimientos en el momento final que en el momento basal, este hecho era de esperar, ya que dicha evaluación contiene la mayoría de ocasiones de notificación de AA y ocurrió de forma similar para todos los tratamientos administrados, incluyendo placebo.



## 2.2.- Acontecimientos adversos reportados espontáneamente por los voluntarios y/o alteraciones analíticas evaluadas según las recomendaciones de la OMS <sup>(WHO, 1986)</sup>

En la tabla R-IV-10 se recogen los acontecimientos adversos espontáneos y/o alteraciones analíticas que presentaron los voluntarios participantes en el estudio.

**Tabla R-IV-10:** Acontecimientos adversos notificados espontáneamente por los voluntarios sanos y/o alteraciones analíticas evidenciadas durante el estudio.

Vol.	Acontecimiento	Tratamiento	Tiempo desde la administración	Intensidad	Causalidad	Duración del acontecimiento	Acción tomada
4. EEP	Mancha hipercrómica (2x4cm) Antebrazo izdo	Placebo	24h	Leve	Posible	16 días	--
7. DPB	Mancha hipercrómica (2x2cm) Flexura brazo decho	Placebo	5 días	Leve	Posible	4 días	--
11. ISG	Mancha hipercrómica (2x1cm) Antebrazo decho	Placebo	4 días	Leve	Posible	4 días	--
14. LGL	Cefalea	Placebo	33h 3min	Leve	Posible	6h	--
26. ALG	Cefalea	Placebo	1h 2h30min	Moderada Moderada	Posible Posible	3h40min 5h	Nolotil 1 cp Nolotil 1 cp
29. OAR	Prurito en tórax	Placebo	9h45min	Leve	Posible	5 días	--
2. CC	Resfriado	240 mg	7h25min	Moderada	NR	4 días	Paracetamol 2cp
6. DPD	Pirosis	240 mg	5h 43min	Leve	Posible	5 h	--
9. PGC	Hipotiroidismo Subclínico	240mg	--	Leve	Probable	--	--
16. DOR	Hipotiroidismo Subclínico	240 mg	--	Leve	Probable	--	--
28. DLM	Gastroenteritis	240 mg	5d11h45min	Leve	NR	1d2h	--
32. GMB	Cefalea	240 mg	3h37min	Moderada	Posible	18h30min	--
32. GMB	Cefalea	240 mg	27h25min	Leve	Posible	5h	--
8. CAC	Mancha hipercrómica (5x2cm) Antebrazo izdo	350 mg	4d3h50min	Leve	Posible	17 días	--
	Hipotiroidismo Subclínico		--	Leve	Probable	--	--
12. ABR	Mancha hipercrómica (5x0.5cm) Antebrazo decho	350 mg	49h30min	Leve	Posible	6d22h	--
13. DSP	Cefalea	350 mg	6d12h30min	Moderada	NR	--	Paracetamol 500mg 1cp
	Fiebre (38°)			Leve			
	Resfriado			Moderada			
	Hipotiroidismo Subclínico		--	Leve	Probable	--	--
21. JRL	Hipotiroidismo Subclínico	350 mg	--	Leve	Probable	--	--
27. AMD	Hipotiroidismo Subclínico	500 mg	--	Leve	Probable	--	--
31. APP	Herpes labial	500 mg	4d 11h 40min	Moderada	NR	9 días	Aciclovir 2 ap 30-07-00
	Hipotiroidismo Subclínico		--	Leve	Probable	--	--

Se notificaron un total de 17 AA de forma espontánea y 7 alteraciones analíticas en 19 de los 32 voluntarios participantes en el estudio (59,38%).

En cuanto a sus características clínicas, en un 15,62% de los voluntarios (26,31% de los que refirieron AA espontáneos y/o alteraciones analíticas) se presentó una mancha hipercrómica localizada en el brazo, en zonas coincidentes con lugares de punción. Tres de los voluntarios habían recibido placebo y dos de ellos habían recibido la dosis de 350mg. En todos los casos dichas manchas aparecieron días después de finalizar la administración repetida, no fueron sintomáticas y desaparecieron sin secuelas. Todas ellas fueron consideradas sin ningún tipo de relevancia clínica.

Otros AA espontáneos que se notificaron con menor frecuencia fueron la cefalea (12,5% de los voluntarios participantes), pirosis (6,25%), y gastroenteritis, resfriado, fiebre y herpes labial con una frecuencia del 3,12% de todos los voluntarios participantes.

En un 21,87% (n=7) de los voluntarios participantes (29,16% de los AA notificados espontáneamente y/o alteraciones analíticas), los análisis clínicos practicados revelaron la presencia de un hipertiroidismo subclínico (Grado 1 (leve): TSH <7,5 mU/L). Todos ellos habían recibido medicación activa (2 voluntarios la dosis de 240mg, 3 la dosis de 350mg y 2 la de 500mg). En ninguno de los casos se pudo precisar el inicio de la alteración ya que todos ellos se detectaron en la analítica practicada el día 18 por una elevación de los niveles de TSH; a todos se les realizó seguimiento hasta la normalización dichos niveles y en cualquier caso, se consideraron sin relevancia clínica ya que fueron asintomáticos tanto clínicamente como a la exploración física.

Al evaluar el tiempo transcurrido entre la aparición del acontecimiento adverso y la toma de medicación, éste fue muy variable, con una media de 52 horas y 15 minutos acompañado de una amplia dispersión (mínimo: 1 hora; máximo: 33 días).

En cuanto a su intensidad, un 94,74% de los 19 AA notificados espontáneamente fueron catalogados de leves y un 36,84% de moderados, no notificándose ninguno de intensidad grave.

Al analizar la causalidad atribuida a dichos 19 AA notificados espontáneamente, en un 63,16% de los casos se consideró que su relación con el tratamiento del estudio podía ser posible, en un 36,84% probable y en un 21,05% de los casos se consideró que no presentaba ninguna relación.

La duración media de dichos acontecimientos fue de 114,17h (4,75 días) con un intervalo que osciló desde las 3 horas 40 minutos a los 17 días.

En un 26,31% de los casos se debieron tomar las medidas oportunas para corregir dichos AA.

### **2.3.- Exploración física**

Todas las exploraciones físicas realizadas a los voluntarios por sistemas (piel y mucosas, sistema cardiovascular, respiratorio, digestivo, locomotor, sistema nervioso y linfático), tanto a nivel basal (premedicación) los días 0 (dosis única) y día +18, al finalizar el estudio, fueron normales.

### **2.4.- Constantes vitales**

#### **2.4.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación)**

En la tabla R-IV-11 se recogen la media y desviación estándar (DE) de las constantes vitales obtenidas en el periodo basal (premedicación), en particular de la presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y frecuencia cardíaca (FC), en decúbito supino así como de la temperatura axilar (T).

**Tabla R-IV-11:** Valores medios ( $\pm$ DE) de los principales parámetros hemodinámicos (PAS, PAD, FC, y T) obtenidos en los voluntarios sanos a tiempo basal (premedicación), para cada una de las dosis administradas y placebo.

Dosis	Placebo (n=8)	240mg (n=8)	350mg (n=8)	500mg (n=8)
Parámetro	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Presión arterial sistólica <sup>a</sup> (mmHg)	115,38 $\pm$ 11,10	115,25 $\pm$ 10,71	115,50 $\pm$ 8,77	118,38 $\pm$ 9,35
Presión arterial diastólica <sup>a</sup> (mm Hg)	58,88 $\pm$ 5,94	64,88 $\pm$ 7,28	58,38 $\pm$ 7,05	60,13 $\pm$ 11,21
Frecuencia cardiaca <sup>a</sup> (min <sup>-1</sup> )	61,75 $\pm$ 12,56	64,00 $\pm$ 8,40	62,00 $\pm$ 9,29	65,25 $\pm$ 15,01
Temperatura axilar (°C)	35,96 $\pm$ 0,21	35,98 $\pm$ 0,29	35,99 $\pm$ 0,22	36,05 $\pm$ 0,41

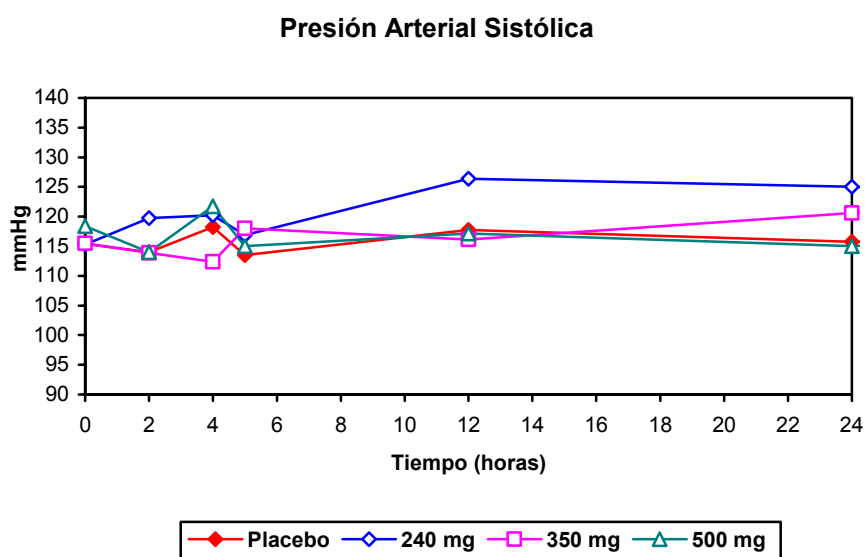
a: decúbito supino

## 2.4.2.- Evolución tras la administración de la medicación

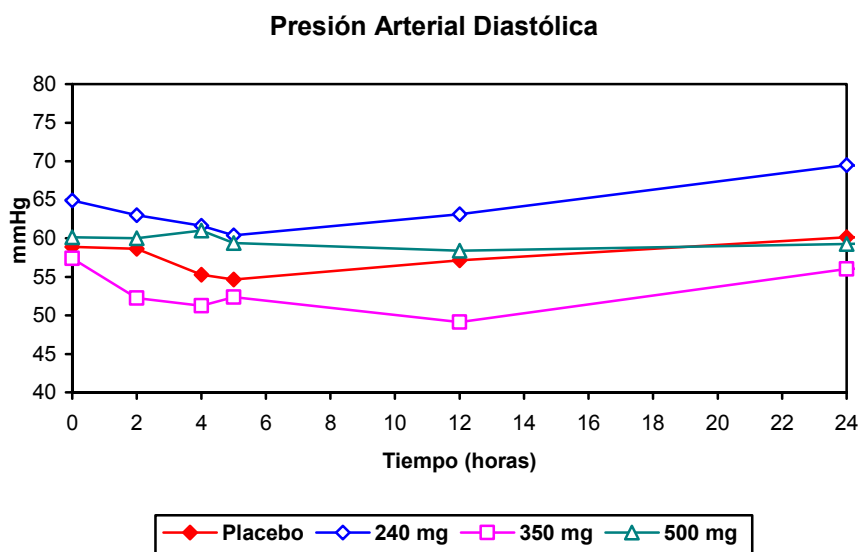
### 2.4.2.1.- Evolución durante el día 0 (fase de estudio de dosis única (0-24h))

En las figuras R-IV-3, R-IV-4, R-IV-5 y R-IV-6 se representa gráficamente la evolución en el tiempo, dosis única (0-24 h), tras la administración de la medicación de las constantes vitales, en particular la presión arterial sistólica (PAS), la presión arterial diastólica (PAD), la frecuencia cardiaca (FC), todas ellas en decúbito supino y de la temperatura axilar (T), respectivamente.

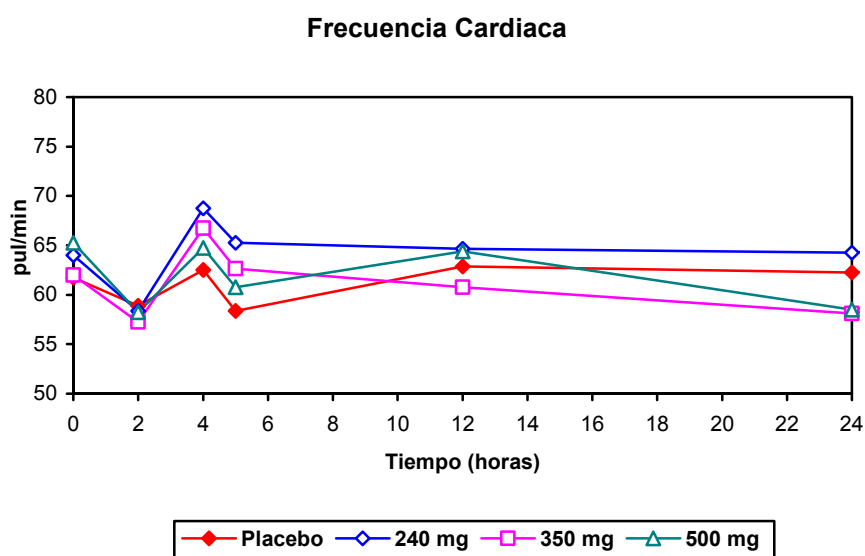
**Figura R-IV-3:** Representación gráfica de los valores medios de la presión arterial sistólica obtenidos de 0-24 horas (día 0) para todas las dosis administradas.



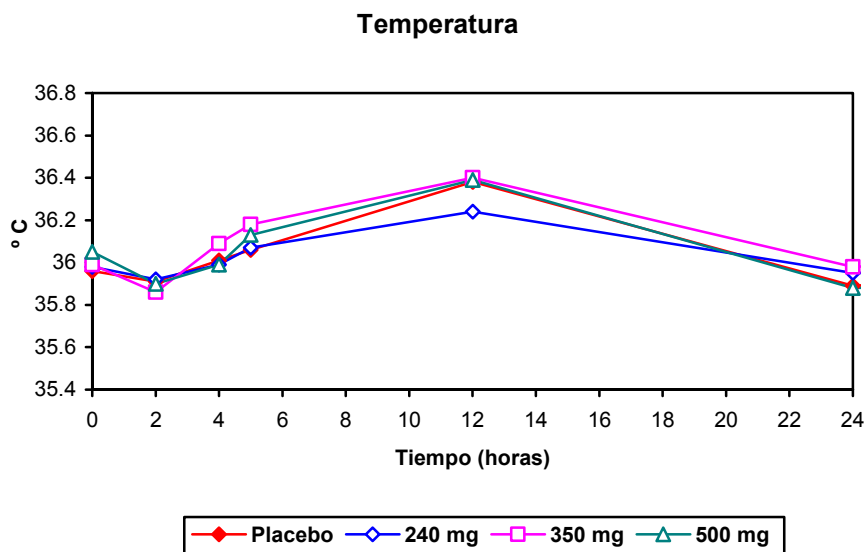
**Figura R-IV-4:** Representación gráfica de los valores medios de la presión arterial diastólica obtenidos de 0-24 horas (día 0) para todas las dosis administradas.



**Figura R-IV-5:** Representación gráfica de los valores medios de la frecuencia cardiaca obtenidos de 0-24 horas (día 0) para todas las dosis administradas.



**Figura R-IV-6:** Representación gráfica de los valores medios de la temperatura axilar obtenidos de 0-24 horas (día 0) para todas las dosis administradas.



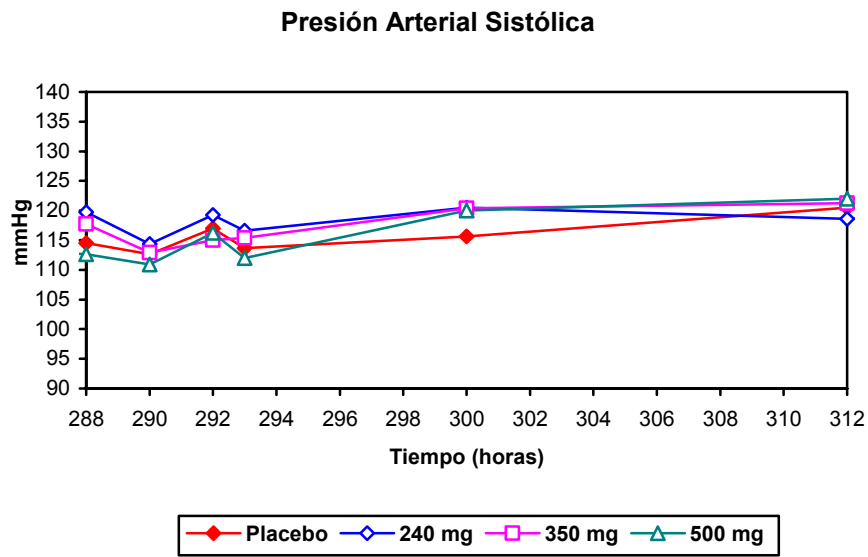
No se observaron alteraciones clínicamente relevantes en ninguna evaluación individual de las distintas constantes vitales registradas.

Los valores medios de la PAS en función de la dosis se mantuvieron siempre dentro de los límites de la normalidad (90-140 mmHg), así como los de la PAD, (50-90 mmHg), la FC (40-100 latidos/minuto) y T (< 37°C).

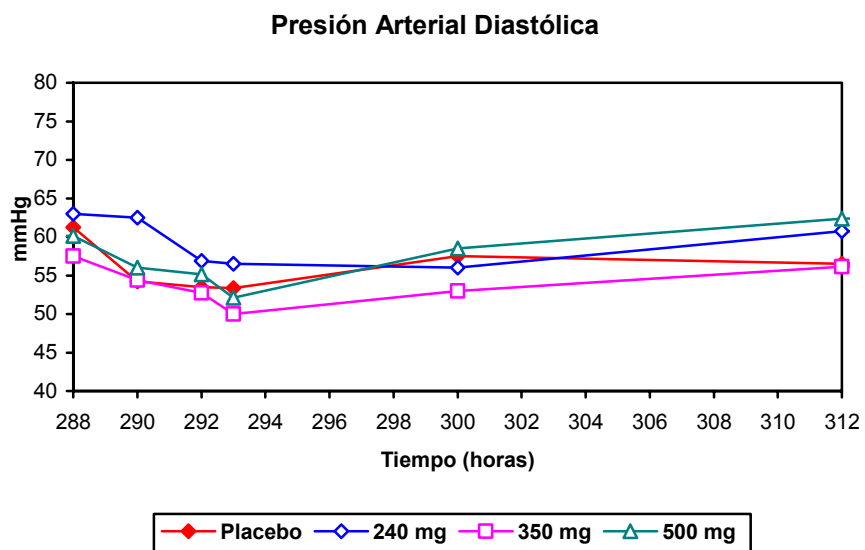
#### **2.4.2.2.- Evolución durante el día +12 (fase de estudio de dosis repetida, última administración)**

En las figuras R-IV-7, R-IV-8, R-IV-9 y R-IV-10 se representa gráficamente la evolución en el tiempo, dosis repetida, última administración (0-24 h), de las constantes vitales, en particular la presión arterial sistólica (PAS), la presión arterial diastólica (PAD), la frecuencia cardiaca (FC), todas ellas en decúbito supino y de la temperatura axilar (T), respectivamente.

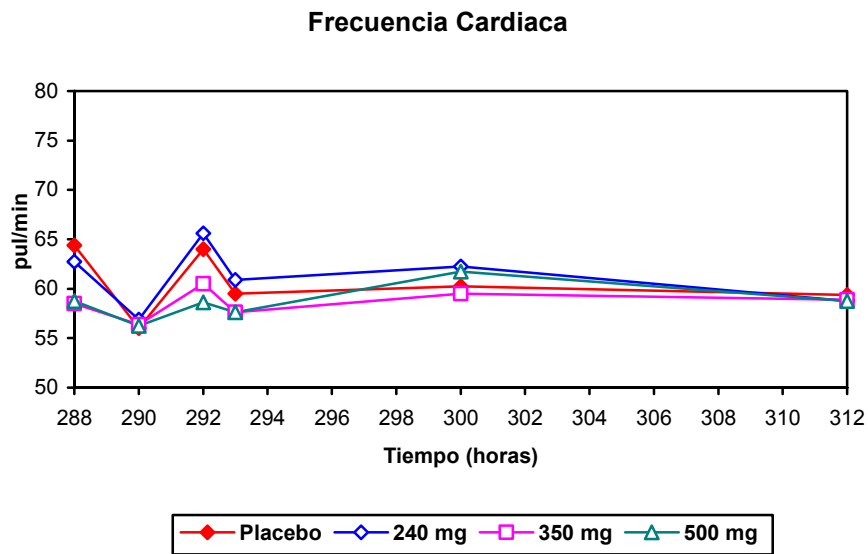
**Figura R-IV-7:** Representación gráfica de los valores medios de la presión arterial sistólica obtenidos de +288 a +312 horas (día +12) para todas las dosis administradas.



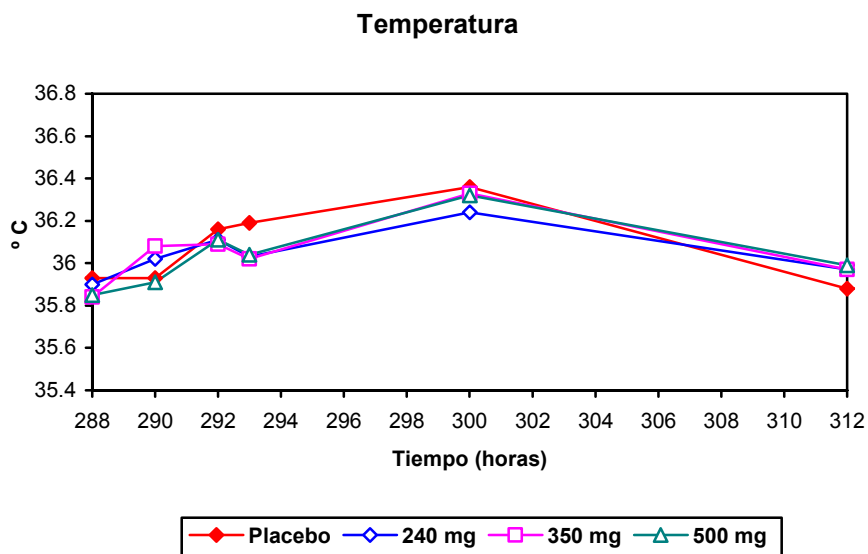
**Figura R-IV-8:** Representación gráfica de los valores medios de la presión arterial diastólica obtenidos de +288 a +312 horas (día +12) para todas las dosis administradas.



**Figura R-IV-9:** Representación gráfica de los valores medios de la frecuencia cardiaca obtenidos de +288 a +312 horas (día +12) para todas las dosis administradas.



**Figura R-IV-10:** Representación gráfica de los valores medios de la temperatura axilar obtenidos de +288 a +312 horas (día +12) para todas las dosis administradas.



No se observaron alteraciones clínicamente relevantes en ninguna evaluación individual de las distintas constantes vitales registradas.

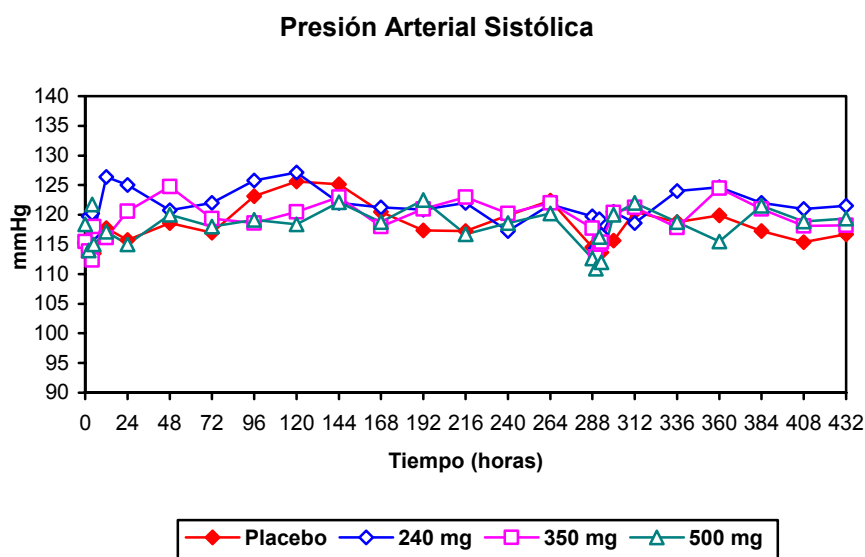


Los valores medios de la PAS en función de la dosis se mantuvieron siempre dentro de los límites de la normalidad (90-140 mmHg), así como los de la PAD, (50-90 mmHg), la FC (40-100 latidos/minuto) y TA (< 37°C).

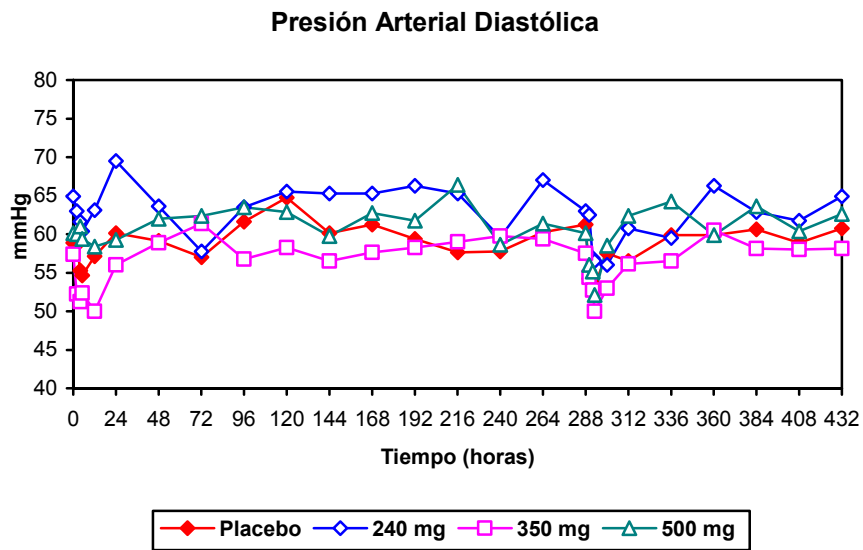
#### 2.4.2.3.- Evolución global a lo largo del estudio (dosis única y repetida)

En las figuras R-IV-11, R-IV-12, R-IV-13 y R-IV-14 se representa gráficamente la evolución global en el tiempo a lo largo del estudio (dosis única y repetida), de las constantes vitales, en particular la presión arterial sistólica (PAS), la presión arterial diastólica (PAD), la frecuencia cardiaca (FC), todas ellas en decúbito supino y de la temperatura axilar (T), respectivamente .

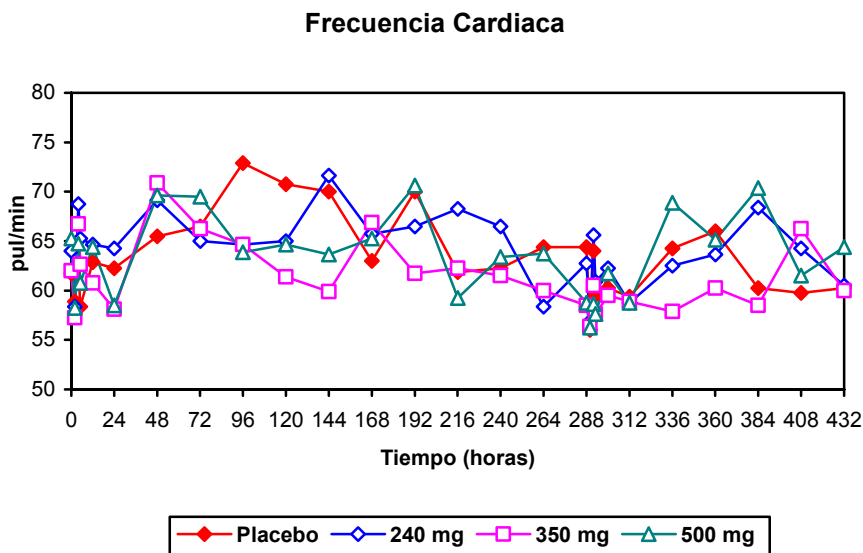
**Figura R-IV-11:** Representación gráfica de los valores medios de la presión arterial sistólica obtenidos a lo largo de todo el estudio (dosis única y repetida) para todas las dosis administradas.



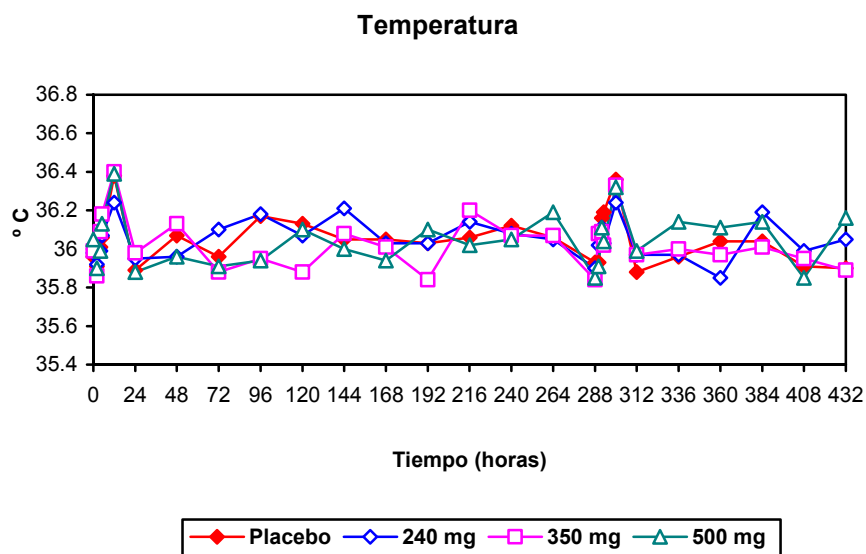
**Figura R-IV-12:** Representación gráfica de los valores medios de la presión arterial diastólica obtenidos a lo largo de todo el estudio (dosis única y repetida) para todas las dosis administradas.



**Figura R-IV-13:** Representación gráfica de los valores medios de la frecuencia cardiaca obtenidos a lo largo de todo el estudio (dosis única y repetida) para todas las dosis administradas.



**Figura R-IV-14:** Representación gráfica de los valores medios de la temperatura axilar obtenidos a lo largo de todo el estudio (dosis única y repetida) para todas las dosis administradas.



No se observaron alteraciones clínicamente relevantes en ninguna evaluación individual de las distintas constantes vitales registradas.

Los valores medios de la PAS en función de la dosis se mantuvieron siempre dentro de los límites de la normalidad (90-140 mmHg), así como los de la PAD, (50-90 mmHg), la FC (40-100 latidos/minuto) y TA (< 37°C).

## 2.5.- Electrocardiograma

### 2.5.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación)

En la tabla R-IV-12 se recogen la media y desviación estándar (DE) de los parámetros obtenidos a partir del electrocardiograma en el periodo basal (premedicación).

**Tabla R-IV-12:** Valores medios ( $\pm$  DE) de los principales parámetros electrocardiográficos (ECG de 12 derivaciones) obtenidos en los voluntarios sanos a tiempo basal (día 0), para cada una de las dosis administradas y placebo.

Dosis	Placebo (n=8)	240mg (n=8)	350mg (n=8)	500mg (n=8)
Parámetro	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Frecuencia cardiaca ( $\text{min}^{-1}$ )	60,00 $\pm$ 11,74	64,00 $\pm$ 6,68	62,75 $\pm$ 6,14	59,88 $\pm$ 14,16
Onda P (ms)	93,25 $\pm$ 13,22	99,25 $\pm$ 9,91	95,75 $\pm$ 13,71	107,25 $\pm$ 10,69
Intervalo QRS (ms)	95,25 $\pm$ 8,20	86,00 $\pm$ 6,05	99,00 $\pm$ 4,78	100,25 $\pm$ 18,91
Intervalo PR (ms)	148,75 $\pm$ 13,90	156,50 $\pm$ 21,00	156,75 $\pm$ 22,06	158,50 $\pm$ 19,00
Intervalo QT (ms)	386,75 $\pm$ 22,85	388,75 $\pm$ 26,96	393,25 $\pm$ 18,05	392,00 $\pm$ 32,58
Intervalo QTC (ms)	386,00 $\pm$ 6,00	394,13 $\pm$ 23,38	395,50 $\pm$ 17,97	391,13 $\pm$ 18,53

min: minutos. ms: milisegundos

### 2.5.2.- Evolución tras administración de la medicación

En la tabla R-IV-13 se identifican aquellos parámetros obtenidos a partir del electrocardiograma que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +18 días, al finalizar el estudio.

**Tabla R-IV-13:** Parámetros obtenidos a partir del electrocardiograma que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +18 días, al finalizar el estudio.

Parámetro	Unidades	Dosis (mg)	Basal Media $\pm$ DE	+18 d Media $\pm$ DE	Valor de p (vs. basal)	Sentido del cambio
QRS	ms	240	86,00 $\pm$ 6,05	89,75 $\pm$ 6,09	0,001	↑
QT	ms	240	388,75 $\pm$ 26,96	403,58 $\pm$ 38,82	0,039	↑

ms: milisegundo

No se observaron alteraciones clínicamente relevantes en ninguna evaluación individual de los distintos parámetros derivados.

Los valores medios de la frecuencia ventricular se mantuvieron dentro de los límites de la normalidad (40-100 latidos/min), así como los de la onda P (<120ms), los del intervalo QRS (<120ms), los del intervalo PR (<220ms), los intervalo QT (<440ms) y los del intervalo QTC (<440ms). Las diferencias estadísticamente significativas encontradas carecieron de relevancia clínica.

En la tabla R-IV-14 se identifican aquellos parámetros electrocardiográficos que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +1, +5, +9, +12 y +13 días.

**Tabla R-IV-14:** Parámetros obtenidos a partir del electrocardiograma que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a + 1, +5, +9, +12 y +13 días postmedicación.

Parámetro	Unidades	Dosis (mg)	Basal Media ± DE	+1 día Media ± DE	Valor de p (vs. basal)	Sentido del cambio
QRS	ms	240	86,00±6,05	90,75±5,55	0,018	↑
QT	ms	240	388,75±26,96	405,50±38,94	0,028	↑
Frec Ventr	Lat/min	240	64,00±6,68	58,63±10,31	0,042	↓
Parámetro	Unidades	Dosis (mg)	Basal Media ± DE	+5 días Media ± DE	Valor de p (vs. basal)	Sentido del cambio
QRS	ms	350	99,00±4,78	95,50±4,99	0,021	↓
Parámetro	Unidades	Dosis (mg)	Basal Media ± DE	+ 9 días Media ± DE	Valor de p (vs. basal)	Sentido del cambio
Onda P	ms	240	99,25±9,91	102,50±69	0,029	↑

ms: milisegundos. Lat/min: latidos por minuto.

Las diferencias estadísticamente significativas encontradas carecieron de relevancia clínica.

## 2.6.- Parámetros de laboratorio

### 2.6.1.- Hematología

#### 2.6.1.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación)

En la tabla R-IV-15 se recogen la media y desviación estándar (DE) de los parámetros hematológicos obtenidos en el periodo basal (premedicación).

**Tabla R-IV-15:** Valores medios ( $\pm$  DE) de los parámetros hematológicos obtenidos en los voluntarios sanos a tiempo basal, para cada una de las dosis administradas y placebo.

Dosis	Placebo (n=8)	240mg (n=8)	350mg (n=8)	500mg (n=8)
Parámetro	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Hemoglobina (g/dL)	142,75 $\pm$ 4,628	140,88 $\pm$ 6,88	141,88 $\pm$ 9,64	144,38 $\pm$ 11,12
Hematocrito (L/L)	0,42 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,02	0,41 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,03
Hematíes (X10E12/L)	4,87 $\pm$ 0,22	4,70 $\pm$ 0,18	4,73 $\pm$ 0,32	4,84 $\pm$ 0,36
VCM (fL)	86,04 $\pm$ 3,18	87,10 $\pm$ 3,75	87,44 $\pm$ 3,45	86,80 $\pm$ 2,54
CCMH (g/L)	341,25 $\pm$ 10,32	344,75 $\pm$ 12,42	343,13 $\pm$ 7,36	343,38 $\pm$ 10,64
HCM (pg)	29,34 $\pm$ 1,02	30,05 $\pm$ 1,57	29,96 $\pm$ 0,77	29,83 $\pm$ 1,05
RDW (%)	12,85 $\pm$ 1,40	13,33 $\pm$ 1,67	13,44 $\pm$ 1,81	13,01 $\pm$ 1,51
Plaquetas (X10E9/L)	200,13 $\pm$ 37,03	241,50 $\pm$ 31,71	209,63 $\pm$ 27,75	227,25 $\pm$ 40,10
VPM (fL)	9,04 $\pm$ 0,76	9,04 $\pm$ 0,68	9,28 $\pm$ 0,84	9,28 $\pm$ 0,64
Plaquetocrito (%)	0,19 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,06	0,20 $\pm$ 0,00	0,21 $\pm$ 0,04
Leucocitos (X10E9/L)	6,87 $\pm$ 1,73	7,11 $\pm$ 1,63	6,95 $\pm$ 2,10	7,05 $\pm$ 1,07
Neutrófilos seg.( X10E9/L)	3,51 $\pm$ 1,21	3,93 $\pm$ 1,40	3,56 $\pm$ 1,38	3,72 $\pm$ 0,81
Eosinófilos (X10E9/L)	0,23 $\pm$ 0,10	0,24 $\pm$ 0,14	0,17 $\pm$ 0,12	0,21 $\pm$ 0,09
Basófilos (X10E9/L)	0,03 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,04	0,05 $\pm$ 0,02
Monocitos (X10E9/L)	0,44 $\pm$ 0,20	0,44 $\pm$ 0,13	0,42 $\pm$ 0,13	0,46 $\pm$ 0,12
Linfocitos (X10E9/L)	2,66 $\pm$ 1,06	2,64 $\pm$ 0,81	2,74 $\pm$ 1,08	2,60 $\pm$ 0,42

### 2.6.1.2.- Evolución tras administración de la medicación

En la tabla R-IV-16 se identifican aquellos parámetros hematológicos que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +18 días, al final el estudio.

**Tabla R-IV-16:** Parámetros hematológicos que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +18 días, al finalizar el estudio.

Parámetro	Unidades	Dosis	Basal Media $\pm$ DE	+18 días Media $\pm$ DE	Valor de p (vs. basal)	Sentido del cambio
Plaquetas	X10E12/L	placebo	200,13 $\pm$ 37,03	217,38 $\pm$ 42,11	0,035	↑
Plaquetas	X10E12/L	240mg	241,50 $\pm$ 31,71	272,50 $\pm$ 50,22	0,005	↑
VPM	Fl	500mg	9,28 $\pm$ 0,64	8,48 $\pm$ 0,99	0,016	↑

No se observaron alteraciones clínicamente relevantes en ninguna evaluación individual de los distintos parámetros evaluados.

Los valores medios de los distintos parámetros hematológicos se mantuvieron dentro de los límites de la normalidad descritos en el PNT correspondiente (Anexo I). Las diferencias estadísticamente significativas encontradas carecieron de relevancia clínica.

## 2.6.2.- Bioquímica

### 2.6.2.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación)

#### *Estándar*

#### **Sangre**

En la tabla R-IV-17 se recogen la media y desviación estándar (DE) de los parámetros bioquímicos estándar en sangre obtenidos en el periodo basal (premedicación).

**Tabla R-IV-17:** Valores medios ( $\pm$ DE) de los parámetros bioquímicos obtenidos en los voluntarios sanos a tiempo basal, para cada una de las dosis administradas y placebo.

<b>Dosis</b>	<b>Placebo (n=8)</b>	<b>240 (n=8)</b>	<b>350 (n=8)</b>	<b>500 mg (n=8)</b>
<b>Parámetro</b>	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Glucosa (mmol/L)	4,38 $\pm$ 0,26	4,37 $\pm$ 0,31	4,48 $\pm$ 0,65	4,56 $\pm$ 0,45
Urea (mmol/L)	5,44 $\pm$ 0,92	6,14 $\pm$ 0,85	6,01 $\pm$ 1,61	5,73 $\pm$ 1,39
Creatinina (Umol/L)	102,50 $\pm$ 11,15	98,38 $\pm$ 8,37	96,00 $\pm$ 7,91	97,38 $\pm$ 7,54
Bilirrubina total (Umol/L)	13,00 $\pm$ 5,07	13,25 $\pm$ 7,98	11,63 $\pm$ 6,86	12,50 $\pm$ 6,00
Bilirrubina directa (Umol/L)	3,38 $\pm$ 1,06	3,25 $\pm$ 1,28	3,50 $\pm$ 2,39	3,25 $\pm$ 1,28
Triglicéridos (mmol/L)	0,77 $\pm$ 0,33	1,22 $\pm$ 0,67	0,85 $\pm$ 0,27	0,84 $\pm$ 0,25
Colesterol total (mmol/L)	4,28 $\pm$ 0,66	4,69 $\pm$ 0,73	3,59 $\pm$ 0,77	4,12 $\pm$ 1,02
ASAT (UI/L)	16,75 $\pm$ 3,28	18,25 $\pm$ 6,39	17,88 $\pm$ 8,54	15,50 $\pm$ 3,89
ALAT (UI/L)	14,24 $\pm$ 7,44	18,38 $\pm$ 11,36	13,25 $\pm$ 6,80	17,25 $\pm$ 7,81
Fosfatasa alcalina (UI/L)	147,00 $\pm$ 23,69	181,00 $\pm$ 35,23	137,63 $\pm$ 37,55	153,88 $\pm$ 25,89
GGT (UI/L)	13,38 $\pm$ 3,58	18,38 $\pm$ 7,13	11,13 $\pm$ 2,53	16,00 $\pm$ 6,99
Proteínas totales (g/L)	69,35 $\pm$ 1,90	71,60 $\pm$ 2,78	68,11 $\pm$ 3,94	70,13 $\pm$ 3,31

## **Orina**

Los valores obtenidos en los parámetros del urianálisis realizados en el periodo basal (premedicación) estuvieron en todos los casos dentro de la normalidad.

### *Específica*

#### **Niveles de TSH**

En la tabla R-IV-18 se recogen la media y desviación estándar (DE) de los niveles de TSH obtenidos en el período basal (premedicación).

**Tabla R-IV-18:** Valores medios ( $\pm$ DE) de los niveles de TSH obtenidos en los voluntarios sanos a tiempo basal, para cada una de las dosis administradas y placebo.

<b>Dosis</b>	<b>Placebo (n=8)</b>	<b>240mg (n=8)</b>	<b>350mg (n=8)</b>	<b>500mg (n=8)</b>
<b>Parámetro</b>	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE	Media $\pm$ DE
Tirotropina (mUI/L)	1,84 $\pm$ 0,99	3,14 $\pm$ 1,15	2,29 $\pm$ 0,75	2,19 $\pm$ 0,69

#### **Sangre oculta en heces**

El análisis de la sangre oculta en heces efectuado en el periodo basal (premedicación) fue negativo en todos los casos.

#### **2.6.2.2.- Evolución tras administración de medicación**

##### *Estándar*

#### **Sangre**

En la tabla R-IV-19 se identifican aquellos parámetros bioquímicos estándar en sangre que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +18 días, al final del estudio.



**Tabla R-IV-19:** Parámetros bioquímicos que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +18 días, al finalizar el estudio.

Parámetro	Unidades	Dosis	Basal Media ± DE	+ 18 días Media ± DE	Valor de p vs. basal	Sentido del cambio
Urea	mmol/L	240mg	6,14±0,85	5,05±0,74	0,003	↓
GGT	UI/L	240mg	18,38±7,13	20,25±8,33	0,03	↑

Los valores medios de los distintos parámetros bioquímicos estándar en sangre se mantuvieron dentro de los límites de la normalidad descritos en el PNT correspondiente (Anexo I). Las diferencias estadísticamente significativas encontradas carecieron de relevancia clínica.

## Orina

Los valores obtenidos en los parámetros del urianálisis realizados a +18 días, al final del estudio, estuvieron en todos los casos dentro de la normalidad.

## Específico

### Niveles de TSH

En la tabla R-IV-20 se identifican aquellas observaciones de los niveles de TSH que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +18 días, al final del estudio.

**Tabla R-IV-20:** Observaciones de los niveles de TSH que mostraron una diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores obtenidos en el periodo basal (premedicación) con los obtenidos a +18 días, al finalizar el estudio.

Parámetro	Unidades	Dosis	Basal Media ± DE	+ 18 días Media ± DE	valor de p vs. basal	Sentido del cambio
Tirotropina	mUI/L	240mg	3,14±1,15	4,34±0,99	0,0001	↑
Tirotropina	mUI/L	350mg	2,29±0,75	4,21±1,63	0,035	↑
Tirotropina	mUI/L	500 mg	2,19±0,69	3,64±1,69	0,012	↑

Los resultados analíticos de las cifras de TSH al finalizar el estudio mostraron que 2 de los 8 voluntarios que habían recibido la dosis de 240mg, 3 de los 8 voluntarios que habían recibido la dosis de 350mg y 2 de los que habían recibido la de 500mg presentaban resultados que se encontraban por fuera del rango autorizado por la PNT del CIM (0,25-5 mU/l) (Anexo I), por lo que este hecho fue registrado como acontecimiento adverso, notificándose en todos estos voluntarios la presencia de hipotiroidismo subclínico, como se ha comentado en el punto 2.2 de la parte IV de resultados de esta tesis doctoral.

Como se ha podido observar en la tabla R-IV-20, los valores medios de los niveles de TSH para cada una de las dosis de fármaco administradas no superaron, en ningún caso los límites autorizados en el CIM (0.25-5.0 mU/l). Las diferencias estadísticamente significativas encontradas carecieron de relevancia clínica.

### **Sangre oculta en heces**

El análisis de sangre oculta en heces efectuado a +18 días, al final del estudio fue negativo en todos los voluntarios, excepto en uno. El voluntario nº 6 (dosis de 240 mg) presentó detección positiva de sangre oculta en heces en la analítica practicada en ese momento. El voluntario refirió que el día previo tomó alimentos que podrían haber influido en el resultado (carne prácticamente cruda); tras recomendarle una dieta libre de alimentos que pudieran interferir en esa determinación, se repitió el análisis 4 días después y el resultado fue negativo.

### **2.6.3.- Sedimento urinario**

#### **2.6.3.1.- Determinaciones en el momento basal (premedicación)**

Los valores obtenidos en el análisis microbiológico del sedimento de orina en el periodo basal (premedicación) estuvieron en todos los casos dentro de la normalidad.

#### **2.6.3.2.- Evolución tras administración de la medicación**

Los valores obtenidos en el análisis microbiológico del sedimento de orina a +18 días, al final del estudio, estuvieron en todos los casos dentro de la normalidad.

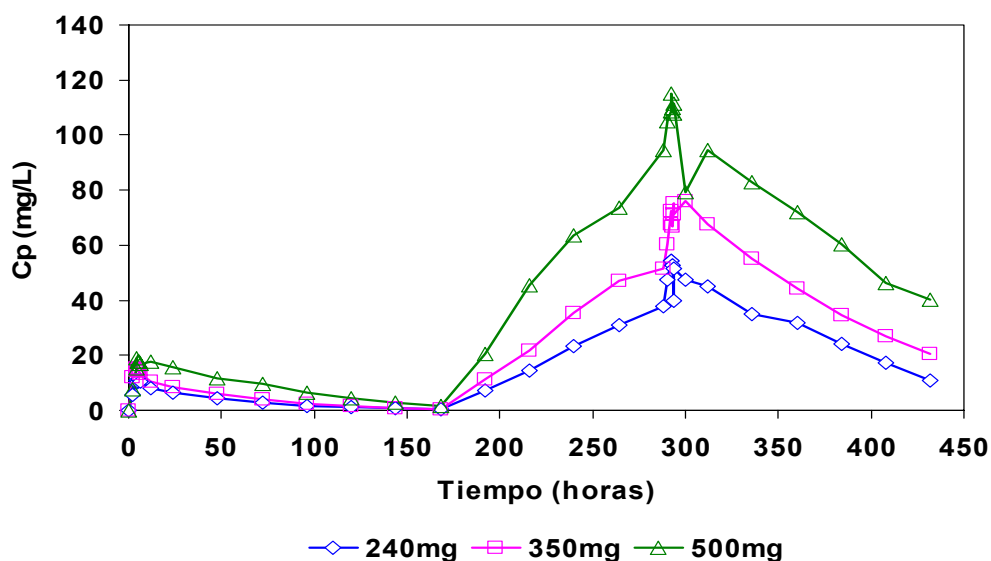
### 3.- FARMACOCINÉTICA

#### 3.1.- Concentraciones plasmáticas

El día 0, los valores basales aportados por el centro responsable del análisis para todos los sujetos fue en todos los casos no detectable, considerándose como tal toda concentración inferior a 0,05mg/L (límite de detección). Sin embargo, el día +7 (inicio de las dosis repetidas), 19 de los 24 voluntarios que habían tomado medicación activa presentaron niveles que superaban el límite de detección. Así, las concentraciones detectadas en 5 de los 8 voluntarios que habían tomado la dosis única de 240mg, osciló entre 0,26 y 1,08mg/L. En 6 de los 8 voluntarios que tomaron la dosis única de 350mg, se cuantificaron niveles plasmáticos de AM-24 que oscilaron entre 0,32 y 0,95mg/L. En el caso de los 8 voluntarios que habían tomado la dosis única de 500 mg, todos ellos presentaron niveles detectables de AM-24 que oscilaron entre 0,23 y 4,69mg/L.

En la figura R-IV-15 se muestran los valores medios de las concentraciones plasmáticas del fármaco a lo largo del tiempo, comparando las tres dosis analizadas (240mg, 350mg y 500mg).

**Figura R-IV-15:** Valores medios de las concentraciones plasmáticas de AM-24 a lo largo del tiempo para las 3 dosis administradas (240mg, 350mg y 500mg).



### 3.2.- Parámetros farmacocinéticos: aproximación amodelística

#### 3.2.1.- Tras administración única

Todos los voluntarios participantes pudieron ser utilizados en los cálculos para caracterizar la farmacocinética tras dosis oral única.

Los resultados obtenidos para los parámetros que caracterizan la biodisponibilidad en magnitud y en velocidad, la distribución y la eliminación tras una única dosis oral se encuentran en las tablas R-IV-21 y R-IV-22.

**Tabla R-IV-21:** Descriptivos de los parámetros farmacocinéticos que caracterizan la biodisponibilidad (magnitud y velocidad): media (desviación estándar) tras administración única.

Parámetro	Dosis única		
	240mg	350mg	500mg
AUC <sub>0-∞</sub> (mg/L)*h (DE)	537,43 (199,57)	740,70 (196,54)	1526,54 (657,60)
AUC <sub>0-∞</sub> /D (hL) (DE)	2,24 (0,83)	2,12 (0,56)	3,05 (1,32)
C <sub>max</sub> (mg/L) (DE)	12,76 (3,39)	17,31 (4,81)	21,16 (6,92)
C <sub>max</sub> /D (L <sup>-1</sup> ) (DE)	0,05 (0,01)	0,05 (0,01)	0,04 (0,01)
t <sub>max</sub> (h) (DE)	4,69 (0,75)	4,5 (1,20)	16,5 (23,43)

**Tabla R-IV-22:** Descriptivos de los parámetros farmacocinéticos que caracterizan la distribución y la eliminación: media (desviación estándar) tras administración única.

Parámetro	Dosis única		
	240mg	350mg	500mg
<b>Distribución</b>			
Vd/F (L) (DE)	23,22 (7,88)	22,27 (3,32)	19,18 (5,16)
<b>Eliminación</b>			
Cl/F (L/h) (DE)	0,53 (0,26)	0,50 (0,14)	0,39 (0,17)
k <sub>e</sub> (h <sup>-1</sup> ) (DE)	0,02 (0,005)	0,02 (0,01)	0,02 (0,01)
t <sub>1/2</sub> (h) (DE)	32,52 (7,27)	31,86 (5,63)	37,92 (13,91)

### 3.2.2.- Tras administración repetida (6 días)

Todos los voluntarios participantes pudieron ser utilizados en los cálculos para caracterizar la farmacocinética tras dosis orales repetidas.

Los resultados obtenidos para los parámetros que caracterizan la biodisponibilidad, la distribución y la eliminación tras administración oral repetida se encuentran en las tablas R-IV-23 y R-IV-24.

**Tabla R-IV-23:** Descriptivos de los parámetros farmacocinéticos que caracterizan la biodisponibilidad (magnitud y velocidad): media (desviación estándar) tras administración repetida.

Parámetro	Dosis repetida		
	240 mg	350 mg	500 mg
$AUC_{T}^{EE}$ (mg/L)*h (DE)	1141,68 (246,57)	1652,36 (276,57)	2337,89 (540,05)
$C_{mn}^{EE}$ (mg/L) (DE)	31,33 (13,89)	50,26 (6,62)	75,21 (34,77)
$C_{max}^{EE}$ (mg/L) (DE)	60,02 (13,80)	84,09 (13,66)	123,18 (25,19)
$C_{av}^{EE}$ (mg/L) (DE)	47,57 (10,27)	68,85 (11,52)	97,41 (22,50)
$t_{max}$ (h) (DE)	292,44 [4,44] (1,21)	297,13 [9,13] (6,83)	294,56 [6,56] (7,18)
Fluctuación (%) (DE)	57,36 (34,09)	48,72 (17,84)	55,89 (65,21)

[ ]  $t_{max}$  calculado a partir de la última toma tras administración repetida.

**Tabla R-IV-24:** Descriptivos de los parámetros farmacocinéticos que caracterizan la distribución y la eliminación: media (desviación estándar) tras administración repetida.

Parámetro	Dosis repetida		
	240 mg	350 mg	500 mg
<b>Distribución</b>			
$V_d/F$ (L) (DE)	17,03 (6,58)	21,34 (9,72)	28,55 (13,35)
<b>Eliminación</b>			
$Cl/F$ (L/h) (DE)	0,22 (0,05)	0,22 (0,03)	0,22 (0,05)
$k_e$ ( $h^{-1}$ ) (DE)	0,01 (0,01)	0,01 (0,00)	0,01 (0,00)
$t_{1/2}$ (h) (DE)	54,15 (19,13)	66,50 (22,78)	92,12 (46,83)

### 3.3.- Linealidad cinética tras administración repetida

La comparación de la  $AUC_0^\infty$  obtenida tras la administración de la dosis única (día 0) para cada una de las dosis con la  $AUC_{\tau}^{EE}$  obtenida para cada una de esas dosis tras la administración de dosis repetidas, mostró diferencias estadísticamente significativas (Tabla R-IV-25). Lo mismo ocurrió para los parámetros  $Cl/F$ ,  $k_e$  y  $t_{1/2}$ , pero no para el  $Vd/F$ . Así, tras administración repetida se observó un incremento en el AUC y  $t_{1/2}$  y un decremento en  $Cl/F$ ,  $k_e$ , no modificándose el  $Vd/F$ .

**Tabla R-IV-25:** Comparación entre AUCs,  $Vd/F$ ,  $Cl/F$ ,  $k_e$  y  $t_{1/2}$  tras administración única y los mismos parámetros obtenidos tras administración repetida, para cada una de las dosis (Test de datos apareados).

Dosis	Dosis única (Media (DE))	Dosis repetida (Media (DE))	Sig "p" bilateral
	$AUC_0^\infty$ (mg/L)*h	$AUC_{\tau}^{EE}$ (mg/L)*h	
240 mg	537,43 (199,57)	1141,68(246,57)	0,000
350 mg	740,70(196,54)	1652,36(276,57)	0,000
500 mg	1526,54 (657,60)	2337,89(540,05)	0,020
Dosis	$Vd/F$ (L)	$Vd/F$ (L)	Sig "p" bilateral
240 mg	23,22 (7,88)	17,03 (6,58)	0.056
350 mg	22,27 (3,32)	21,34 (9,72)	0.749
500 mg	19,18 (5,16)	28,55 (13,35)	0.194
Dosis	$Cl/F$ (L/h)	$Cl/F$ (L/h)	Sig "p" bilateral
240 mg	0,53 (0,26)	0,22 (0,05)	0.006
350 mg	0,50 (0,14)	0,22 (0,03)	0.002
500 mg	0,39 (0,17)	0,22 (0,05)	0.020
Dosis	$k_e$ ( $h^{-1}$ )	$k_e$ ( $h^{-1}$ )	Sig "p" bilateral
240 mg	0,02 (0,005)	0,01 (0,01)	0.036
350 mg	0,02 (0,01)	0,01 (0,00)	0.001
500 mg	0,02 (0,01)	0,01 (0,00)	0.004
Dosis	$t_{1/2}$ (h)	$t_{1/2}$ (h)	Sig "p" bilateral
240 mg	32,52 (7,27)	54,15 (19,13)	0.036
350 mg	31,86 (5,63)	66,50 (22,78)	0.004
500 mg	37,92 (13,91)	92.12 (46.83)	0.016

## **PARTE V: INVESTIGACIÓN “IN NUMERO”: DETERMINACIÓN DE LA PAUTA DE DOSIFICACIÓN A PROPONER PARA CONTINUAR CON EL DESARROLLO DEL COMPUESTO EN PACIENTES**

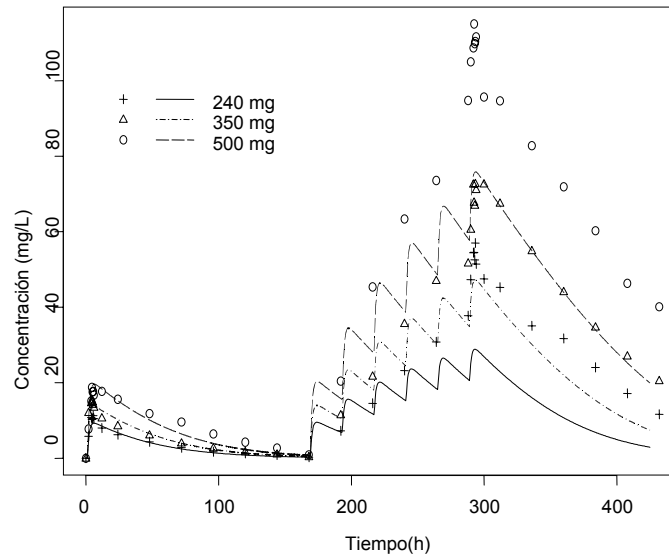
### **1.- DESARROLLO Y SELECCIÓN DEL MODELO**

Se analizaron de manera simultánea la totalidad de las observaciones del estudio.

Durante el desarrollo del modelo se probaron diferentes situaciones. Se asumió que la absorción seguía un proceso de orden cero, de primer orden o incluso que se trataba de un proceso mixto (orden cero y primer orden). Así mismo se valoró la posible saturación del proceso, empleando modelos de saturación de Michaelis-Menten, o la posibilidad de procesos de absorción tiempo dependiente. Por otro lado, también se estudió la necesidad o no de tener que incorporar un tiempo de latencia. Otro de los aspectos valorados fue la posible modificación de la absorción (tanto en velocidad como en magnitud) del fármaco, comprobándose que no se veía modificada ni por la dosis administrada ni por el tiempo transcurrido tras la primera dosis. Un modelo de absorción de 1<sup>er</sup> orden sin necesidad de asociarlo a un tiempo de latencia fue suficiente para describir el proceso.

En relación al proceso de disposición, se testaron diferentes modelos tanto monocompartimentales como bicompartimentales, siendo el modelo de un solo compartimento el seleccionado; no obstante, se observó que la eliminación del fármaco no era lineal. La figura R-V-1 representa las medias de las observaciones junto a las predicciones medias poblacionales obtenidas de un modelo con eliminación lineal, puede observarse la falta de concordancia entre observaciones y predicciones.

**Figura R-V-1:** Perfiles de concentración media observada (símbolos) y predicciones típicas poblacionales obtenidas a partir de un modelo farmacocinético lineal (líneas) frente al tiempo.



La inclusión de variabilidad interindividual fue significativa en todos los parámetros farmacocinéticos con excepción de la  $K_{ENZ}$  y el  $I_{MAX}$  (ver apartado 1.2). La variabilidad residual en los datos se adecuó a los dos componentes del modelo de error combinado.

### 1.1.- Modelo para el $CL_H$ y $F$

Cuando se consideró que AM-24 tenía un aclaramiento no-restrictivo, los modelos no convergían y no se podían obtener estimados de los parámetros. Teniendo en cuenta el criterio AIC, la asunción de una eliminación restrictiva se comportaba peor que los modelos intermedios. Sin embargo, en este último caso, las estimaciones de la variabilidad interindividual se situaban entre 150-200%. Teniendo en cuenta la homogeneidad de la muestra estudiada esos resultados probablemente sugieren una mala especificación del modelo. Cuando la biodisponibilidad relativa típica fue calculada utilizando la ecuación correspondiente, su valor fue siempre  $> 0,8$ , de tal manera que el  $CL_H$  se describió como  $CL_{INT} \times f_L$  y la  $F$  relativa se consideró igual a 1, como si estuviéramos ante un fármaco con aclaramiento restrictivo.



## 1.2.- Modelo para $CL_{INT}$

En la tabla R-V-1 se relacionan los valores de AIC para los modelos de no linealidad evaluados, incluyendo un modelo que asume cinética lineal (en su versión completa, esto es, con todos los efectos aleatorios significativos incorporados), obtenidos al considerar AM-24 un compuesto con aclaramiento restrictivo.

**Tabla R-V-1:** Resultados del AIC de los diferentes modelos evaluados

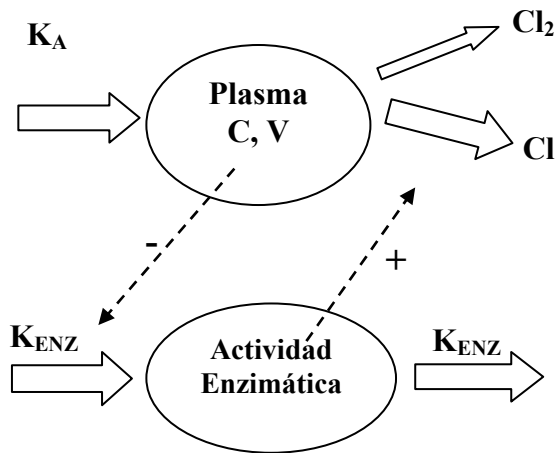
	Descripción	Número de parámetros <sup>1</sup>	AIC
<b>Modelo 0</b>	Farmacocinética lineal	3	5614,3
<b>Modelo I</b>	Cinética de Michaelis-Menten	5	3226,9
<b>Modelo II</b>	Interacción competitiva de metabolito	6	3029,3
<b>Modelo III</b>	Inhibición reversible de formación de enzima	7	3002,4
<b>Modelo IV</b>	Estimulación reversible de degradación de enzima	6	3014,9
<b>Modelo V</b>	Pérdida irreversible de enzima	6	3014,9

AIC, Criterio de Información de Akaike; <sup>1</sup>número correspondiente a parámetros de efecto-fijo; el número de parámetros de efecto-aleatorio fue 7 en todos los modelos excepto el 0 (n=5).

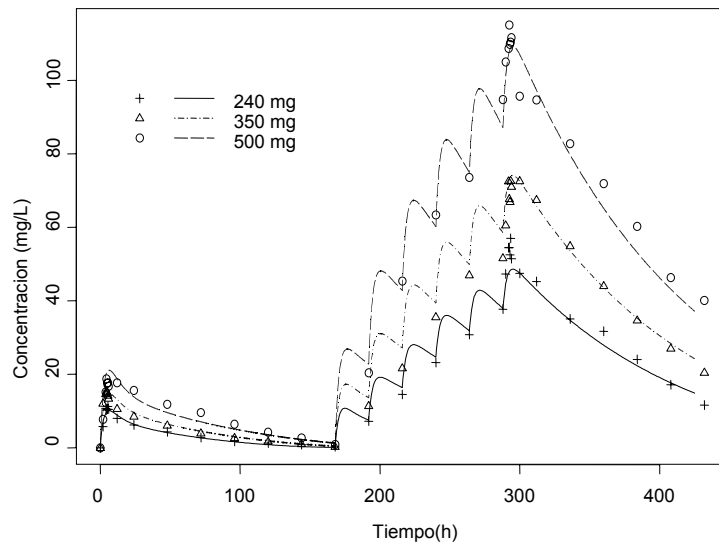
El modelo lineal (modelo 0), obviamente, es el que se comportó peor. Los modelos incorporando una cinética de Michaelis-Menten (modelo I) o la producción de un metabolito competitivo (modelo II) se comportaron peor que los modelos que incluyen la formación y degradación de un enzima responsable de parte de la eliminación de AM-24. De entre estos últimos modelos, se seleccionó el que representaba una inhibición reversible de la formación de enzima (modelo III).

La figura R-V-2 muestra, de manera esquemática, el modelo finalmente seleccionado y la figura R-V-3 las predicciones medias poblacionales que, como puede observarse, son capaces de describir adecuadamente y de manera simultánea las observaciones en el rango de dosis administrado.

**Figura R-V-2:** Representación esquemática del modelo farmacocinético seleccionado;  $K_A$ , constante de velocidad de absorción de 1<sup>er</sup> orden; C, Concentración plasmática; V, volumen de distribución aparente; Cl, aclaramiento plasmático susceptible de inhibición por el fármaco;  $Cl_2$ , aclaramiento plasmático representando vías de eliminación no afectadas por AM-24;  $K_{ENZ}$ , constante de velocidad de 1<sup>er</sup> orden que controla la velocidad de recambio de la cantidad de enzima.



**Figura R-V-3:** Perfiles de concentración media observada (símbolos) y predicciones típicas poblacionales obtenidas a partir del modelo seleccionado (líneas) frente al tiempo.



El modelo seleccionado viene representado por las siguientes ecuaciones:

1.  $dQ_{int}/dt = -K_A * Q_{int}$  ; donde  $dQ_{int}/dt$  representa la velocidad de cambio de la cantidad de fármaco en el intestino ( $Q_{int}$ ) y la  $K_A$  la constante de absorción de primer orden.
2.  $dC_p/dt = K_A * Q_{int} - (Cl * A_{ENZ}/V) * C_p$ ; donde  $dC_p/dt$  representa la velocidad de cambio de las concentraciones de fármaco en plasma ( $C_p$ ) y  $Cl$  y  $V$  representan el aclaramiento plasmático y volumen de distribución aparente del fármaco, respectivamente;  $A_{ENZ}$  hace referencia a la cantidad de enzima (no observada).
3.  $dA_{ENZ}/dt = K_{ENZ} * IN - K_{ENZ} * A_{ENZ}$  ; donde  $dA_{ENZ}/dt$  representa la velocidad de cambio de la cantidad de enzima;  $K_{ENZ}$  es la constante de velocidad de primer orden que controla el grado de recambio del enzima;  $IN$ , función que representa el grado de inhibición en la formación de enzima causado por la presencia del fármaco.
4.  $IN = 1 - I_{max} * C_p / (C_p + CI_{50})$ ; donde  $I_{max}$  es la capacidad máxima inhibitoria;  $CI_{50}$  la concentración de fármaco en plasma capaz de conseguir un grado de inhibición en la formación de enzima igual a la mitad del  $I_{max}$ , donde  $I_{max}$  puede variar desde 0 (no inhibición) hasta 1 (inhibición completa).

Además, en el modelo seleccionado se incorpora  $Cl_2$ ; donde  $Cl_2$  es el aclaramiento plasmático representando vías de eliminación no afectadas por AM-24.

A tiempo igual a 0 (antes de la administración del fármaco) el valor de la actividad enzimática fue, arbitrariamente fijado a 1, de tal manera que inicialmente  $A_{ENZ} = 1$  y  $Cl * A_{ENZ} = Cl$ . A medida que las concentraciones de fármaco empiezan a aparecer en el organismo comienzan a inhibir (no directamente) la actividad enzimática,  $A_{ENZ}$  empieza a ser menor que uno (pero siempre positiva), por tanto  $Cl * A_{ENZ}$  disminuye. En el modelo seleccionado, el valor de  $I_{MAX}$  fue estimado en 0,98, lo que significa que el fármaco a concentraciones suficientes y con una exposición lo suficientemente prolongada es capaz de inhibir el 98% de su propio metabolismo.  $K_{ENZ}$  controla la cinética de las modificaciones en la cantidad de enzima. Un valor alto de  $K_{ENZ}$  implicaría que cambios en las concentraciones del fármaco en plasma repercutirían rápidamente en la cantidad de enzima. En nuestro caso, el valor de  $K_{ENZ}$  es de 0,081 (L/h) lo que equivale a una semivida biológica de 8,5 h. Este resultado puede ser

interpretado de la siguiente manera: se necesitaría mantener al menos durante 42,5 horas un determinado valor constante de concentración en plasma para conseguir un grado de inhibición en la formación del enzima constante.

En la tabla R-V-2 aparecen representados los estimados de los parámetros farmacocinéticos y su medida de variabilidad interindividual. Sólo fue posible estimar la variabilidad interindividual en V, Cl, Cl<sub>2</sub>, k<sub>a</sub> y Cl<sub>50</sub>. Las figuras R-V-4 a R-V-6, muestran las observaciones y predicciones individuales para las distintas dosis de fármaco administradas.

**Tabla R-V-2:** Parámetros farmacocinéticos poblacionales obtenidos del modelo finalmente seleccionado.

Parámetro	Estimado (EER)	VII %
V (L)	16,2 (0,03)	12
Cl (L*h <sup>-1</sup> )	1,23 (0,18)	35
Cl <sub>2</sub>	0,103 (0,34)	30
k <sub>a</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,35 (0,11)	54
K <sub>ENZ</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,081 (0,14)	n.e
I <sub>MAX</sub>	0,98 (0,014)	n.e.
Cl <sub>50</sub> (mg*L <sup>-1</sup> )	0,56 (0,29)	65
Error residual aditivo (mg*L <sup>-1</sup> )	0,19 (0,19)	n.a.
Error residual proporcional (%)	17 (0,075)	n.a.

EER: error estándar relativo. VII variabilidad interindividual expresada como coeficiente de variación (%); V, volumen de distribución aparente; Cl, aclaramiento plasmático susceptible de inhibición por el fármaco; k<sub>a</sub>, constante de velocidad de absorción de primer orden; K<sub>ENZ</sub>, constante de velocidad de primer orden que controla la velocidad de recambio de la cantidad de enzima; I<sub>MAX</sub>, máxima capacidad inhibitoria de AM-24 sobre K<sub>ENZ</sub>; Cl<sub>50</sub>, concentración de fármaco en el plasma capaz de conseguir la mitad de I<sub>MAX</sub>; Cl<sub>2</sub>. Aclaramiento plasmático que representa las vías de eliminación no afectadas por el AM-24; n.e. no estimado en el modelo.; n.a. no aplicable.

**Figura R-V-4:** Perfiles individuales de concentración observada (puntos) y predicciones individuales (líneas continuas) frente al tiempo para los individuos que recibieron la dosis de 240mg.

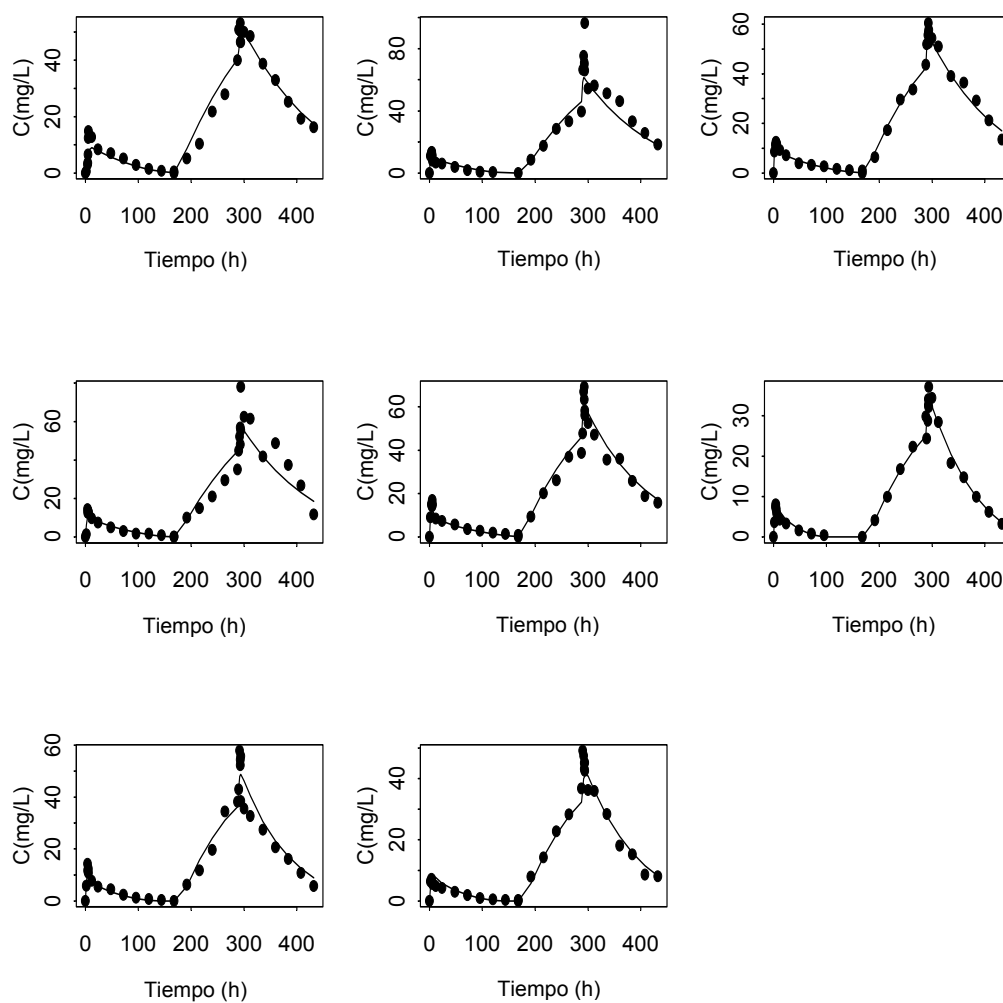
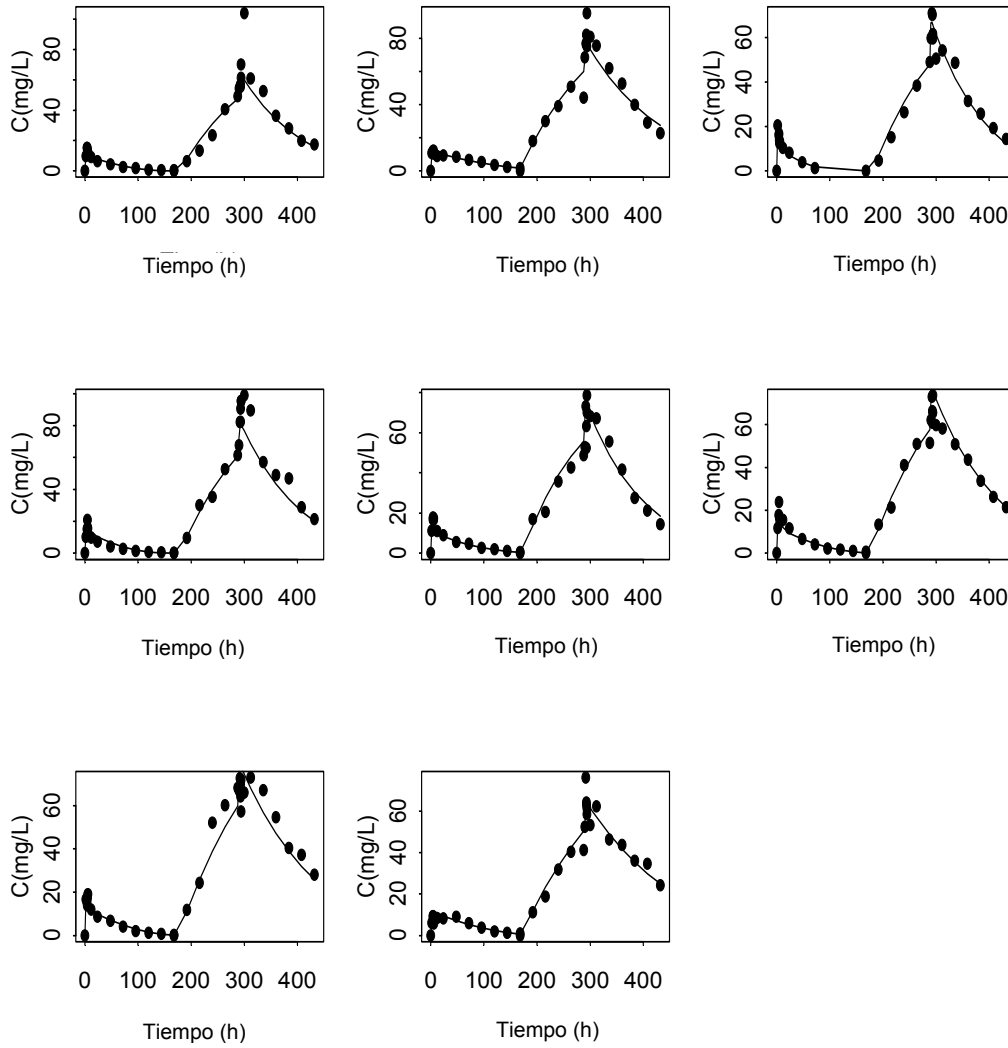
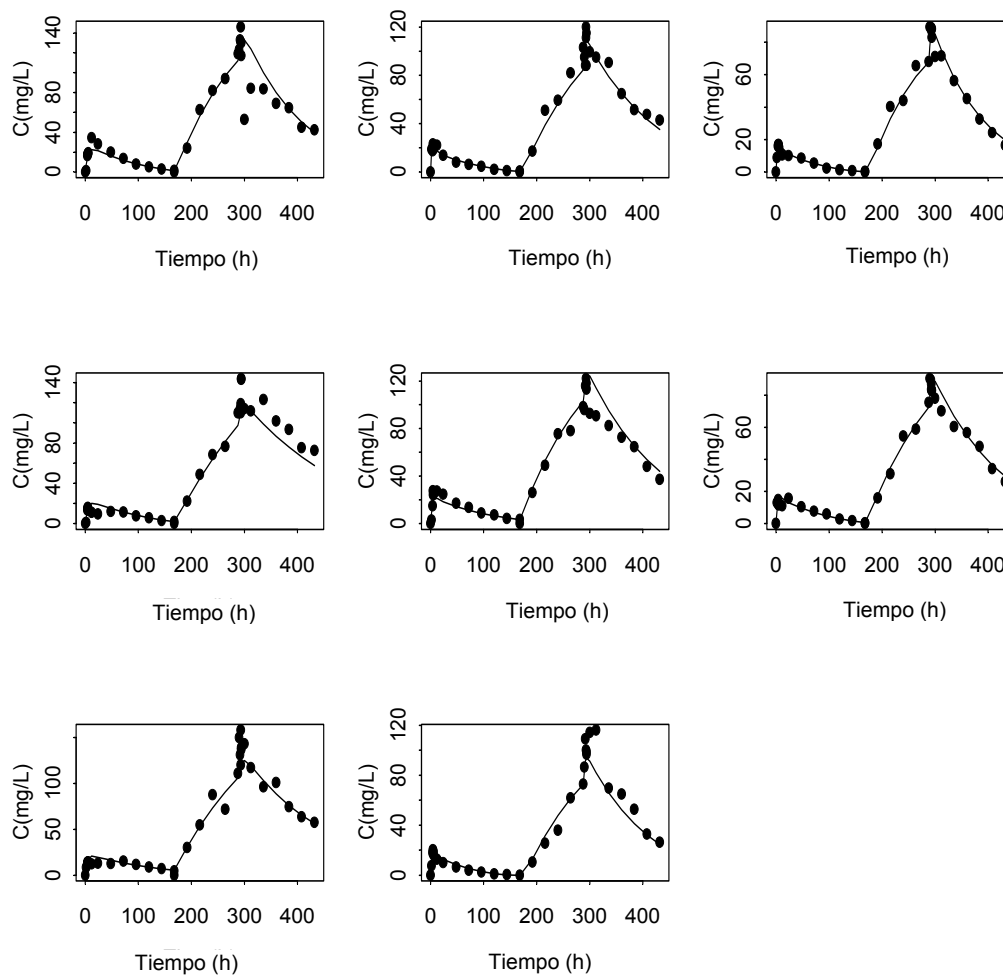


Figura R-V-5: Perfiles individuales de concentración observada (puntos) y predicciones individuales (líneas continuas) frente al tiempo para los individuos que recibieron la dosis de 350mg.



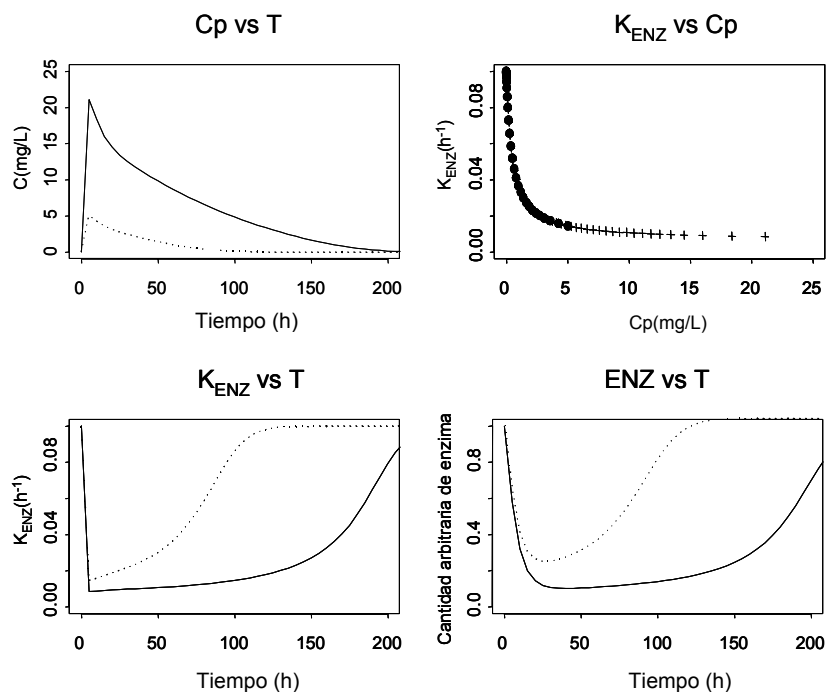
**Figura R-V-6:** Perfiles individuales de concentración observada (puntos) y predicciones individuales (líneas continuas) frente al tiempo para los individuos que recibieron la dosis de 500mg.



### 1.3.- Exploración del modelo

La figura R-V-7 permite observar las características del AM-24 en base a los estimados obtenidos del modelo finalmente seleccionado. En el panel superior izquierdo se muestran los perfiles simulados de concentración plasmática frente al tiempo tras dos dosis orales de 120 y 500mg. En el panel superior derecho se representa la relación entre la capacidad inhibitoria y las concentraciones de fármaco en plasma donde se observa que el nivel máximo de inhibición es muy similar tras las dos dosis, debido a que el valor de  $CI_{50}$  es muy bajo (0,56 mg/L). En el panel inferior derecho se representa el perfil de actividad enzimática tras las dos dosis, observándose que si bien el máximo grado de inhibición es semejante, la recuperación de la capacidad enzimática es anterior en la dosis más baja debido a que los niveles de fármaco en plasma alcanzan un valor inferior al de la  $CI_{50}$  más rápidamente. Puede observarse además, que tras una administración por vía oral de 120mg, la recuperación de la capacidad metabólica se restablece a los 5 días aproximadamente de haber administrado el fármaco.

**Figura R-V-7:** Exploración del comportamiento farmacocinético de AM-24 tras su administración oral en dosis de 120mg (trazos) y 500mg (línea continua). Panel superior derecho, puntos 120mg, cruces 500mg.



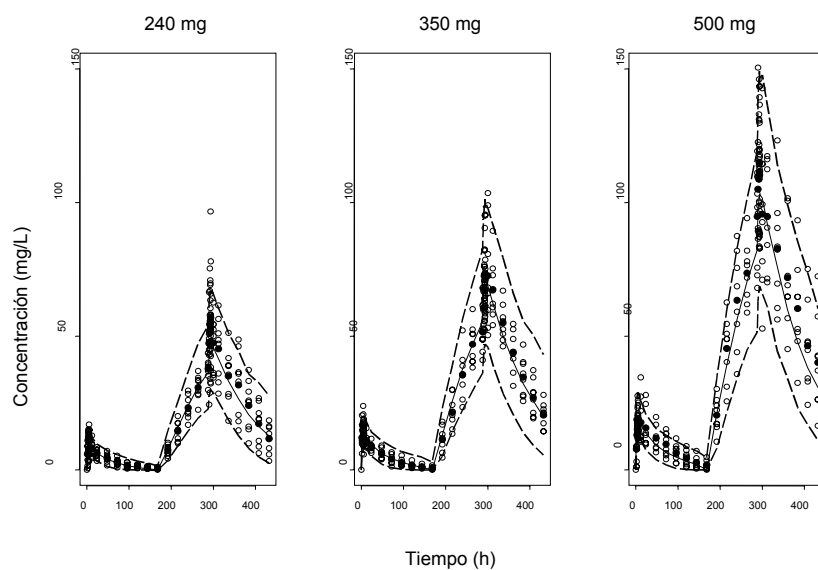


## 2.- VALIDACIÓN DEL MODELO

### 2.1.- Validación interna

La figura R-V-8 representa los resultados de los 1000 perfiles simulados para cada dosis. Puede observarse cómo los percentiles 5 y 95 engloban a la casi totalidad de las observaciones y como la mediana obtenida tiene un perfil muy similar a la tendencia media de las observaciones. Este resultado confirma la validez de los supuestos acerca de la normalidad y simetría alrededor del valor 0 de las fuentes de variabilidad interindividual estimadas.

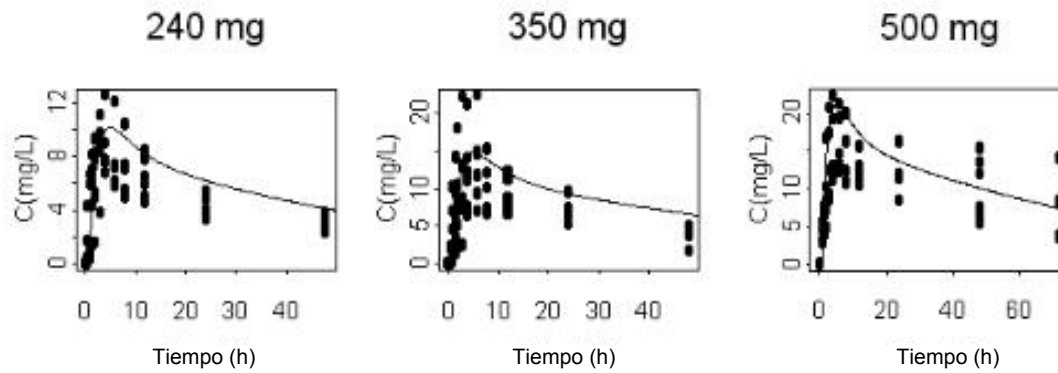
**Figura R-V-8:** Puntos blancos, observaciones experimentales; puntos negros, media de las observaciones; Líneas a trazos, percentiles 5 y 95 de las 1000 simulaciones; línea continua, mediana de las 1000 simulaciones.



## 2.2.- Validación externa

En la figura R-V-9 se observa que los perfiles simulados en base a los estimados medios poblacionales del modelo obtenido con los resultados del estudio de dosis repetida son capaces de describir la tendencia media para los grupos de dosis correspondiente en el estudio previo de dosis única.

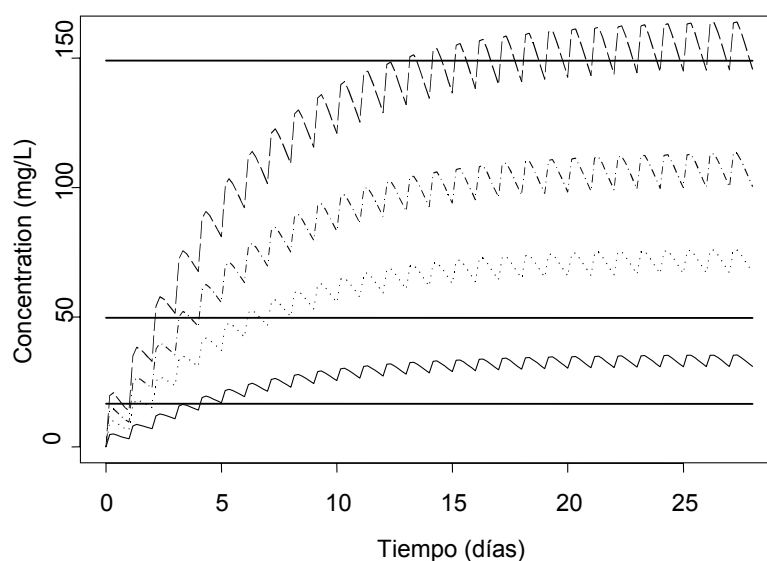
**Figura R-V-9:** Puntos, observaciones experimentales obtenidas en voluntarios sanos tras dosis única, estudio 1; líneas continuas, predicciones obtenidas en base al modelo seleccionado en el estudio de dosis repetidas, estudio 2.



### 3.- SIMULACIONES

La figura R-V-10 muestra el perfil de las concentraciones plasmáticas vs. tiempo de AM-24 tras la administración de 120, 240, 350 y 500mg una vez al día por vía oral durante 28 días.

**Figura R-V-10:** Perfiles de concentraciones plasmáticas simuladas de AM-24 vs tiempo tras 28 días de una administración oral única diaria de 120, 240, 350 y 500 mg. Las líneas horizontales muestran los niveles plasmáticos de AM-24 necesarios para alcanzar un 50, 75 ó 90% de inhibición máxima de la síntesis de LTB<sub>4</sub>.



Las concentraciones plasmáticas alcanzan el estado de equilibrio estacionario tras 3 semanas de tratamiento. La figura R-V-10 muestra como líneas horizontales los valores de concentraciones plasmáticas de AM-24 necesarios para obtener el 50% (16,56mg/L), el 75% (49,8mg/L) y el 90% (149mg/L) de inhibición de la síntesis de LTB<sub>4</sub>. Regímenes de dosificación de 240, 350 y 500mg una vez al día producen en estado de equilibrio estacionario porcentajes de inhibición de la síntesis de LTB<sub>4</sub> superiores al 75%. Si es necesario alcanzar la inhibición máxima, la dosis de mantenimiento debería ser de 500mg.

Las simulaciones sugieren que el uso de una dosis de ataque no sería necesario dado que el 75% de la inhibición de la síntesis máxima de LTB<sub>4</sub> se alcanza en el tercer día de tratamiento para los regímenes de dosificación basados en las dosis más altas (350 y 500mg).

### **3.1.- Propuesta de pauta de dosificación para continuar con el desarrollo clínico del compuesto en pacientes**

En vista de los resultados expuestos previamente, se cree que la pauta de dosificación de AM-24 más apropiada para utilizar en pacientes (fase II) consistiría en 500mg/día. Con esa pauta: (i) se prevé alcanzar un 90% de la inhibición de la síntesis máxima de LTB<sub>4</sub> en estado de equilibrio estacionario (a las 3 semanas de iniciado el tratamiento) y (ii) al tercer día de la administración de esa dosis se cree posible conseguir inhibir la síntesis máxima de LTB<sub>4</sub> en un 75%. Además, la dosis de 500mg tras administración oral repetida es segura y bien tolerada en relación a AA, constantes vitales, parámetros electrocardiográficos, parámetros clínicos de laboratorio y sangre oculta en heces. Si bien, 2, 3 y 2 voluntarios en los grupos de 240, 350 y 500mg, respectivamente, presentaron elevaciones leves, transitorias y asintomáticas de TSH.

## DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

La intervención de los leucotrienos se ha implicado en numerosos trastornos, incluyendo asma, rinitis alérgica, enfermedad inflamatoria intestinal, gota y artritis reumatoide<sup>(Lewis et al., 1990)</sup>. En la colitis ulcerosa, por ejemplo, se han detectado LTB<sub>4</sub> en dializados rectales llevados a cabo durante el episodio agudo, estando normalmente ausentes durante las remisiones, indicando una correlación positiva entre la generación de LTB<sub>4</sub> y la activación del trastorno<sup>(Lauritsen et al., 1986)</sup>. En este momento hay dos aproximaciones básicas en el intento de inhibir los efectos biológicos de los leucotrienos<sup>(Ford-Hutchinson, 1991)</sup>. Una implica el uso de antagonistas de los receptores de los leucotrienos; durante la década de los noventa se desarrollaron y lanzaron con éxito 3 antagonistas de los péptido-leucotrienos, activos y selectivos: estos fueron ICI204219 (zafirlukast, Accolate™, Astra-Zeneca), MK0476 (montelukast, Singulair™, Merck) y ONO1078 (pranlukast, Onon™, Ono, Aziaire™, Shering-Plough); todos ellos presentan un antagonismo competitivo muy potente frente a las acciones de los péptido-leucotrienos, selectivo a nivel de los receptores CysLT<sub>1</sub>. Estos antagonistas, estructuralmente distintos, han mostrado que son activos frente al broncoespasmo inducido por alérgenos, frío y ejercicio; todos ellos son efectivos frente a la fase precoz y tardía del broncoespasmo y reducen igualmente la hiperreactividad bronquial<sup>(Carter et al., 1991)</sup>. La otra aproximación consiste en la inhibición directa redox y no redox de la 5-LOX como el zileuton<sup>(Sirois et al., 1991)</sup> y el ICI D2138<sup>(Yates et al., 1992)</sup>, respectivamente; alternativamente, la biosíntesis de leucotrienos puede inhibirse por sustancias que se unen a un apoproteína de membrana, denominada proteína activadora de la 5-LOX (FLAP), como el compuesto denominado MK-886<sup>(Depré et al., 1993)</sup>; la FLAP permite la translocación de la 5-LOX desde el citosol a la membrana de neutrófilos o fagocitos estimulados por diversas sustancias como el ionóforo de calcio, el zymosan opsonizado o el factor activador plaquetar<sup>(Rouzer et al., 1990, Dixon et al., 1990)</sup>, siendo esencial para la activación de la enzima; muchos de estos compuestos han sido evaluados clínicamente, pero únicamente uno (zileuton) ha obtenido la aprobación por las Agencias Reguladoras<sup>(Kane et al., 1996)</sup>; sus características farmacológicas se asemejan a las de los antagonistas de los péptido-leucotrienos, pero el zileuton presenta, por otra parte, actividad en modelos inflamatorios que no son sensibles a la acción de los antagonistas de los receptores de péptido-leucotrienos, como la inhibición de la infiltración por los neutrófilos y el edema vascular en piel de ratón o conejo, ya que estas acciones estarían mediadas por la acción directa del LTB<sub>4</sub>. El mecanismo exacto por el que AM-24 (2,4,6-Triyodofenol

obtenido por síntesis) inhibe a la 5-LOX todavía no está plenamente esclarecido, si bien parece ser que no es del todo selectivo al inhibir también parcialmente y con menor potencia la ciclooxigenasa.

El objetivo principal de este proyecto de investigación ha sido, a partir de la disponibilidad de datos solamente pre-clínicos y no habiendo todavía administrado el compuesto a humanos, proponer una pauta de dosificación de AM-24 a utilizar en pacientes (fase II), esto es, proponer una pauta de dosificación que proporcione unos niveles plasmáticos asociados con actividad farmacológica.

Para conseguir ese objetivo, se han realizado dos estudios “*in vivo*” en voluntarios jóvenes sanos y dos estudios “in número”. Este conjunto de estudios, ha permitido determinar la Dosis Máxima Tolerada tras administración única, las características farmacocinéticas y de linealidad tras administración oral única así como determinar la existencia de una relación entre niveles plasmáticos y efecto farmacológico. Así mismo, ha permitido determinar, tras administración repetida del compuesto, su tolerabilidad, sus características farmacocinéticas y su falta de linealidad cinética.

### **Tolerabilidad y DMT**

Los resultados relativos a la tolerabilidad de AM-24 indican que es un compuesto bien tolerado cuando se administra a sujetos varones jóvenes sanos, tanto tras ingesta oral única en el rango de dosis entre 6mg y 1200mg, como tras ingesta oral repetida (durante 6 días) en el rango de dosis de 240mg a 500mg. La tolerabilidad ha sido evaluada mediante el registro de los AA espontáneos y los anotados en el cuestionario de AA sugeridos, y mediante la realización de una serie de pruebas clínico-biológicas, incluyendo la exploración física, constantes vitales (presión arterial, frecuencia cardiaca y temperatura axilar), ECG y parámetros de laboratorio, tanto hematológicos y bioquímicos como sedimento urinario. Especial atención merecen dos aspectos analizados: los niveles plasmáticos de hormona tireotropa (TSH) y la eventual presencia de sangre oculta en heces.



Los AA notificados, tanto tras dosis única como tras dosis repetida, fueron, en todos los casos, de intensidad leve o moderada, no habiéndose notificado la aparición de ningún AA grave. Entre los AA sugeridos, los más frecuentemente registrados fueron “somnoliento”, “boca seca” y “cansancio general”, no evidenciándose diferencias entre la administración única o repetida ni entre los distintos tratamientos evaluados (no se ha observado una relación dosis-respuesta, es decir, un incremento de AA al aumentar las dosis administradas), siendo la proporción similar en el grupo placebo. La naturaleza e intensidad de los AA y su patrón de incidencia muestran el buen perfil de tolerabilidad del fármaco en estudio. El buen perfil de tolerabilidad también se demuestra ante los resultados obtenidos en el resto de parámetros de seguridad evaluados (exploración física, constantes vitales, ECGs y pruebas de laboratorio estándar) que en ningún caso presentaron alteraciones que pudieran ser calificadas como clínicamente relevantes.

El análisis de los niveles plasmáticos de hormona tireotropa (TSH) se llevaron a cabo ante la presencia de 3 átomos de yodo en la estructura molecular de AM-24. Tras administración oral única no se observó ningún valor fuera del rango de normalidad en la evaluación de dosis en el intervalo de 6 a 1200mg. Sin embargo, tras administración de dosis orales repetidas (6 días), a pesar que las medias de los valores en los distintos tratamientos se encontraban dentro de los límites de la normalidad, 7 voluntarios (de un total de 24 que recibieron medicación activa) presentaron niveles elevados de TSH en la analítica practicada al final del estudio (2 en la dosis de 240mg, 3 en la dosis de 350mg y 2 en la dosis de 500mg). En todos los casos la elevación fue de grado leve ( $< 1,5 \times \text{LSN}$ , esto es  $< 7,5 \text{ mUI/L}$ ), no estuvo asociada a ninguna clínica y se normalizó espontáneamente en las evaluaciones de seguimiento subsiguientes.

Otros compuestos con yodo en la molécula, como la amiodarona (que contiene dos átomos de yodo por molécula) causa hipotiroidismo o hipertiroidismo, que puede ser imprevisible y de comienzo repentino, en cerca de 4% de los pacientes <sup>(Trip et al., 1991; Davies et al., 1992)</sup>, siendo esta disfunción difícil de reconocer, ya que la amiodarona puede tener muchos efectos en los resultados de las pruebas de la función tiroidea, aun cuando no haya hipertiroidismo ni hipotiroidismo, con un aumento de la concentración sérica de tiroxina, triydotironina inversa y TSH, así como una baja de la concentración sérica de triydotironina <sup>(Harjai y Licata, 1997)</sup>. Son diversos los mecanismos descritos por los que la amiodarona puede afectar la función tiroidea, desde la liberación de un exceso de iones yodo diariamente <sup>(Rao et al., 1986)</sup>, la inhibición periférica (en el hígado) de actividad enzimática 5'-desiodinasa tipo I (que quita un átomo de yodo del anillo externo de la T<sub>4</sub> para generar T<sub>3</sub> y del anillo externo de la T<sub>3r</sub> para producir T<sub>2</sub>), un efecto citotóxico directo, un efecto autoinmune sobre el tiroides o incluso su posible interacción con receptores tiroideos a nivel tisular periférico <sup>(Martino et al., 2001)</sup>. Por lo general, la enfermedad de la tiroides causada por amiodarona puede tratarse con medicamentos y raras veces exige discontinuación del tratamiento con ese producto <sup>(Harjai y Licata, 1997)</sup>.

Los resultados obtenidos en los niveles plasmáticos de TSH tras administración repetida (6 días) de dosis orales de 240 a 500mg de AM24, si bien no preocupantes desde una perspectiva de compromiso importante en la seguridad clínico-biológica del compuesto, claramente alertan sobre la necesidad de llevar a cabo un seguimiento pormenorizado y exhaustivo de la fisiología de la función tiroidea en caso de continuar con el desarrollo del fármaco. A diferencia de la amiodarona, en que, a parte del exceso de yodo que su administración ocasiona, presenta una estructura molecular particular que hace que presente otros muchos niveles de interacción, posiblemente AM-24, dada su simplicidad estructural, solamente condicionara un aporte de yodo diario excesivo. Unos niveles excesivos de yodo terminan por producir un bloqueo de la captación de yodo por el tiroides, lo que a su vez, provoca hiperproducción de TSH por la hipófisis <sup>(Wolff, 1969; Glatte et al., 1993)</sup>. Sin embargo, todas estas consideraciones, en este momento, no son más que meras especulaciones teóricas tributarias de evaluaciones experimentales específicas para comprobar su eventual correspondencia con la realidad.

El análisis de la posible presencia de sangre en heces se llevó a cabo ante el eventual mecanismo de acción como inhibidor de la síntesis de PGs, al haberse descrito que AM-24 a parte de inhibir la 5-LOX también inhibiría parcialmente y con menor potencia la

ciclooxigenasa. Aunque tras la administración de otros inhibidores de la 5-LOX, como el zileuton, no se ha reportado el sangrado gastrointestinal como un AA a tener presente<sup>(Spector, 2001)</sup>, está ampliamente reconocida la capacidad de los antiinflamatorios no esteroideos, como inhibidores de la síntesis de PGs, de provocar la pérdida fecal de sangre<sup>(Porro et al., 1977; Bianchine et al., 1982)</sup>. Así mismo, la posibilidad de que al menos parte de esa pérdida fecal de sangre sea mediada sistémicamente y no sólo localmente, condiciona la importancia de evaluar tal eventualidad no restrictivamente solo tras las primeras administraciones, sino principalmente tras alcanzar concentraciones plasmáticas estables<sup>(Hooper et al., 1985)</sup>, como se planificó en la ejecución del segundo estudio “*in vivo*”. La administración de AM-24, en las evaluaciones efectuadas no ha mostrado que ocasionara la presencia de sangre oculta en heces mediante una prueba basada en el guayaco (test de bencedina).

Si bien hay otras pruebas, como los tests hemo-porfirinas y test inmunoquímicos que son más selectivas<sup>(Mitchell et al., 2004)</sup> e incluso técnicas de marcaje radiactivo de eritrocitos con Cr51 que permiten una cuantificación estricta del posible microsangrado gastrointestinal<sup>(Lussier et al., 1988)</sup>, la utilización de las pruebas basadas en reacciones con guayaco claramente permiten un primer despistaje de este posible AA con un nivel clínicamente suficiente de sensibilidad<sup>(Rockey, 1999)</sup>. En todas aquellas situaciones en las que se efectúa este tipo de evaluaciones, la necesidad de un estricto control dietético para evitar falsos positivos (carne roja, fruta –melón, pomelo e higos- y vegetales crudos –rábano, coliflor, bróquil, nabo, pepino, zanahoria, col, patata, calabaza, perejil y calabacín-) y/o falsos negativos (vitamina C) es una exigencia ineludible tanto en el diseño y planificación de los estudios, como a tener presente su posible trasgresión para una correcta interpretación de los resultados<sup>(Rockey, 1999)</sup>. Así sucedió en el voluntario que dio positivo en la evaluación final tras la dosis de 240mg, en el que se pudo constatar que el positivo obtenido en la prueba de bencidina obedecía a la presencia de hemoglobina no-humana, al haber consumido el día anterior a la recogida de las heces carne prácticamente cruda.

Así, como consecuencia de los resultados obtenidos en los dos estudios “*in vivo*” en los que no se evidenció ningún AA con un grado de severidad que condicionara la interrupción del diseño planificado y por tanto la determinación de una dosis como Dosis Mínima Intolerada, se procedió a identificar como Dosis Máxima Tolerada, aquella más alta evaluada, correspondiéndose a 1200mg tras administración oral única y 500mg durante 6 días tras administración oral repetida.

## Farmacocinética

Un aspecto a resaltar del presente proyecto consistió en la habilidad de evaluar el perfil farmacocinético, y también el perfil farmacodinámico, de AM-24 ya durante el primer estudio “*in vivo*” efectuado en humanos cuyo objetivo principal era la evaluación de la Dosis Máxima Tolerada y por lo tanto su diseño estaba especialmente planteado para abordar ese objetivo. Los resultados han permitido iniciar la caracterización de la absorción, distribución y eliminación de AM-24 en humanos.

### *Absorción y biodisponibilidad*

El AM-24 se absorbe tras administración oral (Tabla D-1), con un  $t_{max}$  no inmediato (alrededor de 6 horas) y calculándosele un tiempo medio de absorción entre una 1,5 y 2 horas, sin necesidad de incorporar un tiempo de latencia. Las AUCs y las  $C_{max}$ s van incrementándose al aumentar las dosis, no habiéndose podido determinar la biodisponibilidad absoluta al no disponer de información relativa a su administración por vía endovenosa.

Hay que tener en cuenta que al plantearse la caracterización cinética como objetivo secundario, el diseño fue necesario ajustarlo progresivamente en función de los resultados que se fueron obteniendo, en particular, durante la realización del estudio 1. Así, las dosis de 120mg y dos voluntarios en la dosis de 240mg, el último punto experimental obtenido fue a +24 horas, los restantes voluntarios en la dosis de 240mg y la dosis de 350mg el último punto experimental fue a +48 horas y las dosis de 500, 700 y 1200mg lo fue a +72 horas, resultando en todos los casos el porcentaje medio de extrapolación desde el último tiempo experimental hasta el infinito superior al 32%. Es por ello, la necesidad de considerar como preliminares algunos de los resultados, especialmente aquellos que se ven especialmente afectados por la falta seguimiento temporal suficientemente prolongado. En el estudio 2 para caracterizar la administración oral única se planteó un seguimiento hasta +144 horas (+6 días); de hecho, a +168 horas (+7 días, muestra basal antes de iniciar la administración oral repetida) todavía se detectaron niveles cuantificables de AM-24 en 19 de los 24 voluntarios participantes. Ello demuestra que los datos farmacocinéticos obtenidos en el primer estudio “*in vivo*” fueron insuficientes para prever el comportamiento farmacocinético que finalmente mostró este fármaco.

Son muchos los factores que afectan la absorción oral de los fármacos: desintegración de la forma de dosificación, disolución de las partículas, estabilidad química y enzimática de los compuestos, motilidad y mezcla en el tracto gastrointestinal, presencia y tipo de alimentos, paso a través de la pared y flujo sanguíneo gastrointestinal, tiempo de vaciamiento gástrico <sup>(Pla y Martin, 1998)</sup>. Teniendo en cuenta que los factores dependientes del voluntario intentaron estar controlados por el diseño experimental y que el compuesto se describe como soluble en medio alcalino, la poca velocidad en la absorción observada podría ser consecuencia tanto de la formulación galénica específica utilizada en los estudios como de las propias características físico-químicas del compuesto. No disponemos de información “*in vitro*” relativa a las características de la formulación galénica. En relación a las características físico-químicas del compuesto, su liposolubilidad, que contribuiría a un rápido cruce de membranas, condicionada por su estructura elemental como núcleo bencénico, sin duda se ve limitada por la presencia de un sustituyente alcohólico y tres sustituyentes con yodo, que introducen cierta polaridad en la molécula.

En relación a la biodisponibilidad en magnitud, si bien es cierto que la ausencia de información tras administración intravenosa sitúa las siguientes consideraciones en el terreno de la especulación, es relevante considerar que el modelo que se seleccionó en el segundo estudio “in número” (análisis poblacional) fue un modelo de aclaramiento hepático estrictamente restrictivo, lo que supone que el CL es proporcional a los cambios en  $CL_{INT}$  y que F tiene un valor próximo a 1. De hecho, cuando se calcularon valores típicos de biodisponibilidad utilizando las fórmulas no simplificadas derivadas de considerar que la eliminación hepática seguía un modelo “de compartimentos bien agitados” (well-stirred model) los valores siempre fueron  $> 0.8$ . Además, datos farmacocinéticos obtenidos en rata <sup>(Peraire et al., 1998)</sup> mostraron una biodisponibilidad absoluta en magnitud del 73% y en el perro del 91% <sup>(PEI, 1996)</sup>. Sin embargo, los valores de biodisponibilidad absoluta en el caballo fueron alrededor del 23% <sup>(PEI, 1996)</sup>.

**Tabla D-1:** Parámetros farmacocinéticos que caracterizan la absorción del AM-24 obtenidos por las distintas aproximaciones de cálculo realizadas.

Parámetro	Unidad	Pauta	Características	Estudio	Aproximación	Dosis		
<b>AUC<sub>0</sub> (DE)</b>	<b>(mg/L)*h</b>					<b>240mg</b>	<b>350mg</b>	<b>500mg</b>
		DU	<i>In vivo</i>	Estudio 1	Amodelístico	327,69 (59,52)	513,66 (116,13)	1348,92 (906,06)
		DU	<i>In vivo</i>	Estudio 2	Amodelístico	537,43 (199,57)	740,70 (196,54)	1526,54 (657,60)
		DM	<i>In vivo</i>	Estudio 2	Amodelístico	1141,68 (246,57)	1652,36 (276,57)	2337,89 (540,05)
			<i>In numero</i>	Datos 1	Promediado simple	246,58 (27,85)	417,72 (19,08)	1240,19 (60,21)
			<i>In numero</i>	Datos 2	Poblacional			
<b>C<sub>max</sub> (DE)</b>	<b>mg/L</b>					<b>240mg</b>	<b>350mg</b>	<b>500mg</b>
		DU	<i>In vivo</i>	Estudio 1	Amodelístico	9,54 (1,58)	14,09 (4,86)	16,17 (3,77)
		DU	<i>In vivo</i>	Estudio 2	Amodelístico	12,76 (3,39)	17,31 (4,81)	21,16 (6,92)
			<i>In numero</i>	Datos 1	Promediado simple	8,42 (18,74)	12,32 (35,93)	14,83 (22,28)
			<i>In numero</i>	Datos 2	Poblacional			
<b>t<sub>max</sub> (DE)</b>	<b>h</b>					<b>240mg</b>	<b>350mg</b>	<b>500mg</b>
		DU	<i>In vivo</i>	Estudio 1	Amodelístico	4,67 (3,66)	5,17 (1,83)	12,67 (17,32)
		DU	<i>In vivo</i>	Estudio 2	Amodelístico	4,69 (0,75)	4,5 (1,20)	16,5 (23,43)
		DM	<i>In vivo</i>	Estudio 2	Amodelístico	292,44 (1,21) [4,44]	297,13 (6,83) [9,13]	294,56 (7,18) [6,56]
			<i>In numero</i>	Datos 1	Promediado simple	5,93 (56,40)	7,21(44,59)	12,04 (66,09)
			<i>In numero</i>	Datos 2	Poblacional			
<b>k<sub>a</sub></b>	<b>1/h</b>					<b>240mg</b>	<b>350mg</b>	<b>500mg</b>
			<i>In numero</i>	Datos 1	Promediado simple	0,65 (77,48)	0,45 (60,69)	0,42 (32,23)
			<i>In numero</i>	Datos 2	Poblacional		0,35 (VII 54)	
<b>t<sub>1/2</sub> K<sub>a</sub></b>	<b>h</b>					<b>240mg</b>	<b>350mg</b>	<b>500mg</b>
			<i>In numero</i>	Datos 1	Promediado simple	1,75 (75,20)	1,44 (46,81)	1,78 (31,87)
			<i>In numero</i>	Datos 2	Poblacional			

DE: desviación estándar. AUC: área bajo la curva. C<sub>max</sub>: concentración plasmática máxima. t<sub>max</sub>: tiempo al que se alcanza la C<sub>max</sub>. k<sub>a</sub>: constante de absorción. t<sub>1/2</sub>k<sub>a</sub>: Tiempo de semivida de la constante de absorción. [ ] t<sub>max</sub> calculado a partir de la última toma tras administración repetida. VII: variabilidad interindividual expresada como coeficiente de variación (%).

### Distribución

El AM-24 presentó un volumen de distribución no superior a los 30L, oscilando alrededor de los 15-30L (Tabla D-2), siguiendo su comportamiento un modelo monocompartimental.

El volumen de distribución está condicionado por la unión del fármaco a proteínas (plasmáticas o tisulares) y la salida del fármaco del interior vascular. La unión a proteínas plasmáticas condiciona un falseamiento por defecto, mientras que la unión a proteínas tisulares lo condiciona por exceso (González y Sánchez, 1998). Un volumen de distribución como el encontrado se situaría entre el correspondiente al fluido extracelular (alrededor de los 14 L) y el agua corporal total (alrededor de los 40 L). Volúmenes de distribución de esa magnitud son característicos de compuestos polares cargados, como la d-tubocurarina, o de compuestos con

una unión importante a proteínas plasmáticas. No disponemos de información relativa a la fracción libre o unida a proteínas plasmáticas de AM-24. Destacar que el comportamiento cinético del compuesto en los estudios llevados a cabo en animales (rata, perro y caballo) había podido ser ajustado de forma óptima a un modelo bicompartimental <sup>(Peraire et al., 1988)</sup>.

**Tabla D-2:** Parámetros farmacocinéticos que caracterizan la distribución del AM-24 obtenidos por las distintas aproximaciones de cálculo realizadas.

Parametro	Unidades	Pauta admin	Características	Fuente datos	Aproximacion	Dosis		
						240mg	350mg	500mg
Vd/F (DE)	L							
		DU	<i>In vivo</i>	Estudio 1	Amodelistico	29,59 (7,11)	29,32 (9,87)	32,04 (8,74)
		DU	<i>In vivo</i>	Estudio 2	Amodelistico	23,22 (7,88)	22,27 (3,32)	19,18 (5,16)
		DM	<i>In vivo</i>	Estudio 2	Amodelistico	17,03 (6,58)	21,34 (9,72)	28,55 (13,35)
			<i>In numero</i>	Datos 1	Promediado simple	22,76 (20,28)	23,53 (50,88)	30,89 (20,89)
			<i>In numero</i>	Datos 2	Poblacional		16,2 (VII 12)	

Vd/F: volumen de distribución aparente. DE: desviación estándar. VII: variabilidad interindividual expresada como coeficiente de variación (%).

### Eliminación

El AM-24 presentó, en el análisis amodelístico, un aclaramiento que osciló entre 0,8 y 0,3L/h y un tiempo de semivida relativamente largo que oscilaba entre 30 y 60 horas (tabla D-3). El aclaramiento cambió significativamente al comparar el observado tras administración única en relación al obtenido tras administración repetida, disminuyendo ostensiblemente y evidenciando una falta de linealidad cinética.

Anteriormente al desarrollo del presente modelo, la eliminación no lineal había sido modelada utilizando el modelo de saturación cinética de Michaelis-Menten <sup>(Gisleskog et al.,1999)</sup>, otros autores habían utilizado variaciones circadianas, como en el caso de la nicotina <sup>(Gries et al., 1998)</sup>, o, más frecuentemente, asumiendo que la eliminación es una función de un enzima. En condiciones basales los niveles de ese enzima se mantienen por el balance entre la síntesis y la degradación, procesos que pueden ser modificados por las concentraciones plasmáticas del fármaco en este tipo de modelos <sup>(von Bahr et al., 1998; Hassan et al., 1999)</sup>. Se han propuesto igualmente modelos más elaborados que tienen en cuenta el estado de activación o inactivación del enzima <sup>(Huitema et al., 2001; de Jonge et al., 2004)</sup>. Estos modelos están lejos de ser puramente mecanísticos pero son útiles para explorar los distintos escenarios de dosificación, ya que utilizan las concentraciones plasmáticas del fármaco o de sus metabolitos como el elemento capaz de generar las alteraciones tiempo-dependientes en la cantidad de enzima. También se

han propuesto otros modelos más empíricos, en los que el tiempo desde el inicio del tratamiento se utiliza como variable predictiva (Bonate et al., 2004). En el caso de AM-24, como no se conoce el mecanismo exacto que es responsable del aumento en la AUC, se probaron distintos modelos (segundo estudio “*in numero*”: análisis poblacional). Si el fármaco se hubiera dado por vía endovenosa, los cambios en el AUC reflejarían un cambio en el aclaramiento plasmático total. En cambio, si el fármaco se administra por vía oral, como en el caso que nos ocupa, los cambios en el AUC pueden ser consecuencia de variaciones en el CL o en la F. Asumiendo un modelo “de compartimentos bien agitados” (well-stirred model) como modelo de eliminación hepática, en el caso de un fármaco con aclaramiento no-restrictivo, el CL sería independiente de la actividad enzimática intrínseca ( $CL_{INT}$ ) y F estaría inversamente relacionada con el CL. En cambio, si el fármaco presentara un aclaramiento restrictivo, el CL sería proporcional a los cambios en  $CL_{INT}$  y F tendría un valor cercano a 1. Dado que, en este caso, no había información previa sobre la biodisponibilidad absoluta en el hombre, se aplicaron a los datos modelos que consideraban un aclaramiento restrictivo, un aclaramiento no-restrictivo y un aclaramiento de características intermedias. En base a los criterios aplicados para seleccionar el mejor modelo, parecía que el CL debería ser el parámetro que mostraba la no-linealidad.

Desgraciadamente, al no disponer de información tras administración endovenosa, no es posible explicar de forma más exhaustiva los posibles mecanismos de inhibición enzimática, ni los enzimas implicados. Hay ejemplos en la literatura que muestran que numerosos enzimas responsables de la eliminación de fármacos se (auto)inhiben tras exposición continuada. Así, la presencia de concentraciones elevadas de 3'-acido-3'-deoxitimidina (AZT) en cultivos de células placentarias primarias indujeron una disminución en uridina difosfato glucuroniltransferasa, resultando en una autoinhibición del metabolismo del AZT (Collier et al., 2004). En otros casos, se ha observado que la actividad del CYP 2D6 disminuía tras 6 semanas de administración continuada de paroxetina (Solai et al., 2002) o que el antagonista del calcio de acción retardada, mibrefadil, era capaz de inhibir su propio metabolismo al disminuir la actividad del CYP 3A4 (Welker et al., 1998). Sin embargo, en ninguno de los estudios citados se intentó modelar la cinética de este comportamiento de autoinhibición, por lo que no es posible realizar comparaciones entre las estimas de los parámetros de los modelos y, según nuestro conocimiento, el trabajo actual es el primero en que se comunica una modelización de una autoinhibición del aclaramiento de un fármaco. De todas formas, otros modelos utilizados para explicar los fenómenos de inducción enzimática han reportado estimas para el parámetro



$K_{ENZ}$  ( $h^{-1}$ ) [0,027 (Hassan et al., 1999); 0,041 (Huiteima et al., 2001); 0,034 (de Jonge et al., 2004)] que son de un orden similar a la que se ha obtenido en el presente estudio (0,081).

El tiempo de semivida de eliminación relativamente largo (entre 30 y 60 horas) observado, en realidad, ante la no-linealidad cinética encontrada tras administración repetida carece de una inequívoca utilidad práctica. Existen compuestos, sin embargo, con tiempos de vida media incluso más largos como por ejemplo la cloroquina o la amiodarona con valores entre 41 días y 17 días, respectivamente (Latini et al., 1984, Frisk-Holmberg et al., 1984). El factor común que presentan estos compuestos que contribuye a prolongar sus tiempos de vida media es su extensa disponibilidad tisular más que un bajo aclaramiento plasmático. Por ejemplo, a pesar de valores de aclaramiento plasmático moderados de 8 a  $25Lh^{-1}$ , los volúmenes de distribución de amiodarona y cloroquina son 4.600 y  $\geq 20.000L$ , respectivamente, con cocientes entre las concentraciones tejido: plasma alrededor de 500. Otro fenómeno que puede condicionar un tiempo de vida media largo es la posibilidad de que el compuesto esté sujeto a una extensa recirculación enterohepática (Shargel y Yu, 1985a). No se dispone de información sobre la importancia cuantitativa de la excreción urinaria de AM-24 ni de su posible excreción vía biliar. La relevancia y contribución relativa de estas consideraciones debería ser objeto de futuras evaluaciones.

**Tabla D-3:** Parámetros farmacocinéticos que caracterizan la eliminación del AM-24 obtenidos por las distintas aproximaciones de cálculo realizadas.

Parámetro	Unidades	Pauta Admin	Características	Estudio	Aproximación	Dosis		
						240mg	350mg	500mg
<b>Cl/F (DE)</b>	<b>L/h</b>							
		DU	<i>In vivo</i>	Estudio 1	Amodelístico	0,75 (0,14)	0,72 (0,22)	0,49 (0,24)
		DU	<i>In vivo</i>	Estudio 2	Amodelístico	0,53 (0,26)	0,50 (0,14)	0,39 (0,17)
		DM	<i>In vivo</i>	Estudio 2	Amodelístico	0,22 (0,05)	0,22 (0,03)	0,22 (0,05)
			<i>In numero</i>	Datos 1	Promediado simple	1,05 (32,73)	0,87 (25,21)	0,43(70,69)
			<i>In numero</i>	Datos 2	Poblacional		1,23 (VII 35)	
<b><math>K_e</math> (DE)</b>	<b>1/h</b>					240mg	350mg	500mg
		DU	<i>In vivo</i>	Estudio 1	Amodelístico	0,03 (0,007)	0,03 (0,009)	0,02 (0,008)
		DU	<i>In vivo</i>	Estudio 2	Amodelístico	0,02 (0,005)	0,02 (0,01)	0,02 (0,01)
		DM	<i>In vivo</i>	Estudio 2	Amodelístico	0,01 (0,01)	0,01 (0,001)	0,01 (0,001)
			<i>In numero</i>	Datos 1	Promediado simple	0,05 (30,27)	0,05 (51,33)	0,02 (69,61)
			<i>In numero</i>	Datos 2	Poblacional			
<b><math>t_{1/2}</math> (DE)</b>	<b>h</b>					240mg	350mg	500mg
		DU	<i>In vivo</i>	Estudio 1	Amodelístico	27,48 (5,72)	30,00 (13,51)	64,34 (60,16)
		DU	<i>In vivo</i>	Estudio 2	Amodelístico	32,52 (7,27)	31,86 (5,63)	37,92 (13,91)
		DM	<i>In vivo</i>	Estudio 2	Amodelístico	54,15 (19,13)	66,50 (22,78)	92,12 (46,83)
			<i>In numero</i>	Datos 1	Promediado simple	15,92 (30,73)	19,71 (62,29)	52,49 (0,77)
			<i>In numero</i>	Datos 2	Poblacional			

Cl/F: Aclaramiento.  $k_e$ : cte de eliminación.  $t_{1/2}$ : tiempo de semivida. DE: desviación estándar. VII: variabilidad interindividual expresada como coeficiente de variación (%).

### *Administración repetida*

En la administración a dosis repetidas, cuando se efectuó el primer estudio “in número” se obtuvieron  $C_{av}$ s de 11,88mg/L (240mg), 17,21mg/L (350mg) y 45,38mg/L (500mg) y fluctuaciones equivalentes a un 56,53% (240mg), 55,82% (350mg) y 25,34% (500mg). Los resultados derivados de la administración durante 6 días de esas dosis (estudio 2 “in vivo”) fueron unas  $C_{av}$ s de 47,57mg/L (240mg), 68,85mg/L (350mg) y 97,41mg/L (500mg) y fluctuaciones de 57,36% (240mg), 48,72% (350mg) y 55,89% (500mg).

Tras la administración repetida de dosis iguales a un determinado intervalo de dosificación, las concentraciones plasmáticas alcanzan el estado de equilibrio estacionario. En este estado estacionario los niveles plasmáticos fluctúan entre la  $C_{max}$  y la  $C_{min}$  de forma constante. Cuanto mayor es el número de dosis administradas, menor es el grado de fluctuación. Las fluctuaciones de los niveles plasmáticos serán tanto mayores cuanto más considerables sean las diferencias entre el intervalo de dosificación y el tiempo de semivida. Así, en la administración crónica diaria de sulfamidas de acción prolongada el nivel es prácticamente constante mientras que con la penicilina se observan grandes fluctuaciones<sup>(Shargel y Yu, 1985b)</sup>. En fármacos con un índice terapéutico estrecho, el intervalo de dosificación no debería ser mayor que el tiempo de semivida de eliminación. Para regular la fluctuación, puede recurrirse, en fármacos de tiempo de semivida corto, a la administración de dosis mayores más espaciadas siempre que las fluctuaciones no excedan el límite superior y entren en la zona de toxicidad<sup>(Shargel y Yu, 1985b)</sup>. En el caso de AM-24, si hubiera tenido un comportamiento cinético lineal y ante un tiempo de semivida relativamente largo (entre 30 y 60 horas) una pauta de administración adecuada consistiría en su administración cada 24 horas, alcanzando el nivel de equilibrio estable entre el quinto y el décimo día.

Es de destacar que ante la disminución del aclaramiento tras administración repetida sin cambios importantes en el volumen de distribución (que condiciona un aumento de la semivida) debería observarse un aumento del nivel estable, del tiempo que tarda en alcanzarse y una disminución en la fluctuación plasmática. Los resultados obtenidos en el segundo estudio “in vivo” claramente constataron el aumento del nivel estable previsible, sin embargo, no se observó la eventual disminución en la fluctuación plasmática. Ésta solo se evidenció cuando se llevó a cabo el primer estudio “in número”, al simular el comportamiento de la

administración repetida de la dosis de 500mg (que ya se asociaba con un incremento considerable de la semivida en relación a dosis inferiores). La no evidencia de la reducción esperable en la fluctuación plasmática ante la disminución del aclaramiento tras administración repetida podría ser un artefacto consecuencia de “haberse quedado corto” en el régimen posológico en cuanto a dosis/día a administrar para haber alcanzado plenamente la situación de equilibrio estacionario, al también aumentar el tiempo requerido para su consecución.

### ***Linealidad cinética***

El primer estudio “*in vivo*” tras administración oral única de dosis crecientes (entre 6 y 1200mg) ya proporcionó datos farmacocinéticos iniciales en los que el  $AUC_0^\infty/D$ ,  $Cl/F$ ,  $k_e$  y  $t_{1/2}$  presentaban diferencias estadísticamente significativas al aumentar la dosis administrada, lo que traduciría la existencia de no linealidad cinética. Las comparaciones *post-hoc* dos a dos sugerían que la pérdida de linealidad cinética aparecía de forma inequívoca entre las dosis de 500 mg y 700mg. El comportamiento cinético no-lineal del fármaco quedó claramente demostrado con los resultados obtenidos en el segundo estudio “*in vivo*” en el que la comparación de la  $AUC_0^\infty$  obtenida tras la administración de una dosis única (día 0) con la  $AUC_\tau^{EE}$  obtenida tras la administración de dosis repetida mostró diferencias estadísticamente significativas para las tres dosis estudiadas (240, 350 y 500mg).

La falta de linealidad cinética puede producirse básicamente por tres mecanismos <sup>(Gabrielsson y Weimar, 1979)</sup>: (i) por efecto del transcurso del tiempo, caracterizada por la necesidad de introducir el factor tiempo para que la no linealidad se manifieste, habiéndose descrito casos de inhibición por producto final (lidocaína), hepatotoxicidad (paracetamol a dosis altas) o autoinducción (carbamecepina) <sup>(Rowland y Tozer, 1995; García-Sánchez, 1997)</sup>; (ii) por efecto directo sobre el aclaramiento, caracterizada por cambios en la perfusión o flujo en los órganos de eliminación como el hígado o los riñones, como en el caso de las alteraciones de la diuresis en relación a la eliminación de teofilina; y (iii) por efecto sobre la capacitancia, cuando es consecuencia de que alguna etapa presenta un comportamiento saturable, habiéndose descrito ejemplos en la absorción (riboflavina, amoxicilina), en el fenómeno de primer paso (propranolol), en la distribución, por presentar una unión a proteínas plasmáticas saturable (disopiramida, ácido valproico), en la excreción (penicilina, ácido ascórbico) o en el

metabolismo, ya sea por existir una biotransformación de capacidad limitada (fenitoína) o por una limitación en el aporte de cofactores (salicilamida). También se ha descrito falta de linealidad cinética como consecuencia de la baja solubilidad del compuesto (griseofulvina) (Rowland y Tozer, 1995; García-Sánchez, 1997). En el caso del AM-24 y como resultado del segundo estudio “*in numero*” (aproximación poblacional) se puede proponer como posible mecanismo subyacente a su no-linealidad cinética el efecto del transcurso del tiempo, como consecuencia de una inhibición reversible en la formación del enzima responsable de su eliminación. El estimado de  $0,081\text{h}^{-1}$  obtenido en el modelo seleccionado como  $K_{\text{ENZ}}$  (constante que controla la velocidad de recambio de la cantidad de enzima) que se corresponde con una vida media de recambio de 8,5 horas explicaría el hecho de que, mientras el tiempo para alcanzar el  $C_{\text{max}}$  es de alrededor de 6 horas, el tiempo para alcanzar la disminución máxima de la cantidad de enzima es aproximadamente de 2 días. Sin embargo, la autoinhibición ya ocurre tras una única administración y puede tener consecuencias experimentalmente contrastables si el curso temporal de las concentraciones plasmáticas que se obtienen supone alcanzar determinada inhibición en la formación del enzima (Trocóniz et al., 2006).

Es interesante destacar que la información pre-clínica de que se disponía no alertó suficientemente de la posible importancia que podría suponer la posibilidad de una falta de linealidad cinética, especialmente tras administración repetida. En rata y perro sólo se evaluó el comportamiento cinético de AM-24 tras administración única (PEI, 1996). En caballo, sin embargo, se observó que los valores obtenidos tras administración repetida (23 días) eran sensiblemente más altos que los esperados (PEI, 1996).

## Farmacodinamia

Farmacodinámicamente se evidenció una suficientemente buena relación sigmoide entre las concentraciones plasmáticas de AM-24 y la inhibición de la biosíntesis de  $\text{LTB}_4$  tras estimulación con ionóforo de calcio en sangre completa “*ex vivo*” con una concentración inhibidora del 50% ( $\text{CI}_{50}$ ) de aproximadamente 16,56mg/L.

Dadas las características del estudio (dos evaluaciones por sujeto tras las distintas dosis administradas) la única estrategia de cálculo que se pudo aplicar fue la conocida con el nombre de método simple de combinación de datos, en la que la elaboración del “sujeto

poblacional" se lleva a cabo combinando todos los datos provenientes de los N individuos como si de uno sólo se tratase (Berg et al., 1992). Si bien esta estrategia presenta ciertas limitaciones, es interesante destacar que otros fármacos inhibidores de la 5-LOX también han mostrado una buena correlación entre los niveles plasmáticos y el efecto inhibitorio en la producción de LTB<sub>4</sub>, como el MK-886 (Depré et al., 1993) o el MK-0591 (Depré et al., 1994; Uematsu et al., 1994), pudiendo en este último estudio también calcular la CI<sub>50</sub> de ese compuesto, coincidiendo los valores derivados del estudio "ex vivo" con los obtenidos previamente en estudios "*in vitro*". En el estudio farmacodinámico realizado, la dosis que proporcionaría, tras una administración oral repetida, unas concentraciones plasmáticas (C<sub>av</sub>) que se corresponderían con las concentraciones capaces de producir el 50% del efecto máximo (CI<sub>50</sub>), en el supuesto que la cinética siguiera un comportamiento lineal, sería la dosis de 350mg. Es interesante destacar que a partir de datos pre-clínicos, en el modelo de inflamación cutánea provocada por el ácido araquidónico en ratones Balb/c hembra, la dosis inhibidora del edema en un 49.5% era la de 5 mg/kg, que a nivel humano se correspondería aproximadamente a 5mg x 70kg, es decir a 350mg. (PEI, 1996)

### **Pauta de dosificación para futuros estudios**

Ante el escenario encontrado, un fármaco en fase inicial de desarrollo clínico que presenta una cinética no-lineal tras administración oral repetida, es importante determinar si se puede alcanzar un estado de equilibrio estacionario tras múltiples administraciones, esto es, si la inhibición del aclaramiento plasmático era completa o no, y en caso de que no fuera completa, explorar la posibilidad de diseñar una pauta de dosificación que permitiera mantener unas concentraciones plasmáticas dentro de un margen óptimo para alcanzar los objetivos terapéuticos.

La modelización de los datos obtenidos permitió anticipar que se podría alcanzar el estado de equilibrio estacionario, dado: (i) que se derivó la posibilidad de que existiese una vía de eliminación alternativa, no inhibida, y (ii) que el estimado del I<sub>MAX</sub> era significativamente distinto de 1 (p<0,001). De todas formas, se debieron realizar simulaciones por ordenador para investigar el momento en que se alcanzaría la concentración plasmática apropiada tras el inicio del tratamiento.

Las enfermedades en que se requiere una inhibición de los LTB<sub>4</sub> como el asma, la psoriasis, la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal <sup>(Tong et al., 2002)</sup>, son enfermedades crónicas de larga duración y por ello no es de máxima importancia alcanzar las concentraciones plasmáticas objetivo inmediatamente tras el inicio del tratamiento. En el caso de AM-24 las simulaciones mostraron que: (i) las condiciones de estado de equilibrio estacionario se pueden alcanzar tras tres semanas de tratamiento, (ii) que se puede alcanzar un 90% de la inhibición de la síntesis máxima de LTB<sub>4</sub> en estado de equilibrio estacionario administrando una dosis de 500mg una vez al día y (iii) que al tercer día de la administración de dicha dosis ya es posible conseguir inhibir la síntesis máxima de LTB<sub>4</sub> en un 75%.

La siguiente etapa en el proceso de desarrollo de AM-24 sería el diseño de un estudio de fase II en el que se pusiera a prueba experimental las hipótesis generadas tras la realización y análisis efectuados hasta el momento. Este desafío experimental “*in vivo*” todavía no se ha llevado a cabo. Sin embargo, en la literatura existen diversos ejemplos en que los resultados obtenidos a través de la modelización farmacocinética-farmacodinámica mediante estimas poblacionales (estudios “*in numero*”) han sido corroborados por datos reales en estudios “*in vivo*” subsiguientes.

Un estudio realizado en voluntarios jóvenes sanos para evaluar el efecto de la vía de administración (intravenosa o subcutánea) sobre la farmacocinética y farmacodinamia de G-CSF, un fármaco estimulador de la respuesta de los neutrófilos, confirmó la validez del modelo PK/PD que había descrito previamente unas características de eliminación de tipo lineal y no-lineal simultáneas y que había predicho, con gran exactitud, que la respuesta de los neutrófilos al G-CSF administrado por vía subcutánea sería ligeramente superior a la respuesta obtenida por vía intravenosa, a pesar de presentar una biodisponibilidad absoluta del 65% por dicha vía <sup>(Wang et al., 1998)</sup>. En otro caso, los datos obtenidos en voluntarios jóvenes sanos sobre la respuesta de las plaquetas a un ligando, el Mpl <sup>(Roskos et al., 1997)</sup>, permitieron desarrollar un modelo PK/PD que incluyó efectos patológicos en la megacariocitopoyesis, el aclaramiento inmunológico de las plaquetas, la utilización aleatoria de las plaquetas por el endotelio y su envejecimiento <sup>(Harker et al., 2000)</sup>; este modelo fue aplicado en pacientes con trombocitopenia secundaria a la infección por VIH y predijo, con éxito, una pauta posológica para este tipo de pacientes <sup>(Harker et al., 1998)</sup>.

## Métodos y procedimientos

Tomados en conjunto, los resultados descritos ponen de manifiesto cómo los pocos datos farmacocinéticos y farmacodinámicos obtenibles en los primeros estudios efectuados en el hombre (donde el objetivo principal es la evaluación de la tolerabilidad) y la aplicación de técnicas de modelado y simulación, pueden ampliar significativamente los conocimientos que se derivan. Así, complementariamente a conocer una tolerabilidad aceptable de AM-24 tras administración oral única en el rango de dosis entre 6 y 1200mg y tras administración oral repetida (6 días) en el rango de dosis entre 240 y 500mg una vez al día, se han obtenido los primeros datos farmacocinéticos en humanos evidenciándose una cinética no-lineal tras administración oral repetida (que ya se insinuaba tras administración oral única al administrar dosis superiores a 500mg) y se ha constatado la producción de un efecto farmacodinámico tras su administración oral. Además, se ha hipotetizado que el origen de la no-linealidad podría radicar en una autoinhibición de la formación de los enzimas responsables de su eliminación y que, a pesar de ello, es posible alcanzar unos niveles plasmáticos en estado de equilibrio estacionario en el rango de concentraciones que presuntamente se requerirían para obtener una eficacia terapéutica del 90%.

### *Estudios “in vivo”*

La necesidad de efectuar estudios en voluntarios jóvenes sanos como paso intermedio entre las evaluaciones efectuadas en animales y las efectuadas ya en los pacientes posibles candidatos a utilizar un nuevo compuesto, se continúan conceptualizando como irrenunciable, a pesar de sucesos como el recientemente acontecido en el que la salud de un grupo de voluntarios jóvenes sanos ha quedado fuertemente comprometida como consecuencia de su participación en un estudio de primera administración en el hombre <sup>(El País,2006)</sup>. La información que aportan estos estudios es necesaria para conocer el perfil de seguridad (y en determinadas áreas terapéuticas y aplicando determinados procedimientos, incluso el perfil de eficacia) de los nuevos fármacos, sin comprometer con ello el estado de salud, ya alterado, de los potenciales beneficiarios. La garantía de la seguridad de los participantes, por tanto, centra buena parte del protagonismo en el diseño y realización de estos estudios.

La aproximación metodológica a los estudios de primera administración en el hombre (“first-in-man studies”) es básicamente secuencial y está mucho menos formalizada que la aproximación metodológica de los estudios a efectuar en otras fases del desarrollo de los fármacos (fases II, III y IV). En general comparten ciertas características. Se identifican con antelación una serie de dosis crecientes del fármaco, siendo la menor de ellas aparentemente muy segura (tanto como lo pueda garantizar la extrapolación de los datos obtenidos en animales). Un grupo de voluntarios, conocido como cohorte, es tratado concurrentemente, recibiendo cada voluntario o solo una dosis o una dosis en cada uno de los periodos de tratamiento consecutivos. Los datos de cada cohorte o de cada periodo efectuado en una cohorte son evaluados antes de administrar el siguiente nivel de dosis. El objetivo es ir escalando las dosis, según un esquema predeterminado, hasta que un nivel de dosis se identifica que podría ser el adecuado para utilizarse en estudios posteriores. Se alcanzan las conclusiones y se toman las decisiones sobre la continuación del estudio de manera secuencial, sin un procedimiento estadístico explícito: no se aplican ecuaciones ni modelos probabilísticos, sino que se utiliza el “criterio clínico” para dar sentido a las observaciones y determinar qué actuación debe seguirse.

Sin embargo, a pesar de esas características compartidas, la heterogeneidad en los métodos aplicados es considerable <sup>(Buoen et al., 2005)</sup>: (i) participación de voluntarios sanos o pacientes; (ii) nivel de ocultamiento de la intervención (abiertos, simple-, doble- ciego); (iii) incorporación o no de placebo; (iv) número de voluntarios investigados por nivel de dosis (de 1 a 16 sujetos, con una mayoría de estudios en los que sólo 8 ó menos sujetos constituyen el tamaño de la cohorte evaluada), si se utiliza placebo la combinación placebo vs. activo que se implementa en la cohorte varía considerablemente; (v) el número de dosis, esquema de escalado, dosis de inicio y de paro; (vi) el diseño aplicado, utilizándose mayoritariamente diseños en paralelo, pero también cruzados (tanto totalmente cruzados como alternantes). Ante esta heterogeneidad, la selección de los métodos a emplear en los primeros estudios a realizar en el hombre parece arbitraria. La mayoría son conservadores y parecen basarse más en el hábito y la preferencia que en justificaciones científicas y/o estadísticas que optimicen los resultados alcanzables en estos estudios.

Un panorama distinto caracteriza el desarrollo de compuestos en el área de oncología donde se han ido desarrollando procedimientos formales para guiar la toma de decisiones <sup>(Whitehead et al., 2001)</sup>. Sería interesante que estos procedimientos fueran contemplados como expresión de



---

aquello que puede alcanzarse y se utilizaran como estímulo y guía en el desarrollo de aproximaciones similares, pero posiblemente más complejas, para efectuar los primeros estudios en el hombre con fármacos pertenecientes a otras áreas terapéuticas.

### ***Estudios “in numero”***

La actividad que consiste en la utilización de técnicas matemáticas, estadísticas y numéricas en un entorno informático para tratar de responder a una pregunta específica: modelado y simulación PK/PD, claramente supone una herramienta de gran valor en el proceso de desarrollo de nuevos compuestos dotados eventualmente de actividad terapéutica. Permite no sólo aportar posibles explicaciones ante la presencia de “complejidades” en el comportamiento farmacocinético y/o farmacodinámico, sino también hipotetizar los hallazgos que presumiblemente se obtendrán con futuros estudios en nuevos escenarios.

En este contexto la aproximación al análisis en una etapa, que se conoce, en general, como aproximación poblacional (“linear and non-linear mixed effects modelling”) es la que claramente presenta una serie de ventajas en relación a otras aproximaciones de análisis existentes, como por ejemplo, la estimación de las variabilidades entre sujetos (VII), entre-ocasiones (VIO) e intra-sujeto (VIS) tanto a partir de conjuntos de datos exhaustivos (diseños experimentales con pocos sujetos y elevado nivel de control) como de conjuntos de datos escasos (diseños observacionales con muchos sujetos y poco nivel de control) <sup>(Piotrovsky, 2000)</sup>, presenta también como francos inconvenientes la complejidad teórica y su laboriosa implementación práctica, que condicionan la necesidad de largos periodos de aprendizaje y una dificultad importante en la comprensión de los resultados. No obstante estas limitaciones el poder heurístico de esta aproximación es enorme, prueba de ello es el constante y progresivo incremento en su implantación, no solo en los procesos de investigación y desarrollo de nuevos compuestos sino también en la práctica clínica.

En el presente proyecto se han utilizado también otras aproximaciones analíticas, como la mezcla inocente de datos (“naive pooled data approach”) para los datos farmacodinámicos y el promediado inocente de datos (“naive averaged data approach”) para estimar los parámetros con los que efectuar la simulación de las concentraciones plasmáticas que se preveían se alcanzarían en la realización del segundo estudio “in vivo”. Si bien con

limitaciones evidentes (Rodríguez Larrea, 1996a), aunque de aprendizaje y aplicación menos complejos, su utilización, ante la disponibilidad de datos que existía y ante los objetivos que requerían su uso (Rodríguez Larrea, 1996b), ha permitido una eficiente resolución de las cuestiones que fueron planteadas en las distintas etapas del proceso, proporcionando estimas de los parámetros con calidad suficiente.

## CONCLUSIONES



- 1.- La pauta de dosificación de AM-24 que se propone a utilizar en pacientes (fase II) consiste en 500mg/día. Con esta pauta:
  - Se prevé alcanzar un 90% de la inhibición de la síntesis máxima de LTB<sub>4</sub> en estado de equilibrio estacionario (a las 3 semanas de iniciado el tratamiento).
  - Al tercer día de la administración de esa dosis se cree posible conseguir inhibir la síntesis máxima de LTB<sub>4</sub> en un 75%.
- 2.- La Dosis Máxima Tolerada de AM-24 tras administración oral única fue de 1200mg.
- 3.- AM-24 presentó una buena tolerabilidad clínico-biológica (acontecimientos adversos, constantes vitales, parámetros electrocardiográficos, parámetros clínicos de laboratorio, sangre oculta en heces) en los siguientes rangos de dosis:
  - Administración oral única de 6 a 1200mg.
  - Administración oral repetida (6 días) de 240 a 500mg/día.

Si bien, ante las elevaciones no graves de TSH observadas tras administración repetida en algunos voluntarios se plantea la conveniencia de efectuar un pormenorizado seguimiento de la fisiología del tiroides.

- 4.- AM-24 se absorbió tras administración oral, con un  $t_{max}$  alrededor de 6 horas (absorción de primer orden sin tiempo de latencia) y un volumen de distribución no superior a 30L, oscilando alrededor de 15-30L (modelo de distribución monocompartimental).
  - Tras administración oral única se observó un aclaramiento entre 0,8 y 0,3 L/h y un tiempo de vida media relativamente largo, oscilando entre 30 y 60 horas.
  - Tras administración oral repetida no se alcanzó el nivel de equilibrio estacionario como se previa obteniéndose unos niveles plasmáticos superiores a los esperados.

- 5.- AM-24 no presentó un comportamiento cinético lineal:
- al proceder a incrementar las dosis orales únicas, especialmente a partir de 500mg.
  - al proceder a administrarlo oralmente de manera repetida.
- 6.- El modelado de la no linealidad cinética observada tras administración oral repetida sugiere que, asumiendo un modelo de aclaramiento hepático “de compartimentos bien agitados” (well-stirred model):
- AM-24 está sujeto a un aclaramiento hepático restrictivo, presentaría una biodisponibilidad absoluta no inferior a 0,8 y la no-linealidad cinética sería consecuencia de una inhibición reversible en la formación del enzima responsable de su eliminación, con una vida media de recambio de ese enzima de unas 8,5 horas. Esta inhibición no llegaría a ser completa (cercana al 98%), identificándose otra vía de eliminación que representaría menos del 10% del aclaramiento plasmático total.
- 7.- Se evidenció una relación sigmoide entre las concentraciones plasmáticas de AM-24 y la inhibición de la biosíntesis de LTB<sub>4</sub> tras estimulación con ionóforo de calcio en sangre completa “ex vivo” con una CI<sub>50</sub> de aproximadamente 16,56mg/L.
- 8.- La utilización conjunta de estudios “*in vivo*” (voluntarios jóvenes sanos) y estudios “*in numero*” (modelado y simulación) en fases iniciales del desarrollo clínico de un nuevo compuesto se ha mostrado altamente eficaz para dar respuestas convenientes a las cuestiones que de forma secuencial van surgiendo a lo largo del proceso.

## BIBLIOGRAFÍA





Aarons L, Karlsson MO, Mentre F, Rombout F, Steimer JL, van PA. Role of modelling and simulation in Phase I drug development. *Eur J Pharm Sci* 2001;13:115-22.

ABPI, Association of the British Pharmaceutical Industry. Guidelines for medical experiments on non-patients human volunteers. London, ABPI, 1989.

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-6.

Albert D, Zundorf I, Dingermann T, Muller WE, Steinhilber D, Werz O. Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochem Pharmacol* 2002;64:1767-75.

Alvaro I, López Bote J. La respuesta inflamatoria. In: Grupo Prodesfarma, editor. *Manual de Enfermedades Reumáticas*. 1 ed. Madrid: 1996. p. 33-42.

Amann R, Schuligoi R, Lanz I, Peskar BA. Effect of a 5-lipoxygenase inhibitor on nerve growth factor-induced thermal hyperalgesia in the rat. *Eur J Pharmacol* 1996;306:89-91.

Andazola JJ, Underwood JA, Chiono M, Torres OA, Herman CA. Leukotriene B4 and leukotriene B5 have binding sites on lung membranes and cause contraction of bullfrog lung. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;263:1111-7.

Andoh T, Kuraishi Y. Intradermal leukotriene B4, but not prostaglandin E2, induces itch-associated responses in mice. *Eur J Pharmacol* 1998;353:93-6.

Andoh T, Katsube N, Maruyama M, Kuraishi Y. Involvement of leukotriene B(4) in substance P-induced itch-associated response in mice. *J Invest Dermatol* 2001;117:1621-6.

Andoh T, Kuraishi Y. Expression of BLT1 leukotriene B4 receptor on the dorsal root ganglion neurons in mice. *Brain Res Mol Brain Res* 2005;137:263-6.

Andoh T. [Importance of epidermal keratinocytes in itching]. *Yakugaku Zasshi* 2006;126:403-8.

Antonijuan R, Moros C, Morte A, Zsolt I, Vernet E, Gich I, Barbanj MJ, Jané F. Factors related to adverse effect reports in phase I studies. *Br J Clin Pharmacol* 2000; CPT200:78.

Avis I, Hong SH, Martinez A, Moody T, Choi YH, Trepel J, et al. Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions. *FASEB J* 2001;15:2007-9.

Awni WM, Cavanaugh JH, Leese P, Kasier J, Cao G, Locke CS, et al. The pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction between zileuton and terfenadine. *Eur J Clin Pharmacol* 1997a;52:49-54.

Awni WM, Wong S, Chu SY, Patterson K, Hansen R, Machinist JM, et al. Pharmacokinetics of zileuton and its metabolites in patients with renal impairment. *J Clin Pharmacol* 1997b;37:395-404.

- Bakke O, Carné X, García Alonso F. Investigación y desarrollo de nuevos fármacos. En: Bakke O, Carné X, García Alonso F, editores. *Ensayos Clínicos con Medicamentos*. Madrid: Mosby/Doyma Libros; 1994a. p. 45-55.
- Bakke O, Carné X, García Alonso F. Protección de los sujetos participantes en los ensayos clínicos. En: Bakke O, Carné X, García Alonso F, editores. *Ensayos Clínicos con Medicamentos*. Madrid: Mosby/Doyma Libros; 1994b. p. 23-36.
- Bakke O, Carné X, García Alonso F. Ensayos en sujetos sanos. En: Bakke O, Carné X, García Alonso F, editores. *Ensayos Clínicos con Medicamentos*. Madrid: Mosby/Doyma Libros; 1994c. p. 138-56.
- Barbanoj MJ, Ballester MR, Romero S, Valle M. Basics in pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling: application to pharmaco-EEG. En: *Textbook for the Training Course of the International Pharmaco-EEG Society*. Hyogo: IPEG 2006; p 63-76.
- Bauer JA, Balthasar JP, Fung HL. Application of pharmacodynamic modeling for designing time-variant dosing regimens to overcome nitroglycerin tolerance in experimental heart failure. *Pharm Res* 1997;14:1140-5.
- Beal SL y Sheiner LB. *NONMEM Users Guides*. NONMEM Project Group, University of California at San Francisco. San Francisco, CA, 1992.
- Berg MJ, Fincham RW, Ebert BE, Schottelius DD. Phenytoin pharmacokinetics: before and after folic acid administration. *Epilepsia* 1992;33:712-20.
- Bianchine JR, Procter RR, Thomas FB. Piroxicam, aspirin, and gastrointestinal blood loss. *Clin Pharmacol Ther* 1982;32:247-52.
- Biernacki WA, Kharitonov SA, Biernacka HM, Barnes PJ. Effect of montelukast on exhaled leukotrienes and quality of life in asthmatic patients. *Chest* 2005;128:1958-63.
- Bisgaard H. Pathophysiology of the cysteinyl leukotrienes and effects of leukotriene receptor antagonists in asthma. *Allergy* 2001;56:7-11.
- Bitterman H, Lefér AM. Use of a novel peptide leukotriene receptor antagonist, Ly-163443, in splanchnic artery occlusion shock. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1988;32:63-70.
- Bitterman H, Smith BA, Lefér AM. Beneficial actions of antagonism of peptide leukotrienes in hemorrhagic shock. *Circ Shock* 1988;24:159-68.
- Boeckman A, Sheiner LB y Beal SL. *NONMEM Users Guide-Part V*. NONMEM Project Group; University of California; San Francisco 1989.
- Bonate PL, Howard D. Prospective allometric scaling: does the emperor have clothes? *J Clin Pharmacol* 2000;40:335-40.

Bonate PL, Floret S, Bentzen C. Population pharmacokinetics of APOMINE: a meta-analysis in cancer patients and healthy males. *Br J Clin Pharmacol* 2004;58:142-55.

Boudinot FD, Jusko WJ. Dose-dependent pharmacokinetics of prednisolone in normal and adrenalectomized rats. *J Pharmacokinet Biopharm* 1986 ;14:453-67.

Boudinot FD, D'Ambrosio R, Jusko WJ. Receptor-mediated pharmacodynamics of prednisolone in the rat. *J Pharmacokinet Biopharm* 1986 ;14:469-93.

Breimer LT, Burm AG, Danhof M, Hennis PJ, Vletter AA, de Voogt JW, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modelling of the interaction between flumazenil and midazolam in volunteers by aperiodic EEG analysis. *Clin Pharmacokinet* 1991;20:497-508.

Brodie BB, Reid WD. Some pharmacological consequences of species variation in rates of metabolism. *Fed Proc* 1967;26:1062-70.

Brom J, Schonfeld W, Konig W. Metabolism of leukotriene B<sub>4</sub> by activated human polymorphonuclear granulocytes. *Immunology* 1988;64:509-18.

Brynskov J, Freund L, Rasmussen SN, Lauritsen K, de Muckadell OS, Williams N, et al. A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of cyclosporine therapy in active chronic Crohn's disease. *N Engl J Med* 1989;321:845-50.

Brynskov J, Freund L, Norby RS, Lauritsen K, Schaffalitzky de MO, Williams CN, et al. Final report on a placebo-controlled, double-blind, randomized, multicentre trial of cyclosporin treatment in active chronic Crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1991;26:689-95.

Buoen C, Bjerrum OJ, Thomsen MS. How first-time-in-human studies are being performed: a survey of phase I dose-escalation trials in healthy volunteers published between 1995 and 2004. *J Clin Pharmacol* 2005;45:1123-36.

Busse WW. Leukotrienes and inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:S210-S213.

Carter GW, Young PR, Albert DH, Bouska J, Dyer R, Bell RL, et al. 5-lipoxygenase inhibitory activity of zileuton. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;256:929-37.

Chaikin P, Rhodes GR, Bruno R, Rohatagi S, Natarajan C. Pharmacokinetics/pharmacodynamics in drug development: an industrial perspective. *J Clin Pharmacol* 2000;40(Pt 2):1428-38.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:13926-31.

Chen YQ, Duniec ZM, Liu B, Hagmann W, Gao X, Shimoji K, et al. Endogenous 12(S)-HETE production by tumor cells and its role in metastasis. *Cancer Res* 1994;54:1574-9.

Chen M, Lam BK, Kanaoka Y, Nigrovic PA, Audoly LP, Austen KF, et al. Neutrophil-derived leukotriene B4 is required for inflammatory arthritis. *J Exp Med* 2006;203:837-42.

Circular 15/2002 de la Agencia Española del Medicamento. Relaciones con las Administraciones Públicas. 3.1.3. Marco Normativo. Procedimiento de comunicación en materia de Farmacovigilancia de Medicamentos de uso humano entre la Industria Farmacéutica y el Sistema Español de Farmacovigilancia de medicamentos de uso humano.

Coe NR, Bernlohr DA. Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1998;1391:287-306.

Colburn W. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling: Study design considerations. En: Smith R, Kroboth P, Juhl R, editores. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. Research, design and analysis.* Cincinnati:1986. p. 65-84.

Colburn WA. Optimizing the use of biomarkers, surrogate endpoints, and clinical endpoints for more efficient drug development. *J Clin Pharmacol* 2000;40:1419-27.

Coles SJ, Neill KH, Reid LM, Austen KF, Nii Y, Corey EJ, et al. Effects of leukotrienes C4 and D4 on glycoprotein and lysozyme secretion by human bronchial mucosa. *Prostaglandins* 1983;25:155-70.

Collier AC, Keelan JA, Van Zijl PE, Paxton JW, Mitchell MD, Tingle MD. Human placental glucuronidation and transport of 3'azido-3'-deoxythymidine and uridine diphosphate glucuronic acid. *Drug Metab Dispos* 2004;32:813-20.

Conover W. The Kruskal-Wallis Test. En: Conover W, editor. *Practical Nonparametric Statistics.* second ed. New York: John Wiley & Sons; 1980. p. 229-37.

Cook JA, Wise WC, Halushka PV. Protective effect of a selective leukotriene antagonist in endotoxemia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1985;235:470-4.

Crooke ST, Monia BP, Chiang MY, Bennett CF. Leukotriene receptors and mechanisms of signal transduction. *Ann NY Acad Sci* 1991;629:120-4.

Crooks SW, Stockley RA. Leukotriene B4. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:173-8.

Danz H, Stoyanova S, Thomet OA, Simon HU, Dannhardt G, Ulbrich H, et al. Inhibitory activity of tryptanthrin on prostaglandin and leukotriene synthesis. *Planta Med* 2002;68:875-80.

Davidson EM, Rae SA, Smith MJ. Leukotriene B4, a mediator of inflammation present in synovial fluid in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1983;42:677-9.

Davies PH, Franklyn JA, Sheppard MC. Treatment of amiodarone induced thyrotoxicosis with carbimazole alone and continuation of amiodarone. *BMJ* 1992;305:224-5.

de Jonge ME, Huitema AD, Rodenhuis S, Beijnen JH. Integrated Population Pharmacokinetic Model of both cyclophosphamide and thiotepa suggesting a mutual drug-drug interaction. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2004;31:135-56.

Depre M, Margolskee DJ, Van HA, Hsieh JS, Buntinx A, de Schepper PJ, et al. Dose-dependent kinetics of the enantiomers of MK-571, and LTD<sub>4</sub>-receptor antagonist. *Eur J Clin Pharmacol* 1992a;43:431-3.

Depre M, Margolskee DJ, Hsieh JY, Van HA, Buntinx A, de L, I, et al. Plasma drug profiles and tolerability of MK-571 (L-660,711), a leukotriene D<sub>4</sub> receptor antagonist, in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1992b;43:427-30.

Depre M, Friedman B, Tanaka W, Van HA, Buntinx A, DeSchepper PJ. Biochemical activity, pharmacokinetics, and tolerability of MK-886, a leukotriene biosynthesis inhibitor, in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1993;53:602-7.

Depre M, Friedman B, Van Hecken A, de Lepellerie I, Tanaka W, Dallob A, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of multiple oral doses of MK-0591, a 5-lipoxygenase-activating protein inhibitor. *Clin Pharmacol Ther* 1994;56:22-30.

Derendorf H, Mollmann H, Hochhaus G, Meibohm B, Barth J. Clinical PK/PD modelling as a tool in drug development of corticosteroids. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1997;35:481-8.

Derendorf H, Meibohm B. Modeling of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationships: concepts and perspectives. *Pharm Res* 1999;16:176-85.

Devchand P, Keller H, Peters J, Vazquez M, Gonzalez F, Wahli W. The PPAR alpha-leukotriene B<sub>4</sub> pathway to inflammation control. *Nature* 1996;384:139-43.

Diamant Z, Timmers M, Van der Veen H, De Smet M, Leff J, Friedman B, et al. Effect of oral montelukast (MK-0467), a potent leukotriene D<sub>4</sub> receptor antagonist, on allergen-induced airway responses in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:A346.

Dias VC, Wallace JL, Parsons HG. Modulation of cellular phospholipid fatty acids and leukotriene B<sub>4</sub> synthesis in the human intestinal cell (CaCo-2). *Gut* 1992;33:622-7.

Ding XZ, Iversen P, Cluck MW, Knezetic JA, Adrian TE. Lipoxygenase inhibitors abolish proliferation of human pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:218-23.

Dixon RA, Diehl RE, Opas E, Rands E, Vickers PJ, Evans JF, et al. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature* 1990;343:282-4.

Dost FH. [The clearance problem in children.]. *Kinderarztl Prax* 1953;7:227-32.

Dost FH. *Grundlagen der Pharmakokinetik*. Leipzig: 1965.

Drazen JM, Austen KF, Lewis RA, Clark DA, Goto G, Marfat A, et al. Comparative airway and vascular activities of leukotrienes C-1 and D in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:4354-8.

Drazen JM, O'Brien J, Sparrow D, Weiss ST, Martins MA, Israel E, et al. Recovery of leukotriene E4 from the urine of patients with airway obstruction. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:104-8.

Drugs for asthma. *The Medical Letter* 2000;42:19-24.

Dunn CJ, Goa KL. Zafirlukast: an update of its pharmacology and therapeutic efficacy in asthma. *Drugs* 2001;61:285-315.

Eberhard J, Jepsen S, Tiemann M, Krause R, Acil Y, Albers HK. Leukotriene A(4)-hydrolase expression and leukotriene B(4) levels in chronic inflammation of bacterial origin: immunohistochemistry and reverse-phase high-performance liquid chromatography analysis of oral mucosal epithelium. *Virchows Arch* 2002;440:627-34.

Esplugues JV, Barrachina MD. Mediadores celulares II. Eicosanoides, óxido nítrico y factor activador de las plaquetas. En: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A, Editores. *Farmacología Humana*, 4ª Ed. Barcelona: Masson 2003. p347-373.

Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999;286:487-91.

Farré M, Lamas X, Camí J. Sensation seeking amongst healthy volunteers participating in phase I clinical trials. *Br J Clin Pharmacol* 1995;39:405-9.

Fauler J, Neumann C, Tsikas D, Frolich J. Enhanced synthesis of cysteinyl leukotrienes in psoriasis. *J Invest Dermatol* 1992;99:8-11.

FDA (US Food and Drug Administration). Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Pharmacology and Toxicology. July 2005. Guidance for Industry. Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. <http://www.fda.gov/cder/guidance/5541fn1.pdf>

Fiebich BL, Heinrich M, Langosch JM, Kammerer N, Lieb K. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort. *Lancet* 1999;354:777.

Figuroa DJ, Borish L, Baramki D, Philip G, Austin CP, Evans JF. Expression of cysteinyl leukotriene synthetic and signalling proteins in inflammatory cells in active seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy* 2003;33:1380-8.

Findlay S, Barden J, Easley C, Glass M. Effect of the oral leukotriene antagonist, ICI 204,219, on antigen-induced bronchoconstriction in subjects with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1992;89:1040-5.

Fisher A, McFadden C, Frantz R, Awni W, Cohn J, Drazen J, et al. Effect of 5-lipoxygenase inhibition on airway hyperresponsiveness in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;152:1203-7.

- Ford-Hutchinson AW. Inhibition of leukotriene biosynthesis. *Ann N Y Acad Sci* 1991;629:133-42.
- Ford-Hutchinson AW, Bray MA, Doig MV, Shipley ME, Smith MJ. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 1980;286:264-5.
- Fowler AA, Hamman RF, Good JT, Benson KN, Baird M, Eberle DJ, et al. Adult respiratory distress syndrome: risk with common predispositions. *Ann Intern Med* 1983;98:593-7.
- Frisk-Holmberg M, Bergqvist Y, Termond E, Domeij-Nyberg B. The single dose kinetics of chloroquine and its major metabolite desethylchloroquine in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 1984;26:521-30.
- Fujimura M, Sakamoto S, Kamio Y, Matsuda T. Effect of a leukotriene antagonist, ONO-1078, on bronchial hyperresponsiveness in patients with asthma. *Respir Med* 1993;87:133-8.
- Gabrielsson J, Weimar D. Nonlinear Models. En: Gabrielsson J, Weimar D, editors. *Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis: concepts and applications*. Second edition ed. Stokholm: Apotekarsocieteten. Swedish Pharmaceutical Society; 1979. p. 119-39.
- Galeazzi RL, Benet LZ, Sheiner LB. Relationship between the pharmacokinetics and pharmacodynamics of procainamide. *Clin Pharmacol Ther* 1976;20:278-89.
- Galluppi GR, Rogge MC, Roskos LK, Lesko LJ, Green MD, Feigal DW, Jr., et al. Integration of pharmacokinetic and pharmacodynamic studies in the discovery, development, and review of protein therapeutic agents: a conference report. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:387-99.
- Garcia-Capdevila L, Lopez-Calull C, Pompermayer S, Arroyo C, Molins-Pujol AM, Bonal J. High-performance liquid chromatography analysis of Bobel-24 in biological samples for pharmacokinetic, metabolic and tissue distribution studies. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;708:169-75.
- Garcia-Marcos L, Schuster A. Antileukotrienes in asthma: present situation. *Expert Opin Pharmacother* 2001;2:441-66.
- García-Sánchez M. Farmacocinética no lineal. En: Domenech J, Martínez-Lanao J, Pla J, editores. *Biofarmacia y farmacocinética*, Vol 1: Farmacocinética. Madrid: Editorial Síntesis; 1997. p. 201-26.
- Gardmark M, Brynne L, Hammarlund-Udenaes M, Karlsson MO. Interchangeability and predictive performance of empirical tolerance models. *Clin Pharmacokinet* 1999;36:145-67.
- GEMA: Guía Española para el manejo del Asma, 2003. [http://www.separ.es/publicaciones/consensos/GEMA\\_ABNM.pdf](http://www.separ.es/publicaciones/consensos/GEMA_ABNM.pdf)
- Gerritsen ME, Bloor CM. Endothelial cell gene expression in response to injury. *FASEB J* 1993;7:523-32.
- Ghosh J, Myers CE. Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: critical role of 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:418-23.

Gisleskog PO, Hermann D, Hammarlund-Udenaes M, Karlsson MO. The pharmacokinetic modelling of GI198745 (dutasteride), a compound with parallel linear and nonlinear elimination. *Br J Clin Pharmacol* 1999;47:53-8.

Glattre E, Haldorsen T, Berg JP, Stensvold I, Solvoll K. Norwegian case-control study testing the hypothesis that seafood increases the risk of thyroid cancer. *Cancer Causes Control* 1993;4:11-6.

Goldman DW, Gifford LA, Olson DM, Goetzl EJ. Transduction by leukotriene B<sub>4</sub> receptors of increases in cytosolic calcium in human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol* 1985;135:525-30.

Goldman DW, Gifford LA, Marotti T, Koo CH, Goetzl EJ. Molecular and cellular properties of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B<sub>4</sub>. *Fed Proc* 1987;46:200-3.

Gómez, L. Seis voluntarios desarrollan cáncer y lupus tras probar un fármaco en Reino Unido. *El País*, 1.08.2006, pp 29. Sección Sociedad.

Gonzalez I, Sanchez A. Unión a proteínas. En: Domenech J, Martinez-Lanao J, Pla J, editores. *Biofarmacia y farmacocinética*, Vol 2: Biofarmacia. Madrid: Editorial Síntesis; 1998. p. 467-99.

Green SA, Malice MP, Tanaka W, Tozzi CA, Reiss TF. Increase in urinary leukotriene LTE<sub>4</sub> levels in acute asthma: correlation with airflow limitation. *Thorax* 2004;59:100-4.

Gries JM, Benowitz N, Verotta D. Importance of chronopharmacokinetics in design and evaluation of transdermal drug delivery systems. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;285:457-63.

Grimminger F, Sibelius U, Seeger W. Amplification of LTB<sub>4</sub> generation in AM-PMN cocultures: transcellular 5-lipoxygenase metabolism. *Am J Physiol* 1991;261:L195-L203.

Hagmann W, Borgers S. Requirement for epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and for 12-lipoxygenase activity in the expression of 12-lipoxygenase in human epidermoid carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 1997;53:937-42.

Hagmann W, Denzlinger C, Keppler D. Role of peptide leukotrienes and their hepatobiliary elimination in endotoxin action. *Circ Shock* 1984;14:223-35.

Hamilton A, Faiferman I, Stober P, Watson P, O'Byrne P. Pranlukast (SB205312, ONO1078), a leukotriene receptor antagonist, attenuates allergen-induced early and late phase bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness in asthmatic subjects. *Eur Respir J* 1997;10:419S.

Harjai KJ, Licata AA. Effects of amiodarone on thyroid function. *Ann Intern Med* 1997;126:63-73.

Harker LA, Carter R, Marzec U, Cherry J, Gunthel C, Lennox J, et al. Correction of thrombocytopenia and ineffective platelet production in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV) by PEG-rHuMGDF therapy. *Blood* 1998; 92: 707a.



Harker LA, Roskos LK, Marzec UM, Carter RA, Cherry JK, Sundell B, et al. Effects of megakaryocyte growth and development factor on platelet production, platelet life span, and platelet function in healthy human volunteers. *Blood* 2000;95:2514-22.

Hassan M, Svensson US, Ljungman P, Bjorkstrand B, Olsson H, Bielenstein M, et al. A mechanism-based pharmacokinetic-enzyme model for cyclophosphamide autoinduction in breast cancer patients. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48:669-77.

Hay DW, Torphy TJ, Udem BJ. Cysteinyl leukotrienes in asthma: old mediators up to new tricks. *Trends Pharmacol Sci* 1995;16:304-9.

Heise CE, O'Dowd BF, Figueroa DJ, Sawyer N, Nguyen T, Im DS, et al. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem* 2000;275:30531-6.

Henderson WR, Jr. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med* 1994a;121:684-97.

Henderson WR, J. Role of leukotrienes in asthma. *Ann Allergy* 1994b;72:272-8.

Heukamp I, Kilian M, Gregor JI, Kiewert C, Schimke I, Kristiansen G, et al. Impact of polyunsaturated fatty acids on hepato-pancreatic prostaglandin and leukotriene concentration in ductal pancreatic cancer -- is there a correlation to tumour growth and liver metastasis? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2006;74:223-33.

Hidi R, Coeffier E, Vargaftig BB. Formation of LTB<sub>4</sub> by fMLP-stimulated alveolar macrophages accounts for eosinophil migration in vitro. *J Leukoc Biol* 1992;51:425-31.

Higgs G, Salmon J. Cyclo-oxygenase products in carrageenin-induced inflammation. *Prostaglandins* 1979;17:737-46.

Hill J, Ratliff J, Parrot J, et al. Pulmonary pathology in acute respiratory insufficiency: lung biopsy as a diagnostic tool. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982;71:64-71.

Hochhaus G, Barrett JS, Derendorf H. Evolution of pharmacokinetics and pharmacokinetic/dynamic correlations during the 20th century. *J Clin Pharmacol* 2000;40:908-17.

Hofstra W, Sterk P, Neijens H, Van der Weij A, van Zoest J, Duiverman F. Two weeks treatment with zafirlukast (Accolate), sodium cromoglycate or placebo on exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic adolescents. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:A665.

Holazo AA, Brazzell RK, Colburn WA. Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of cibenzoline plasma concentrations and antiarrhythmic effect. *J Clin Pharmacol* 1986;26:336-45.

Holford NH, Kimko HC, Monteleone JP, Peck CC. Simulation of clinical trials. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:209-34.

Hollander M. A distribution-free test for ordered alternatives (Jonckheere, Terpstra). En: Hollander M, Wolfe D, editors. *Nonparametric Statistical Methods*. New York: John Wiley & Sons; 1973. p. 120-3.

Hong SH, Avis I, Vos MD, Martinez A, Treston AM, Mulshine JL. Relationship of arachidonic acid metabolizing enzyme expression in epithelial cancer cell lines to the growth effect of selective biochemical inhibitors. *Cancer Res* 1999;59:2223-8.

Hooper JW, Anslow JA, Martin WS, Araujo P, Darke A. Fecal blood loss during isoxicam and piroxicam administration for 28 days. *Clin Pharmacol Ther* 1985;38:533-7.

Hu OY, Hu TM, Tang HS. Determination of galactose in human blood by high-performance liquid chromatography: comparison with an enzymatic method and application to the pharmacokinetic study of galactose in patients with liver dysfunction. *J Pharm Sci* 1995;84:231-5.

Hui KP, Taylor IK, Taylor GW, Rubin P, Kesterson J, Barnes NC, et al. Effect of a 5-lipoxygenase inhibitor on leukotriene generation and airway responses after allergen challenge in asthmatic patients. *Thorax* 1991;46:184-9.

Huitema AD, Mathot RA, Tibben MM, Rodenhuis S, Beijnen JH. A mechanism-based pharmacokinetic model for the cytochrome P450 drug-drug interaction between cyclophosphamide and thioTEPA and the autoinduction of cyclophosphamide. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2001;28:211-30.

Israel E, Fischer AR, Rosenberg MA, Lilly CM, Callery JC, Shapiro J, et al. The pivotal role of 5-lipoxygenase products in the reaction of aspirin-sensitive asthmatics to aspirin. *Am Rev Respir Dis* 1993a;148:1447-51.

Israel E, Rubin P, Kemp JP, Grossman J, Pierson W, Siegel SC, et al. The effect of inhibition of 5-lipoxygenase by zileuton in mild-to-moderate asthma. *Ann Intern Med* 1993b;119:1059-66.

Jakobsson PJ, Odlander B, Claesson HE. Effects of monocyte-lymphocyte interaction on the synthesis of leukotriene B<sub>4</sub>. *Eur J Biochem* 1991;196:395-400.

Jewell DP, Snook J. Immunology of ulcerative colitis and Crohn's disease. En: Allan R, Keighley M, Alexander-Williams J, Hawkins C, editores. *Inflammatory bowel disease*. London: Churchill Livingstone; 1990. p. 127-46.

Kachur JF, Askonas LJ, Villani-Price D, Ghoreishi-Haack N, Won-Kim S, Liang CD, et al. Pharmacological characterization of SC-57461A (3-[methyl[3-[4-(phenylmethyl)phenoxy] propyl]amino]propanoic acid HCl), a potent and selective inhibitor of leukotriene A<sub>4</sub> hydrolase II: in vivo studies. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;300:583-7.

Kane GC, Pollice M, Kim CJ, Cohn J, Dworski RT, Murray JJ, et al. A controlled trial of the effect of the 5-lipoxygenase inhibitor, zileuton, on lung inflammation produced by segmental antigen challenge in human beings. *J Allergy Clin Immunol* 1996;97:646-54.

Karlsson MO, Beal SL, Sheiner LB. Three new residual error models for population PK/PD analyses. *J Pharmacokinet Biopharm* 1995a;23:651-72.

Karlsson MO, Port RE, Ratain MJ, Sheiner LB. A population model for the leukopenic effect of etoposide. *Clin Pharmacol Ther* 1995b;57:325-34.

Kawai R, Mathew D, Tanaka C, Rowland M. Physiologically based pharmacokinetics of cyclosporine A: extension to tissue distribution kinetics in rats and scale-up to human. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;287:457-68.

Keam SJ, Lyseng-Williamson KA, Goa KL. Pranlukast: a review of its use in the management of asthma. *Drugs* 2003;63:991-1019.

Kerbusch T, Milligan PA, Karlsson MO. Assessment of the relative in vivo potency of the hydroxylated metabolite of darifenacin in its ability to decrease salivary flow using pooled population pharmacokinetic-pharmacodynamic data. *Br J Clin Pharmacol* 2004;57:170-80.

Kim ND, Chou RC, Seung E, Tager AM, Luster AD. A unique requirement for the leukotriene B4 receptor BLT1 for neutrophil recruitment in inflammatory arthritis. *J Exp Med* 2006;203:829-35.

Kimko HC, Reece SS, Holford NH, Peck CC. Prediction of the outcome of a phase 3 clinical trial of an antischizophrenic agent (quetiapine fumarate) by simulation with a population pharmacokinetic and pharmacodynamic model. *Clin Pharmacol Ther* 2000;68:568-77.

Klegeris A, McGeer PL. Toxicity of human monocytic THP-1 cells and microglia toward SH-SY5Y neuroblastoma cells is reduced by inhibitors of 5-lipoxygenase and its activating protein FLAP. *J Leukoc Biol* 2003;73:369-78.

Klickstein LB, Shapleigh C, Goetzel EJ. Lipoxygenation of arachidonic acid as a source of polymorphonuclear leukocyte chemotactic factors in synovial fluid and tissue in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. *J Clin Invest* 1980;66:1166-70.

Knapp HR, Sladek K, Fitzgerald GA. Increased excretion of leukotriene E4 during aspirin-induced asthma. *J Lab Clin Med* 1992;119:48-51.

Knorr P, Matz J, Berstein J, Nguyen H, Seidenberg B, Reiss T, et al. Montelukast for chronic asthma in 6-to14-year old children: a randomized double blind trial. Pediatric Montelukast Study Group. *JAMA* 1998;279:1181-6.

Kohrogi H, Iwagoe H, Fujii K, Fukuda K, Kawano O, Hmamoto J, et al. The effect of leukotriene antagonist pranlukast on moderate and severe persistent asthma continues more than one year. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:A662.

Koller H, Siebler M. Impaired neuronal function induced by the immune mediator leukotriene B4. *Brain Res* 1993;628:313-6.

- Koshihara Y, Isono T, Oda H, Karube S, Hayashi Y. Measurement of sulfidopeptide leukotrienes and their metabolism in human synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1988;32:113-9.
- Kragballe K, Desjarlais L, Voorhees JJ. Leukotrienes B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub> and D<sub>4</sub> stimulate DNA synthesis in cultured human epidermal keratinocytes. *Br J Dermatol* 1985;113:43-52.
- Labat C, Ortiz JL, Norel X, Gorenne I, Verley J, Abram TS, et al. A second cysteinyl leukotriene receptor in human lung. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;263:800-5.
- Laitinen A, Lindqvist A, Halme M, Altraja A, Laitinen LA. Leukotriene E<sub>4</sub>-induced persistent eosinophilia and airway obstruction are reversed by zafirlukast in patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:259-65.
- Lapetina EG. Regulation of arachidonic acid production: role of phospholipase C and A<sub>2</sub>. *TIPS* 1982;3:115-8.
- Latini R, Tognoni G, Kates RE. Clinical pharmacokinetics of amiodarone. *Clin Pharmacokinet* 1984;9:136-56.
- Lauritsen K, Laursen LS, Bukhave K, Rask-Madsen J. Effects of topical 5-aminosalicylic acid and prednisolone on prostaglandin E<sub>2</sub> and leukotriene B<sub>4</sub> levels determined by equilibrium in vivo dialysis of rectum in relapsing ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1986;91:837-44.
- Lave T, Coassolo P, Reigner B. Prediction of hepatic metabolic clearance based on interspecies allometric scaling techniques and in vitro-in vivo correlations. *Clin Pharmacokinet* 1999;36:211-31.
- Lazarus SC, Lee T, Kemp JP, Wenzel S, Dube LM, Ochs RF, et al. Safety and clinical efficacy of zileuton in patients with chronic asthma. *Am J Manag Care* 1998;4:841-8.
- Lee TC, Charles B, Steer P, Flenady V, Shearman A. Population pharmacokinetics of intravenous caffeine in neonates with apnea of prematurity. *Clin Pharmacol Ther* 1997;61:628-40.
- Leff AR. Discovery of leukotrienes and development of antileukotriene agents. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;86:4-8.
- Leff AR, Pizzichini F, Efthimiadis A, Boulet L, Wei L, Winland D, et al. Effect of Montelukast (MK-0476) on airway eosinophilic inflammation in mildly uncontrolled asthma: a randomized placebo-controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:A977.
- Leung DY, Bhan AK, Schneeberger EE, Geha RS. Characterization of the mononuclear cell infiltrate in atopic dermatitis using monoclonal antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 1983;71:47-56.
- Levine JD. Effects of tumor promoters on arachidonic acid metabolism by cells in culture. *Carcinog Compr Surv* 1982;7:477-94.
- Levine JD, Lau W, Kwiat G, Goetzl EJ. Leukotriene B<sub>4</sub> produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. *Science* 1984;225:743-5.

Levy G, Nelson E. Theoretical relationship between dose, elimination rate, and duration of pharmacological effects. *J Pharm Sci* 1964;54:812.

Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med* 1990;323:645-55.

Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. *Boletín Oficial del Estado*, 178.

Li PC, Liang JT, Huang HT, Lin PH, Wu SN. Enhanced activity of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels by 1-[2-hydroxy-3-propyl-4-[(1H-tetrazol-5-yl)butoxy]phenyl] ethanone (LY-171883) in neuroendocrine and neuroblastoma cell lines. *J Cell Physiol* 2002;192:188-99.

Liston TE, Conklyn MJ, Houser J, Wilner KD, Johnson A, Apseoff G, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the leukotriene B<sub>4</sub> receptor antagonist CP-105,696 in man following single oral administration. *Br J Clin Pharmacol* 1998;45:115-21.

Lofdahl CG, Reiss TF, Leff JA, Israel E, Noonan MJ, Finn AF, et al. Randomised, placebo controlled trial of effect of a leukotriene receptor antagonist, montelukast, on tapering inhaled corticosteroids in asthmatic patients. *BMJ* 1999;319:87-90.

Long MW. Blood cell cytoadhesion molecules. *Exp Hematol* 1992;20:288-301.

Lowes JR, Jewell DP. The immunology of inflammatory bowel disease. *Springer Semin Immunopathol* 1990;12:251-68.

Lundgren JD, Kaliner M, Logun C, Shelhamer JH. Platelet activating factor and tracheobronchial respiratory glycoconjugate release in feline and human explants: involvement of the lipoxygenase pathway. *Agents Actions* 1990;30:329-37.

Luo M, Lee S, Brock TG. Leukotriene synthesis by epithelial cells. *Histol Histopathol* 2003;18:587-95.

Lussier A, Arsenault A, de Medicis R, Lussier Y, LeBel E. The use of a <sup>51</sup>Cr technique to detect gastrointestinal microbleeding associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Semin Arthritis Rheum* 1988;17:40-5.

Maas RL, Brash AR, Oates JA. Novel leukotrienes and lipoxygenase products from arachidonic acid. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 1982;9:29-44.

Mahmood I. Allometric issues in drug development. *J Pharm Sci* 1999;88:1101-6.

Mahmood I, Balian JD. The pharmacokinetic principles behind scaling from preclinical results to phase I protocols. *Clin Pharmacokinet* 1999;36:1-11.

- Malmstrom K, Rodriguez-Gomez G, Guerra J, Villaran C, Pineiro A, Wei LX, et al. Oral montelukast, inhaled beclomethasone, and placebo for chronic asthma. A randomized, controlled trial. Montelukast/Beclomethasone Study Group. *Ann Intern Med* 1999;130:487-95.
- Mancini JA, Abramovitz M, Cox ME, Wong E, Charleson S, Perrier H, et al. 5-lipoxygenase-activating protein is an arachidonate binding protein. *FEBS Lett* 1993;318:277-81.
- Mandema JW, Danhof M. Electroencephalogram effect measures and relationships between pharmacokinetics and pharmacodynamics of centrally acting drugs. *Clin Pharmacokinet* 1992;23:191-215.
- Mandema JW, Tuk B, van Steveninck AL, Breimer DD, Cohen AF, Danhof M. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the central nervous system effects of midazolam and its main metabolite alpha-hydroxymidazolam in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 1992;51:715-28.
- Mantovani A, Bussolino F, Dejana E. Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J* 1992;6:2591-9.
- Marder P, Spaethe SM, Froelich LL, Cerimele BJ, Petersen BH, Tanner T, et al. Inhibition of ex vivo neutrophil activation by oral LY293111, a novel leukotriene B4 receptor antagonist. *Br J Clin Pharmacol* 1996;42:457-64.
- Markham A, Faulds D. Montelukast. *Drugs* 1998;56:251-6.
- Marom Z, Shelhamer JH, Bach MK, Morton DR, Kaliner M. Slow-reacting substances, leukotrienes C4 and D4, increase the release of mucus from human airways in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1982;126:449-51.
- Martinez-Lanao J. Aclaramiento. En: Domenech J, Martinez-Lanao J, Pla J, editores. *Biofarmacia y farmacocinética*, Vol 1: Farmacocinética. Madrid: Editorial Sintesis; 1997. p. 277-304.
- Martino E, Bartalena L, Bogazzi F, Braverman LE. The effects of amiodarone on the thyroid. *Endocr Rev* 2001;22:240-54.
- Mayburd AL, Martlinez A, Sackett D, Liu H, Shih J, Tauler J, et al. Ingenuity network-assisted transcription profiling: Identification of a new pharmacologic mechanism for MK886. *Clin Cancer Res* 2006;12:1820-7.
- McGill KA, Busse WW. Zileuton. *Lancet* 1996;348:519-24.
- McMillan R. Leukotrienes in respiratory disease. *Paediatric Respir Rev* 2001;2:238-44.
- Mezhybovska M, Wikstrom K, Ohd JF, Sjolander A. The inflammatory mediator leukotriene D4 induces beta-catenin signaling and its association with antiapoptotic Bcl-2 in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2006;281:6776-84.
- Microsoft® Excel 97. Microsoft Corporation, 1997.
- Minami Y, Kono T, Yamada K, Taniguchi T. The interleukin-2 receptors: insights into a complex signalling mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1992;1114:163-77.

Mitchell SH, Schaefer DC, Dubagunta S. A new view of occult and obscure gastrointestinal bleeding. *Am Fam Physician* 2004;69:875-81.

Muijsers RB, Noble S. Montelukast: a review of its therapeutic potential in asthma in children 2 to 14 years of age. *Paediatr Drugs* 2002;4(2):123-39.

Natarajan R, Nadler J. Role of lipoxygenases in breast cancer. *Front Biosci* 1998;3:E81-E88.

Natarajan R, Esworthy R, Bai W, Gu JL, Wilczynski S, Nadler J. Increased 12-lipoxygenase expression in breast cancer tissues and cells. Regulation by epidermal growth factor. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1790-8.

Nathan RA, Kemp JP. Efficacy of antileukotriene agents in asthma management. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;86:9-17.

Nathan RA, Bernstein JA, Bielory L, Bonuccelli CM, Calhoun WJ, Galant SP, et al. Zafirlukast improves asthma symptoms and quality of life in patients with moderate reversible airflow obstruction. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:935-42.

Nayak A. A review of montelukast in the treatment of asthma and allergic rhinitis. *Expert Opin Pharmacother* 2004;5:679-86.

NIH.U.S. Department of Health and Human Services. Updates the NAEPP Expert Panel Report 2 (NIH Publication No 97-4051). Bethesda 2002.

Noe DA, Rowinsky EK, Shen HS, Clarke BV, Grochow LB, McGuire WB, et al. Phase I and pharmacokinetic study of brequinar sodium (NSC 368390). *Cancer Res* 1990;50:4595-9.

Noguchi M, Rose DP, Earashi M, Miyazaki I. The role of fatty acids and eicosanoid synthesis inhibitors in breast carcinoma. *Oncology* 1995;52:265-71.

Obach R. El tratamiento de datos en los estudios de biodisponibilidad. En: Badia A, Dominguez-Gil A, Garzón J, editores. *Tratamiento de datos en farmacología*. Barcelona: Doyma; 1989. p. 73-80.

Ohuchi K, Levine L. Stimulation of prostaglandin synthesis by tumor-promoting phorbol-12, 13-diester in canine kidney (MDCK) cells. Cycloheximide inhibits the stimulated prostaglandin synthesis, deacylation of lipids, and morphological changes. *J Biol Chem* 1978;253:4783-90.

Oketani K, Nagakura N, Harada K, Inoue T. In vitro effects of E3040, a dual inhibitor of 5-lipoxygenase and thromboxane A(2) synthetase, on eicosanoid production. *Eur J Pharmacol* 2001;422:209-16.

Orning L, Kaijser L, Hammarstrom S. In vivo metabolism of leukotriene C4 in man: urinary excretion of leukotriene E4. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;130:214-20.

Pacitti N, Bryson SE, McKechnie K, Rodger IW, Parratt JR. Leukotriene antagonist FPL 57231 prevents the acute pulmonary effects of *Escherichia coli* endotoxin in cats. *Circ Shock* 1987;21:155-68.

- Pang KS, Rowland M. Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a "well-stirred" model and a "parallel tube" model. Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance. *J Pharmacokinet Biopharm* 1977;5:625-53.
- Parker J, Daniel LW, Waite M. Evidence of protein kinase C involvement in phorbol diester-stimulated arachidonic acid release and prostaglandin synthesis. *J Biol Chem* 1987;262:5385-93.
- Patel P, Philip G, Yang W, Call R, Horak F, LaForce C, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of montelukast for treating perennial allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005;95:551-7.
- Payan DG, Goetzl EJ. Specific suppression of human T lymphocyte function by leukotriene B4. *J Immunol* 1983;131:551-3.
- Pearlman DS, van AJ, Philip G, Tilles SA, Busse W, Hendeles L, et al. Onset and duration of protection against exercise-induced bronchoconstriction by a single oral dose of montelukast. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;97:98-104.
- Peck CC, Barr WH, Benet LZ, Collins J, Desjardins RE, Furst DE, et al. Opportunities for integration of pharmacokinetics, pharmacodynamics, and toxicokinetics in rational drug development. *Pharm Res* 1992;9:826-33.
- PEI (Producto en Investigación) N° 94-46, otorgado por el Ministerio de Sanidad y Consumo, Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios. Madrid, 1996.
- Pepe PE, Potkin RT, Reus DH, Hudson LD, Carrico CJ. Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome. *Am J Surg* 1982;144:124-30.
- Peraire C, Obach R, Domenech J. Estudio farmacocinético de un derivado fenólico triyodado en la rata. *C I F* 1988;7:74-7.
- Pieters MS, Jennekens-Schinkel A, Schoemaker HC, Cohen AF. Self-selection for personality variables among healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1992;33:101-6.
- Piotrovsky V. Population pharmacodynamic and pharmacokinetic modeling via mixed effects. *Curr Opinion in Drug Discovery & Development* 2000;3:314-30.
- Pla J, Martín A. Absorción gastrointestinal. En: Domenech J, Martínez-Lanao J, Pla J, editores. *Biofarmacia y farmacocinética*, Vol 2: Biofarmacia. Madrid: Editorial Síntesis; 1998. p. 129-44.
- Porro GB, Corvi G, Fuccella LM, Goldaniga GC, Valzelli G. Gastro-intestinal blood loss during administration of indoprofen, aspirin and ibuprofen. *J Int Med Res* 1977;5:155-60.
- Pratt P. Pathology of adult respiratory distress syndrome. Implications regarding therapy. *Semin Respir Med* 1982;4:79-85.



Puranapanda V, Hinshaw LB, O'Rear EA, Chang AC, Whitsett TL. Erythrocyte deformability in canine septic shock and the efficacy of pentoxifylline and a leukotriene antagonist. *Proc Soc Exp Biol Med* 1987;185:206-10.

Qian C, Hwang SB, Libertine-Garahan L, Eckman JB, Cai X, Scannell RT, et al. Anti-inflammatory activities of LDP-392, a dual PAF receptor antagonist and 5-lipoxygenase inhibitor. *Pharmacol Res* 2001;44:213-20.

Rae SA, Davidson EM, Smith MJ. Leukotriene B<sub>4</sub>, an inflammatory mediator in gout. *Lancet* 1982;2:1122-4.

Ramsay C, van Kan C, Nieman R, Wang J, van Krieken J, Willems L, et al. The effects of oral pranlukast on airway immunopathology and clinical parameters in patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:A502.

Rao RH, McCready VR, Spathis GS. Iodine kinetic studies during amiodarone treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;62:563-8.

Real decreto 561/1993, de 16 de abril, por el que se establecen los requisitos para la realización de ensayos clínicos con medicamentos. *Boletín Oficial del Estado* 1993,114.

Real decreto 223/2004, de 7 de febrero, por el que se regulan los ensayos clínicos con medicamentos. *Boletín Oficial del Estado* 2004, 33.

Reid J. ABT-761 Abbot. *Curr Opin Invest Drugs* 2001;2:68-71.

Reigner BG, Blesch KS. Estimating the starting dose for entry into humans: principles and practice. *Eur J Clin Pharmacol* 2002;57:835-45.

Reinhold U, Kukel S, Goeden B, Neumann U, Kreysel HW. Functional characterization of skin-infiltrating lymphocytes in atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 1991;86:444-8.

Reiss TF, Altman LC, Chervinsky P, Bewtra A, Stricker WE, Noonan GP, et al. Effects of montelukast (MK-0476), a new potent cysteinyl leukotriene (LTD<sub>4</sub>) receptor antagonist, in patients with chronic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:528-34.

Reiss TF, Chervinsky P, Dockhorn RJ, Shingo S, Seidenberg B, Edwards TB. Montelukast, a once-daily leukotriene receptor antagonist, in the treatment of chronic asthma: a multicenter, randomized, double-blind trial. Montelukast Clinical Research Study Group. *Arch Intern Med* 1998;158:1213-20.

Renzi PM. Antileukotriene agents in asthma: the dart that kills the elephant? *CMAJ* 1999;160:217-23.

Rizzo WB, Lin Z, Carney G. Fatty aldehyde dehydrogenase: genomic structure, expression and mutation analysis in Sjogren-Larsson syndrome. *Chem Biol Interact* 2001;130-132:297-307.

Rockey DC. Occult gastrointestinal bleeding. *N Engl J Med* 1999;341:38-46.

Rodríguez Larrea J. Estudio de la variabilidad poblacional en farmacocinética y farmacodinamia.I. Conceptos generales. *Cienc Pharm* 1996a;6:96-105.

Rodríguez Larrea J. Estudio de la variabilidad poblacional en farmacocinética y farmacodinamia.(II). Métodos paramétricos. *Cienc Pharm* 1996b;6:152-62.

Rodríguez Larrea J. Estudio de la variabilidad poblacional en farmacocinética y farmacodinamia.(III). Métodos no paramétricos. *Cienc Pharm* 1996c;6:201-9.

Rola-Pleszczynski M, Stankova J. Leukotriene B4 enhances interleukin-6 (IL-6) production and IL-6 messenger RNA accumulation in human monocytes in vitro: transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Blood* 1992;80:1004-11.

Roskos L, Stead R, Harker L, Cebon J, Basser R, Begley G, et al. Cytokynetic model of platelet production and destruction following administration of PEF-rHuMGDF. *Blood* 1997; 90: 171.

Rouzer CA, Ford-Hutchinson AW, Morton HE, Gillard JW. MK886, a potent and specific leukotriene biosynthesis inhibitor blocks and reverses the membrane association of 5-lipoxygenase in ionophore-challenged leukocytes. *J Biol Chem* 1990;265:1436-42.

Rowland M, Tozer T. Dose and time dependencies. En: Rowland M, Tozer T, editores. *Clinical Pharmacokinetics, Concepts and Applications*. Third ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1995. p. 394-420.

Royal College of Physicians Working Party. Research on healthy volunteers. *Journal of the Royal College of Physicians, London* 1986, 4:3-17.

Ruzicka T, Burg G. Effects of chronic intracutaneous administration of arachidonic acid and its metabolites. Induction of leukocytoclastic vasculitis by leukotriene B4 and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid and its prevention by prostaglandin E2. *J Invest Dermatol* 1987;88:120-3.

Sahn S, Galant S, Murray JJ, Bronsky E, Spector S, Faiferman I, et al. Pranlukast (Ultair) improves FEV in patients with asthma: results of a 12 week multicenter study vs. nedocromil. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:A665.

Sala A, Voelkel N, Maclouf J, Murphy RC. Leukotriene E4 elimination and metabolism in normal human subjects. *J Biol Chem* 1990;265:21771-8.

Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 1983;220:568-75.

Samuelsson B. An elucidation of the arachidonic acid cascade. Discovery of prostaglandins, thromboxane and leukotrienes. *Drugs* 1987a;33:2-9.

Samuelsson B, Dahlen SE, Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* 1987b;237:1171-6.

Sarau HM, Ames RS, Chambers J, Ellis C, Elshourbagy N, Foley JJ, et al. Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol Pharmacol* 1999;56:657-63.

Schempp CM, Pelz K, Wittmer A, Schopf E, Simon JC. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *Lancet* 1999;353:2129.

Schempp CM, Winghofer B, Ludtke R, Simon-Haarhaus B, Schopf E, Simon JC. Topical application of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and of its metabolite hyperforin inhibits the allostimulatory capacity of epidermal cells. *Br J Dermatol* 2000;142:979-84.

Schuttler J, Stanski DR, White PF, Trevor AJ, Horai Y, Verotta D, et al. Pharmacodynamic modeling of the EEG effects of ketamine and its enantiomers in man. *J Pharmacokinet Biopharm* 1987;15:241-53.

Schwartz H, Petty T, Reed R, Dubé L, Swanson L. The comparative effects of zileuton, a 5-lipoxygenase inhibitor vs. theophylline in patients with moderate asthma: results from a 13 week, multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:A376.

Schwilden H, Schuttler J, Stoeckel H. Closed-loop feedback control of methohexital anesthesia by quantitative EEG analysis in humans. *Anesthesiology* 1987;67:341-7.

Scorrano L, Penzo D, Petronilli V, Pagano F, Bernardi P. Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition. Implications for tumor necrosis factor-alpha apoptotic signaling. *J Biol Chem* 2001;276:12035-40.

Scott JC, Cooke JE, Stanski DR. Electroencephalographic quantitation of opioid effect: comparative pharmacodynamics of fentanyl and sufentanil. *Anesthesiology* 1991;74:34-42.

Seyger MM, van Pelt JP, van den BJ, Latijnhouwers MA, de Jong EM. Epicutaneous application of leukotriene B4 induces patterns of tenascin and a heparan sulfate proteoglycan epitope that are typical for psoriatic lesions. *Arch Dermatol Res* 1997;289:331-6.

Shak S, Goldstein I. Leukotriene B4 w-hydroxylase in human polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* 1985;76:1218-28.

Shargel L, Yu A. Multiple-dosage Regimens. En: Shargel L, editor. *Applied Biopharmaceutics and pharmacokinetics*. Tercera ed. Conneticut: Appelton & Lange; 1985a. p. 353-74.

Shargel L, Yu A. Nonlinear pharmacokinetics. En: Shargel L, editor. *Applied Biopharmaceutics and pharmacokinetics*. Tercera ed. Conneticut: Appelton & Lange; 1985b. p. 375-95.

Sharma S, Sharma S. An update on eicosanoids and inhibitors of cyclooxygenase enzyme systems. *Indian J Exp Biol* 1997;35:1025-31.

Sahrma J, Mohammed L. The role of leukotrienes in the pathophysiology of inflammatory disorders: Is there a case for revisiting leukotrienes as therapeutic targets? *Inflammopharmacology* 2005;14:10-6.

Sheiner LB. Learning vs confirming in clinical drug development. *Clin Pharmacol Ther* 1999;61:275-91.

Sheiner LB, Steimer JL. Pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in drug development. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2000;40:67-95.

Sheiner LB, Rosenberg B, Marathe VV. Estimation of population characteristics of pharmacokinetic parameters from routine clinical data. *J Pharmacokinet Biopharm* 1977;5:445-79.

Sherman JW, Mendelson MA, Boggs JM, Koo CH, Goetzl EJ. Ligand-induced formation of the leukotriene B<sub>4</sub> receptor-G protein complex of human polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biochem* 1992;48:367-72.

Shirley JT, Cheng JB. Competition of leukotrienes and ICI-198,615 for [3H]LTD<sub>4</sub> binding sites in guinea pig lung membranes suggests the involvement of two LTD<sub>4</sub> receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;258:531-6.

Shureiqi I, Lippman SM. Lipoxygenase modulation to reverse carcinogenesis. *Cancer Res* 2001;61:6307-12.

Sibille M. Selection of healthy volunteers for phase I studies. *Fundam Clin Pharmacol* 1990;4:167s-76s.

Sirois P, Borgeat P, Lauziere M, Dube L, Rubin P, Kesterson J. Effect of Zileuton (A-64077) on the 5-lipoxygenase activity of human whole blood ex vivo. *Agents Actions* 1991;34:117-20.

Smith KA. Interleukin-2. *Curr Opin Immunol* 1992;4:271-6.

Snyderman R, Uhing R. Phagocytic cells. Stimulus response coupling mechanisms. En: Galling J, Goldstein I, Snyderman R, editores. *Inflammation: basic principles and correlates*. New York: Raven Press; 1988. p. 309-23.

Sola J, Godessart N, Vila L, Puig L, de Moragas JM. Epidermal cell-polymorphonuclear leukocyte cooperation in the formation of leukotriene B<sub>4</sub> by transcellular biosynthesis. *J Invest Dermatol* 1992;98:333-9.

Solai LK, Pollock BG, Mulsant BH, Frye RF, Miller MD, Sweet RA, et al. Effect of nortriptyline and paroxetine on CYP2D6 activity in depressed elderly patients. *J Clin Psychopharmacol* 2002;22:481-6.

Spector SL. Safety of antileukotriene agents in asthma management. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2001;86:18-23.

Spector SL, Smith LJ, Glass M. Effects of 6 weeks of therapy with oral doses of ICI 204,219, a leukotriene D<sub>4</sub> receptor antagonist, in subjects with bronchial asthma. ACCOLATE Asthma Trialists Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:618-23.

SPSS® Base 8.0. Application Guide. Spss Inc Chicago, 1998.

Stankova J, Gagnon N, Rola-Pleszczynski M. Leukotriene B4 augments interleukin-2 receptor-beta (IL-2R beta) expression and IL-2R beta-mediated cytotoxic response in human peripheral blood lymphocytes. *Immunology* 1992;76:258-63.

Stankova J, Dupuis G, Gagnon N, Thivierge M, Turcotte S, Rola-Pleszczynski M. Priming of human monocytes with leukotriene B4 enhances their sensitivity in IL-2-driven tumor necrosis factor-alpha production. Transcriptional and post-transcriptional up-regulation of IL-2 receptors. *J Immunol* 1993;150:4041-51.

Stanski DR. Pharmacodynamic modeling of anesthetic EEG drug effects. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1992;32:423-47.

Steinberg KP, Milberg JA, Martin TR, Maunder RJ, Cockrill BA, Hudson LD. Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:113-22.

Stenke L, Mansour M, Reizenstein P, Lindgren JA. Stimulation of human myelopoiesis by leukotrienes B4 and C4: interactions with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1993;81:352-6.

Storms W, Michele TM, Knorr B, Noonan G, Shapiro G, Zhang J, et al. Clinical safety and tolerability of montelukast, a leukotriene receptor antagonist, in controlled clinical trials in patients aged > or = 6 years. *Clin Exp Allergy* 2001;31:77-87.

Szekeres CK, Tang K, Trikha M, Honn KV. Eicosanoid activation of extracellular signal-regulated kinase1/2 in human epidermoid carcinoma cells. *J Biol Chem* 2000;275:38831-41.

Tamaoki J, Kondo M, Sakai N, Nakata J, Takemura H, Nagai A, et al. Leukotriene antagonist prevents exacerbation of asthma during reduction of high-dose inhaled corticosteroid. The Tokyo Joshi-Idai Asthma Research Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155:1235-40.

Tang DG, Honn KV. Apoptosis of W256 carcinosarcoma cells of the monocytoid origin induced by NDGA involves lipid peroxidation and depletion of GSH: role of 12-lipoxygenase in regulating tumor cell survival. *J Cell Physiol* 1997;172:155-70.

Tang DG, La E, Kern J, Kehrer JP. Fatty acid oxidation and signaling in apoptosis. *Biol Chem* 2002;383:425-42.

Taylor IK, O'Shaughnessy KM, Fuller RW, Dollery CT. Effect of cysteinyl-leukotriene receptor antagonist ICI 204.219 on allergen-induced bronchoconstriction and airway hyperreactivity in atopic subjects. *Lancet* 1991;337:690-4.

Teorell T. Kinetics of distribution of substances administered to the body. I. The extravascular modes of administration. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1937;57:226-40.

Ternowitz T. The enhanced monocyte and neutrophil chemotaxis in psoriasis is normalized after treatment with psoralens plus ultraviolet A and anthralin. *J Am Acad Dermatol* 1987;16:1169-75.

Tong WG, Ding XZ, Hennig R, Witt RC, Standop J, Pour PM, et al. Leukotriene B4 receptor antagonist LY293111 inhibits proliferation and induces apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res* 2002a;8:3232-42.

Tong WG, Ding XZ, Adrian TE. The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002b;296:942-8.

Toon S, Holt BL, Mullins FG, Bullingham R, Aarons L, Rowland M. Investigations into the potential effects of multiple dose ketorolac on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of racemic warfarin. *Br J Clin Pharmacol* 1990a;30:743-50.

Toon S, Holt BL, Langley SJ, Mullins FG, Rowland M, Halliday MS, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction between the antidepressant tianeptine and oxazepam at steady-state. *Psychopharmacology (Berl)* 1990b;101:226-32.

Torrent J, Izquierdo I, Barbanoj MJ, Obach R, Nomen M, Jane F. Theophylline pharmacokinetics following single and repeated administration of slow-release capsules. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1988;13:225-30.

Torrent J, Barbanoj M, Jané F. Infraestructura y métodos de investigación en una unidad de fase I. *Rev Farmacol Clin Exp* 1990;7:11-9.

Tosato G, Seamon KB, Goldman ND, Sehgal PB, May LT, Washington GC, et al. Monocyte-derived human B-cell growth factor identified as interferon-beta 2 (BSF-2, IL-6). *Science* 1988;239:502-4.

Trip MD, Wiersinga W, Plomp TA. Incidence, predictability, and pathogenesis of amiodarone-induced thyrotoxicosis and hypothyroidism. *Am J Med* 1991;91:507-11.

Troconiz IF. Population-based approach to the assessment of pharmacokinetic-pharmacodynamic data. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1996;18:51-2.

Troconiz IF, Zsolt I, Garrido MJ, Valle M, Antonijoan RM, Barbanoj MJ. Dealing with Time-Dependent Pharmacokinetics during the Early Clinical Development of a New Leukotriene B(4) Synthesis Inhibitor. *Pharm Res* 2006;23:1533-42.

Uematsu T, Kanamaru M, Kosuge K, Hara K, Uchiyama N, Takenaga N, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of a novel leukotriene biosynthesis inhibitor, MK-0591, in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1995;40:59-66.

Urbano G, Valle M, Morte A, Yritia M, Sánchez R, García-Gea C, Jané F, Barbanoj MJ. Population pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling on behavioural domains after intravenous lorazepam administration. Anxious personality effects. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 2001;23:325 (014A).

Utsumi K, Takai Y, Tada T, Ohzeki S, Fujiwara H, Hamaoka T. Enhanced production of IL-6 in tumor-bearing mice and determination of cells responsible for its augmented production. *J Immunol* 1990;145:397-403.

Vaidya AB, Vaidya RA. Initial human trials with an investigational new drug (phase I and 2): planning an management. *J Postgrad Med* 1981;27:197-213.

van Adelsberg J, Philip G, Pedinoff AJ, Meltzer EO, Ratner PH, Menten J, et al. Montelukast improves symptoms of seasonal allergic rhinitis over a 4-week treatment period. *Allergy* 2003;58:1268-76.

van der Heijden FL, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML. High frequency of IL-4-producing CD4+ allergen-specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin. *J Invest Dermatol* 1991;97:389-94.

van Gelder T, Hilbrands LB, Vanrenterghem Y, Weimar W, de Fijter JW, Squifflet JP, et al. A randomized double-blind, multicenter plasma concentration controlled study of the safety and efficacy of oral mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection after kidney transplantation. *Transplantation* 1999;68:261-6.

Veyrat-Follet C, Bruno R, Olivares R, Rhodes GR, Chaikin P. Clinical trial simulation of docetaxel in patients with cancer as a tool for dosage optimization. *Clin Pharmacol Ther* 2000;68:677-87.

Vickers PJ. 5-Lipoxygenase-activating protein (FLAP). *J Lipid Mediat Cell Signal* 1995;12:185-94.

Virchow J, Hassall S, Summerton L, Garris A. Improved asthma control over 6 weeks with Accolate (zafirlukast) in patients on high-dose inhaled corticosteroids. *J Invest Med* 1997;42:286A.

von Bahr C, Steiner E, Koike Y, Gabrielsson J. Time course of enzyme induction in humans: effect of pentobarbital on nortriptyline metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 1998;64:18-26.

Wade JR, Sambol NC. Felodipine population dose-response and concentration-response relationships in patients with essential hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 1995;57:569-81.

Wang G, Ludden T, Cheung E, Cruickshank S. Determination of absolute bioavailability of subcutaneously administered filgrastim following single doses to healthy volunteers. *Pharm Sci* 1998;1:3380.

Wang S, Gustafson E, Pang L, Qiao X, Behan J, Maguire M, et al. A novel hepatointestinal leukotriene B4 receptor. Cloning and functional characterization. *J Biol Chem* 2000;275:40686-94.

Welker HA, Wiltshire H, Bullingham R. Clinical pharmacokinetics of mibefradil. *Clin Pharmacokinet* 1998;35:405-23.

Werz O. 5-lipoxygenase: Cellular biology and molecular pharmacology. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*. 2002. p. 23-44.

Wheelan P, Zirrolli JA, Morelli JG, Murphy RC. Metabolism of leukotriene B4 by cultured human keratinocytes. Formation of glutathione conjugates and dihydro metabolites. *J Biol Chem* 1993;268:25439-48.

- Whitehead J, Zhou Y, Stallard N, Todd S, Whitehead A. Learning from previous responses in phase I dose-escalation studies. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52:1-7.
- WHO. Adverse Reaction Dictionary. WHO Collaborating Centre for International Drug Monitoring. Uppsala, 1986.
- Widmark E, Tandberg J. Über die Bedingungen für de Akkumulation indifferenter Narkotika (Theoretische Berechnungen). *Biochem Z* 1924;147:359-69.
- Willemsen M, Lutt M, Stijlen P, Nijuis-Van der Sanden M, Cruysberg Marinette van der Graaf J, Pasman Ertan Mayatepek J, et al. Clinical and biochemical effects of zileuton in patients with the Sjögren-Larsson syndrome. *Eur J Pediatr* 2001;160:711-7.
- Williams PJ, Ette EI. The role of population pharmacokinetics in drug development in light of the Food and Drug Administration's 'Guidance for Industry: population pharmacokinetics'. *Clin Pharmacokinet* 2000;39:385-95.
- Williams B, Noonan G, Reiss TF, Knorr B, Guerra J, White R, et al. Long-term asthma control with oral montelukast and inhaled beclomethasone for adults and children 6 years and older. *Clin Exp Allergy* 2001;31:845-54.
- WinNonlin. Profesional WinNonlin.2.0. Reference Guide. Scientific Consulting, Inc. 1998.
- Wolff J. Iodide goiter and the pharmacologic effects of excess iodide. *Am J Med* 1969;47:101-24.
- Wong E, Camp RD, Greaves MW. The responses of normal and psoriatic skin to single and multiple topical applications of leukotriene B4. *J Invest Dermatol* 1985;84:421-3.
- Woodmansee DP, Simon RA. A pilot study examining the role of zileuton in atopic dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;83:548-52.
- Wu KK, Hatzakis H, Lo SS, Seong DC, Sanduja SK, Tai HH. Stimulation of de novo synthesis of prostaglandin G/H synthase in human endothelial cells by phorbol ester. *J Biol Chem* 1988;263:19043-7.
- Yamamoto H, Nagata M, Kuramitsu K, Tabe K, Kiuchi H, Sakamoto Y, et al. Inhibition of analgesic-induced asthma by leukotriene receptor antagonist ONO-1078. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:254-7.
- Yamaoka K, Nakagawa T, Uno T. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J Pharmacokinet Biopharm* 1978;6:165-75.
- Yates R, McMillan R, Ellis S, et al. A new nonredox 5 lipoxigenase inhibitor ICI D2138 is well tolerated and inhibits blood leukotriene synthesis in healthy volunteers. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:A745.
- Yokomizo T, Izumi T, Shimizu T. Co-expression of two LTB4 receptors in human mononuclear cells. *Life Sci* 2001;68:2207-12.



Zaitsev M, Hamasaki Y, Matsuo M, Ichimaru T, Fujita I, Ishii E. Leukotriene synthesis is increased by transcriptional up-regulation of 5-lipoxygenase, leukotriene A4 hydrolase, and leukotriene C4 synthase in asthmatic children. *J Asthma* 2003;40:147-54.

Zileuton for asthma. *Med Lett Drugs Ther* 1997;39:18-9.

## **Anexo I:**

Valores de normalidad del Laboratorio del Centre d'Investigació de  
Medicaments (PNT FASEI.Doc/015).



Valores de Normalidad

Versión 9; de 14 de julio de 2006, sustituye a versión 8 de 26 de Septiembre de 2005

Bioquímica

*Copia del original*

Parámetro	Laboratorio		Grado 0		Grado 1	Grado 2
	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer		
Na + (mmol/l)	136 - 145		134 - 150		< 134 - > 150	< 120 - > 160
K + (mmol/l)	3.5 - 5.10		3.4 - 5.2		< 3.4 - > 5.2	< 3 - > 6
Cl - (mmol/l)	98 - 107		90 - 120		< 90 - > 120	< 80 - > 130
Ca ++ (mmol/l)	2.15 - 2.55		2.10 - 2.7		< 2.1 - > 2.7	< 2.0 - > 2.7
Fósforo (mmol/l)	0.87 - 1.45		0.77 - 1.52		< 0.77 - > 1.52	< 0.65 - > 1.80
Magnesio (mmol/l)	0.65 - 1.05		0.65 - 1.05		< 0.65 - > 1.05	< 0.65 - > 1.05
Urato (umol/l)	210- 420	150-350	150 - 450		< 150 - > 450	< 140 - > 500
LDH (U/I)	240 - 480		230 - 490		< 230 - > 490	< 210 - > 500
CK (U/I)	< 174	< 140	< 250	< 220	> 250	> 270
Glucosa (mmol/l)	3.0 - 6.0		2.8 - 6.4		< 2.8 - > 6.4	< 2.5 - > 7
Urea (mmol/l)	2.1 - 7.1		1.7 - 7.8		< 1.7 - > 7.8	> 12
Creatinina (umol/l)	< 115	< 97	< 125	< 110	> 125	> 150
Bilirrubina total (umol/l)	< 17		< 25		> 25	> 40
Bilirrubina dcta (umol/l)	< 6		< 10		> 10	> 20
Triglicéridos (mmol/l)	< 2.26		< 2.33		> 2.33	> 2.50
Colesterol (mmol/l)	< 6.20		< 6.5		> 6.5	> 8.0
AST (U/I)	< 37	< 31	< 45	< 40	> 45	> 150
ALT (U/I)	< 41	< 31	< 55	< 45	> 55	> 200
Fosfatasas alcalinas (U/I)	40 - 130	35 - 110	35 - 140	30 - 120	> 150	> 300
GGT (U/I)	< 54	< 43	< 60	< 50	> 65	> 200
Proteína total (g/l)	64 - 83		62 - 90		< 62 - > 90	< 58 - > 95
Albúmina (g/l)	34 - 48		34 - 58		< 34 - > 58	< 30
HGC (UI/1)	< 5	< 5	< 5		< 5	< 5

## **Anexo II:**

Adverse Reaction Dictionary. WHO Collaborating Centre for International Drug Monitoring.

# RECOMENDACIONES PARA LA VALORACIÓN DE LOS ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

(Modificaciones de la recomendaciones de la OMS)

	GRADO 1 (Leve)	GRADO 2 (Moderado)	GRADO 3 (Grave)	GRADO 4 (Riesgo Vital)
<b>HEMATOLÓGICOS (Adultos)</b>				
Hemoglobina (g/dl)	9,5 - 10,9	8,0 - 8,4	6,5 - 7,9	<6,5
Leucocitos (1000/mm <sup>3</sup> )	2,0 - 2,9	1,5 - 1,9	1,0 - 1,4	<1,0
Neutrófilos (1000/mm <sup>3</sup> )	1,0 - 1,5	0,75 - 0,99	0,5 - 0,74	<0,5
Plaquetas (1000/mm <sup>3</sup> )	70 - 100	50 - 60	25 - 49	<25
Linfocitos (1000/mm <sup>3</sup> )	0,5 > 0,20	0,2 > 0,10	0,10	
Hemorragia	-	Ligeramente sintomática, no requiere tratamiento	Pérdida macroscópica de sangre o transfusión 1-2 unidades	Pérdida masiva de sangre o transfusión de >2 unidades
<b>GASTROINTESTINAL</b>				
Bilirrubina total	1,26 - 2,5 x LNS*	2,6 - 5 x LNS	5,1 - 10 x LNS	Indicios de insuficiencia hepática
AST/ALT (SGOT/SGPT)	2 x basal	2,1 - 5 x basal	5,1 - 10 x basal	Indicios de insuficiencia hepática
Fosfatasa alcalina	2 x basal	2,1 - 5 x basal	5,1 - 10 x basal	Indicios de insuficiencia hepática
Oral/Estomatitis	Úlceras indolores, eritema o sensibilidad leve	Eritema, edema o úlceras dolorosas, pero puede comer	Eritema, edema o úlceras dolorosas, y no puede comer	Requiere soporte parenteral o enteral
Diarrea	Aumento de 2-3 deposiciones/día respecto antes de tratamiento	Aumento de 4-6 deposiciones/día, o deposiciones nocturnas, o calambres moderados	Aumento de 7-9 deposiciones/día, o incontinencia, o calambres intensos	Aumento de 10 deposiciones/día o diarrea fuertemente sanginolenta o necesidad de soporte parenteral distensión y vómitos
Estreñimiento	Leve	Moderado	Distensión abdominal	Distensión y vómitos
<b>RENAL Y VEJIGA</b>				
Creatinina (mg/dl)	>1,5 <2,0	2,0 <4,0	4,0 <8,0	≥8,0
Proteinuria (g/dl)	1+, <0,3	2-3+, 0,3 - 1,0	4+, >1,0	Síndrome nefrótico
Hematuria	Solo microscópica	Macroscópica, sin coágulos	Macroscópica, con coágulos	Requiere transfusión
PULMONAR	Asintomática, con anomalías en PFP	Úlceras en esfuerzo significativo	Dificultad en nivel de actividad normal	Dificultad en reposo
ALÉRGICO	Rash transitorio	Urticaria, broncoespasmo leve	Enfermedad del suero, broncoespasmo, requiere medicación parenteral	anafilaxia
CUTÁNEO/RASH/DERMATITIS	Eritema, prurito	Erupción maculopapular difusa o descamación seca	Vesiculación o descamación húmeda, o ulceración	Uno cualquiera de afectación de la membrana mucosa, aspecto de Stevens-Johnson (TSJ), eritema multiforme, necrosis que requiere cirugía, dermatitis exfoliativa
PELO	Pérdida mínima de pelo	Alopecia de alguna moderada	Alopecia completa pero reversible	Alopecia no reversible
<b>CARDÍACA</b>				
Distritmias cardíacas	Asintomáticas, transitorias, no requiere tratamiento	Recurrente o persistente, no requiere tratamiento	Requiere tratamiento	Requiere monitorización o produce hipotensión o taquicardia ventricular o fibrilación
Función cardíaca	Asintomáticas, pero con algunas anomalías	Disturbio sintomático leve que no requiere tratamiento	Disturbio sintomático que responde al tratamiento	Disturbio sintomático que no responde al tratamiento
Cardíaco - isquémico	Aplasmamiento no específico de la onda T (nuevos cambios en el ECG)	Asintomático, cambios isquémicos en ST y onda T que sugieren isquemia (nuevos cambios en el ECG)	Angina sin indicios de infarto	Infarto agudo de miocardio
Cardíaco - pericardio	Pericarditis asintomática, no requiere intervención	Pericarditis (pose, dolor torácico, cambios en ECG)	Pericarditis sintomática, requiere drenaje	Taponamiento, requiere drenaje urgente

\* LNS = límite superior de normalidad

# RECOMENDACIONES PARA LA VALORACIÓN DE LOS ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

(Modificaciones de la recomendaciones de la OMS)

	GRADO 1 (Leve)	GRADO 2 (Moderado)	GRADO 3 (Grave)	GRADO 4 (Riesgo Vital)
<b>PRESIÓN ARTERIAL</b>				
Hipertensión	Asintomática, transitoria, aumento en >20 mmHg (0) o hasta >150/100 si anteriormente DLN. No requiere tratamiento	Recurrente o persistente, aumento en >20 mmHg (0) o hasta >150/100 si anteriormente DLN. No requiere tratamiento	Requiere terapia	Crisis hipertensiva o que requiera hospitalización a causa de la hipertensión
Hipotensión	Hipotensión ortostática transitoria, no requiere tratamiento	Síntomas corregibles con tratamiento con líquidos	Requiere líquidos intravenosos, no requiere hospitalización	Requiere hospitalización
<b>NEUROTOXICIDAD</b>				
Periférica	Parestesias y/o reflejo tendinoso disminuido	Parestesias severas y/o debilidad leve	Parestesias intolerables y/o pérdida motora marcada	Parálisis
Neuro-motora (Astenia)	Debilidad subjetiva, sin hallazgos objetivos	Debilidad objetiva leve pero sin deterioro significativo de la función	Debilidad objetiva con deterioro de la función	Parálisis, o confinado a la cama o silla de ruedas a causa de la debilidad muscular
Neuro-cortical	Somnolencia leve o agitación	Somnolencia moderada o agitación	Somnolencia severa, agitación, confusión, desorientación o alucinaciones	Coma, convulsiones, psicosis tóxica
Neuro-cerebelar	Descoordinación ligera, disidiadococinesia	Tembor intencional, dismetría, lenguaje titubeante, nistagmo	Ataxia que requiere ayuda para caminar o incoordinación del brazo que interfiere con las AVD	Incapaz de sostenerse en pie
Neuro-humor	Ansiedad o depresión leves	Ansiedad o depresión moderadas	Ansiedad o depresión severas	Ideas suicidas
Neuro-audición	Asintomática, pérdida auditiva sólo en la audiometría	Tinnitus	Pérdida auditiva que interfiere con la función pero corregible con audífonos	Sordera no corregible
Neuro-visión	-	-	Pérdida de visión subtotal sintomática	Ceguera
<b>DOLOR (especificar localización)</b>	Leve	Moderado	Severo	Intolerable, requiere uso de narcóticos
<b>LOCAL (especificar localización)</b>	Dolor	Dolor e hinchazón con inflamación o flebitis	Ulceración	Indicación de cirugía plástica, dolor intratable
<b>SÍNTOMAS PSEUDOGRIPALES</b>				
Fiebre	Hasta 38,6 °C	38,7°C – 39,9°C	>40°C	Fiebre con hipotensión
Escalofríos	Temblores leves a moderados	Temblores intensos	Rigor que incapacita al paciente para su actividad diaria	-
Cefalea	<2 horas y no requiere analgésicos	2 horas, pero <24 y requiere analgésicos	24 horas, requiere dosis múltiples de analgésicos	Intratable, requiere dosis repetidas de narcóticos
Fatiga	Comunica fatiga pero sin efecto sobre la actividad diaria	Disminución moderada en la actividad diaria	Fatiga que incapacita al paciente para su actividad diaria	-
Malestar general	<24 horas de duración	24-48 horas de duración	Persistente, >48 de duración	-
Náuseas	Ocasional y transitoria	Persistente, >24 horas	Persistente, >24 horas con vómitos diarios	-
Vómitos	Esporádicos, no se producen todos los días	Emesis diaria	Emesis diaria intolerable que requiere tratamiento	Vómitos intratables
Aumento/pérdida de peso	5,0 – 9,9%	10,0 – 19,9%	≥20,0%	-
Artralgia	Dolor en las articulaciones pero no afecta a la actividad diaria	Disminución moderada en la actividad diaria	Dolor en las articulaciones que incapacita al paciente para su actividad diaria	-
Mialgia	Dolor muscular pero no afecta la funcionamiento diario	Disminución moderada en la función diaria	Dolor muscular que incapacita al paciente para su actividad diaria	-

\* LNS = Límite superior de normalidad

## RECOMENDACIONES PARA LA VALORACIÓN DE LOS ACONTECIMIENTOS ADVERSOS

(Modificaciones de la recomendaciones de la OMS)

	GRADO 1 (Leve)	GRADO 2 (Moderado)	GRADO 3 (Grave)	GRADO 4 (Riesgo Vital)
<b>ANOMALÍAS TIROIDEAS</b>				
Hipotiroidismo	Elevación límite de la TSH ( $<1,5 \times \text{LSN}$ )	TSH elevada ( $\geq 1,5 \text{ LNS}$ , $T_4$ baja, sin clínica)	TSH elevada, $T_4$ baja, con clínica que requiere terapia de reposición tiroidea	Mixodema o coma mixodematoso
Hipertiroidismo	TSH baja	TSH baja, $T_4$ elevada, sin clínica	TSH baja, $T_4$ elevada, con clínica que requiere terapia de reposición antihipertiroidia	Crisis tiroidea, hipertiroidismo poco o nada controlado con la medicación antihipertiroidia
<b>METABÓLICOS</b>				
Hiper glucemia (mmol/l)	6,4 – 8,8	8,9 – 13,7	13,8 – 27,5	$>27,5$ o cetoacidosis
Hipoglucemia (mmol/l)	3,0 – 3,5	2,2 – 2,9	1,7 – 2,1	$<1,7$
Hiperuricemia	$>\text{LSN} \leq 1,5 \times \text{LSN}$	$>1,5 \times \text{LSN}$ , sin síntomas clínicos	Gota clínica	
Amilasa	$>\text{LSN} <1,5 \times \text{LSN}$	$1,5 - 2,0 \times \text{LSN}$	$2,1 - 5,0 \times \text{LSN}$	$>5,0 \times \text{LSN}$
Hiper calcemia (mmol/l)	2,6 – 2,89	2,9 – 3,09	3,1 – 3,3	$>3,3$
Hipocalcemia (mmol/l)	1,9 – 2,14	1,7 – 1,89	1,5 – 1,69	$<1,5$
Hipomagnesemia (mmol/l)	1,4 – 1,2	1,1 – 0,9	0,8 – 0,6	$\leq 0,5$
<b>COAGULACIÓN</b>				
Fibrinógeno	$0,99 - 0,75 \times \text{LSN}$	$0,74 - 0,50 \times \text{LSN}$	$0,49 - 0,25 \times \text{LSN}$	$0,24 \times \text{LSN}$
Tiempo de protrombina	$1,01 - 1,25 \times \text{LSN}$	$1,26 - 1,50 \times \text{LSN}$	$1,51 - 2,00 \times \text{LSN}$	$> 2,00 \times \text{LSN}$
Tiempo parcial de tromboplastina	$1,01 - 1,66 \times \text{LSN}$	$1,67 - 2,33 \times \text{LSN}$	$2,34 - 3,00 \times \text{LSN}$	$>3,00 \times \text{LSN}$
<b>OTROS</b>	Se comunican pero no tiene efecto sobre la actividad diaria	Disminución moderada de la actividad diaria	Incapacita al paciente para la actividad diaria	Juicio clínico del investigador con documentación de los criterios clínicos utilizados para tomar la decisión

\* LNS = Límite superior de normalidad