



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**ESTUDIOS CLÍNICOS FARMACOCINÉTICOS DEL HEPP, UN NUEVO
ANTIEPILÉPTICO**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

DINORA FABIOLA GONZÁLEZ ESQUIVEL



TUTOR: HELGI JUNG COOK

AÑO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de México.

Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por el apoyo económico recibido.

A los laboratorios Armstrong de México por el soporte económico y tecnológico recibido para realizar este proyecto.

A los voluntarios que participaron en el estudio.

Al Programa Nacional de Epilepsia.

Al Jurado revisor del trabajo.

A mis amigas y amigos, especialmente a Nelly Castro y a Gaby Alcántara.

Al Profesor Edilberto Pérez y al Dr. Germán Chamorro.

Al Dr. Rafael Castillo, a la Dra Rachel Matta y al Dr, Camilo Ríos por su confianza.

A Luis Eduardo, Emiliano y Jorge

Este trabajo se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”.

México, D.F.

Índice

1.0	Resumen.
2.0	Abstract
3.0	Introducción
4.0	Objetivo General
4.1.	<i>Objetivos Particulares</i>
5.0	Generalidades
5.1.	<i>Desarrollo de un fármaco</i>
5.2.	<i>Epilepsia</i>
5.3.	D, L-3-Hidroxi-3-etil-3-fenil-propionamida (HEPP)
5.3.1.	<i>Propiedades fisicoquímicas</i>
5.3.2.	<i>Síntesis</i>
5.3.3.	<i>Estudios pre-clínicos del HEPP</i>
5.3.4.	<i>Actividad Farmacológica</i>
5.3.5.	<i>Mecanismo de acción</i>
5.3.6.	<i>Toxicología Preclínica</i>
5.3.7.	<i>Farmacocinética Preclínica</i>
5.3.8.	<i>Efecto de la preñez en la disposición del HEPP</i>
5.3.9.	<i>Unión a proteínas del plasma</i>
5.4.0.	<i>Escalamiento entre especies</i>
5.4.1.	<i>Estudios de Interacción farmacocinética</i>
5.4.1.1.	<i>Interacción entre HEPP y Difenilhidantoína</i>
4.1.2..	<i>Interacción entre HEPP y Carbamazepina</i>
6.0	Parte Experimental
6.1	Método Analítico
6.1.1.	<i>Material y equipo</i>
6.1.2.	<i>Reactivos</i>
6.1.3.	<i>Estandares</i>
6.1.4.	<i>Soluciones</i>

- 6.2.2. *Linearidad*
- 6.2.3. *Precisión*
- 6.2.3.1. *Repetibilidad Intradía*
- 6.2.3.2. *Repetibilidad Interdía*
- 6.2.4. *Exactitud*
- 6.2.5. *Recobro absoluto*
- 6.2.6. *Límite de Cuantificación*
- 6.2.7. *Límite de Detección*

7.0 Estudios Clínicos Farmacocinéticos del HEPP

- 7.1. Criterios de inclusión
- 7.2. Criterios de Exclusión
- 7.3. Estudio de Farmacocinética en dosis única. Proporcionalidad de dosis
- 7.3.1. *Voluntarios*
- 7.3.2. *Diseño del Estudio*
- 7.3.3. *Protocolo del Estudio*
- 7.4. Farmacocinética de HEPP en Dosis Múltiple
- 7.4.1. *Voluntarios*
- 7.4.2. *Protocolo del estudio*
- 7.5. Estudio de dosis múltiple en conejo
- 7.5.1. *Protocolo del estudio*
- 7.6. Análisis Farmacocinético
- 7.6.1. *Dosis única*
- 7.6.2. *Linealidad y Proporcionalidad de dosis*
- 7.6.3. *Dosis Múltiple*
- 7.7. Análisis estadístico

8.0 Resultados y Discusión

- 8.1. Validación del Método Analítico
- 8.1.1. *Selectividad*
- 8.1.2. *Linealidad*
- 8.1.3. *Precisión*
- 8.1.3.1. *Reproducibilidad Intra-día*

8.2.1.	<i>HEPP excretado en orina</i>
8.2.2.	<i>Evaluación clínica</i>
8.3.	Estudio dosis múltiple
8.3.1.	<i>Estudio en sujetos sanos</i>
8.3.2.	<i>Estudio en conejos</i>
9.0	Conclusiones
10.0	Apéndices
Apéndices A	Carta de Consentimiento Informado
Apéndice B	Estudio de linealidad de dosis. Hoja control
Apéndice C	Hoja de reacción y eventos adverso
Apéndice D	Datos individuales de concentración plasmática de HEPP vs tiempo. Dosis única en humanos
Apéndice E	Perfiles de concentración de HEPP vs tiempo en humanos. Dosis única
Apéndice F	Estudio de Dosis Múltiple. Carta de Consentimiento Informado
Apéndice G	Estudio de Dosis múltiple. Datos individuales de concentración plasmática de HEPP en humanos. Primera Dosis y Dosis Final
Apéndice H	Perfiles individuales de concentración de HEPP vs tiempo en humanos
Apéndice I	Datos individuales de concentración plasmática de HEPP después de administrarlo en dosis múltiple en conejo
Apéndice J	Perfiles individuales de concentración de HEPP vs tiempo. Dosis múltiple en conejo
Apéndice K	Publicaciones derivadas del trabajo de tesis
11.0	Bibliografía.

LISTA DE TABLAS

Tabla No	Título de Tablas
Tabla 1.-	Actividad anticonvulsionante del HEPP en diferentes modelos experimentales de epilepsia.
Tabla 2.-	Perfil toxicológico del HEPP y la serie homóloga, HEPA y HEPB.
Tabla 3.-	Parámetros farmacocinéticos del HEPP obtenidos en diferentes especies animales.
Tabla 4.-	Parámetros farmacocinéticos promedio del HEPP en conejo después de administración I.V. solo y en conjunto con DFH.
Tabla 5.-	Parámetros farmacocinéticos promedio del HEPP en conejos después de administración oral solo y en conjunto con CBZ.
Tabla 6.-	Preparación de la curva estandar de HEPP.
Tabla 7.-	Conversión de dosis en animales a dosis equivalentes en humanos.
Tabla 8.-	Dosis utilizadas de HEPP en diferentes especies animales
Tabla 9.-	Regimen de administración del HEPP y de toma de muestras sanguíneas durante el estudio de dosis múltiple en voluntarios sanos.
Tabla 10.-	Regresión lineal del método para HEPP en plasma.
Tabla 11.-	Regresión lineal del método para HEPP en orina.
Tabla 12.-	Repetibilidad del método para HEPP en plasma.
Tabla 13.-	Repetibilidad del método para HEPP en orina.
Tabla 14.-	Repetibilidad Inter-día del método para HEPP en plasma.
Tabla 15.-	Repetibilidad Inter-día del método para HEPP en orina.
Tabla 16.-	Exactitud del método para HEPP en plasma.
Tabla 17.-	Exactitud del método para HEPP en orina.
Tabla 18.-	Recuperación Absoluta del método para HEPP en plasma y en orina.

- Tabla 21.- Parámetros farmacocinéticos de l HEPP obtenidos después de la administración oral de 4 dosis escaladas en voluntarios sanos.
- Tabla 22.- Parámetros farmacocinético promedio del HEPP en voluntarios sanos, normalizados por dosis, después de administración de 4 dosis escaladas.
- Tabla 23.- Ajuste polinomial de ABC con respecto a la dosis administrada de HEPP.
- Tabla 24.- Cantidad de HEPP inalterado (mg) excretado en orina durante 72 horas.
- Tabla 25.- Porcentaje excretado de HEPP en orina durante 72 horas en voluntarios sanos.
- Tabla 26.- Datos demográficos de los voluntarios participantes en el estudio de dosis múltiple.
- Tabla 27.- Parámetros farmacocinéticos de HEPP en humanos después de la administración oral única de 375 mg y después de la última dosis (durante el intervalo) de un regimen de 375 mg b.i.d./7dias.
- Tabla 28.- Concentraciones observadas en estado estacionario después de la administración oral múltiple de 375 mg de HEPP b.i.d. durante 7 dias en voluntarios sanos.
- Tabla 29.- Parámetros farmacocinéticos de HEPP en conejos después de la administración intraperitoneal de 30 mg/kg en dosis única y en dosis múltiple durante 6 dias consecutivos.

LISTA DE FIGURAS

Figura No.	Título de Figura
Figura 1.-	Estructura química del D,L-3-hidroxi-3-etil-3-fenilpropionamida.
Figura 2.-	Síntesis de HEPP y la serie homóloga de fenil alcohol amidas.
Figura 3.-	Relación alométrica para el HEPP entre el volumen de distribución, ($V_{\text{área}}/F$) y el peso corporal en diferentes especies: rata, conejo y humano.
Figura 4.-	Perfil de concentración plasmática de HEPP respecto al tiempo farmacocinético. Modelo Dieneticronos en 3 especies.
Figura 5.-	Diagrama para la cuantificación de HEPP en fluidos biológicos.
Figura 6.-	Cromatogramas representativos de una muestra blanco de plasma y una muestra de voluntario después de la administración de 500 mg de HEPP.
Figura 7.-	Cromatogramas representativos de un blanco de orina y una muestra de voluntario con HEPP.
Figura 8.-	Linealidad del método analítico para la cuantificación de HEPP en plasma.
Figura 9.-	Linealidad del método analítico para la cuantificación de HEPP en orina.
Figura 10.-	Cromatogramas representativos de la determinación del límite de cuantificación y límite de detección del HEPP en plasma.
Figura 11.-	Perfiles de concentración plasmática promedio de HEPP después de la administración oral de dosis únicas de 250, 375, 500 y 625 mg en sujetos sanos voluntarios.
Figura 12.-	Valores promedio (\pm EE) de $ABC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\text{ h}$) y C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) del HEPP después de la administración oral de 250, 375 y 500 mg en sujetos sanos voluntarios, como función de la dosis.
Figura 13.-	Ajuste polinomial de 2° grado entre la dosis administrada de HEPP y el área bajo la curva.
Figura 14.-	Perfiles de concentración plasmática promedio de HEPP después de la administración de la primera y la última dosis de la administración múltiple en sujetos sanos.
Figura 15.-	Perfiles de concentración plasmática después de la administración de 1

1.- RESUMEN

En el presente trabajo se llevaron a cabo diversos estudios con la D, L, 1 fenilpropionamida (HEPP), compuesto sintetizado y desarrollado en México, con actividad anticonvulsiva, con la finalidad de caracterizar su farmacocinética y proporcionalidad, como también determinar su tolerancia y seguridad después de su administración en humanos. Los estudios se llevaron a cabo en voluntarios sanos, quienes permanecieron hospitalizados durante la realización de éste y bajo estricta vigilancia médica, en apego a las buenas prácticas, previa firma de consentimiento informado y aprobación por el comité de ética del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) y del Programa Prioritario de Epilepsia del mismo Instituto.

La farmacocinética del HEPP se caracterizó en 6 voluntarios sanos después de la administración oral de dosis únicas y escaladas de 250, 375, 500 y 625 mg en 4 periodos diferentes. Se tomaron muestras de sangre y de orina durante 72 horas y el HEPP se cuantificó utilizando un método de cromatografía de líquidos de alta resolución previamente validado. Los principales parámetros farmacocinéticos se determinaron utilizando el programa WinNonLin (v 4.0). Los resultados mostraron que el HEPP presenta absorción relativamente rápida, independientemente de la dosis administrada y un patrón bifásico en su disposición. La vida media de eliminación fue de 22.8 h con una variabilidad interindividual con un valor de media armónica de 22.8 h. Se observó proporcionalidad entre dosis y concentraciones plasmáticas en el rango de 250, 375 y 500 mg; los parámetros farmacocinéticos de $C_{m\acute{a}x}$ y área bajo la curva (ABC) mostraron proporcionalidad, con la dosis de 625 mg el comportamiento farmacocinético no fue lineal, sugiriendo a nivel de saturación en la absorción. La cantidad de fármaco inalterado excretado en orina osciló entre el 6% de la dosis administrada lo que sugiere un extenso metabolismo del HEPP. No se observó eventos adversos serios a las dosis administradas, excepto con la dosis de 625 mg cuando se observó ligera somnolencia cuando la concentración alcanzó su máximo.

En este trabajo, también se llevó a cabo un estudio clínico de dosis múltiple en voluntarios sanos.

disminuyó y la depuración total (Cl/F) aumentó significativamente lo cual sugiere que el metabolismo del fármaco podría estar ocurriendo un proceso de autoinducción.

Al igual que el estudio anterior, se realizó un estudio de dosis múltiple en 12 conejos de Zelanda, los cuales recibieron por vía intraperitoneal, 30 mg/kg de HEPP cada 24 horas durante 7 días, el día 7 del estudio, el intervalo de dosificación cambió y el fármaco se administró a intervalos de 16, 20 y 24 horas. Se tomaron muestras sanguíneas después de la primera y la última dosis a los 10 horas para caracterizar el perfil farmacocinético. Los resultados observados mostraron un comportamiento semejante al observado en humanos, el ABC disminuyó y la depuración aumentó corroborando la probable presencia de un proceso de inducción metabólica.

2. – ABSTRACT

HEPP (DL-3-hydroxy-3-phenylpentanamide) is a novel compound with anticonvulsant activity. The purpose of this pharmacokinetic phase 1 clinical trial was to provide the first pharmacokinetic data to support its clinical development as an anticonvulsant. Pharmacokinetics, dose proportionality and multiple dose administration was studied in 10 male volunteers. Six subjects were orally administered with 250, 375, 500 and 625 mg (capsules) for the scaled single dose study. Blood and urine samples were collected for 24 h post-dose and plasma was analyzed by HPLC. Regression and power model analyses were used to evaluate the data (WinNonLin v 4.0). Results showed that after single dose administration HEPP was rapidly absorbed, with t_{max} values between 1.5 and 6 hours. Plasma mean terminal half-life after the different single doses ranged between 15.83 and 27.62 h with an overall half-life value of 22.8 h. The mean peak concentration (C_{max}) and area under the curve (AUC_{0-24}) increased linearly with doses of 250, 375 and 500 mg but did not with the dose of 625 mg. The amount of unchanged drug excreted in urine was between 3 and 6% of administered dose, which shows an extensive metabolism of the drug.

The multiple dose study involved the administration of 375 mg/12 hours of HEPP for 7 days in 10 healthy volunteers. Pharmacokinetic profiles were characterized after the last multiple dose during 72 hours. AUC_{0-24} values decreased and total clearance (Cl/F) significantly increased after the multiple administrations suggesting an induction of the metabolic disposition of the drug.

No serious adverse events or clinically significant systemic adverse events occurred during the study. All adverse events were investigated.

Drug-related adverse events were limited to light somnolence at the t_{max} , at the end of the day after administered in the scaled study.

Also it was carried-out a multiple dose study in rabbits administering 30 mg/kg intraperitoneally daily for 6 days and on the 7th day, HEPP was administered at a shorter dosing interval.

The HEPP has advantageous pharmacokinetic characteristics as a useful antiepileptic
its clinical research and development.

3.- INTRODUCCIÓN.

Las epilepsias, consideradas por la Organización Mundial de la Salud como un problema de salud pública, afectan aproximadamente entre 40 y 50 millones de personas alrededor del mundo. Al menos 5 millones de personas en Latinoamérica tienen epilepsia y más de tres millones reciben tratamiento. Sin embargo, los avances en la investigación básica, como la electroencefalografía, los estudios de imagen, la investigación clínica y farmacológica, y los avances en la biología molecular, han elevado las expectativas de tratamiento por lo que vez existe mayor esperanza de mejor control e inclusive curación en la población infantil. Durante los últimos años se han sintetizado un gran número de nuevos fármacos para el tratamiento de las epilepsias. Estos nuevos fármacos son igual o más efectivos que los tradicionales y ofrecen mejor tolerabilidad, menor posibilidad de interacciones, características farmacocinéticas más ventajosas y potencialmente ofrecen mayor seguridad durante el embarazo. Aún cuando en la actualidad no existe un fármaco de elección para el tratamiento de las epilepsias, estos nuevos fármacos antiepilépticos representan un avance y una alternativa para el paciente y el médico. También, desde la década de los 90's se introdujeron fármacos que han demostrado amplias posibilidades y efectividad como es el estimulador del sistema nervioso central cuyo costo no ha permitido ampliar su uso (1-4).

Dentro del programa de desarrollo de nuevos fármacos antiepilépticos, en México se desarrolló una serie homóloga de fenilalquilamidas con actividad anticonvulsiva significativa. El homólogo 3-hidroxi-3-etil-3-fenil-propionamida (HEPP) mostró el margen de seguridad más favorable dentro de la serie, al ser evaluado de acuerdo al proyecto de cernimiento de los Institutos Nacionales de Salud en EUA (NIH) y cumplió con las pruebas preclínicas de seguridad que norman la investigación de antiepilépticos. Sus propiedades anticonvulsivas han sido demostradas en diferentes modelos animales incluyendo las descargas inducidas por electrochoque, kindling, crisis provocadas por pentilentetrazol, 4-aminopiridina y tiociclopentilhidantoína.

Los estudios preclínicos de disposición del HEPP en animales han permitido caracterizar su farmacocinética en rata, conejo y perro después de administración única del fármaco. Se encontró que existe una correlación directa entre el efecto anticonvulsivo y la concentración del fármaco inalterado en cerebro, utilizando el modelo de crisis inducidas por pentileno-tetrazol (13). Como parte de su evaluación biofarmacéutica, se han realizado diferentes estudios relacionados con el grado de unión a proteínas plasmáticas (14) y estudios de farmacocinético en diferentes especies animales (15), así como estudios en conejo de interacción con otros antiepilépticos comúnmente utilizados (16, 17).

El HEPP, d, 1-3-hidroxi-3-etil-3-fenilpropionamida, ha cumplido con las pruebas de toxicidad y seguridad que norman la investigación preclínica y fue elegido por su menor neurotoxicidad y su amplio espectro de acción para continuar su evaluación farmacológica, por lo que en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

4.- OBJETIVO GENERAL.

Iniciar el proceso de evaluación clínica (Fase I) del HEPP en sujetos sanos con la intención de contribuir al desarrollo de nuevos fármacos antiepilépticos con probable uso terapéutico.

4.1. Objetivos Particulares.

- Caracterizar la farmacocinética del HEPP en voluntarios sanos después de la administración en dosis única y en dosis múltiple.
- Determinar la proporcionalidad de dosis después de administrar cuatro dosis de HEPP.
- Caracterizar la farmacocinética del HEPP después de la administración de dosis múltiples para evaluar su acumulación y determinar su posible inducción o inhibición metabólica.
- Establecer la seguridad y tolerancia del HEPP en sujetos sanos.

5.-GENERALIDADES.

5.1. Desarrollo de un fármaco.

La década pasada fue testigo de cambios muy importantes en la procuración, uso y prescripción de medicamentos. La experiencia adquirida con los fármacos antiepilépticos comúnmente utilizados, el conocimiento de nuevos estudios epidemiológicos, el desarrollo de métodos y estándares para conducir estudios clínicos, el impacto del programa de desarrollo de fármacos antiepilépticos de los Institutos Nacionales de Salud (NIH) en EUA así como el conocimiento y avance que se ha adquirido en los mecanismos básicos a nivel de células nerviosas y a nivel genético ha conducido a la investigación y diseño de fármacos específicamente dirigidos hacia el desorden químico de una manera más sofisticada y precisa (18, 19). En la última década del siglo pasado hubo una explosión de nuevos fármacos para el tratamiento de la epilepsia y aproximadamente desde 1993 se han aprobado 10 nuevos fármacos para el tratamiento de la epilepsia (20).

El proceso de evaluación de nuevos fármacos comprende una serie de etapas que se llevan a cabo de acuerdo a normas y regulaciones propias de cada país. El proceso, en general, incluye: desarrollo e investigación preclínica en animales, estudios clínicos en humanos y revisión y evaluación por un Organismo Oficial. Una vez que una sustancia nueva ha probado su actividad y seguridad durante la fase preclínica en animales de experimentación, pasa a la Fase Clínica en humanos, la cual se divide en varias etapas (21, 22).

Estudios preclínicos.- Por razones prácticas, la mayoría de los compuestos que se encuentran aún en la etapa de identificación de actividad, se estudian en roedores normales, es decir, modelos experimentales a los cuales se les inducen o provocan crisis por medio de algún estímulo químico o eléctrico. Los modelos crónicos de epilepsia en los que los animales son propensos a crisis, ya sea de manera genética o adquirida, también pueden ser incluidos ya que éstos serían lo más

cercano a la epilepsia humana (3). Los modelos que se consideran estándares de oro para el estudio de nuevos fármacos son el modelo de electrochoque máximo (MES) y el modelo de administración subcutánea de pentilentetrazol, ya que se ha observado que las sustancias que son activas en éstos modelos, generalmente son eficaces en los estudios clínicos.

El modelo de Kindling, donde los animales poseen una susceptibilidad adquirida hacia las crisis límbicas, en la actualidad forma parte de la batería de modelos que se prueban con una sustancia nueva (23, 24).

Otros modelos comúnmente usados incluyen los ratones susceptibles a crisis audiogénicas así como los ratones que presentan crisis tipo ausencia.

El uso de modelos no sólo permite determinar si una sustancia es activa, también permite identificar nuevos mecanismos de acción o bien nuevos blancos moleculares.

Estudios Clínicos Fase I. Estos estudios se llevan a cabo generalmente en voluntarios sanos y el nuevo fármaco es administrado por primera vez en humanos. El principal objetivo de esta fase es definir el rango de dosis que puede ser tolerado en humanos. Durante esta fase se caracteriza la farmacocinética del fármaco después de su administración en dosis única y en dosis múltiple, la proporcionalidad de dosis escaladas y también se evalúa la biodisponibilidad de la forma farmacéutica que se utilizará en estudios posteriores.

Estudios Clínicos Fase II. Los objetivos de esta fase son, demostrar la efectividad terapéutica del fármaco en pacientes, establecer posibles relaciones entre dosis y niveles plasmáticos, entre dosis y efecto farmacológico, entre niveles plasmáticos y efecto farmacológico así como diseñar los regímenes de dosificación que serán utilizados en los estudios posteriores. En esta fase también se determinan los posibles efectos colaterales a corto plazo así como los riesgos asociados al fármaco.

Estudios Clínicos Fase III. En esta fase, que también se lleva a cabo en pacientes, se llevan a cabo los estudios de farmacocinética y biodisponibilidad de la forma farmacéutica y se establece

el régimen de dosificación. Se realizan los estudios de farmacocinética en poblaciones especiales: pediátrica y geriátrica, así como en pacientes con daño hepático y pacientes con daño renal.

En la fase III también es posible llevar a cabo estudios adicionales que permitan obtener información acerca de probables interacciones del fármaco con diferentes inductores e inhibidores del metabolismo así como también estudios de influencia de la dieta en la absorción, en voluntarios sanos.

Los datos obtenidos durante esta fase permitirán contar con información adicional acerca de la efectividad y seguridad del fármaco, necesaria para evaluar la relación riesgo-beneficio y de esta manera proporcionar una base adecuada para la aprobación del fármaco.

Fase IV.- Durante esta fase se realiza la evaluación del fármaco por medio de estudios multicéntricos que permitan documentar la eficacia y la presencia de efectos adversos (24).

5.2. Epilepsia.

La epilepsia es una serie de desordenes complejos, heterogéneos y crónicos que afecta aproximadamente a 0.5 – 1% de la población mundial (25). Es un trastorno del sistema nervioso central caracterizado por la repetición de 2 o más crisis epilépticas no provocadas por una causa inmediatamente identificable. Una crisis epiléptica es la manifestación clínica que aparece en relación a una alteración del funcionamiento neuronal autolimitado. Dependiendo del área cerebral afectada, las crisis tienen manifestaciones diversas (motoras, sensitivas, psíquicas, etc.) y se originan por muy diversos mecanismos que suelen producir un exceso de excitación neuronal o un defecto de inhibición.

En la mayoría de los pacientes, las crisis tienen un inicio focal. En los pacientes con diagnóstico reciente y con inicio de crisis clínicamente localizables, 30 % de las crisis inician en el lóbulo temporal y en pacientes con epilepsia refractaria hasta 70% de los pacientes tienen patología del lóbulo temporal (25, 26).

La epilepsia es una de las enfermedades neurológicas más comunes y serias asociada con un alto grado de morbilidad y mortalidad. Se estima que entre 20 y 30 % de los pacientes con epilepsia presentan crisis epilépticas a pesar de estar bajo tratamiento y el 70-80% restante, que se considera estar bajo control, toleran muchos efectos colaterales indeseables propios de los fármacos, por lo que persiste la necesidad de desarrollar nuevos fármacos antiepilépticos, para aquellos pacientes refractarios a la terapia farmacológica.

De manera general, se estima que alrededor de un 50% de los pacientes con epilepsia responden de forma completa al tratamiento inicial con monoterapia, aún y cuando la posibilidad de respuesta depende en gran medida del tipo de síndrome epiléptico y de la etiología. Los pacientes que no vuelven a presentar ninguna crisis durante un período de 2 a 5 años se consideran pacientes en remisión por lo que en la mayoría de los casos, la administración del fármaco se va disminuyendo lentamente hasta su retiro total. De estos pacientes en remisión, aproximadamente un 30% recurrirán. De hecho se dice que el 70% de los pacientes alcanza una remisión superior a 5 años con o sin tratamiento.

El uso de fármacos antiepilépticos como tratamiento médico para la epilepsia, generalmente se inicia administrándolos como monoterapia a dosis estandarizadas, ya sea con incrementos de dosis hasta conseguir el control de las mismas, o bien hasta alcanzar la dosis máxima tolerable. Como ya se había mencionado, aproximadamente 50% de los pacientes responden a un primer fármaco y en los pacientes en los cuales no se logra control de crisis, se procede a la sustitución o a la adición de un segundo fármaco; sin embargo, un porcentaje muy bajo logra el control con esta medida. La elección de un antiepiléptico generalmente se establece por la eficacia que presenta en determinado tipo de epilepsia y por los efectos adversos potenciales. De esto se desprende el interés de sintetizar nuevos fármacos antiepilépticos, que presenten un perfil farmacocinético favorable que permita diseñar regímenes de dosificación con menor grado de interacciones y menos efectos adversos (27)

Indudablemente que cada vez que un nuevo fármaco se introduce en el mercado, su uso en grandes poblaciones es lo que nos permitirá observar efectos idiosincráticos y posibles complicaciones que en algunos aún no se han manifestado. Por ejemplo, la aparición del Síndrome de Stevens-Johnson con la lamotrigina, la restricción del campo visual con la vigabatrina, y la anemia aplásica y hepatopatía severa asociada al felbamato.

Bajo estas consideraciones también se han buscado otras alternativas como fue el desarrollo de la estimulación vagal (reducción de crisis en 30% de los pacientes); principalmente para epilepsias de tipo refractario; otra alternativa que aún se continúa utilizando es la dieta cetogénica, indicada también en niños con epilepsias resistente a medicamentos (altamente eficaz en 30-50% de los pacientes) y por último la cirugía de epilepsia. (2).

Los avances recientes en la fisiología de los canales iónicos y otros blancos moleculares potenciales, así como la información genética de epilepsias idiopáticas se han venido aplicando en la búsqueda de nuevos fármacos antiepilépticos. Por ejemplo las subunidades $\alpha 2$ - δ voltaje dependientes de los canales de Ca^{2+} han sido reconocidas como un blanco molecular para el diseño racional de nuevos fármacos antiepilépticos. De la misma manera, los estudios genéticos de epilepsia idiopática familiar han permitido la identificación de numerosos genes asociados a diversos síndromes epilépticos, incluyendo los genes que codifican los canales de Na^+ y los receptores GABA_A . Otros blancos potenciales incluyen proteínas auxiliares y subunidades de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, canales tipo A- o M voltaje dependientes de K^+ así como receptores ionotrópicos a glutamato. (18, 27)

La clonación molecular de subunidades de proteínas de canales iónicos sugieren nuevos blancos incluyendo receptores acoplados a proteína-G tales como los receptores metabotrópicos a glutamato y los receptores GABA_B .

Como se había mencionado, en los últimos 10 años se han comercializado nuevos fármacos antiepilépticos como vigabatrina, lamotrigina, felbamato, gabapentina, topiramato, tiagabina,

oxcarbazepina, levetiracetam y retigabina ofreciendo al médico y al paciente una mayor posibilidad en la elección del tratamiento. Actualmente sólo vigabatrina y tiagabina pertenecen al grupo de antiepilépticos diseñados racionalmente.

La mayoría de los antiepilépticos posee más de un mecanismo de acción, es por esto que un mismo fármaco es usado en diferentes tipos de epilepsia e incluso de patología. Deckers et al (28) clasifica los antiepilépticos de acuerdo a:

a).- El grupo que bloquea descargas repetidas sostenidas en neuronas individuales; éste efecto se debe al bloqueo de canales de sodio o calcio voltaje-dependientes. Dentro de este grupo se encuentra la carbamazepina, gabapentina, lamotrigina, oxcarbazepina, fenobarbital, fenitoína, topiramato y valproato, fármacos efectivos principalmente contra crisis generalizadas tónico-clónicas y crisis parciales.

b).- En otro grupo de antiepilépticos se encuentran algunos que son usados en todo tipo de crisis: de ausencia, tónico-clónico generalizadas y parciales. Estos fármacos aumentan los eventos inhibitorios mediados por GABA; benzodiacepinas, gabapentina, fenobarbital, tiagabina, topiramato, vigabatrina y valproato. Estos fármacos actúan ya sea aumentando la síntesis, facilitando el efecto de GABA sobre los receptores GABAérgicos tipo A que permiten la entrada de cloro hiperpolarizando la membrana; o bien impidiendo la recaptura de GABA (tiagabina estiripentol) e inhibiendo su catabolismo (vigabatrina).

c).- Un tercer grupo comprende prácticamente un fármaco, etosuximida, el cual bloquea canales de calcio tipo T y es activo en crisis de ausencia. Se ha sugerido que la zonisamida también es inhibidor de canales de calcio tipo T.

d).- Finalmente se encuentra el grupo de fármacos antiepilépticos que reducen los eventos mediados por aminoácidos excitatorios como son felbamato y fenobarbital.

La selección y síntesis empírica de nuevos fármacos aún sigue siendo útil ya que ha permitido la identificación de muchos fármacos con diferentes propiedades clínicas, por lo que en la actualidad se ha abordado con mayor énfasis el diseño de fármacos antiepilépticos hacia blancos moleculares, considerando los mecanismos de acción de algunas sustancias, naturales o sintéticas, que se han venido utilizando como proconvulsionantes. Es decir, provienen de un diseño racional, moléculas relacionadas al receptor GABA, a enzimas involucradas en el metabolismo (Vigabatrina) o relacionados al bloqueo de la recaptura de GABA (Tiagabina).

Por ejemplo, se ha observado experimentalmente, en modelos de “status epilepticus” y de isquemia cerebral, que algunos antiepilépticos pueden actuar como neuroprotectores, esto es, muestran un efecto que previene la muerte neuronal irreversible. Tiagabina, topiramato, vigabatrina, zonizamida, felbamato, gabapentina. Todos ellos de la nueva generación de antiepilépticos, han mostrado tener efecto en la reducción en la severidad de daño producido por isquemia o status epilepticus (25).

Aunado a esto, éstas nuevas moléculas poseen ventajas farmacocinéticas sobre los antiepilépticos tradicionales como cinética lineal, inducción enzimática reducida o ausente, potencial bajo de interacciones, y menor unión a proteínas (28).

5.3. D, L-3-Hidroxi-3-etil-3-fenil-propionamida (HEPP).

5.3.1. Propiedades Físico-Químicas (29, 30).

Descripción: Polvo blanco-grisáceo, cristalino, con ligero olor característico, preparado mediante síntesis química.

Nombre IUPAC: 3-fenil-3-hidroxipentanamida.

Nombre químico (dado al compuesto): D,L-3-hidroxi-3-etil-3-fenilpropionamida.

Fórmula condensada: C₁₁H₁₅NO₂

Formula desarrollada.

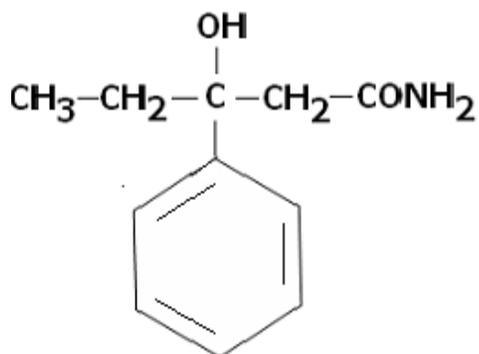


Figura 1.- Estructura química del D, L-3-hidroxi-3-etil-3-fenilpropionamida

Peso Molecular: 193.126 g/mol.

Solubilidad: soluble en etanol, cloroformo, éter, acetonitrilo; ligeramente soluble en agua.

Punto de fusión: 98-100 °C.

Coefficiente de partición lípido/agua: 1.83.

5.3.2. Síntesis:

El HEPP se sintetizó por primera vez en 1964 por Carvajal y cols. (31, 32). El método de síntesis, en breve, consistió en tratar la propiofenona [1] con la sal de sodio del acetonitrilo, para dar el 3-hidroxi-3-etil-3-fenilpropionitrilo [2] (nombre relacionado al compuesto HEPP (o bien 3-Fenil-3-hidroxi-pentanonitrilo, nombre según la IUPAC), el cual por hidrólisis condujo al HEPP, según se muestra en la figura 2.

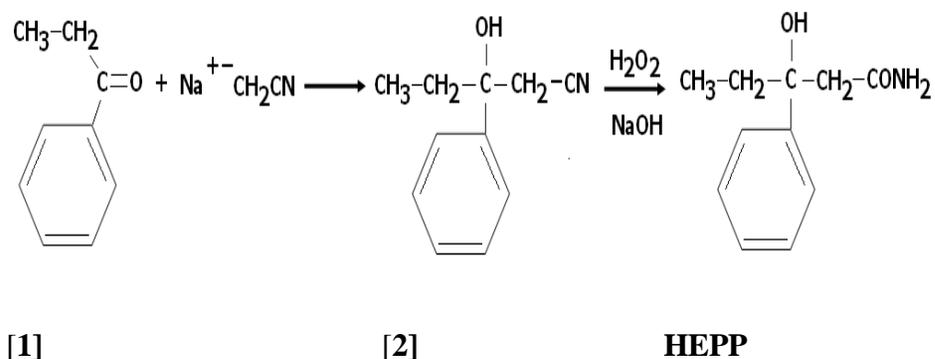


Figura 2.- Reacciones de síntesis para obtener el HEPP.

El nombre D,L-3-hidroxi-3-etil-3-fenilpropionamida se relaciona al HEPP desde que fue sintetizado. Los reportes, tesis y publicaciones relacionados con su síntesis y diversos estudios han utilizado históricamente éste nombre por el cual es conocido el HEPP.

5.3.3. Estudios preclínicos del HEPP.

5.3.4. Actividad Farmacológica.

Considerando los lineamientos y guías internacionales en cuanto a cernimiento de fármacos anticonvulsiantes así como los modelos para identificación de su actividad anticonvulsiva y neurotoxicidad, el HEPP fue evaluado utilizando un amplio espectro de modelos de convulsiones (Tabla 1), incluyendo el choque supramáximo (ESM), la administración de pentilentetrazol (PTZ) y el uso de sustancias químicas con diferente mecanismo de acción como fueron: bicuculina (BIC), que bloquea los receptores GABA_A, 4-amino-piridina (4-AP) que altera los canales de potasio y calcio; picrotoxina (PIC), que afecta los receptores de cloro asociados al receptor GABA_A; la estriocina (EST) que bloquea los receptores de glicina, tiosemicarbazida (TSC) (5, 32-34) y el

síndrome de abstinencia al ácido γ -aminobutírico (GABA), modelo de epilepsia focal, el cual muestra una alta resistencia a los antiepilépticos clásicos. (6-9).

Los estudios fueron realizados en ratones utilizando para cada sustancia convulsionante, la dosis que produjo convulsiones en 97% de los animales. Los convulsionantes se administraron por vía subcutánea (sc) en el caso de BIC y PTZ e intraperitoneal (ip) en el caso de 4-AP y TSC.

El índice de protección fue determinado utilizando la dosis que produce toxicidad en 50% de los animales (utilizando la prueba de rotarod), dividida por la dosis efectiva anticonvulsiva en 50% de los animales de la misma especie.

Como se puede observar en la Tabla 1, el HEPP mostró un amplio espectro de actividad. La protección fue parcial en el modelo de 4-AP y con TSC mostró un alto índice de protección. (34).

Sin embargo, en otros estudios (35) en los que también se utilizaron sustancias químicas como convulsionantes, se observó que la protección fue menor: en el caso de Picrotoxina (PIC) utilizando una dosis de 130 mg/kg se observó 37% de protección máxima y con estriquina (EST) se observó 30% de la protección máxima utilizando dosis de 100 mg/kg.

Tabla 1.-Actividad anticonvulsionante del HEPP, en diferentes modelos experimentales de epilepsia.

ESM		PTZ		4AP		BIC		TSC	
DE	IP								

HEPP	144	1.48	63	3.39	19	11.26	38	5.63	43	4.97
Fenobarbital	21.8	3.2	13	5.2	-	1.09	38	1.83	63	1.09
Etosuximida	1000	0.40	130	3.4	-	0.57	459	0.96	770	0.57
Valproato	272	1.6	149	2.9	-		360	1.18	-	-

ESM=electrochoque supramáximo; PTZ=pentilentetrazol; 4AP=4-aminopiridina; BIC=bicuculina;; TSC=tiosemicarbazida. Actividad determinada 30 min. post-administración; DE50=Dosis efectiva, mg/kg; IP=índice de protección; Dosis Tóxica50 (rotarod) 214 mg/kg; DL50 (ip) =767mg/kg; DL50 (po)=858 mg/kg.

En otros estudios realizados en rata y en gato en los que se utilizó el kindling hipocampal como modelo convulsionante, el HEPP también mostró protección (36-37).

El síndrome de abstinencia al GABA es un modelo de epileptogénesis focal en el que la actividad paroxística se induce mediante la interrupción de la infusión intracortical o límbica de GABA (7 días) en ratas normales; este síndrome parece ser un modelo diferente de status epilepticus focal (7).

El HEPP fue probado en este síndrome y demostró su efecto GABA-mimético. El fármaco logró disminuir la frecuencia de descarga del foco epiléptico en las primeras horas de su administración; observándose el efecto máximo aproximadamente a los 30 minutos y mantuvo su actividad entre 60 y 90 minutos. Cabe mencionar que ninguno de los fármacos de uso común en la clínica, como fenitoína, valproato, carbamazepina o barbitúricos, modificaron en forma significativa el patrón anticonvulsivo en este modelo (8).

Para evaluar su neurotoxicidad, se utilizó la prueba de ataxia en rotarod en ratón al tiempo de máximo efecto (30 min post-administración) para medir el efecto del fármaco sobre la actividad motora. Con el rotarod acelerado (2.16 rpm hasta 22.5 rpm en 4 min) se obtuvo una dosis tóxica 50

(DT₅₀) de 214 mg/kg (203-226) mientras que al utilizar rotarod de velocidad constante el valor de DT₅₀ fue de 168 mg/kg (137-206) (5).

5.3.5. Mecanismo de acción.

A pesar de que se han realizado diversos estudios encaminados a conocer su mecanismo de acción, este aún se desconoce. Sin embargo, considerando los diferentes modelos estudiados en donde se ha demostrado su actividad anticonvulsionante, así como su similitud estructural con ciertos ligandos a los receptores GABAB, principalmente el antagonista DL-2-hidroxisaclofén, el HEPP probablemente actúa en el sistema GABAérgico, antagonizando las acciones del GABA. Los receptores GABAB están involucrados en la generación de crisis de ausencia en modelos farmacológicos y genéticos de epilepsia, en los que se ha observado que los antagonistas a dichos receptores muestran actividad anticonvulsiva (38-39). Considerando estos antecedentes Meza y cols (40) llevaron a cabo algunos estudios *in vitro e in vivo* con diversos ligandos al receptor GABAB y utilizando membranas sinápticas de cerebro de rata. Los resultados mostraron que el HEPP inhibió la unión de baclofén marcado con [³H] a las membranas sinápticas, de manera similar a cómo lo hace el compuesto DL-baclofén. Así mismo, el R-baclofén inhibió la actividad anticonvulsiva del HEPP en convulsiones inducidas por pentilentetrazol de manera dosis-dependiente, sugiriendo que dichos receptores podrían estar involucrados en el mecanismo de acción del HEPP. El estudio demostró que el HEPP posee una afinidad muy alta para los receptores GABAB, comparable a la del DL-baclofén, agonista tipo de estos receptores.

Estos estudios también mostraron que la posición *para* del anillo aromático es crítica para su actividad biológica. Se encontró que la presencia de halógenos como el cloro y el fluor, incrementan la afinidad del receptor GABAB hacía los ligandos. Al comparar la actividad anticonvulsiva del HEPP con la serie de fluorobenzenamidas, se observó que la adición del grupo

trifluoro-metil al anillo fenil del HEPP, aumenta la actividad anticonvulsiva, estableciendo así la importancia del grupo fenil para la presencia de actividad (40-42).

Es interesante hacer notar que el HEPP produjo disminución de la actividad focal en ratas con crisis de ausencia del modelo genético de Strasbourg, modelo donde los antagonistas de receptores GABAB muestran actividad anticonvulsiva. (8).

A pesar de que el HEPP no mostró ninguna afinidad por los receptores GABAA, protege de crisis inducidas por la administración de bicuculina, antagonista de receptores GABAA.

5.3.6. Toxicología Preclínica.

Como parte de los estudios de seguridad, se han realizado algunos estudios correspondientes a la parte toxicológica en la serie homóloga de anticonvulsionantes. El grupo de Chamorro y colaboradores (10, 43) han llevado a cabo algunos de estos estudios.

Para la determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀) se utilizaron ratones de la cepa NMR1 y dos vías de administración, intraperitoneal y oral. Los resultados mostraron que el HEPP es el compuesto menos tóxico de la serie homóloga, ya que la dosis necesaria para producir el 50% de toxicidad y el 50% de letalidad fue aproximadamente el doble con respecto a sus homólogos (ver Tabla 2).

El estudio teratogénico se llevó a cabo utilizando ratones NIH y el HEPP se administró disuelto en el agua de alimentación, en el período de organogénesis (del 6° día de gestación y hasta el 15°). El análisis de fetos no reveló malformaciones congénitas; tampoco se observaron fetos reabsorbidos. Cabe mencionar que el peso de los fetos se encontró aumentado.

Por otro lado también se evaluó el efecto del HEPP sobre la fertilidad y reproducción en ratones NIH utilizando dosis de 0.85 y 340 mg/kg. Los machos estuvieron bajo tratamiento durante 60 días y las hembras 14 antes del apareamiento. El día 14 de la gestación se sacrificó al 50% de las hembras, se realizó el recuento de cuerpos lúteos, reabsorciones, implantaciones, crías viables y

crías muertas. El 50 % restante tuvo sus crías a los 20 días determinándose el índice de fertilidad, gestación y destete. Al comparar ambos grupos de dosis con los grupos control, no se encontró efecto del HEPP sobre la fertilidad y gestación.

Para llevar a cabo los estudios de genotoxicidad se utilizaron células somáticas de la mosca *Drosophila melanogaster*. La prueba permite detectar mutaciones puntuales, aberraciones cromosómicas y recombinación mitótica. Se utilizaron dosis en el rango de 0.5 hasta 10 mg/ml encontrándose que a partir de la concentración de 5 mg/ml se redujo la viabilidad de las larvas y con 10 mg/ml se indujo la mortalidad del 50% de los individuos, a pesar de esto no se produjo una frecuencia significativa de mutaciones.

Por otro lado se han realizado estudios preliminares de la hepatotoxicidad del HEPP, los cuales han sido comparados con los efectos del valproato de sodio y del fenobarbital en cultivos de hepatocitos de larga sobrevivencia. Los hepatocitos se sembraron sobre una monocapa alimentadora de células T3, letalmente tratadas con mitomicina C y posteriormente fueron expuestas durante 7-14 días, a los anticonvulsivantes. Se determinó en el medio de cultivo la liberación de las enzimas citoplásmicas transaminasa glutámico oxalacética (TGO), transaminasa glutámico pirúvica (TGP) y deshidrogenasa láctica (LDH); también se determinó el contenido de triglicéridos. El HEPP produjo gotas intracitoplásmicas de lípidos ensanchamiento de espacios intercelulares y vacuolización de células sin embargo el valproato produjo la más alta liberación de TGO, TGP y LDH.

Tabla 2.- Perfil toxicológico promedio del HEPP y la serie homóloga, HEPA y HEPB en ratones.

Compuesto	Dosis Tóxica ₅₀	Dosis Letal ₅₀ (ip)	Dosis Letal ₅₀ (oral)
	mg/kg	mg/kg	mg/kg
HEPP	214	767	858

	(203-226)	(665-886)	(734-1003)
HEPB	111	395	443
	(100-122)	(367-425)	(398-493)
HEPA	132	269	474
	(119-146)	(234-308)	(402-558)

Valores promedio (Desviación estandar).

5.3.7. *Farmacocinética Preclínica.*

Como parte de la evaluación preclínica, Gómez y cols (11-13) caracterizaron la farmacocinética del HEPP en tres diferentes especies animales, evaluaron la proporcionalidad de dosis en perro y determinaron su patrón de acumulación después de dosis múltiple en conejo.

En el estudio realizado en rata, utilizaron tres vías de administración diferentes: intravenosa (iv), oral (po) e intraperitoneal (ip) (12). Los autores encontraron que después de la administración de 50 mg/kg, el fármaco se ajusta a un modelo abierto de dos compartimientos con una vida media de eliminación promedio de 3.15 horas para las tres vías utilizadas. Este valor relativamente largo de vida media, concuerda perfectamente con el valor de depuración que obtuvieron, el cual fue muy bajo, de 3.3 mL/min/kg. El volumen de distribución aparente encontrado, indica que el HEPP se distribuye extensamente en los tejidos extracelulares ($V_d=0.8$ L/kg). Los parámetros de absorción obtenidos para la vía ip, mostraron que el HEPP se absorbe de manera rápida; la concentración máxima alcanzada después de administración ip fue de 51 $\mu\text{g/mL}$ en sólo 0.22 horas (t_{max}); la biodisponibilidad absoluta (F) para esta vía fue de 0.8. En contraste, los parámetros obtenidos para la vía oral sugieren un proceso más lento, lo cual concuerda con el valor de biodisponibilidad

absoluta calculado, que fue de 0.6. Los autores sugieren que este valor de F tan bajo para la vía oral puede deberse a la poca solubilidad del HEPP en agua o bien a efecto de primer paso (ver Tabla 3).

Utilizando un modelo de crisis inducidas con pentilentetrazol, en este mismo estudio se encontró una correlación entre el efecto anticonvulsivo y el curso temporal de las concentraciones del HEPP en plasma y en cerebro. Se observó que el HEPP penetra rápidamente en el cerebro y después de la fase de distribución, la desaparición en plasma y cerebro ocurre de manera casi paralela, encontrándose una relación cerebro/plasma de 1.1. El efecto anticonvulsivo fue máximo (100% de los animales protegidos) durante una hora; posteriormente disminuyó de manera lineal hasta 3 horas. Las concentraciones promedio observadas a la mitad del efecto anticonvulsivo máximo (CE_{50}) fueron de 70.6 $\mu\text{g/mL}$ en plasma y 60.1 $\mu\text{g/mL}$ en cerebro.

En otro estudio realizado por los mismos autores, se caracterizó la farmacocinética del HEPP en perro (13) y se evaluó la linealidad de dosis en el rango de dosis entre 8 y 30 mg/kg. Las dosis de HEPP administradas fueron 8, 15 y 30 mg/Kg, por vía intravenosa. Los resultados obtenidos mostraron que el perfil de concentración-tiempo para las 3 dosis utilizadas se ajustó a un modelo de dos compartimientos, con un tiempo de vida media de eliminación de 3.01 h en promedio. Al igual que en rata, el HEPP se distribuye ampliamente con una depuración muy baja, aproximadamente 10% del gasto cardiaco. Se encontró una excelente correlación, ($r^2=0.999$) entre las dosis administradas y los valores promedio de área bajo la curva: 44.1, 72.1 y 127.4 ($\mu\text{g/mL}$)h para las dosis de 8, 15 y 30 mg/Kg respectivamente, por lo que los autores concluyen que la cinética del HEPP fue lineal en el rango de dosis estudiado, de 8 a 30 mg/Kg.

Con el fin de obtener información sobre la disposición del HEPP después de dosis múltiples y determinar si la administración repetida del fármaco modifica sus propios patrones de disposición, Gómez y cols. (11, 44) llevaron a cabo un estudio en conejos a los cuales se les administró el HEPP por vía iv en dosis única (15 mg/kg) para caracterizar su farmacocinética, posteriormente se les

administró 30 mg/kg (i.p.) durante 4 días, con la finalidad de observar su acumulación y una vez terminado el tratamiento repetido, se caracterizó nuevamente la farmacocinética con dosis única de 15 mg/kg. Al comparar los resultados obtenidos antes y después de la administración repetida, encontraron diferencias en la depuración y en el valor de área bajo la curva pero no en el valor de vida media de eliminación, sugiriendo que quizá haya un proceso de inducción. Sin embargo, se observó que el fármaco mostró amplias fluctuaciones en el estado estacionario y la acumulación no fue la adecuada por lo que los autores recomendaron utilizar intervalos más cortos de administración durante periodos más largos de tiempo.

Tabla 3.- Parámetros farmacocinéticos del HEPP obtenidos en diferentes especies. animales (11-13).

Parámetro farmacocinético	RATA			PERRO ^b			CONEJO
	Dosis 30 mg/kg			Dosis vía iv (mg/kg)			Dosis 15
	iv	po	ip	8	15	30	mg/kg (iv)
ABCo _∞ (μg/mL)h	234	141	193	44.1	72.1	127.4	39.80
t ½ (h)	3.15	3.15	3.15	3.01	3.01	3.01	1.71
Cmáx (μg/mL)	–	49	51	–	–	–	–
t máx (h)	–	0.55	0.22	–	–	–	–
Cl/(mL min ⁻¹ kg ⁻¹)	3.3	–	–	3.36	3.53	4.02	6.16
TMR (h)	4.41	3.85	4.55	4.55	4.90	5.07	2.39
F	1.0	0.60	0.80				

(ABC=área bajo la curva de concentración plasmática versus tiempo; t ½= tiempo de vida media de eliminación; Cmáx= concentración máxima observada en plasma; tmáx= tiempo al cual se observa la Cmáx; Cl=depuración; TMR=tiempo medio de residencia; F=biodisponibilidad absoluta; vía iv=intravenosa; ;po=per oral; ip=intraperitoneal).

5.3.8. Efecto de la preñez en la disposición del HEPP.

Con la finalidad de determinar si la preñez podría afectar la disposición del HEPP, estudio en ratas (45) administrando el HEPP durante diferentes estadios de la gestación, adicionalmente se evaluó la transferencia materno-fetal así como la exposición fetal durante el último periodo gestacional (21 días). El estudio mostró que, al igual que en estudios previos de farmacocinética realizados en ratas, el HEPP se absorbe rápidamente y su perfil farmacocinético de eliminación muestra un decaimiento biexponencial. A lo largo de la gestación se observan algunos cambios en la disposición del HEPP, aumento en el área bajo la curva de concentración plasmática, disminución en la vida media de eliminación, cambios en las constantes de transferencia intercompartimental, así como una ligera disminución en el volumen de distribución, en la depuración y en el tiempo medio de residencia. Estos cambios fueron comparados respecto a ratas no preñadas así como con los parámetros obtenidos en estudios realizados 12 días de gestación. Se encontró que el HEPP se transfiere rápidamente hacia el feto, sin embargo, no se observa acumulación en éste, ya que después del equilibrio, la concentración de HEPP disminuye de manera paralela en la madre, placenta y feto.

5.3.9. Unión a proteínas del plasma.

Como parte de la evaluación biofarmacéutica de un nuevo fármaco, es necesario determinar los parámetros relacionados con su distribución en el organismo y uno de los principales factores que determinan esta distribución es su grado de unión a proteínas. El conocer el grado de unión de un fármaco es importante ya que sólo el fármaco libre es capaz de atravesar las membranas biológicas para ejercer la actividad farmacológica o toxicológica. Considerando la importancia que tiene este parámetro en la farmacocinética y farmacodinamia de un fármaco, se determinó, *in vitro*, el grado de unión del HEPP a proteínas plasmáticas (14). El estudio se realizó utilizando el método de diálisis al equilibrio y se determinó la unión tanto a proteínas plasmáticas totales como a la albúmina sérica bovina, considerando que es la proteína que se encuentra en mayor proporción en el plasma.

albúmina. La unión a proteínas del HEPP no reviste importancia clínica, ya que se debe considerar que sólo cuando el porcentaje de unión a proteínas plasmáticas se encuentra por encima del 85% se pueden presentar interacciones por desplazamiento o bien, toxicidad que afecte la eficacia terapéutica.

5.4.0. Escalamiento entre especies.

El escalamiento es un método de interpolación y extrapolación basado en similitudes fisiológicas y bioquímicas entre especies, el cual permite extrapolar datos de animales para posteriormente diseñar los estudios iniciales fase I en humanos. Estos estudios permiten diseñar regímenes de dosificación en especies mayores y en humanos, sino también pronosticar dosis posiblemente tóxicas. En la extrapolación de parámetros farmacocinéticos obtenidos en la fase preclínica, el escalamiento alométrico es el más utilizado por su sencillez, que está basado en el principio de que las variables fisiológicas entre especies se pueden relacionar a su peso corporal (46-47).

García L. (15) llevó cabo un estudio de escalamiento farmacocinético para el HEPP, utilizando ecuaciones alométricas simples. Los parámetros farmacocinéticos seleccionados para el escalamiento fueron: depuración (Cl/F), volumen de distribución (Vd) y vida media de eliminación ($t_{1/2}$). En este trabajo se utilizaron los parámetros farmacocinéticos obtenidos en rata y conejo, previamente reportados por Gómez y cols (12) y los obtenidos en voluntarios sanos en el presente trabajo. Se utilizaron cuatro métodos matemáticos para escalar los parámetros farmacocinéticos, los cuales involucran diferentes variables como el peso corporal, el peso cerebral y el máximo potencial de vida (MPV, longevidad máxima de la especie). Este último modelo de MPV produjo la mejor predicción en los parámetros farmacocinéticos seleccionados. La Figura 3 ejemplifica el escalamiento obtenido por el método de la depuración (Cl/F).

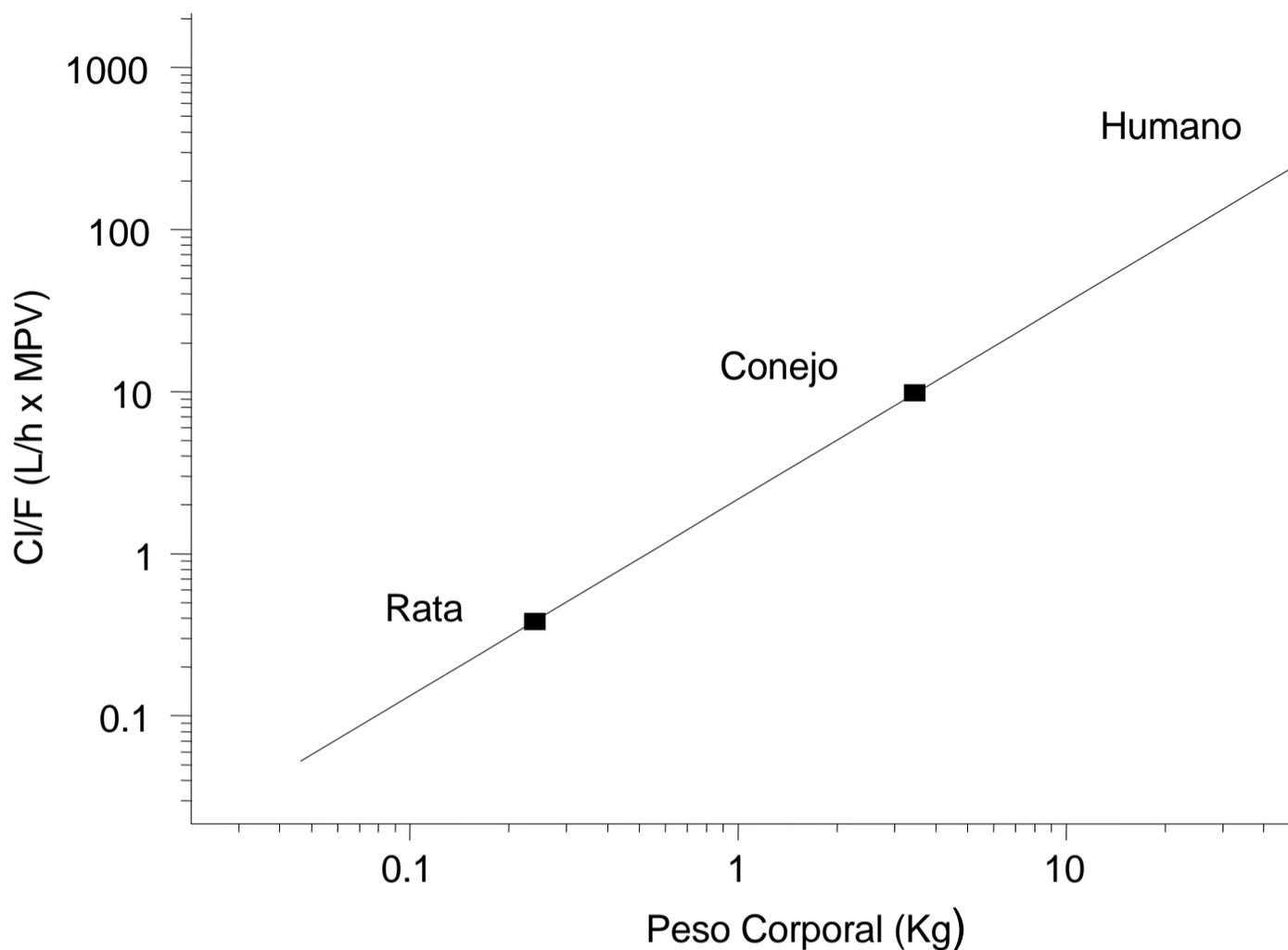


Figura 3.- Relación alométrica para el HEPP entre la depuración (Cl/F) multiplicado por el potencial de vida (MPV) y el peso corporal en diferentes especies; rata, conejo y humano. Ecuación utilizada $Cl/F = 2.1672 (MPV)^{-1} (P)^{-1.212}$ ($r = 0.999$, $p = 0.00274$).

Los autores realizaron las transformaciones necesarias para expresar el tiempo farmacológico en cada especie con unidades equivalentes, obteniendo la mejor representación de lo observado con el modelo Dineticonos, el cual incluye en su ecuación el *Máximo Potencial*.

Figura 4. Con los resultados obtenidos en este trabajo se demostró que es posible corroborar los parámetros farmacocinéticos del HEPP en humanos a partir de los datos obtenidos en el conejo de manera confiable.

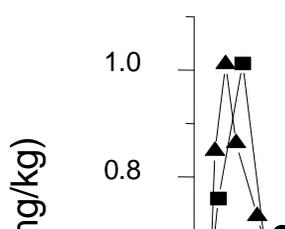


Figura 4.-Perfil de concentración plasmática de HEPP respecto al tiempo farmacológico de acuerdo al modelo Diéneticrons después de la administración oral en 3 especies diferentes.

5.4.1. Estudios de Interacción farmacocinética .

5.4.1.1. Interacción entre HEPP y Difenilhidantoína.

En el tratamiento de la epilepsia es común la administración conjunta de varios antiepilépticos con la finalidad de controlar de manera adecuada las crisis que se presentan. Esta politerapia conlleva la posibilidad de una interacción farmacocinética entre los fármacos administrados. Estas interacciones pueden ocurrir al nivel de diferentes procesos ya sea en la absorción, metabolismo o en la excreción. Las principales consecuencias clínicas de una interacción son la presencia de efectos secundarios o bien disminución del efecto terapéutico. De ahí que los estudios de interacción entre fármacos resultan de gran utilidad para conocer y evitar posibles problemas en la práctica clínica. Considerando que la difenilhidantoína (DFH) es uno de los antiepilépticos de primera elección para el tratamiento de crisis tónico-clónicas generalizadas y que generalmente se administra en conjunto con otros antiepilépticos, Medina y cols. (16) llevaron a cabo un estudio con la finalidad de observar la posibilidad de una interacción farmacocinética entre HEPP y DFH cuando se administran de manera conjunta. El estudio se realizó en conejos y se evaluó la influencia del HEPP en la farmacocinética de la DFH así como la influencia de la DFH sobre la farmacocinética del HEPP. Los resultados mostraron que la eliminación de HEPP se acelera significativamente cuando se administra en conjunto con DFH. Los principales parámetros farmacocinéticos calculados del HEPP, cambiaron de manera significativa al administrarlo en conjunto con DFH: el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo se redujo en un 56.49%; la vida media de eliminación promedio disminuyó de 2.68 ± 0.35 horas a 0.92 ± 0.15 horas. La depuración aumentó de 0.35 ± 0.058 a un valor de 0.81 ± 0.09 (L/hora)kg. Por lo tanto, estos resultados, la administración conjunta de HEPP y DFH podría traer como consecuencia una disminución de la actividad del HEPP.

con HEPP y se calcularon algunos parámetros farmacocinéticos, el área bajo la curva, la vida media de eliminación ($t_{1/2}$) y el tiempo medio de residencia (TMR). Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en los parámetros farmacocinéticos de DFH en los tratamientos, por lo que los autores concluyen que el HEPP no altera la farmacocinética de la difenilhidantoína cuando ambos fármacos se administran de manera conjunta.

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos promedio del HEPP en conejo después de su administración intravenosa (I.V.) sólo y en conjunto con DFH (\pm DE)

Parámetro farmacocinético	HEPP (Dosis 15 mg/kg)	HEPP + DFH
ABCo _{∞} (μ g/mL)h	43.23 \pm 7.01	18.81 \pm 2.03
T $\frac{1}{2}$ (horas)	2.68 \pm 0.35	1.05 \pm 0.07
Cl (L/h)kg	0.35 \pm 0.05	0.81 \pm 0.09

*Dosis de DFH= 30 mg/kgc/12h/5días; ABC=área bajo la curva de concentración plasmática versus tiempo; $t_{1/2}$ = tiempo de vida media de eliminación; C_{máx}= concentración máxima observada en plasma; Cl=depuración total; a=diferencia estadísticamente significativa

5.4.1.2. Interacción entre HEPP y Carbamazepina.

En otro estudio de interacción farmacocinética realizado por los mismos autores, (17) se evaluó la influencia de la carbamazepina (CBZ) sobre la disposición del HEPP y viceversa, en su administración conjunta por vía oral, en conejo. La carbamazepina es un fármaco antiepiléptico utilizado para el tratamiento de crisis parciales y crisis generalizadas tónico-clónicas y es un inductor del citocromo P450 asociado a un gran número de interacciones de importancia con diversos fármacos. El estudio se llevó a cabo en conejos, ya que en diversos estudios se ha demostrado que el metabolismo de la CBZ en conejo es semejante al del humano. Am

significativamente reducidos cuando éste se administró en conjunto con DFH, que modifica la disposición del HEPP.

Por otro lado al examinar los parámetros farmacocinéticos de CBZ, tampoco se observaron diferencias significativas entre tratamientos, CBZ sola y CBZ en conjunto con HEPP, tampoco el HEPP modifica la disposición de la CBZ.

Tabla 5. Parámetros farmacocinéticos promedio del HEPP en conejos después de administración oral solo y en conjunto con CBZ (\pm DE).

Parámetro Farmacocinético	HEPP (Dosis 30 mg/kg)	HEPP + CBZ
$ABC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$)	82.86 ± 19.4	83.24 ± 12.5
$t_{1/2}$ (horas)	3.40 ± 0.29	3.35 ± 0.45
$C_{\text{máx}}$ ($\mu\text{g/mL}$)	18.92 ± 2.99	19.79 ± 2.68
t_{max} (h)	1.27 ± 0.16	1.21 ± 0.11

*Dosis de CBZ= 50 mg/kg; ABC=área bajo la curva de concentración plasmática versus tiempo

$t_{1/2}$ = tiempo de vida media de eliminación; $C_{\text{máx}}$ = concentración máxima observada en plasma; t_{max} = tiempo en el que se observa la concentración máxima.

Con base en los estudios que se han realizado, el HEPP es un candidato muy promisorio para ser utilizado en un futuro en la clínica, por lo que sería conveniente continuar su desarrollo farmacológico con los estudios clínicos Fase I en humanos lo cual permitiría a su vez el inicio del proceso de desarrollo y evaluación de un nuevo fármaco sintetizado en el país.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Método Analítico.

El método analítico para la cuantificación del HEPP en plasma y orina, utiliza como método de separación la cromatografía de líquidos de alta resolución y fue reportado previamente por Lehman (11).

6.1.1. Material y equipo:

- Balanza Analítica Sartorius modelo i 1800.
- Centrífuga Beckman modelo TJ-6.
- Agitador horizontal Lab line modelo 3520.
- Cromatógrafo de líquidos HP series 1050, equipado con:
- Bomba cuaternaria modelo 79851AX.
- Detector UV-VIS longitud de onda variable modelo 79853C.
- Inyector Automuestreador HP series 1100 G1313A.
- Potenciómetro Beckman modelo pHI 41.

6.1.2. Reactivos:

- Hidróxido de sodio RA (J.T. Baker).
- Fosfato de potasio monobásico (J.T. Baker).
- Acetonitrilo grado HPLC (Mallincrodt).
- Diclorometano RA (Mallincrodt).
- Agua desionizada.
- Plasma obtenido del banco de sangre del mismo Instituto (INNN).

6.1.3. Estándares:

6.1.4. Soluciones:

- Solución de hidróxido de sodio 2.0 M. Pesar 8.0 gr de lentejas de hidróxido de sodio, disolver y aforar a 100 ml con agua bidestilada.
- Solución de hidróxido de sodio 0.8 M. Pesar 3.3. gr de Hidróxido de sodio, disolver y aforar a 100 ml con agua bidestilada.
- Solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH=8. Pesar 1.36 gr de fosfato de sodio monobásico, disolver y aforar a 100 ml con agua desionizada. Ajustar el pH a 8.0M.

6.1.5. Estándares de referencia.

- Solución estándar de D,L-3-hidroxi-3-etil-3-fenilpropionamida (HEPP). Pesar 10 mg de HEPP, disolver y aforar a 5.0 ml en metanol (1mg/ml), transferir con micropipeta a 10 ml con plasma o con metanol para obtener una concentración de 100 µg/ml (Solución A).
- Solución estándar de D, L-2-hidroxi-2-etil-2-fenilacetamida (HEPA) estándar de 100 µg/ml en metanol. Pesar 10 mg de HEPA, disolver y aforar a 10 ml con metanol RA. Diluir 1.0 ml de esta solución con metanol para obtener una concentración de 10 µg/ml.

6.1.6. Curvas patrón de HEPP.

A partir de la solución estándar A de HEPP, de 100 µg/mL, se realizaron diluciones sucesivas de la siguiente manera siguiente: tomar 5 ml de la solución y diluir a 10 ml ya sea con metanol, plasma u orina (50 µg/ml), dependiendo del fluido a validar; de esta solución tomar 5 ml y diluirlos nuevamente a 10 ml con metanol, plasma u orina (25 µg/ml), de la solución anterior tomar 5 ml y diluirlos nuevamente a 10 ml con metanol, plasma u orina (12.5 µg/ml), de esta solución tomar 5 ml y diluirlos nuevamente a 10 ml con metanol, plasma u orina (6.25 µg/ml), de la solución anterior tomar 5 ml y diluirlos nuevamente a 10 ml con metanol, plasma u orina (3.12 µg/ml), de esta solución tomar 5 ml y diluirlos nuevamente a 10 ml con metanol, plasma u orina (1.56 µg/ml).

Tabla 6. Preparación de la curva estándar de HEPP.

Solución	Alicuota de solución	Aforo (mL de plasma, orina o metanol)	Concentración (µg/mL)
1	5 mL de solución A	10	
2	5 mL de solución 1	10	
3	5 mL de solución 2	10	
4	5 mL de solución 3	10	
5	5 mL de solución 4	10	3
6	5 mL de solución 5	10	
7	5 mL de solución 6	10	
8	5 mL de solución 7	10	

6.1.7. Procedimiento de extracción de HEPP en fluidos biológicos.

El método se basa en una extracción líquido-líquido en medio básico: en un tubo con tapón de rosca se transfieren 0.5 ml de fluido, plasma u orina, adicionar 50 µL de este HEPA (100 µg/mL), 0.5 mL de NaOH 2.0 M y 0.5 mL de solución amortiguadora de 0.1 M pH=8.0, agitar en vortex 15 seg y adicionar 5.0 mL de diclorometano, posteriormente 3000 rpm durante 15 minutos en agitador horizontal. Después de centrifugar durante 15 minutos separar la fase orgánica y evaporarla a 25 °C utilizando baño María, bajo corriente de nitrógeno. El residuo fue reconstituido con 200 µL de fase móvil y transferido a microviales con pipeta automática. Una alícuota de 100 µL es inyectada al cromatógrafo. La figura 6.1.7 muestra el esquema de preparación de las muestra biológicas.

6.1.8. Condiciones cromatográficas.

Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes:

- Columna Hypersil octadecilsilano C18 (200x 4.6 mm. 5µm)

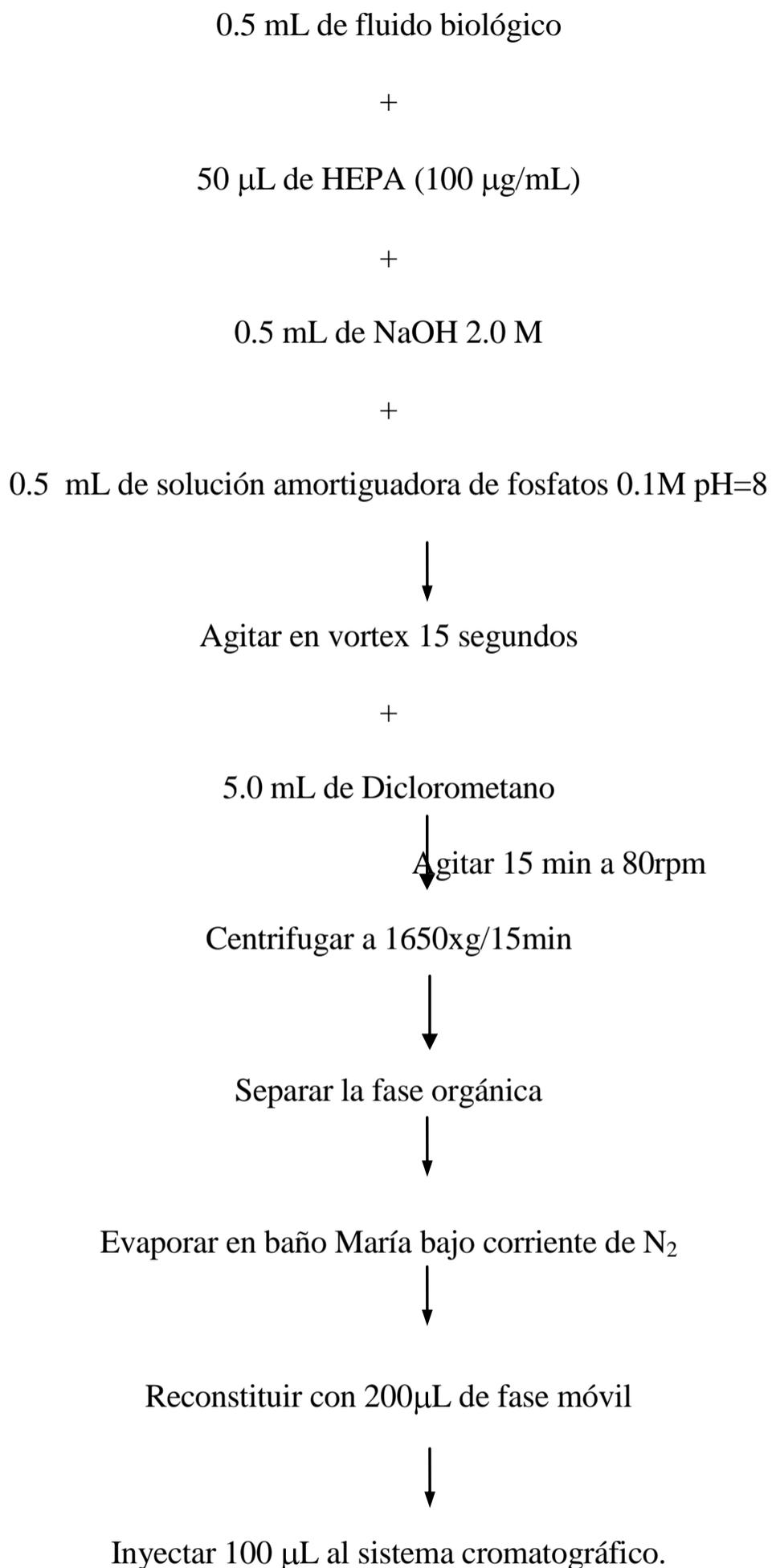


Figura 5 Diagrama para la cuantificación de HEPP en fluidos biológicos.

6.2. Validación del método analítico

El método analítico se validó tomando como base los siguientes parámetros, siguiendo las normas oficiales (48-49): selectividad, linealidad, exactitud, repetibilidad, límite de cuantificación y límite de detección. La metodología a seguir fue la siguiente.

6.2.1. Selectividad.

Con la finalidad de observar si existía interferencia en la determinación del HEPP o del HEPA interno HEPA por parte de sustancias endógenas, se prepararon muestras por quintuplicado en plasma blanco, orina blanco así como muestras blanco de ambos fluidos contenidas en el HEPA. Las muestras se analizaron de acuerdo a lo especificado en la sección 6.1.7.

6.2.2. Linealidad.

Para determinar si la respuesta obtenida (relación de alturas HEPP/HEPA) era proporcional a la concentración adicionada, se prepararon 3 curvas patrón en plasma y 3 en orina en el rango de concentración de 0.78 a 100 $\mu\text{g/mL}$, de acuerdo a lo especificado en la sección 6.1.7. Para cada curva se determinó el coeficiente de correlación (r), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b).

6.2.3. Precisión.

6.2.3.1. Repetibilidad Intradía.

En un mismo día de trabajo, se analizaron muestras tanto de orina como de plasma por quintuplicado, a 3 niveles de concentración, de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 6.1.7 y se determinó el coeficiente de variación (CV), el cual debe de ser menor al 15%.

6.2.3.2. Repetibilidad inter-día.

Se analizaron por duplicado durante tres días, 3 concentraciones conocidas de HEPP. La variación de variación entre ellos no debe de ser mayor al 15% en cada nivel de concentración.

6.2.5 .Recobro absoluto.

Se prepararon por triplicado 3 concentraciones de HEPP en plasma y 3 concentraciones en soluciones metanólicas a las mismas concentraciones. El porcentaje recuperado no necesariamente es del 100% pero si debe de ser constante en los 3 niveles de concentración (el coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%)

6.2.6. Límite de Cuantificación.

Se determinó cuantificando diluciones de la concentración más pequeña del rango que cumplieran con los parámetros de exactitud y precisión.

6.2.7. Límite de Detección.

Se determinó utilizando las concentraciones más pequeñas a partir del límite de cuantificación.

7. ESTUDIOS CLÍNICOS FARMACOCINÉTICOS DEL HEPP.

Con la finalidad de continuar con la evaluación farmacológica del HEPP, se llevarán a cabo los siguientes estudios en voluntarios sanos:

- Estudio de la farmacocinética en dosis única.
- Estudio de proporcionalidad de dosis.
- Estudio de dosis repetida.

El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética, por el Comité de Investigación Clínica, así como por Programa Prioritario de Epilepsia del mismo Instituto. Los estudios se llevarán a cabo siguiendo los lineamientos de la Declaración de Helsinki y Buenas Prácticas Clínicas, aprobada por la Comisión Internacional de Armonización, (ICH) (50-52).

Para determinar la máxima dosis segura por administrar en humanos, por primera vez, en un estudio perteneciente a fase clínica I generalmente se usan los datos reportados en el laboratorio, como son las dosis administradas, la toxicidad observada y algún otro dato que permita relacionarlos.

También se ha utilizado la modelación farmacocinética, siempre y cuando se cuente con los datos de diferentes especies para construir un modelo farmacocinético válido que permita determinar una dosis recomendada y segura para ser usada en humanos (47, 53).

Considerando que cuando se va a iniciar una fase clínica en humanos por primera vez, para evitar cualquier signo de toxicidad, la elección de la dosis no sólo deberá considerarse en base a los datos de una Fase Clínica I: tolerabilidad terapéutica, perfil farmacocinético y perfil farmacodinámico, sino cuando así sea requerido, sino también todos los datos preclínicos disponibles.

La dosis equivalente humana (DEH) se calcula con base a la extrapolación de la dosis usada en la especie animal a la dosis que se usará en humano, también en mg/kg. La especie que produce la DEH más baja, se dice que es la especie más sensible.

Cuando la DEH se calcula con datos de estudios toxicológicos, se recomienda utilizarla con precaución y seguridad una vez calculada la DEH, basándose en la posibilidad de que los humanos

En el caso del HEPP, la dosis por usar en humanos se calculó con base en los datos preclínicos de farmacocinética, realizados previamente por Gómez y cols(11-13) y fórmula previamente reportadas por Boxenbaum (46):

$$DEH = \text{dosis animal en mg/kg} \times [(\text{peso del animal en kg}/\text{peso humano en kg})]$$

Esta fórmula se encuentran incluida en las guías de la FDA para cálculo de máxima dosis humana (53):

Tabla 7.- Factores de conversión de dosis en animales a dosis equivalentes en humanos

Especie	Para convertir dosis animal a dosis humana en mg/kg	
	Dividir dosis animal por	Multiplicar dosis animal por
Ratón	12.3	0.08
Rata	6.2	0.16
Conejo	3.1	0.32
Perro	1.8	0.54

En el caso del HEPP, las dosis utilizadas en cada especie fueron las siguientes, las cuales sirvieron para el cálculo de la DEH utilizando los factores de la Tabla 7:

Tabla 8.- Dosis utilizadas de HEPP en diferentes especies animales.

Especie	Dosis mg/Kg	Peso (Kg)	DEH (mg/Kg)	DEH (mg/Kg)
Ratón	50	0.025	4.0	
Rata	50	0.25	4.8	
Conejo	15	2.5	8.0	
	30	2.5	9.6	

Considerando estos resultados, la dosis inicial a usar en humanos en el estudio de escalamiento de 250 mg; posteriormente se escalaron las dosis usando 375, 500 y 625 mg.. Una vez determinadas las dosis por utilizar se realizó el estudio clínico bajo los siguientes criterios.

Los criterios de inclusión y exclusión de los estudios fueron los siguientes:

7.1. Criterios de inclusión.

- Voluntarios adultos entre 18 y 55 años de edad.
- Género masculino.
- Estado general de salud física y mental de acuerdo a la historia clínica y exploración física.
- Peso corporal \pm 10% del peso corporal ideal sobre la base del índice de masa corporal.
- Presión arterial y frecuencia cardiaca normales (de pie y supino).
- Pruebas hematológicas (Biometría hemática), química sanguínea, exámenes de orina y de gabinete (electrocardiograma y telerradiografía de tórax) dentro de los rangos normales.
- Transaminasas hepáticas normales.
- Marcadores virales para el virus de la Hepatitis B (HBsAg) y anticuerpos de inmunodeficiencia humana (anti-HIV) negativos. VDRL negativo en suero.
- Carta de consentimiento informado.
- No haber recibido algún medicamento dos semanas antes (2 meses de los medicamentos inductores de enzimas hepáticas) del inicio del estudio

7.2. Criterios de Exclusión.

- Antecedente o presencia de padecimientos cardiovasculares, respiratorios, renales, gastrointestinales, endocrinológicos o neurológicos capaces de alterar la absorción, metabolismo o eliminación de el fármaco y/o que constituyesen

con los requisitos del protocolo. Resultados fuera del rango normal en exámenes de laboratorio hematológicos, bioquímicos y de gabinete realizadas en la fase de selección.

- Sujetos con antecedentes familiares o personales de reacción alérgica o de reacción de hipersensibilidad de cualquier origen.
- Ingesta de fármacos inductores o inhibidores del metabolismo dentro de los 14 días antes de la primera dosis del fármaco en estudio.
- Sujetos que hubieran estado hospitalizados, por cualquier razón, dentro de los 4 semanas previas al estudio.
- Participación en otro protocolo de investigación, donación de sangre o transfusión de sangre significativa en las últimas 12 semanas antes de su inclusión en el presente estudio.

7.3. Estudio de Farmacocinética en dosis única proporcionalidad de dosis.

Este estudio se llevó a cabo con el fin de caracterizar el comportamiento farmacocinético del fármaco

bajo estudio después de administrarlo en dosis única, en condiciones de ayuno.

A los voluntarios se les proporcionó información detallada de las condiciones y procedimientos del estudio, del periodo de toma de muestras sanguíneas y urinarias, así como de los procedimientos que representa la administración de un nuevo fármaco. A cada uno de ellos se les entregó un formulario de consentimiento informado, la cual fue firmada antes de cualquier intervención, en presencia de los investigadores testigos. A los sujetos se les proporcionó un seguro de vida por un año a partir del inicio del estudio.

Los sujetos fueron informados de su participación voluntaria así como del abandono o interrupción de la participación de manera voluntaria o por indicación médica si así fuese requerido.

7.3.1. Voluntarios.

Participaron 6 voluntarios de sexo masculino cuya edad osciló entre 20 y 55 años y con

Una vez que se determinó la dosis por administrar, se diseñó el estudio de manera que los voluntarios participantes tomaran de manera escalada las diferentes dosis de HEPP, ya que el inicio de una dosis pequeña, permitiría no sólo caracterizar la farmacocinética del fármaco, sino también evaluar los efectos secundarios, en caso de que estos se presentaran.

7.3.2. Diseño del Estudio.

El fármaco se administró en cápsulas, las cuales fueron preparadas con dosis de 125 mg y 250 mg de HEPP: las cápsulas contenían únicamente HEPP, es decir, no contenían placebo alguno. La preparación de las cápsulas fue realizada por Armstrong Laboratorios de México S.A. El estudio se realizó de acuerdo a un diseño sencillo de escalamiento, en donde todos los voluntarios recibieron por primera vez la dosis más baja del fármaco, 250 mg, posteriormente recibieron 375 mg de HEPP, en el tercer periodo del estudio recibieron 500 mg de HEPP y la dosis más alta de 625 mg, se administró al final por razones de seguridad. Entre cada fase de administración se realizó un periodo de lavado de 4 semanas.

Para el estudio de farmacocinética la administración se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Para el estudio de farmacocinética con dosis de 250 mg de HEPP, se administró una dosis de 250 mg a cada voluntario.
- Para el estudio de farmacocinética con dosis de 375 mg de HEPP, se administró una dosis de 375 mg a cada voluntario.

7.3.3. Protocolo del Estudio.

Los sujetos participantes en el estudio, estuvieron hospitalizados y bajo vigilancia médica en cada fase del estudio. Los voluntarios se apegaron al siguiente protocolo:

1. Un día antes del inicio del estudio, los sujetos ingresaron al hospital del INNN y permanecieron en él durante la realización de éste bajo estricta supervisión médica.
2. Una vez ingresados en el hospital, se les realizó toma de signos vitales por una enfermera y un equipo. El médico asignado al estudio realizó un interrogatorio y exploración física al momento de ingreso, registrándose estos datos en el expediente clínico del voluntario.
3. A las 20:00 hrs aproximadamente del día de ingreso al hospital, se les sirvió un desayuno estandarizado de 800 kilocalorías (Kcal) y agua a libre demanda iniciando el ayuno a las 22:00 hs.
4. El día de la administración del fármaco, día 1 del estudio, se les colocó a cada uno de los voluntarios, un punzocat intravenoso en la vena antecubital izquierda, utilizando una técnica aséptica para las vías para la toma de muestras sanguíneas y heparina diluida para mantenerlo permeable durante el tiempo del estudio.
5. Antes de la administración del fármaco, aproximadamente 5 minutos, se tomó una muestra sanguínea basal de 10 mL, correspondiente al tiempo 0.
6. Cada dosis del fármaco se administró con 250 mL de agua bajo supervisión del investigador.
7. Después de la administración del fármaco, los sujetos permanecieron sentados en la sala durante la siguiente hora. Posteriormente, se les permitió caminar.
8. Cuatro horas después de la administración del fármaco se les proporcionó un almuerzo que consistió en 2 sandwiches de pollo, 250 ml de jugo de manzana y una rebanada de pan de agua.
9. Después de 4 horas post-dosis, el consumo de líquidos fue ad libitum.
10. Cuatro horas posteriores al almuerzo, se les dió una comida estandarizada: un plato de arroz con pollo y una rebanada de pan de agua.

12. Se tomaron muestras sanguíneas de 5 mL utilizando tubos de cristal a anticoagulante. Los tiempos de muestreo fueron los siguientes: pre-dosis, tiempo 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas después de la administración del fármaco.
13. El plasma se separó por centrifugación y almacenó a -20°C hasta el momento de su análisis.
14. Así mismo se colectó la orina excretada durante 72 horas, en intervalos de 8 horas. De cada intervalo de orina se midió y se almacenó una alícuota de 10 ml de cada intervalo bajo congelación a -20°C .
15. Durante todo el estudio los sujetos fueron supervisados por la coordinadora del estudio y el médico a cargo, de manera continua.
16. Con la toma de la última muestra sanguínea, a las 72 horas post-administración, se tomaron muestras para realizar las pruebas de laboratorio de rutina post-estudio.
17. Antes de la salida de cada voluntario, el médico a cargo les realizó exploración física y valoración clínica.
18. Este procedimiento fue repetido durante la administración de las 4 diferentes dosis utilizadas para el escalamiento de dosis.
19. Durante el estudio a los sujetos no les fue permitido fumar ni ingerir bebidas alcohólicas que contuvieran cafeína, así como ningún medicamento.

7.4. Farmacocinética de HEPP en Dosis Múltiple.

Como parte de los estudios farmacocinéticos que se realizan durante el desarrollo de un fármaco, se realizan estudios de administración del fármaco en dosis múltiple con la finalidad de determinar la acumulación después de administración repetida, así como evaluar la presencia de un proceso de inducción o inhibición metabólica.

7.4.1. Voluntarios.

intervención, firmaron la carta de consentimiento informado. A los sujetos se les realizó una exploración física y toma de signos vitales, electrocardiograma y evaluación neurológica. Se realizaron todas las pruebas de laboratorio. Una vez seleccionados y aceptados como voluntarios para el estudio, a los sujetos incluidos se les proporcionó un seguro de vida por un año a partir del inicio del estudio.

Esta fase del estudio tuvo una duración de 14 días. Durante este periodo, los sujetos fueron valorados diariamente por un Neurólogo Residente a cargo del estudio (exploración física, signos vitales, pruebas neurológicas). Los voluntarios se ajustaron al siguiente protocolo:

7.4.2. Protocolo del estudio.

En la Tabla 9 se muestra el esquema de administración de dosis y de la toma de muestras de sangre durante este estudio.

1. No tomar medicamentos o alcohol por lo menos 1 semana previa al estudio y durante el mismo.
2. Los voluntarios permanecieron en ayuno 12 horas previas al día 1 del estudio, y 12 horas después de la administración del fármaco.
3. El día 1 del estudio, se administró por vía oral 375 mg del fármaco (HEPP) con 240 ml de agua. Cuatro horas después de la administración del fármaco (12:00 pm) se proporcionó una comida que consistió en cocktail de frutas, 2 sandwiches de pollo, un vaso de leche, 250 ml de jugo de manzana y una rebanada de gelatina de agua. Posteriormente, 8 horas después de la administración del fármaco, (16:00 h) se proporcionó una comida estandarizada que consistió en un plato de sopa de verduras cocidas, un plato de arroz, pechuga de pollo asada con verduras cocidas y una manzana o una rebanada de gelatina de agua. Los voluntarios fueron proporcionaron después de la toma de muestra sanguínea correspondiente a ese horario.
4. A cada uno de los voluntarios, se les colocó un catéter (intracath) de calibre 21 gauge en la antecubital izquierda, utilizando una llave de tres vías para la toma repetida de muestras sanguíneas y heparina diluida para mantenerlo permeable durante el tiempo del estudio.

6. Las muestras se colectaron en tubos con anticoagulante previamente etiquetados para el análisis de plasma por centrifugación y se congeló hasta el momento de su análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución.
7. El día 4 del estudio, después de la toma de la muestra sanguínea correspondiente, se inició la administración múltiple del HEPP, administrándose 375 mg del fármaco en dos dosis (8:00 h y 20:00 h) con 240 ml de agua.
8. La dosis matutina, administrada previa al desayuno, fue proporcionada por el médico responsable de la evaluación clínica de los voluntarios. La dosis vespertina se administró de la misma manera. Este esquema de dosificación se mantuvo durante 6 días con la finalidad de alcanzar el estado estacionario.
9. El día 9 del estudio se tomaron 2 muestras de sangre, a las 8:00 h (en ayuno), inmediatamente antes de la siguiente dosis del fármaco y a las 14:00 horas, con la finalidad de verificar el estado estacionario.
10. El día 10 del estudio, los voluntarios recibieron la última dosis del medicamento, 375 mg, a las 8:00 h de la mañana. Los días 10, 11, 12 y 13 se tomaron muestras de sangre durante 72 horas, en los tiempos indicados para los días 1, 2, 3 y 4.
11. Al igual que el día 1 del estudio, las muestras se colectaron en tubos con anticoagulante previamente etiquetados, se separó el plasma por centrifugación y se congeló hasta el momento de su análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución.
12. El día 13 del estudio, con la última muestra sanguínea para análisis de HEPP, se tomaron muestras adicionales de sangre para examen de laboratorio así como muestra de orina.
13. Durante las 48 horas subsecuentes a la toma de la última muestra de sangre, los voluntarios fueron valorados clínicamente.

Tabla 9. Regimen de administración del HEPP y de toma de muestras sanguíneas durante de dosis múltiple en voluntarios sanos.

DIA	DOSIS/HORA	MUESTRAS SANGRE
DIA 1	375 mg 8:00 h	Antes de las 8:00 (blanco). A los 30, 45 minutos; a 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0, horas post-administración.
DIA 2		24.0 y 36.0 horas post-administración
DIA 3		48.0 y 60.0 horas post-administración
DIA 4	375 mg 8:00 am 375 mg 20:00 h	72.0 horas post-administración.
DIA 5	375 mg 8:00 am 375 mg 20:00 h	
DIA 6	375 mg 8:00 am 375 mg 20:00 h	
DIA 7	375 mg 8:00 am 375 mg 20:00 h	
DIA 8	375 mg 8:00 am 375 mg 20:00 h	
DIA 9	375 mg 8:00 am 375 mg 20:00	8:00 a. m. y 14:00 horas.
DIA 10	375 mg 8:00 am	Antes de las 8:00 (blanco). A los 30, 45 minutos; a 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, horas post-administración
DIA 11		8:00 y 14:00 horas
DIA 12		8:00 y 14:00 horas
DIA 13		8:00 am

7.5. Estudio de dosis múltiple en conejo.

Considerando los resultados obtenidos en el estudio de dosis múltiples en humanos, se

7.5.1. Protocolo del estudio.

- En el estudio se utilizaron 12 conejos macho Nueva Zelanda, con un peso promedio de 2.5 kg, los cuales se dividieron al azar en dos grupos: grupo control y grupo HEPP. El protocolo del estudio fue el siguiente:

- DIA 1: Los conejos se mantuvieron en ayuno durante 12 hrs previas al estudio y recibieron agua después de la administración del fármaco. La ingesta de agua fue *ad libitum*. Para la obtención de muestras sanguíneas se colocó un punzocat con llave de 3 vías en la vena marginal de la oreja. A las 8:00 a.m se administró HEPP en ambos grupos a una dosis de 30 mg/kg vía intraperitoneal. Se tomaron muestras sanguíneas de 3 ml de la vena marginal de la oreja, a los siguientes intervalos: 15, 30, 45 min, 1, 2, 3, 5, 8 y 10 hrs.

- Durante 5 días consecutivos se administró HEPP (30 mg/kg IP) cada 24 h al grupo HEPP y bien solución salina al grupo control.

- El día 7 del estudio se administró el fármaco a un menor intervalo de dosificación con la finalidad de alcanzar el estado estacionario: a las 0 (7am), 12h (7pm), 16h (11pm) y 20h (8pm). El grupo control recibió únicamente solución salina.

- El día 8 se administró nuevamente HEPP a ambos grupos y se tomaron muestras sanguíneas para caracterizar el perfil farmacocinético como el día 1 del estudio.

- El plasma se separó por centrifugación y se congeló hasta el momento de su análisis. El método analítico previamente descrito en la sección 7.1.7.

7.6. Análisis Farmacocinético.

7.6.1. Dosis única.

Los principales parámetros farmacocinéticos del HEPP se calcularon de la siguiente manera. La Concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) así como el tiempo máximo ($t_{m\acute{a}x}$, tiempo para alcanzar la concentración máxima) fueron determinados directamente de los perfiles individuales de concentración plasmática versus tiempo. El área bajo la curva (ABC) se calculó hasta el

β = constante de velocidad de eliminación

La depuración plasmática total Cl/F , fue calculada como $Dosis/ABC$; el volumen de distribución V_d se estimó utilizando la siguiente fórmula: $V_d = D / (ABC \times \beta)$.

Los demás parámetros farmacocinéticos se calcularon utilizando el programa de análisis farmacocinético WinNonLin (v3.0).

7.6.2. Linealidad y Proporcionalidad de dosis.

Las concentraciones plasmáticas y los parámetros farmacocinéticos de C_{max} y ABC se normalizaron por dosis.

La proporcionalidad de dosis se corroboró por medio del ajuste de ABC con la dosis por cuadrática, utilizando la ecuación polinomial (55):

$$ABC = a + (b \cdot dosis) + (c \cdot dosis)^2$$

7.6.3. Dosis Múltiple.

Los parámetros farmacocinéticos y el área bajo la curva en estado estacionario ABC_{ee} se calcularon de la misma manera, que en el caso de dosis única, utilizando la regla trapezoidal. La relación de acumulación predicha se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$R_p = \frac{1}{1 - e^{-\beta\tau}}$$

donde β es la constante de velocidad terminal calculada a partir del perfil de concentración plasmática versus tiempo del día 1 y τ es el intervalo de dosis.

R_o , es la relación de acumulación observada y se calculó dividiendo el ABC_{ee} en el día 1 por el ABC extrapolada a infinito del día 1:

$$R_o = \frac{ABC_{\tau ee}}{ABC_{0 \infty \text{ día 1}}}$$

compararon nuevamente por ANOVA y se sometieron a comparación pareada con “Student-Newman-Keuls”.

Se realizó regresión lineal y prueba de t-student para los datos de dosis farmacocinéticos analizando diferencia en intercepto tanto para Cmax como para AUC.

Los resultados obtenidos con la ecuación cuadrática para proporcionalidad de dosis se analizaron con una prueba de *Fisher* para significancia en el intercepto y en los términos cuadráticos.

Los parámetros obtenidos en los estudios de dosis múltiple fueron comparados por prueba de *t-student* cuando fue aplicable así como con la prueba Mann-Whitney de suma de rangos.

Se consideró diferencia significativa cuando $p < 0.05$. (Sigma Stat Corp).

8.0. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1. Validación del Método Analítico.

El método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución utilizado para cuantificar el HEPP fué optimizado y validado de acuerdo a la reglamentación (48-49). El método fue validado tanto en plasma como en orina. Los resultados obtenidos en los parámetros de validación que se evaluaron fueron los siguientes:

8.1.1. Selectividad

En las figuras 6 y 7 se muestran los cromatogramas de una muestra de plasma blanco y una muestra de orina blanco así como los cromatogramas típicos de una muestra plasmática adicionada y una urinaria adicionadas con HEPP y con HEPA (estándar interno). En ellas se puede apreciar que no se presentan interferencias en los tiempos de retención del HEPP ni del HEPA.

8.1.2. Linealidad.

La linealidad se corroboró mediante un análisis de regresión por mínimos cuadrados para obtener las ecuaciones de las tres rectas generadas. En la Tabla 10 se muestran los valores de los parámetros de regresión obtenidos en plasma, para cada una de las rectas. El valor promedio de r fue de 0.9994. (Figura 8). Los valores promedio de linealidad de HEPP en orina se presentan en la Tabla 11, figura 9.

Tabla 10. Regresión lineal del método para la cuantificación de HEPP en plasma.

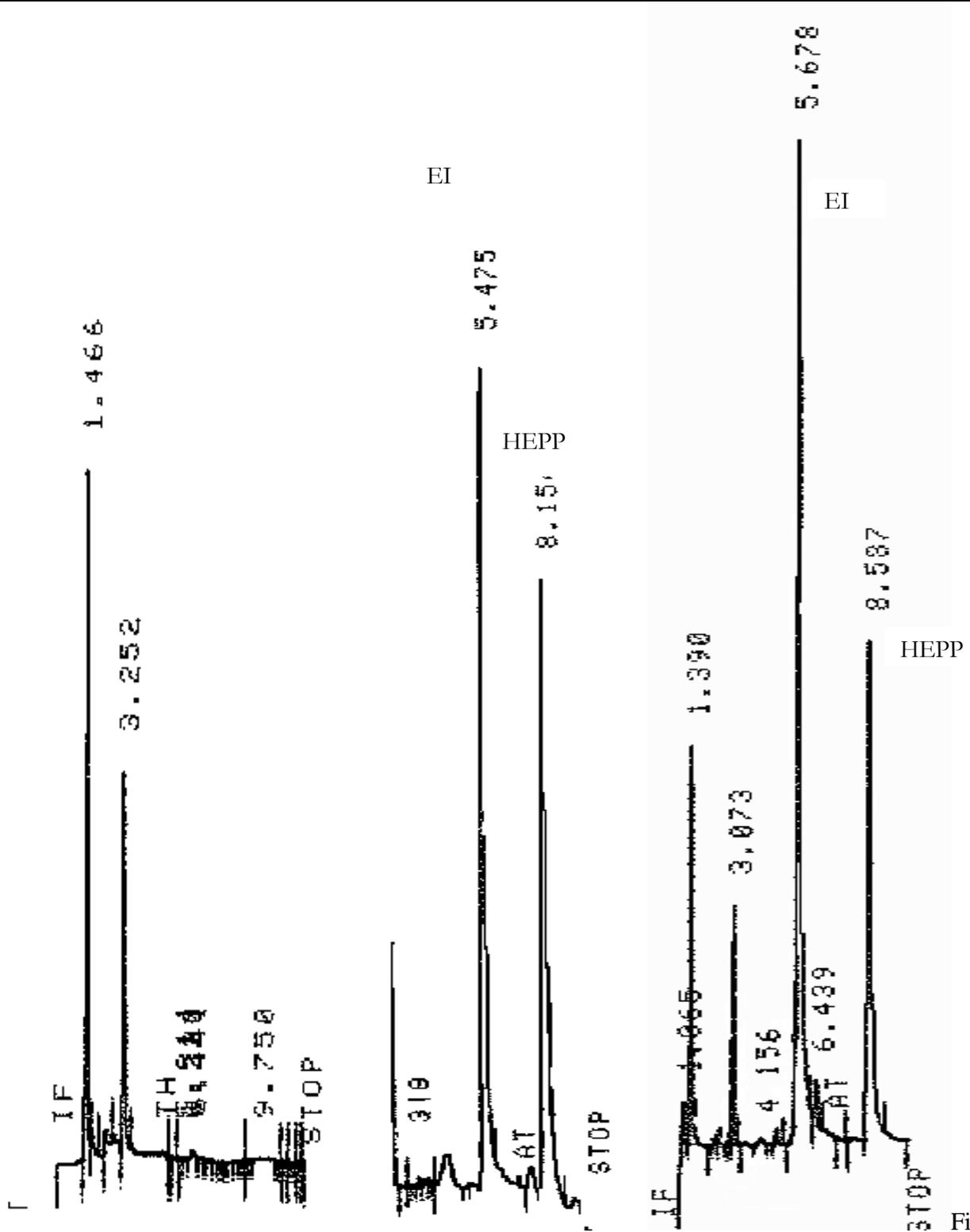
Curva	r	m	b
1	0.9999	0.0563	-0.0190
2	0.9998	0.0522	-0.0246
3	0.9966	0.0551	-0.0786
Promedio	0.9994	0.0546	-0.0407

r = coeficiente de correlación; m=pendiente; b =ordenada al origen.

Tabla 11. Regresión lineal del método para HEPP en orina

Curva	r	m	b
1	0.9958	0.0566	-0.0269
2	0.9999	0.05659	-0.0036
3	0.9993	0.05628	-0.0350
Promedio	0.9996	0.0565	-0.0218

r = coeficiente de correlación m = pendiente ; b = ordenad al origen



Figura

6.- Cromatogramas de una muestra de plasma blanco y dos muestra plasmáticas de voluntarios después de la administración de 500 mg de HEPP por vía oral (conc. HEPP=3.42 µg/ml y 2.38 µg/ml).

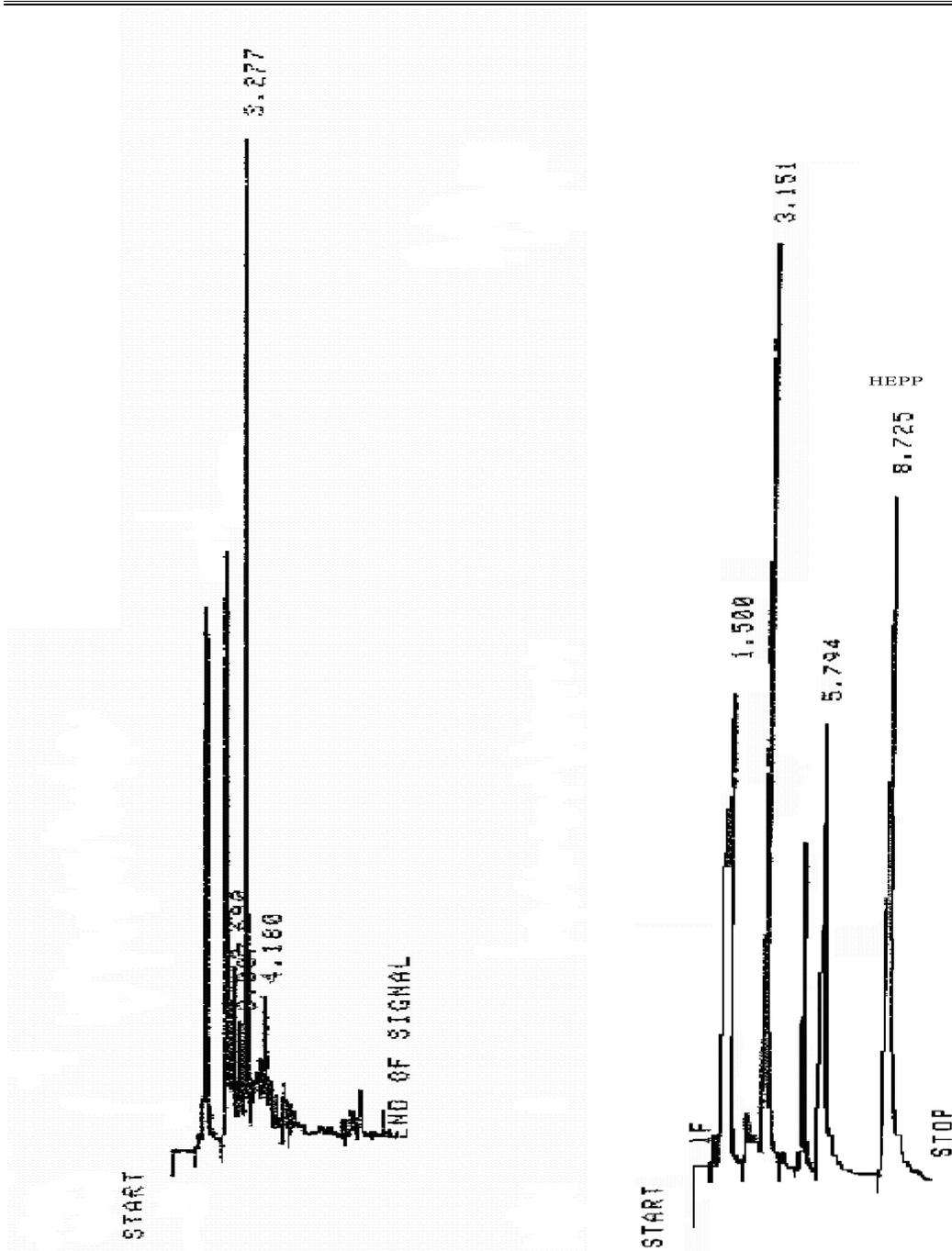


Figura 7. [A] Cromatograma de un blanco de orina. [B] Cromatograma de una muestra urinaria de voluntario después de la administración de una dosis de 625 mg de HEPP [$t_r=8.72$ min] y HEPA [$t_r=5.79$ min].

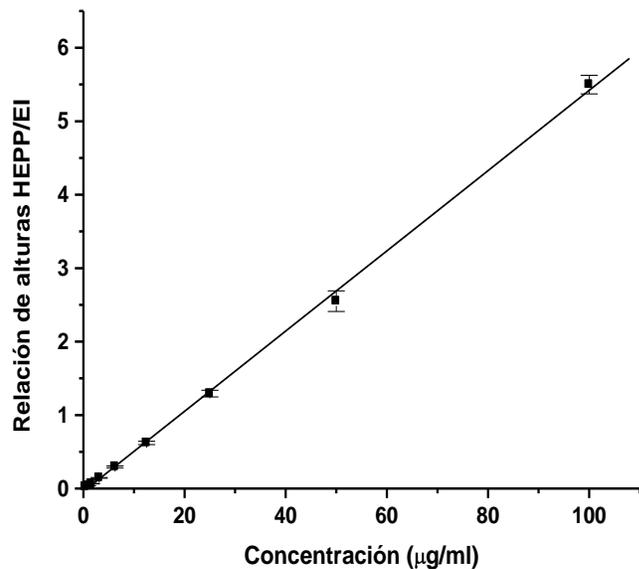


Figura 8.- Linealidad del método analítico para la cuantificación de HEPP en plasma. $r=0.9994$; $m=0.05460$; $b=-0.04077$. Los datos representan la media \pm error estándar.

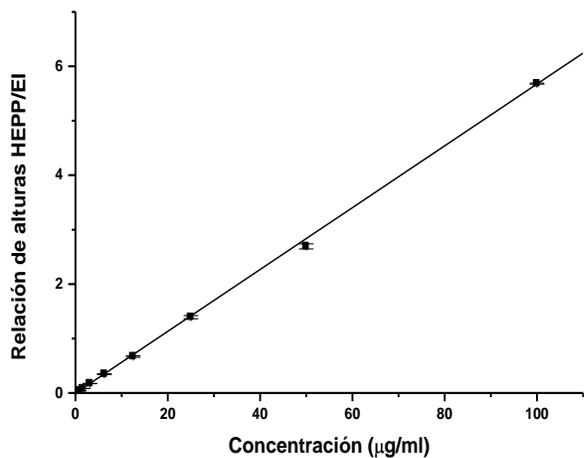


Figura 9- Linealidad del método analítico para la cuantificación de HEPP en orina . $r=0.99969$; $m=0.056$; $b=-0.021$. Los datos representan la media \pm error estandar.

8.1.3. Precisión

8.1.3.1. Repetibilidad Intra-día

En las Tablas 12 y 13 se muestran los resultados de repetibilidad en plasma y orina respectivamente. Se presenta el promedio, la desviación estándar y el % del coeficiente de variación de las determinaciones para los tres niveles de concentración evaluados.

Tabla 12. Repetibilidad intradía del método para HEPP en plasma .

Muestra	Punto bajo (1.56 µg/ml)	Punto medio (6.25 µg/ml)	Punto Alto (25 µg/ml)
1	1.613	6.255	25.098
2	1.563	6.239	26.448
3	1.572	6.297	25.092
4	1.590	6.181	26.766
5	1.556	6.364	25.722
Promedio	1.579	6.243	25.825
D.E.	0.022	0.0483	0.766
C.V.%	1.452	0.773	2.966

D.E.= desviación estandar; C.V.= coeficiente de variación.

Tabla 13. Repetibilidad del método para HEPP en orina.

Muestra	Punto bajo (1.56 µg/ml)	Punto medio (6.25 µg/ml)	Punto Alto (25 µg/ml)
1	1.44	6.22	24.15
2	1.57	6.15	25.74
3	1.42	6.11	25.54
4	1.55	6.43	24.12
5	1.54	6.29	24.55
Promedio	1.50	6.24	24.82
D.E.	0.06	0.12	0.76
C.V.%	4.463	2.02	3.10

D.E.= desviación estandar; C.V.= coeficiente de variación.

8.1.3.2. Repetibilidad Inter-día.

En las Tablas 14 y 15 se presentan los resultados de la repetibilidad inter-día en plasma y en orina. Se muestran los valores promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para los tres niveles de concentración.

Tabla 14. Repetibilidad inter-día del método analítico para HEPP en plasma.

Día	Réplica No-	Punto bajo (1.56 µg/ml)	Punto medio (6.25 µg/ml)	Punto alto (25 µg/ml)
1	1	1.56	6.18	24.71
	2	1.43	6.20	26.57
2	1	1.51	6.18	23.981
	2	1.49	6.26	23.750
3	1	1.51	6.20	26.47
	2	1.54	6.41	25.04
Promedio		1.511	6.24	25.08
D.E.		0.044	0.08	1.20
C.V%		2.92	1.41	4.80

Tabla 15. Repetibilidad inter-día del método para HEPP en orina.

Día	Réplica No-	Punto bajo (1.56 µg/ml)	Punto medio (6.25 µg/ml)	Punto alto (25 µg/ml)
1	1	1.53	6.35	24.36
	2	1.57	6.22	24.09
2	1	1.56	6.30	26.23
	2	1.49	6.08	25.82
3	1	1.50	6.34	25.61
	2	1.53	6.33	23.52
Promedio		1.53	6.27	24.94
D.E.		0.031	0.10	1.091
C.V%		2.04	1.67	4.37

8.1.4. Exactitud

A partir de los datos de reproducibilidad intra- e inter-día se evaluó la exactitud del método. En las Tablas 16 y 17 se muestran los resultados obtenidos y como se puede observar, en ambos fluidos, para los tres niveles de concentración evaluados, la diferencia del promedio de concentraciones con respecto a la concentración nominal del HEPP no es mayor del 15 %.

Tabla 16. Exactitud del método para HEPP en plasma.

	% Desviación absoluta promedio		
	Punto bajo	Punto medio	Punto alto
Intra día	1.23	0.10	3.30
Inter día	3.11	0.14	0.35

Tabla 17. Exactitud del método para HEPP en orina.

	% Desviación absoluta promedio		
	Punto bajo	Punto medio	Punto alto
Intra día	3.35	0.12	0.70
Inter día	1.57	0.40	0.22

8.1.5. Recobro Absoluto

Los resultados de recuperación absoluta del HEPP en plasma y en orina se presentan en la Tabla 18. Los datos muestran que el promedio del porcentaje de recobro para HEPP en plasma es 99% y de 96.31% en orina. También se puede observar que el porcentaje de recobro absoluto para HEPP no varía ± 15 % del

promedio en todos los niveles.

Tabla 18. Recuperación absoluta del método para HEPP en plasma y en orina

	Puntos control en plasma			Puntos control en orina		
	1.56 µg/ml	6.25 µg/ml	25 µg/ml	1.56 µg/ml	6.25 µg/ml	25 µg/ml
	95.13	100.05	98.63	94.8	98.09	94.54
	96.56	101.83	100.69	94.14	98.73	95.75
	95.35	102.51	98.86	96.67	98.33	94.24
Promedio	95.68	101.46	99.39	95.20	98.38	94.84
D.E.	0.77	1.27	1.12	1.31	0.323	0.799
C.V%	0.8047	1.252	1.135	1.78	0.328	0.842
% de recobro promedio			98.845			96.14

8.1.6. Límite de cuantificación y Límite de detección.

El límite de cuantificación obtenido fue de 0.5 µg/ml y el límite al cual se detectó la señal del HEPP por encima de la señal de ruido fue de 0.37 µg/ml , mismos que se muestran en la figura 10.

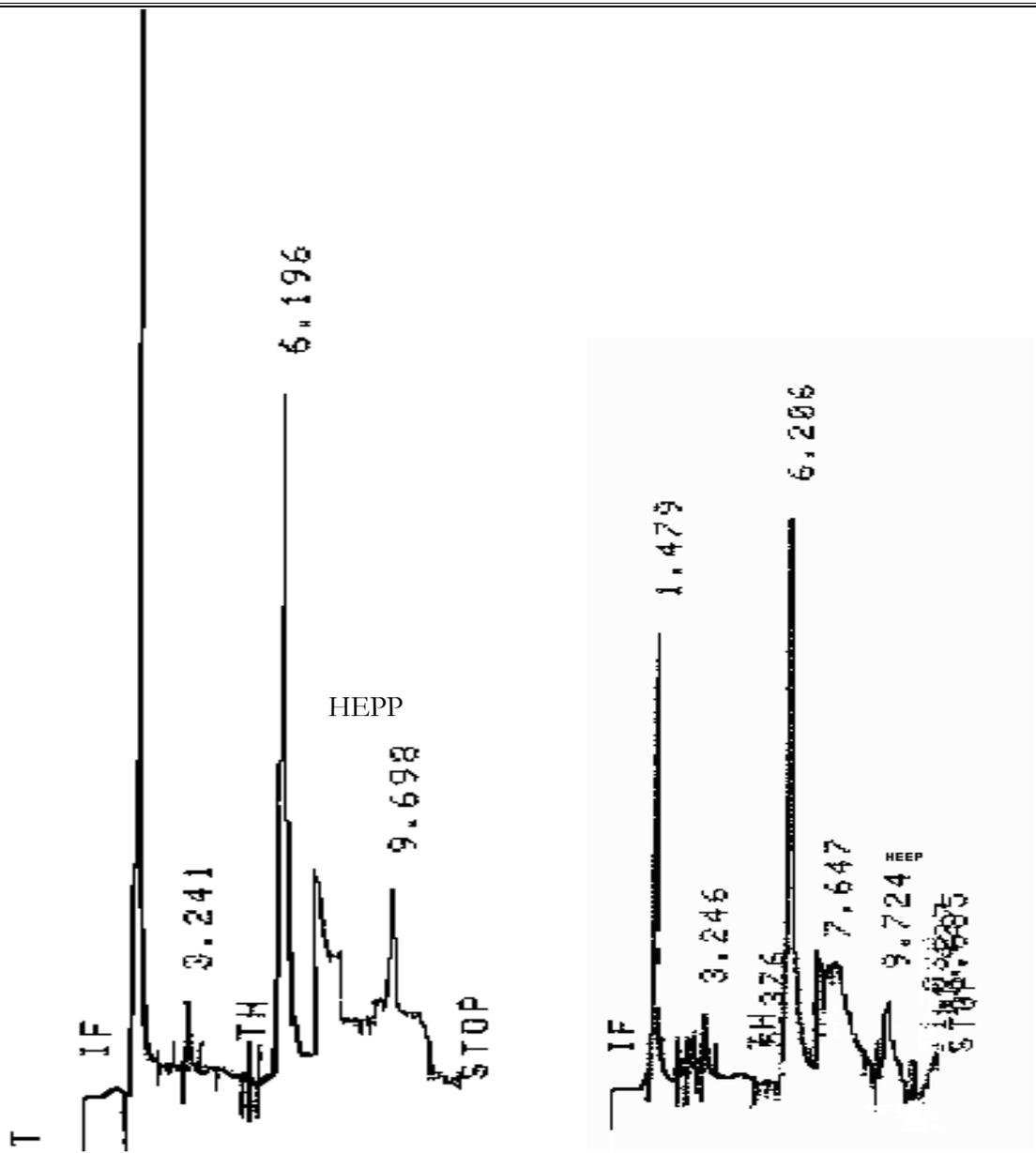


Figura 10- Cromatogramas representativos de la determinación del límite de cuantificación y límite de detección del HEPP en plasma.

8.2. Estudio dosis única.

Con el fin de continuar con la evaluación farmacológica del HEPP, se llevaron a cabo los estudios de dosis única en un grupo de 6 voluntarios sanos, cuyo objetivo fue caracterizar la farmacocinética del HEPP después de la administración de dosis única, así como evaluar la proporcionalidad de 4 dosis escaladas en voluntarios sanos.

En la Tabla 19 se muestran las características individuales de los sujetos participantes.

Tabla 19. Características demográficas de los voluntarios participantes en el estudio de escalamiento de dosis de HEPP.

VOLUNTARIO	EDAD	PESO	ESTATURA
	Años	Kg	cm
1	20	69	174
2	20	52.7	173
3	25	52	175
4	23	67	166
5	35	66	161
6	21	63.5	171
Promedio	24.	61.7	170
D.E.	5.72	7.459	5.44

Los resultados obtenidos en el estudio mostraron que el HEPP presenta una amplia variación intra- e interindividual en los niveles plasmáticos, con todas las dosis administradas. La fig. 11 muestra los perfiles de concentración plasmática promedio de HEPP después de la administración oral de dosis únicas de 250 mg, 375 mg, 500 mg y 625 mg. El HEPP fue absorbido relativamente rápido con todas las dosis administradas. El perfil farmacocinético de las concentraciones plasmáticas versus tiempo mostró un patrón de decaimiento biexponencial. Los perfiles individuales para cada dosis se muestran en el

apéndice E. En algunos sujetos también se observó un segundo pico entre las 6 y las 8 horas post-administración.

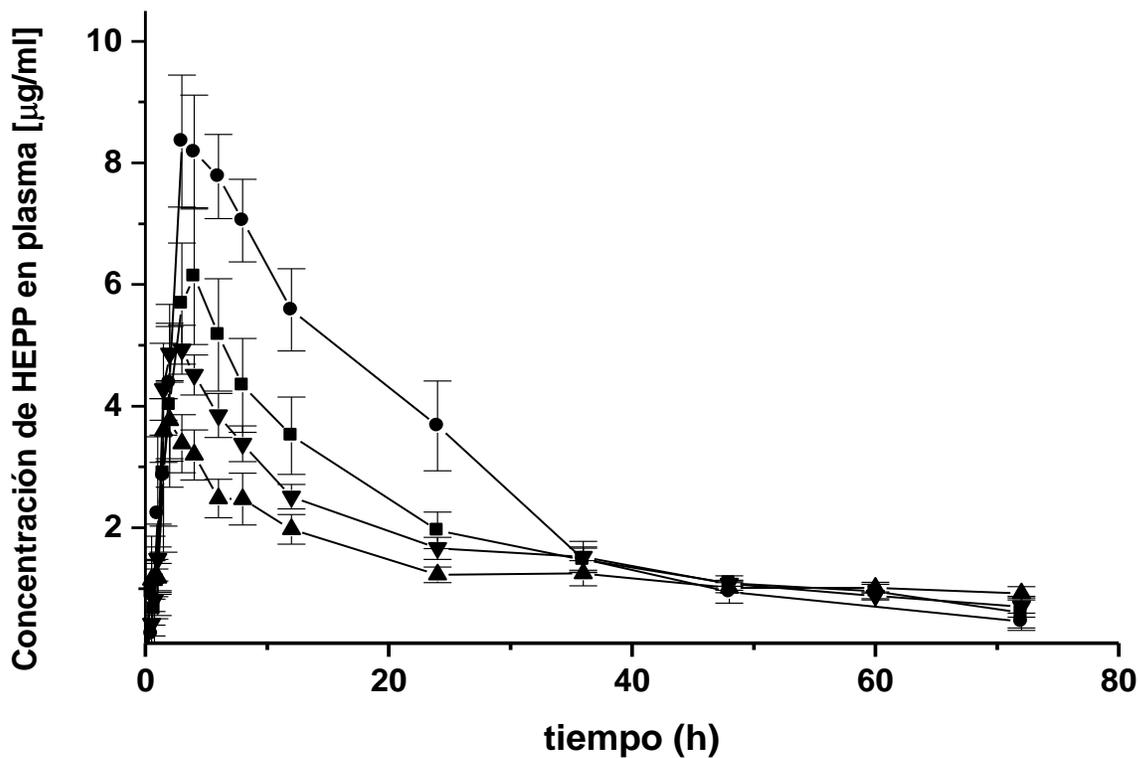


Figura 11. A, Perfiles de concentración plasmática promedio de HEPP después de la administración oral de dosis únicas de 250 (▲), 375 (▼), 500 (●) y 625 (■) mg en sujetos sanos voluntarios.(n=6).

La Tabla 20 muestra las concentraciones plasmáticas promedio obtenidas con las 4 dosis administradas. Sin importar la dosis, el HEPP se absorbió rápidamente alcanzando concentraciones máximas entre las 2 y 6 horas.

Tabla 20.- Concentraciones plasmáticas promedio (DE) del HEPP obtenidas después de la administración oral de 250, 375, 500 y 625 mg en 6 voluntarios sanos.

CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA (µg /mL)									
TIEMPO	DOSIS 250 mg		DOSIS 375 mg		DOSIS 500 mg		DOSIS 625 mg		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	
0.5	1.14	(0.774)	0.41	(0.4918)	0.25	(0.35)	0.92	(2.07)	
0.75	1.17	(0.756)	0.81	(0.7609)	-	-	0.66	(1.47)	
1.0	1.17	(0.583)	1.48	(1.4202)	2.22	(3.10)	1.12	(1.25)	
1.5	3.59	(1.284)	4.27	(1.8517)	2.85	(3.09)	2.89	(1.94)	
2.0	3.76	(1.542)	4.86	(1.0915)	4.38	(3.15)	4.01	(3.01)	
3.0	3.38	(1.172)	4.92	(0.9902)	8.35	(2.65)	5.68	(2.23)	
4.0	3.19	(1.008)	4.51	(0.8110)	8.17	(2.29)	6.13	(2.51)	
6.0	2.48	(0.772)	3.84	(0.8903)	7.77	(1.69)	5.16	(2.06)	
8.0	2.46	(1.042)	3.38	(0.7263)	7.05	(1.66)	4.33	(1.7235)	
12	1.97	(0.596)	2.50	(0.4899)	5.58	(1.65)	3.51	(1.42)	
24	1.22	(0.316)	1.66	(0.4433)	3.67	(1.81)	1.95	(0.67)	
36	1.24	(0.513)	1.51	(0.6253)	1.48	(0.44)	1.47	(0.46)	
48	1.01	(0.199)	1.07	(0.1057)	0.96	(0.46)	1.08	(0.26)	
60	1.01	(0.21)	0.87	(0.16)	0.45	(0.34)	0.952	(0.26)	
72	0.92	(0.25)	0.7	(0.41)	2.22	-	0.6	(0.42)	

Valores promedio ± DE

La Tabla 21 muestra los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos después de administrar las 4 dosis escaladas. La vida media de eliminación también mostró una gran variabilidad interindividual y sus valores oscilaron entre 13 y 45 horas con las cuatro dosis administradas. Sin embargo, al comparar los valores obtenidos con las dosis administradas, por medio de análisis de varianza, no se encontraron diferencias significativas entre ellas. La media armónica obtenida fue de 22.80 ± 5.0 h.

Los valores de C_{max} aumentaron proporcionalmente con las dosis de 250, 375 y 500 mg, obteniéndose valores promedio de 3.76 $\mu\text{g/ml}$, 4.92 $\mu\text{g/ml}$ y 8.35 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Con la dosis de 625 mg, el valor de C_{max} obtenido disminuyó a 6.13 $\mu\text{g/ml}$, valor menor que el obtenido con la dosis de 500 mg. Al igual que con el C_{max} , los valores de área bajo la curva, $ABC_{0-\infty}$ aumentaron proporcionalmente con las dosis de 250, 375 y 500 mg, pero no con la dosis mayor de 625 mg ($p=0.0822$).

Al comparar los valores de C_{max} y ABC obtenidos con la dosis de 500 mg y los obtenidos con la dosis de 625 mg, no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos ($p<0.05$), por lo que con la finalidad de corroborar la no proporcionalidad con la mayor dosis administrada, los parámetros de C_{max} y ABC fueron normalizados por dosis ($ABC/Dosis$, C_{max}/D) y nuevamente fueron comparados utilizando para ello análisis de varianza y prueba de Student-Newman-Keuls. No se encontraron diferencias significativas entre los parámetros con las dosis de 250, 375 y 500 mg para el $ABC_{0-\infty}/Dosis$ ($p=0.079$) así como tampoco para el parámetro de $C_{max}/Dosis$ ($p=0.2726$); sin embargo, al comparar los parámetros de la dosis de 500 mg con los parámetros normalizados de la dosis de 625mg si hubo diferencias significativas, indicando no proporcionalidad de dosis. La Tabla 22 muestra los valores obtenidos de C_{max} y ABC después de normalizarlos por dosis.

Tabla 21. Parámetros farmacocinéticos del HEPP obtenidos después de la administración oral de 250, 375, 500 y 625 mg en sujetos sanos voluntarios.

<i>Dosis</i> (mg)	<i>t_{max}</i> (h)	<i>C_{max}</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>t_{1/2}</i> (h)	<i>ABC_{0-\infty}</i> ($\mu\text{g/mL h}$)	<i>Cl/F</i> (mL/min/kg)	<i>Vd/F</i> (L/Kg)
250	2.0	3.76 (1.54)	23.16 (16.6)	136.45 (30.84)	0.550 (0.15)	1.12 (0.39)
375	3.0	4.92 (0.99)	24.58 (12.64)	157.85 (11.91)	0.643 (0.08)	1.55 (0.55)
500	3.0	8.35 (2.65)	15.83 (8.24)	206.7 (64.65)	0.990 (0.23)	0.99 (0.23)
625	4.0	6.13 (2.51)	27.62 (3.99)	198.93 (40.84)	0.853 (0.25)	2.26 (1.12)

Los valores son promedio con (desviación estándar). t_{\max} , tiempo para alcanzar concentración máxima; C_{\max} , concentración máxima en plasma, $t_{1/2}$, vida media, ABC, área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo; Cl, depuración plasmática; Vd, volumen de distribución.

Tabla 22. Parámetros farmacocinéticos promedio de HEPP, en voluntarios sanos, normalizados por la dosis, después de administración de 4 dosis escaladas en voluntarios sanos.

<i>Dosis</i>	<i>C_{max}/dosis</i>	<i>ABCo-∞/dosis</i>
(mg)	(mcg/mL)/mg	(mcg·mL ⁻¹ h)/mg
250	0.0182 (0.0049)	0.545 (0.12)
375	0.0149 (0.0033)	0.420 (0.031)
500	0.0185 (0.00405)	0.413 (0.129)
625	0.0120 (0.0028)	0.3182 (0.065)

Media (desviación estandar)

La figura 12 muestra la relación de la dosis administrada (250, 375 y 500 mg) con los valores de C_{máx} y ABC_{0-∞}. Al realizar análisis de linealidad, la prueba de “t-student” no mostró diferencias significativas para el intercepto en C_{max} (p=0.6861) así como tampoco en ABC_{0-∞} (p=0.1148).

Así mismo, después de aplicar una prueba de “Fisher”, se obtuvieron valores de p (p>0.05) altamente significativos para la relación dosis-efecto lineal.

Con la finalidad de corroborar la proporcionalidad de dosis en el rango de dosis de 250 a 500 mg se realizó una regresión cuadrática del ABC respecto a la dosis, ajustando a la ecuación de un polinomio, utilizando la siguiente ecuación:

$$ABC = a + b (\text{dosis}) + c (\text{dosis})^2$$

Para poder concluir proporcionalidad de dosis, los parámetros obtenidos en la ecuación, con cada dosis evaluada, fueron analizados estadísticamente sobre el intercepto y sobre el término cuadrático con la finalidad de no encontrar diferencia significativa (52). La ecuación fue aplicada en el rango de dosis de 250 a 500 mg y no se encontraron diferencias significativas para los

términos a , b y c . De la misma manera, una prueba de F mostró un valor p no significativo para el modelo.

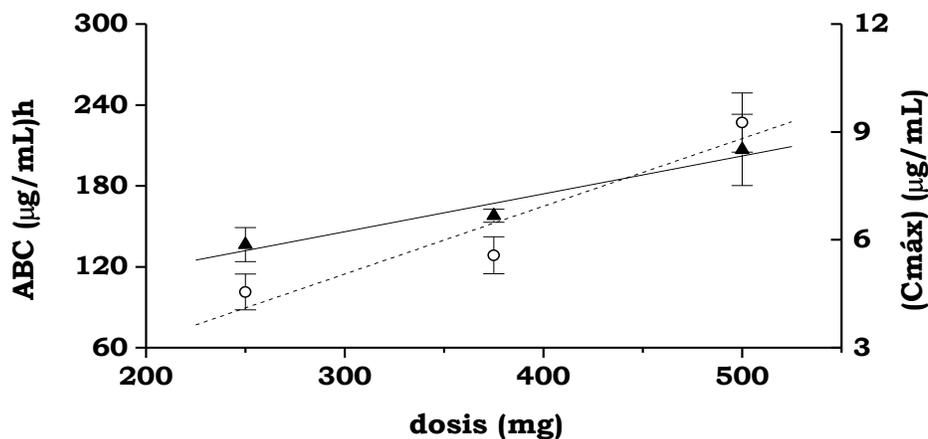
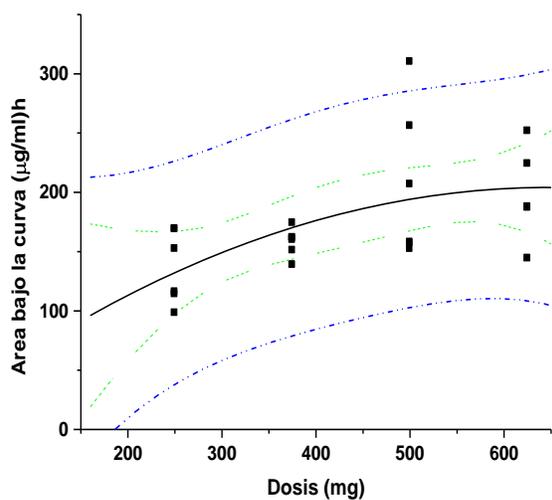


Figura 12.- Valores promedio (\pm ES) de $ABC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\text{ h}$) (\blacktriangle) y C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)(\circ) del HEPP después de la administración oral de 250, 375 y 500 mg en sujetos sanos voluntarios, como función de la dosis. ($y=0.28x + 61.64$; $r^2=0.95$ para ABC; $y=0.01884x - 0.605$; $r^2=0.90$ para C_{max}).

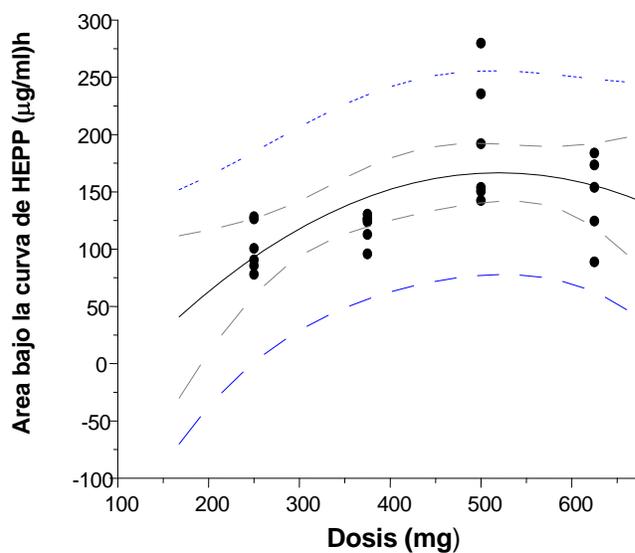
Estos resultados puede observarse en la Tabla 23 que muestra la proporcionalidad de dosis con la administración de las 3 dosis iniciales de HEPP, es decir, 250 mg, 375 mg y 500 mg, corroborando que en este rango de dosis la farmacocinética del HEPP presenta un proceso lineal de absorción y eliminación, figura 13.

Tabla 23.- Ajuste polinomial de ABC con respecto a la dosis administrada de HEPP

Parámetro	Valor	Error	Valor de t	Probabilidad >t
A	221.84503	184.605	1.201	0.2494
B1	-0.5916	1.0339	-0.5722	0.5762
B2	.00112	0.00136	0.822	0.4244
R2	0.3329			



A



B

Figura 13.- Ajuste polinomial de 2° grado entre las cuatro dosis de HEPP administradas y el área bajo la curva: ajuste polinomial (—); límites de confianza al 95% (- - - - -); límites de predicción al 95% (-.-.-.-.). A= ajuste con 3 dosis: 250, 375 y 500 mg. B.-Ajuste con 4 dosis 250, 375, 500 y 625 mg.

La no-proporcionalidad observada después de la administración de la dosis de 625 mg se puede atribuir a cambios en la fracción de dosis (F) absorbida de HEPP debido a un proceso saturable en la absorción. Una posible explicación sería que la dosis de 625 mg se administró de manera dividida en 3 cápsulas, dos de 250 mg y una de 125 mg lo cual podría causar un proceso de dosis dependencia en la absorción. Considerando que el HEPP tiene baja solubilidad acuosa, su disolución es un proceso que puede limitar la liberación del fármaco, produciendo el proceso de dosis-dependencia en la absorción. Es bien sabido que cuando hay una solución saturada del fármaco en el sitio de absorción, la velocidad de absorción es constante por lo que la cantidad de fármaco absorbida no es proporcional a la dosis administrada.

8.2.1. HEPP excretado en orina.

El volumen de orina recolectado de cada uno de los sujetos voluntarios, fue medido en intervalos de 8 horas. La Tabla 24 muestra los volúmenes obtenidos así como el valor de pH medido.

Las alícuotas de orina fueron analizadas de la misma manera que las muestras plasmáticas, utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución. La concentración obtenida en las muestras, se relacionó al volumen de orina total excretado, con la finalidad de obtener la cantidad total de HEPP excretado en orina

Cantidad HEPP excretado= (Concentración HEPP alícuota) (Volumen total de orina excretada)

Tabla 24.-Cantidad de HEPP inalterado (mg) excretado en orina durante 72 horas

Voluntario	Cantidad de HEPP (mg)				pH
	Dosis				
	250 mg	375mg	500 mg	625 mg	
VOL 1	11.57	16.14	12.81	14.81	5.9
VOL 2	16.18	24.93	24.05	-	7.11
VOL 3	18.02	21.49	15.23	30.84	6.42
VOL 4	5.44	26.81	21.57	28.57	6.71
VOL 5	9.46	12.03	18.66	29.78	5.22
VOL 6	5.82	14.39	12.34	32.53	5.87

Como puede observarse, en la Tabla 25, después de analizar las muestras urinarias los resultados muestran que la cantidad de HEPP inalterado excretado en orina durante 72 horas, intervalo en que fue recolectada la orina y analizada oscila en el rango de 5.4 a 30.84 mg. La Tabla 25 muestra que de acuerdo a la dosis administrada, el porcentaje osciló entre 2.1 y 7.2 %, obteniendo un promedio de 4.35%, lo que nos indicaría que el HEPP es metabolizado casi en su totalidad. De acuerdo al volumen excretado en intervalos de 24 horas, se observó que el 60% de la dosis se excreta durante las primeras 24 horas; el 30 % en el intervalo de 24 a 48 horas y en el período de 48 a 72 horas el porcentaje de fármaco excretado fue del 15%.

Tabla 25. Porcentaje excretado de HEPP en orina durante 72 horas en voluntarios sanos.

Voluntario	Porcentaje de la dosis de HEPP excretado			
	Dosis administrada			
	250 mg	375 mg	500 mg	625 mg
VOL 1	4.628	4.304	2.562	2.37
VOL 2	6.472	6.649	4.81	--
VOL 3	7.2096	5.732	3.046	4.935
VOL 4	2.177	7.1503	4.315	4.571
VOL 5	3.7844	3.208	3.732	4.765
VOL 6	2.329	3.838	2.469	5.205
Promedio	4.443	5.146	3.489	4.369

8.2.2. Evaluación clínica.

Considerando que era la primera vez que el HEPP se administraba en humanos, los voluntarios estuvieron hospitalizados y bajo supervisión médica durante cada fase del estudio. Los voluntarios fueron revisados periódicamente, se tomaron sus signos vitales y se sometieron a diferentes pruebas neurológicas. Con la administración de las dosis de 250, 375 y 500 mg de HEPP no se observó ningún signo que indicara posibles efectos adversos debido al fármaco, sin embargo, con la dosis de 625 mg, es decir, la dosis más alta administrada, en todos los voluntarios se observó ligera somnolencia entre las 4 y 6 horas después de la administración del fármaco.

8.3. Estudio dosis múltiple

Con la finalidad de caracterizar la farmacocinética del HEPP después de su administración en dosis múltiple y considerando que los estudios previos de escalamiento entre especies (15) mostraron que el conejo es una especie en la que se encontró similitud farmacocinética del HEPP. El estudio se llevó a cabo en 2 fases: un estudio clínico en humanos y otro estudio en conejos.

8.3.1. Estudio en sujetos sanos.

Considerando los resultados obtenidos en el estudio de escalamiento de dosis, en donde se encontró linealidad de dosis en el rango de 250 a 500 mg, se consideró que la dosis intermedia dentro de este intervalo era la más adecuada para administrar de manera repetida, no sólo por estar dentro del rango lineal sino también por seguridad. Los 10 sujetos que fueron incluidos en el protocolo de dosis múltiple finalizaron el estudio. Las características demográficas de éstos se muestran en la Tabla 26. El rango de edad osciló entre 25 y 33 años y el peso promedio fue de 71.72 Kg.

Al igual que en los estudios previos de administración de dosis única, el HEPP fue bien tolerado por los voluntarios, reportándose cansancio en el 30 % de los voluntarios.

Tabla 26.- Datos demográficos de los voluntarios participantes en el estudio de dosis múltiple.

# Voluntario	Edad	Peso (Kg.)	Estatura (cm.)
1	30	65.0	1.72
2	26	68.5	1.75
3	30	53.0	1.67
4	32	77.5	1.70
5	29	81.0	1.74
6	27	83.0	1.79
7	28	68.0	1.68
8	33	77.0	1.71
9	32	80.0	1.74
10	25	64.2	1.70
Promedio	29.2	71.7	1.72

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos después de la administración del HEPP en dosis múltiple, se presentan en la Tabla 27. Después de la primera dosis de 375 mg, el HEPP mostró un tiempo de vida media de absorción de 0.527 ± 0.20 h. Los valores de $C_{m\acute{a}x}$ obtenidos mostraron amplia variabilidad interindividual y oscilaron de 4.21 a 15.8 $\mu\text{g/ml}$ para la primera dosis y de 8.75 a 26.5 $\mu\text{g/ml}$ después de la administración múltiple. El valor de $t_{m\acute{a}x}$ parece ser independiente del número de dosis administradas, ya que después de la dosis inicial los valores se encontraron dentro del rango de 0.91 a 5.2 h y después de la administración repetida, los valores observados fueron de 0.5 a 3 h.

Tabla 27. Parámetros farmacocinéticos de HEPP en humanos después de la administración oral de 375 mg y después de la última dosis (durante el intervalo) de un régimen de 375 mg b.i.d. /7 días.

HEPP	t _{max} (h)	C _{max} (μg/mL)	t _{1/2} (h)*	ABC (μg/mL h)	Cl/F L/h	Vd/F (L/kg)	Relación de acumulación Ro (observada)	Relación de acumulación Rp (predicha) ^d
Dosis única inicial	2.25 (1.19)	8.40 (3.58)	18.78 (6.64)	168.76 (63.26)	2.71 (1.0)	69.60 (25.12)		
				<i>A</i>				
Dosis múltiple final	1.48 (0.85)	13.64 (5.56) *	13.43 (4.0511) *	100.47 (34.03) <i>b</i> *	4.09 (1.27)	78.96 (8.751)	0.60 (0.2497)	2.82 (0.787)

Valores media con (S.D.). t_{max}, tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima; C_{max} concentración plasmática máxima. t_{1/2}, vida media de eliminación; ABC, área bajo la curva de concentración plasmática vs tiempo: *a*= ABC desde cero hasta infinito; *b*=AUC durante el intervalo; C/F depuración; Vd, volumen de distribución; Ro= ABCintervalo/ABC0-∞ día 1; Rp=1/1-e^{-βτ}.

Diferencia significativa a P<0.05.

Analizando los valores de C_{max} , claramente se puede observar la diferencia entre ambos tratamientos, es decir dosis única y dosis múltiple por lo que con la finalidad de corroborar la no proporcionalidad observada, los valores de C_{max} se relacionaron al área bajo la curva, C_{max}/ABC , encontrando diferencias significativas entre ambos tratamientos. Los valores promedio fueron $0.05377 \pm 0.016 \text{ h}^{-1}$ para la primera dosis y de $0.136 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ para la administración múltiple ($p < 0.001$). De la misma manera se encontraron diferencias al comparar los valores de ABC ($p = 0.005$). En la misma Tabla 27 se puede observar que los valores de depuración, Cl/F , aumentaron después de la administración múltiple, sin embargo los valores de volumen de distribución, Vd/F no se vieron alterados. Estas diferencias en depuración podrían explicarse por diferencias en la fase de eliminación. Los resultados mostraron que el valor promedio de tiempo de vida media de eliminación después de la primera dosis fue mayor con respecto al valor observado después de la administración múltiple, $18.78 \pm 6.64 \text{ h}$ versus $13.43 \pm 4.05 \text{ h}$. Dichas diferencias fueron estadísticamente significativas.

Considerando estas diferencias se realizó el cálculo del Factor de acumulación, el cual relaciona los valores de ABC obtenidos con los 2 regímenes y éste se comparó con el factor de acumulación predicho, encontrándose diferencias significativas ya que el valor observado fue 78% menor que lo predicho.

La Figura 14 muestra los perfiles de concentración de ambos tratamientos, dosis única y dosis múltiple.

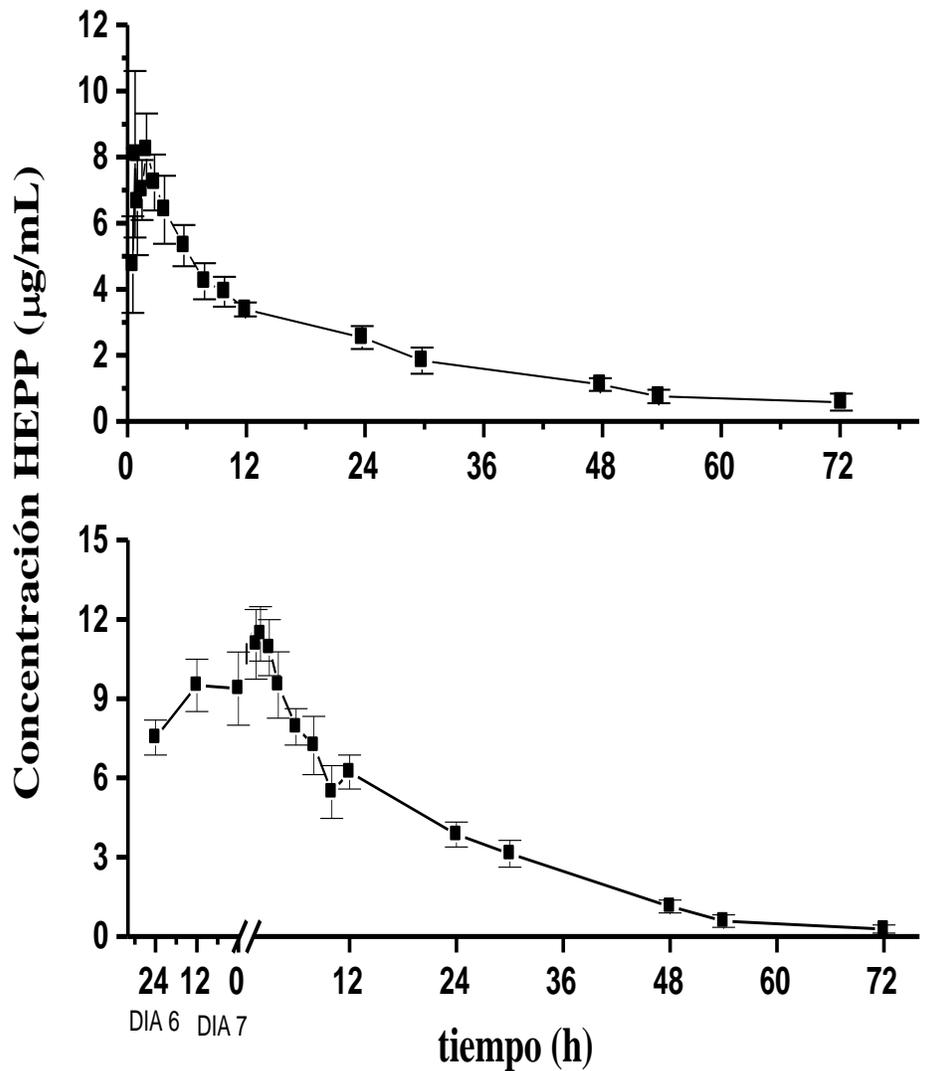


Fig 14.- Perfiles de concentración plasmática promedio de HEPP después de la administración de la primera (■) y la última dosis (■) de una administración múltiple en sujetos sanos.

Tomando en cuenta que se realizaron 2 determinaciones del fármaco en estado estacionario es decir, concentración mínima en estado estacionario, $C_{min_{ee}}$, (Tabla 28), se realizaron simulaciones con la finalidad de determinar la C_{min} esperada. Los resultados mostraron que el valor observado fue menor que el predicho, $8.37 \pm 4.38 \mu\text{g/ml}$ vs $27.84 \pm 16.25 \mu\text{g/ml}$, Esta diferencia concuerda con la diferencia observada en el factor de acumulación, corroborando la hipótesis de un proceso dependiente del tiempo en la farmacocinética del HEPP después de administración repetida. Se observó que después de la administración múltiple en humanos, el valor de ABC disminuyó en un 40.5%, mientras que el valor de Cl/F aumentó en 50.92%, resultados que sugieren un proceso de auto-inducción.

Este tipo de efecto, obtenido con la administración repetida del HEPP, en donde se observa disminución en las concentraciones al estado estacionario después de administración repetida indica que, o bien disminuye la biodisponibilidad oral o la depuración aumenta con el tiempo. La CBZ, antiepiléptico ampliamente estudiado, muestra un comportamiento similar en su disposición, en animales y en humanos. Los estudios realizados con CBZ mostraron que su farmacocinética presenta dependencia con el tiempo, la cual es atribuida al aumento de su depuración. Aunado a esto, se demostró que la autoinducción de la CBZ es dosis y concentración dependiente, ya que en los estudios realizados tanto en ratas (47) como en sujetos sanos voluntarios, la vida media de eliminación de la CBZ (48) disminuye después de administración repetida. Los estudios posteriores en pacientes corroboraron estos resultados.

De acuerdo a estos antecedentes, es probable que el proceso de autoinducción del HEPP sea mayor en pacientes y desde el punto de vista clínico, las consecuencias terapéuticas son de gran importancia, ya que los ajustes de regimenes de dosificación deben individualizarse.

Existen otros factores que pueden causar procesos de cinética tiempo-dependiente; por ejemplo, variaciones diurnas en la función renal, pH urinario, la concentración de alfa 1-glicoproteína ácida, fisiología gastrointestinal (comida y bebida) y gasto cardiaco. Sin embargo, la mayoría de ellos se han detectado después del uso crónico del fármaco. A pesar de estas desventajas cinéticas, el uso de la carbamazepina no se ha limitado, por el contrario es uno de los antiepilépticos de mayor uso en la clínica.

Tabla 28.- Concentraciones observadas y predicciones en estado estacionario después de la administración oral múltiple de 375 mg de HEPP b.i.d. durante 7 días en voluntarios sanos.

# VOL	C _{max} observado	C _{max} ee predicho	C _{min} ee observado	C _{min} ee observado	C _{min} ee predicho
	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
	Día	Día 6	día 6	día 7	Día 7
1	26.51	15.63	11.04	11.06	7.82
2	18.19	27.54	6.13	13.05	17.33
3	16.47	16.96	9.58	16.01	10.18
4	14.24	11.11	7.89	8.38	6.43
5	8.75	16.59	4.99	3.20	8.97
6	10.00	11.38	8.27	7.25	7.54
7	8.92	11.42	5.43	4.76	6.22
8	11.01	15.24	5.82	6.29	7.82
9	9.98	13.95	6.33	8.33	11.07
10	12.9	24.21	9.83	15.41	18.10
Media	13.64	16.40	7.53	9.37	10.15
D.E.	5.56	5.49	2.10	4.38	4.26

8.3.2. Estudio en conejos.

La figura 15 muestra los perfiles farmacocinéticos del HEPP después de su administración en dosis única (primera dosis) y múltiple (última dosis) en conejos. Después de la primera dosis, la vida media de absorción fue de 0.362 ± 0.566 h. En la mayoría de los animales el t_{max} ocurrió entre 0.5 y 1.0 hora y la vida media de eliminación fue de 1.5 h (Tabla 29). La administración de dosis múltiples de HEPP durante 6 días consecutivos produjo resultados similares a los encontrados en humanos, el ABC disminuyó en un 25.6 % y el valor de CI/F aumentó en un 48.91%. Al igual que en humanos se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en los valores de ABC, CI/F y $t_{1/2}$ de eliminación en contraste con ningún cambio en el valor de V_d/F , 2.40 vs 2.41L. Al calcular el factor de acumulación, también se encontró que la relación observada fue menor que la predicha ($p < 0.05$).

Como se muestra en la Tabla 29, a pesar de que la tendencia de cambios en los parámetros farmacocinéticos en conejo es idéntica a lo observado en humanos (Tabla 27), estos cambios son menores que los observados en hombre. Estas diferencias se pueden atribuir a diferencias de especie en el metabolismo o diferencias en el tiempo de inducción.

Los resultados encontrados tanto en humano como en conejo sugieren que la farmacocinética de HEPP es dependiente de la duración de la administración. La disminución en ABC y el aumento en depuración después de administración repetida de HEPP se pueden atribuir a disminución en la biodisponibilidad, sin embargo considerando que en ambas especies la depuración aumentó la explicación más viable sería la presencia de un proceso de inducción metabólica.

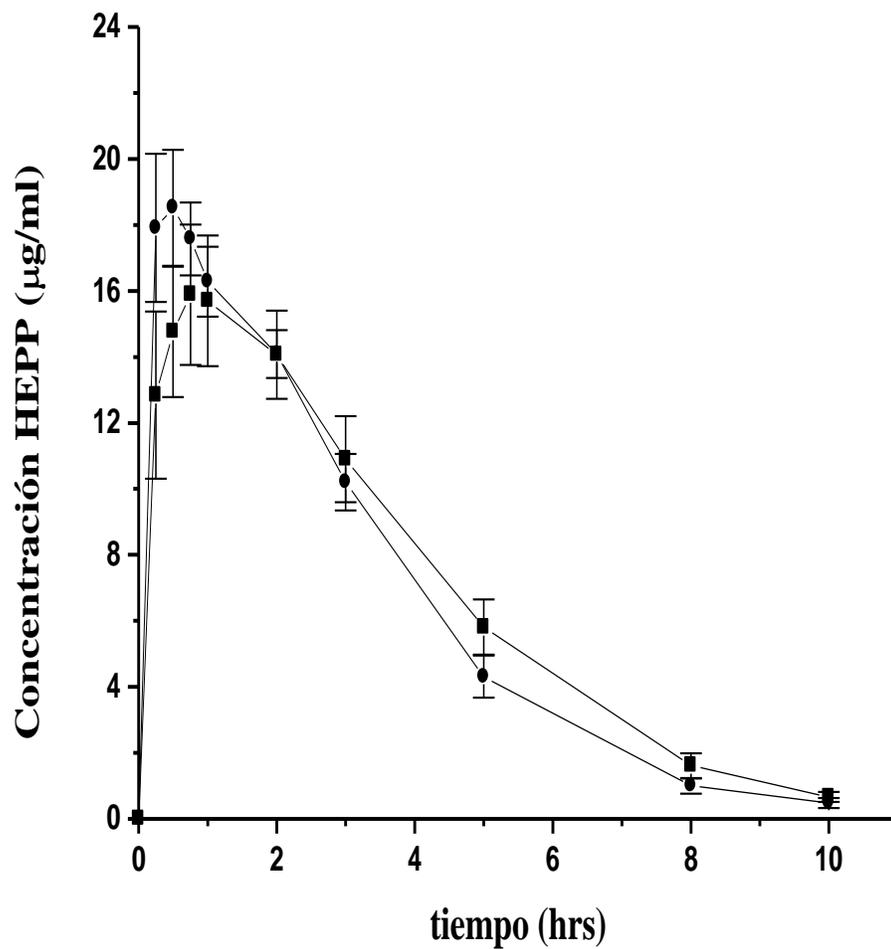


Fig. 15.-Perfiles de concentración plasmática después de la administración de la primera dosis (■) y la última dosis (●) de la administración repetida de HEPP durante 8 días (30 mg/kg, i.p.) en conejos macho.

Tabla 29. Parámetros farmacocinéticos de HEPP en conejos después de la administración intraperitoneal de 30 mg/kg en dosis única y en dosis múltiple durante 6 días consecutivos.

HEPP	Tmax (h)	Cmax (µg/mL)	t 1/2 (h)*	ABC ₀ (µg/mL h)	Cl/F L/h	Vd (L)	Relación Acumulación Ro (observado)	Relación Acumulación Rp (predicho)
Dosis única inicial	1.20 (1.08)	18.38 (8.5)	1.59 (0.362)	72.05 (17.918)	0.92 (0.257)	2.40 (1.443)		
A								
Dosis múltiple final	0.75 (0.632)	19.84 (4.76)	1.21 (0.13) *	53.54 (7.28) <i>b</i> *	1.37 (0.18) *	2.42 (0.43)	0.860 (0.058)	1.00 (3.74E-05)

Valores media con (S.D.). tmax, tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima; Cmax concentración plasmática máxima. t1/2, vida media de eliminación; ABC, área bajo la curva de concentración plasmática vs tiempo: *a*= ABC desde cero hasta infinito; *b*=AUC durante el intervalo; C/F, depuración; Vd, volumen de distribución; Ro= ABCintervalo/ABC_{0-∞} día 1; Rp=1/1-e^{-βτ}. t diferencia significativa a p<0.05

9. CONCLUSIONES.

- El método analítico empleado para la cuantificación de HEPP en plasma y orina mediante cromatografía de líquidos de alta resolución, fue lineal, exacto, preciso y selectivo en un rango de concentración de 0.78 a 100 $\mu\text{g/ml}$, por lo que se consideró adecuado para los objetivos del estudio.
- El HEPP muestra proporcionalidad de dosis con la administración de 250, 375 y 500 μg .
- Es probable que exista un proceso de saturación en la absorción con la dosis de 500 μg .
- La cantidad de HEPP excretado en orina de forma inalterada fue menor a los resultados de estudios de dosis única, por lo que el HEPP se metaboliza en un porcentaje mayor.
- No se observaron eventos adversos durante la administración de dosis únicas e intermedias, lo que el HEPP se considera seguro en el rango de dosis estudiado.
- La diferencia observada en los parámetros farmacocinéticos después de la administración múltiple del HEPP, tanto en humanos como en conejos, sugiere disminución de la biodisponibilidad o bien un proceso de autoinducción.
- La farmacocinética del HEPP después de administración múltiple es dependiente del tiempo.
- El HEPP posee características farmacocinéticas ventajosas por lo que posee un potencial terapéutico para ser utilizado en la clínica: como es rápida absorción, larga vida media de eliminación y baja unión a proteínas.

10.0 APÉNDICES

APÉNDICE A.

ESTUDIO DE DOSIS ÚNICA Y LINEALIDAD DE DOSIS

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Protocolo: Estudios clínicos farmacocinéticas del HEPP, un nuevo anticonvulsivante en sujetos sanos.

Antes de estar de acuerdo en participar en el estudio que se le ha propuesto sobre la administración de un nuevo fármaco con propiedades antiepilépticas, HEPP, es importante que esté informado sobre las características del estudio, los procedimientos a los que será sometido y los eventuales efectos colaterales del tratamiento. La participación en el estudio es enteramente voluntaria. En caso de participar, podrá abandonar el estudio en cualquier momento. Este estudio está respaldado por el Comité de Investigación y el Programa Prioritario de Epilepsia (PPE) del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Estudio

El estudio tiene como objetivo determinar las concentraciones plasmáticas de un nuevo fármaco con propiedades antiepilépticas, después de administrarlo en 4 dosis diferentes por separado. Esto permitirá caracterizar su disposición en el organismo así como evaluar si existe proporcionalidad entre las 4 dosis administradas. Con éste estudio también será posible determinar su tolerancia y seguridad. Los estudios se llevarán a cabo en voluntarios sanos. A continuación se describe la metodología que deberá seguir cada voluntario:

1. En el estudio participarán 6 voluntarios sanos que cumplan con los criterios de inclusión.

2. Previo a la evaluación clínica de los voluntarios sanos (la cual será realizada por un médico residente del Instituto), se les informará sobre las características del estudio y en caso de que acepten participar, firmarán la carta de consentimiento informado.
3. Un día antes del inicio del estudio, los sujetos ingresarán al hospital del INNN y permanecerán en él durante la completa realización del estudio bajo estricta supervisión médica. Durante el estudio los sujetos no se les permitirá fumar ni ingerir bebidas alcohólicas o que contengan cafeína.
4. Se tomarán signos vitales por una enfermera del equipo. El médico asignado al estudio realizará interrogatorio y exploración física completa de ingreso, registrándose estos datos en el expediente clínico del voluntario.
5. Se les servirá una cena ligera estandarizada de 800 kilocalorías (Kcal) y agua a libre demanda a las 20 horas, iniciando el ayuno a partir de las 22:00 hs.
6. Al día siguiente, día 1 del estudio, se colocará a cada uno de los voluntarios, un punzocat intravenoso en la vena antecubital izquierda, utilizando una llave de 3 vías para la toma de muestras sanguíneas y éste se mantendrá permeable con heparina (80%) durante el tiempo del estudio.
7. Antes de administrar el fármaco, se tomará una muestra sanguínea basal de 5 mL, correspondiente al tiempo 0.
8. Se administrará el fármaco (en cápsulas) con 250 mL de agua bajo estricta supervisión del investigador.
9. Los voluntarios recibirán un almuerzo ligero 4 horas después de la administración del fármaco (2 sandwiches de pollo, 250 ml de jugo de manzana y una rebanda de gelatina de agua). El consumo de líquidos será libre.
10. Posteriormente, recibirán una comida estandarizada 8 horas después de la administración del fármaco: un plato de sopa de verduras cocidas, un plato de arroz,

pechuga de pollo asada con ensalada de verduras cocidas y una manzana o una rebanada de gelatina de agua. Durante los 3 días del estudio farmacocinético, las comidas se estandarizarán de la misma manera.

11. Se tomarán muestras sanguíneas de 5 mL utilizando tubos de cristal al vacío con anticoagulante (EDTA), a los siguientes tiempos: 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60 y 72 horas después de la administración del fármaco. Se separará el plasma por centrifugación y se congelará hasta el momento de su análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución.
12. Se colectará la orina excretada durante 72 horas, en intervalos de 8 horas. Se medirá el volumen de orina y se almacenará una alícuota de 10 ml de cada intervalo bajo condiciones de congelación a -20°C .
13. El tercer día de estudio, además de tomar la última muestra sanguínea (correspondiente a 72 horas post-administración), se obtendrán muestras para realizar las pruebas de laboratorio de rutina post-estudio.
14. Antes de la salida de cada voluntario, el médico a cargo realizará exploración física y valoración clínica.
15. Este procedimiento será repetido durante la administración de las 4 diferentes dosis de HEPP, utilizadas para el escalamiento de dosis.

Beneficios

Su participación permitirá establecer:

- Los niveles plasmáticos de éste nuevo fármaco, describir su farmacocinética y determinar sus principales parámetros farmacocinéticos en sujetos sanos.
- Si el HEPP puede ser un candidato adecuado para continuar los estudios clínicos en humanos.

Riesgos

Las reacciones secundarias que pueden presentarse son impredecibles ya que ésta es la primera vez que se administra en humanos, pero considerando que se administra en dosis única, los efectos que podrían esperarse, abarcan desde molestias gastrointestinales hasta dolor abdominal, náusea, mareo, vómito y cefalea. También podría presentarse euforia, cansancio y somnolencia.

Es importante subrayar que la mayoría de los efectos de un fármaco se presentan con mayor probabilidad después de un tratamiento prolongado y no ante administraciones de dosis única como es el caso que nos ocupa.

Confidencialidad

La información clínica recopilada es estrictamente confidencial. Su nombre no aparecerá en ningún reporte o publicación de acuerdo a los lineamientos establecidos en la Ley General de Salud, en los lineamientos del Comité de Investigación Clínica del Instituto así como en las Buenas Prácticas Clínicas.

Importante

Su participación es enteramente voluntaria, si desea abandonar el estudio en cualquiera de sus etapas, podrá hacerlo en cualquier momento y deberá notificarlo al investigador a cargo.

Si tiene alguna duda, favor de aclararla inmediatamente con el grupo de investigadores a cargo del estudio. Gracias por tomarse el tiempo en leer detenidamente esta información.

En caso de requerir información, comunicarse con:

M. En C. Dinora F González Esquivel Tel 56063822 ext 2017

Dr. Francisco Rubio Donnadieu Tel 56063822 Programa Prioritario de Epilepsia

Dr. Francisco Javier Cornejo Tercer piso Neurología y Residencia Médica

Dr. Andrés Navarrete

Tercer piso Neurología

A través de la presente, doy mi consentimiento para participar como voluntario en el protocolo de investigación “**Estudios clínicos farmacocinéticas del HEPP un nuevo anticonvulsivante en sujetos sanos**”. Hago constar que he recibido toda la información acerca de la naturaleza y el propósito del estudio. He recibido, leído y entendido la carta de información del estudio así como los riesgos descritos. Se me ha informado que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento. Entiendo que recibiré una copia firmada y fechada de ésta forma de consentimiento. Estoy de acuerdo que la información clínica derivada del estudio de mi caso sea comunicada a la comunidad médica verbalmente o por escrito, pero sin revelar mi identidad.

Nombre del voluntario

Firma del voluntario

Fecha

Nombre del Testigo 1

Firma del Testigo 1

Dirección del testigo 1

Teléfono del testigo 1

Parentesco con el voluntario

Fecha

Nombre del Testigo 2

Firma del Testigo 2

Dirección del testigo 2

Teléfono del testigo 2

Parentesco con el voluntario

Fecha

APÉNDICE B

LINEALIDAD DE DOSIS DEL HEPP

HOJA CONTROL DE TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

Determinación de concentraciones plasmáticas de HEPP después de la administración oral de _____ mg de HEPP en dosis única en sujetos sanos voluntarios.

NOMBRE COMPLETO _____ EDAD _____

VOLUNTARIO No _____ INICIALES _____ SEXO _____

PESO _____ (Kg) ESTATURA (cm.) _____ DOSIS ADMINISTRADA: _____
REGISTRO _____ No DE CAMA _____

FECHA Y HORA REAL DE LA ADMINISTRACIÓN: _____

TOMAR MUESTRA SANGUÍNEA Y DE ORINA PARA ANÁLISIS DE LABORATORIO

# Muestra	Tiempo de toma de Muestras	Hora	Hora real de toma de la muestra	Concentración plasmática (mcg/ml)	Observaciones
1	0 min. (Blanco)				
	Admón. Del HEPP	8:00 am			
2	30 min	8:30			
3	45 min	8:45			
4	1.0 hrs	9:00			
5	1.5 hrs	9:30			
6	2.0 hrs	10:00			
7	3.0 hrs	11:00			
8	4.0 hrs	12:00			ALIMENTOS
9	6.0 hrs	14:00			
10	8.0 hrs	16:00			ALIMENTOS
11	12.0 hrs	20:00			
12	24.0 hrs	8:00			
13	36.0 hrs	20:00			ALIMENTOS
14	48.0 hrs	8:00			
15	60.0 hrs	20:00			
16	72.0 hrs	8:00			

El voluntario deberá recolectar la orina de 24 horas durante los 3 días del estudio en recipientes diferentes, los cuales serán proporcionados durante su admisión. Estos permanecerán en un lugar fresco hasta su colecta por personal del protocolo. No deberá tirar ninguna muestra de orina durante éste intervalo.

APÉNDICE D.

DOSIS ÚNICA: DATOS INDIVIDUALES DE CONCENTRACIÓN PLASMA VS TIEMPO

DOSIS HEPP 250 MG

Concentración. (µg/ml)						
Tiempo (Hrs.)	VOL 1	VOL 2	VOL 3	VOL 4	VOL 5	VOL 6
0	0	0	0	0	0	0
0.5	0.739	0.615	0.895	2.647	0.675	1.279
0.75	0.771	0.606	0.767	2.634	0.926	1.318
1.0	0.764	0.885	0.747	2.249	0.968	1.441
1.5	2.679	2.929	2.248	3.349	5.221	5.160
2.0	2.511	5.295	3.175	5.628	1.774	4.211
3.0	2.061	4.745	3.343	1.916	4.292	3.929
4.0	1.887	4.6057	3.255	2.188	3.658	3.587
6.0	1.557	2.985	2.964	1.417	3.057	2.906
8.0	1.460	2.473	2.559	1.342	2.768	3.215
12.0	1.392	1.529	2.829	1.537	2.540	2.003
24.0	0.913	1.002	1.242	1.000	1.716	1.476
36.0	0.998	0.865	0.837	0.987	1.837	1.971
48.0	0.992	0.636	1.086	1.053	1.082	1.223
60.0	0.996	0.715	0.790	1.208	1.162	1.204
72.0	0.626	0.659	0.784	1.124	1.203	1.127

DOSIS HEPP 375 MG

Concentración. (µg/ml)						
Tiempo (hrs.)	VOL 1	VOL 2	VOL 3	VOL 4	VOL 5	VOL 6
0	0	0	0	0	0	0
0.5	0.861	0	0	1.104	0.548	0
0.75	0.900	0	0	1.760	0.609	1.604
1.0	0.937	0	1.021	4.015	0.764	2.152
1.5	3.709	4.233	1.753	4.230	4.220	7.509
2.0	4.160	6.072	3.262	4.395	5.565	5.715
3.0	3.683	6.499	5.373	4.102	4.903	5.012
4.0	3.203	5.463	4.876	4.268	4.156	5.105
6.0	2.434	4.556	4.980	3.495	3.640	3.963
8.0	2.306	3.849	4.414	2.964	3.269	3.480
12.0	1.732	2.692	3.176	2.354	2.335	2.763
24.0	1.730	1.356	2.180	2.028	0.968	1.703
36.0	1.304	1.166	1.350	1.304	2.786	1.196
48.0	1.120	1.081	1.095	1.131	0.871	1.170
60.0	0.984	0.946	1.000	1.138	0.678	1.107

72.0	0.995	0.939	1.095	1.090	0.678	1.019
------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

DOSIS HEPP 500 MG

Concentración. (µg/ml)						
Tiempo (Hrs.)	VOL 1	VOL 2	VOL 3	VOL 4	VOL 5	VOL 6
0	0	0	0	0	0	0
0.5	0.824	0	0	0.134	0.565	0
1.0	2.897	0	0.568	8.166	1.552	0.187
1.5	3.120	0.149	1.467	8.309	3.985	0.116
2.0	9.186	1.182	4.208	6.529	4.239	0.951
3.0	9.430	12.970	5.628	7.345	8.525	6.257
4.0	8.585	11.226	4.451	8.754	9.155	6.881
6.0	8.108	10.073	8.404	5.099	8.269	6.711
8.0	7.020	9.388	7.297	4.357	7.847	6.394
12.0	5.724	6.947	5.037	3.089	7.792	4.91
24.0	2.799	3.563	2.386	3.754	7.170	2.363
36.0	1.410	1.839	1.300	0.990	2.174	1.183
48.0	0.886	1.552	0.655	0.511	1.490	0.581
60.0	0.770	0.674	0.209	0.249	0.816	0
72.0	0	0	0	0	0	0

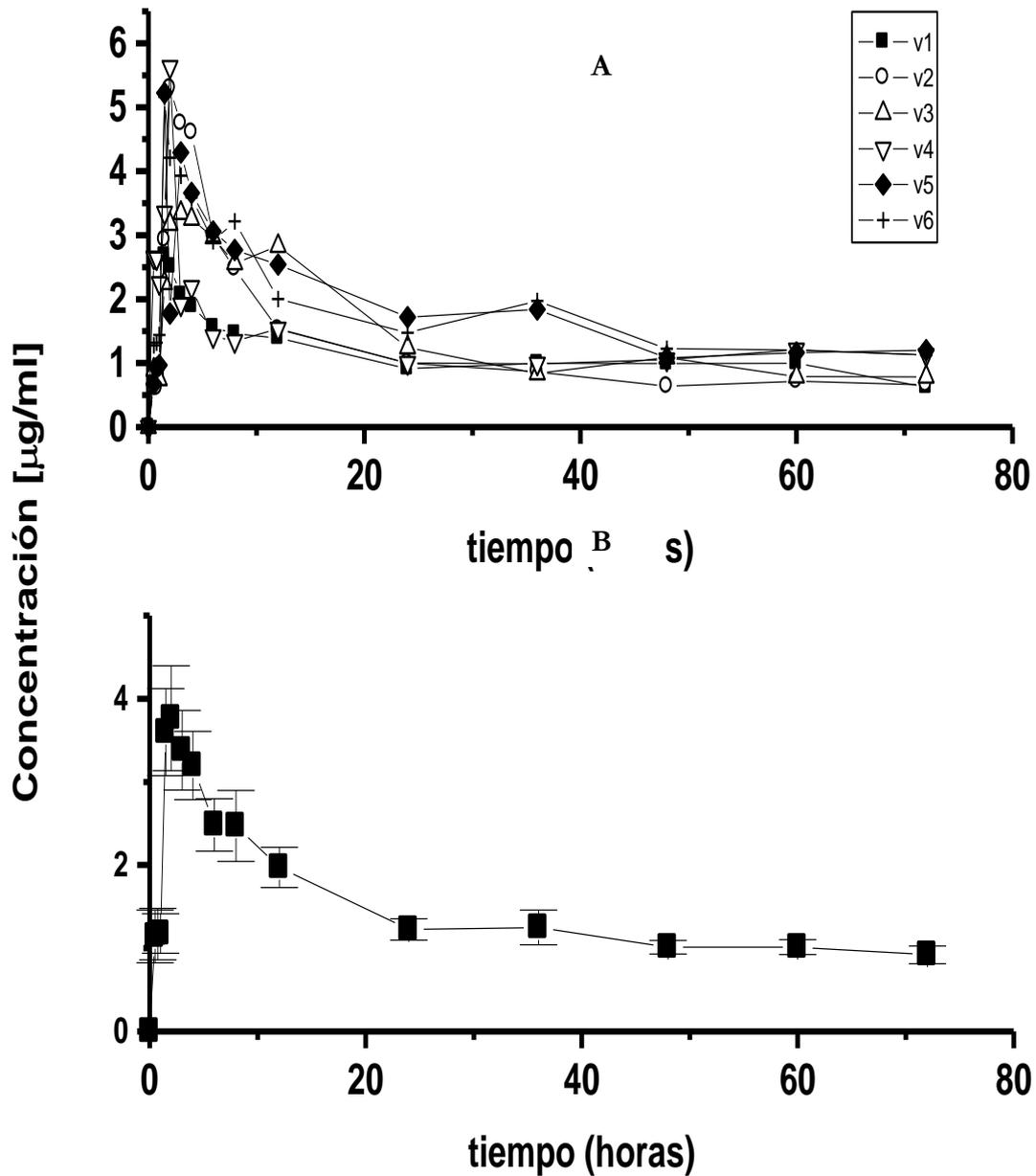
DOSIS HEPP 625 MG

Concentración. (µg/ml)					
Tiempo (Hrs.)	VOL 1	VOL 3	VOL 4	VOL 5	VOL 6
0	0	0	0	0	0
0.5	0	0	4.647	0	0
0.75	0	0	3.302	0	0
1.0	0.651	0.555	3.251	1.143	0
1.5	0.694	1.320	2.925	5.376	4.173
2.0	0.970	2.043	2.903	5.806	8.354
3.0	3.602	6.927	7.888	2.973	7.033
4.0	4.877	9.556	2.788	6.833	6.625
6.0	4.833	7.700	2.022	5.952	5.336
8.0	3.943	6.168	1.643	5.368	4.566
12.0	3.226	5.248	1.343	4.005	3.746
24.0	1.52	2.560	1.010	2.542	2.147
36.0	1.180	1.558	0.926	2.160	1.538
48.0	0.950	1.000	0.887	1.549	1.045
60.0	0.779	0.700	1.063	1.358	0.86
72.0	NC	0.5123	0.852	NC	

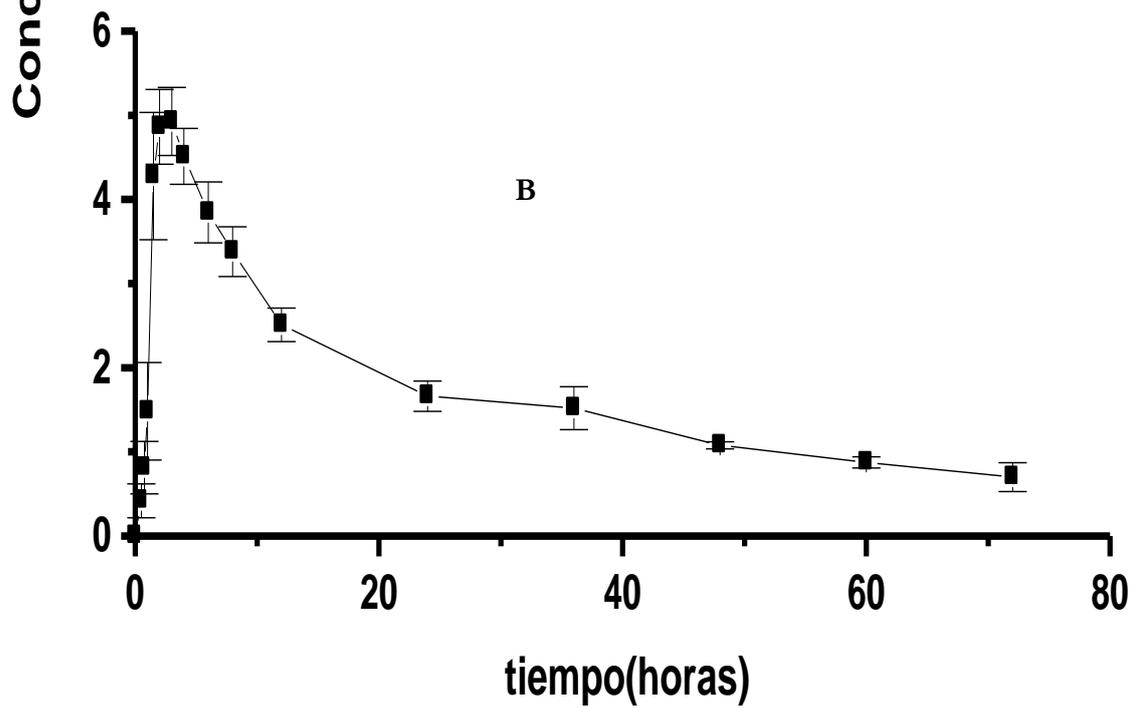
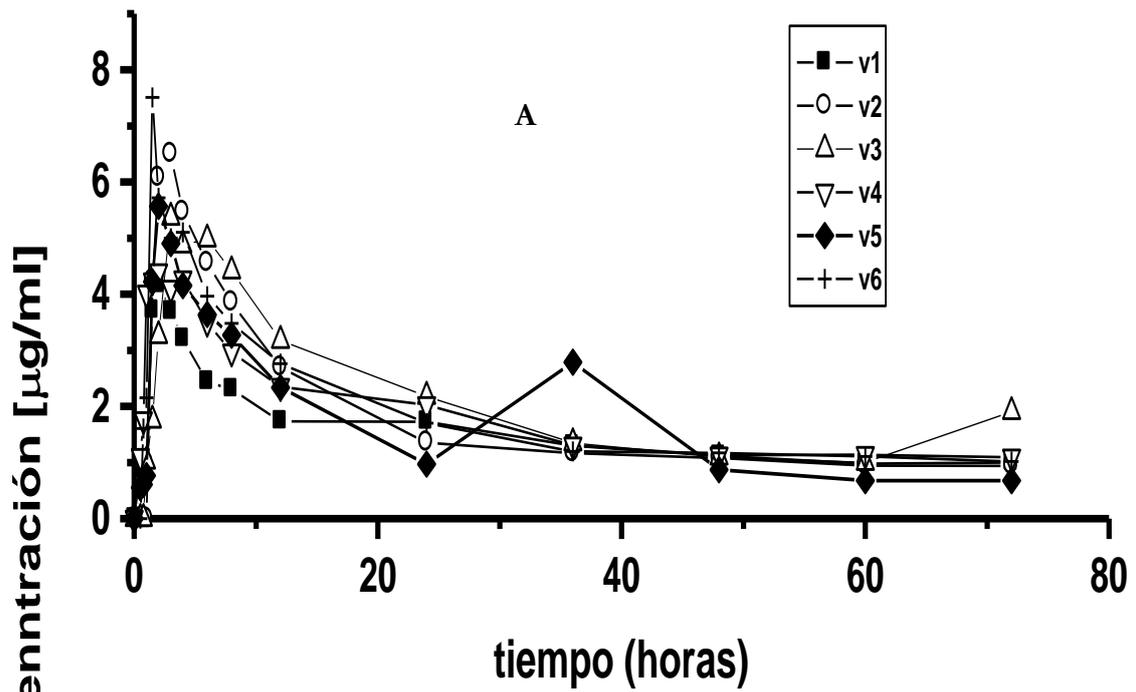
APENDICE E

DOSIS ÚNICA

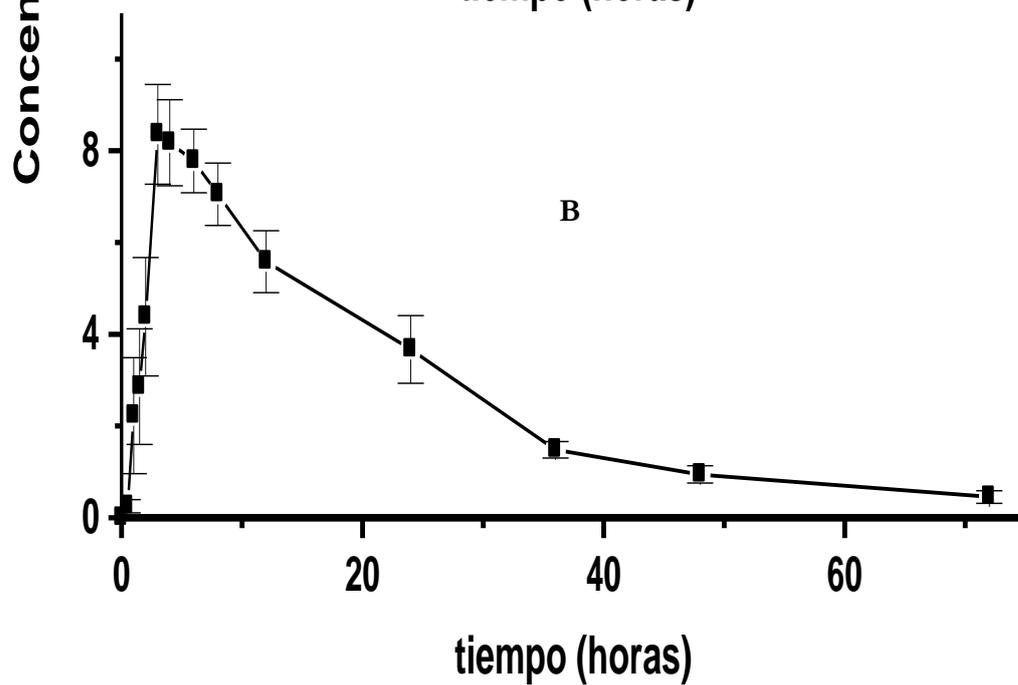
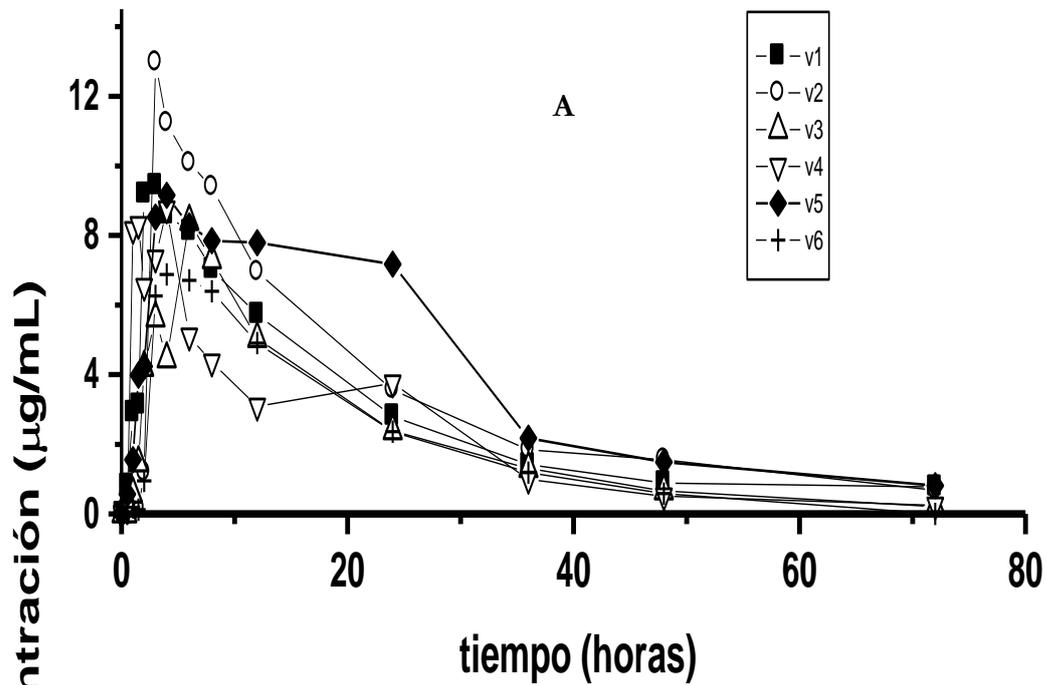
. PERFILES DE CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE HEPP VS TIEMPO EN HUMANOS



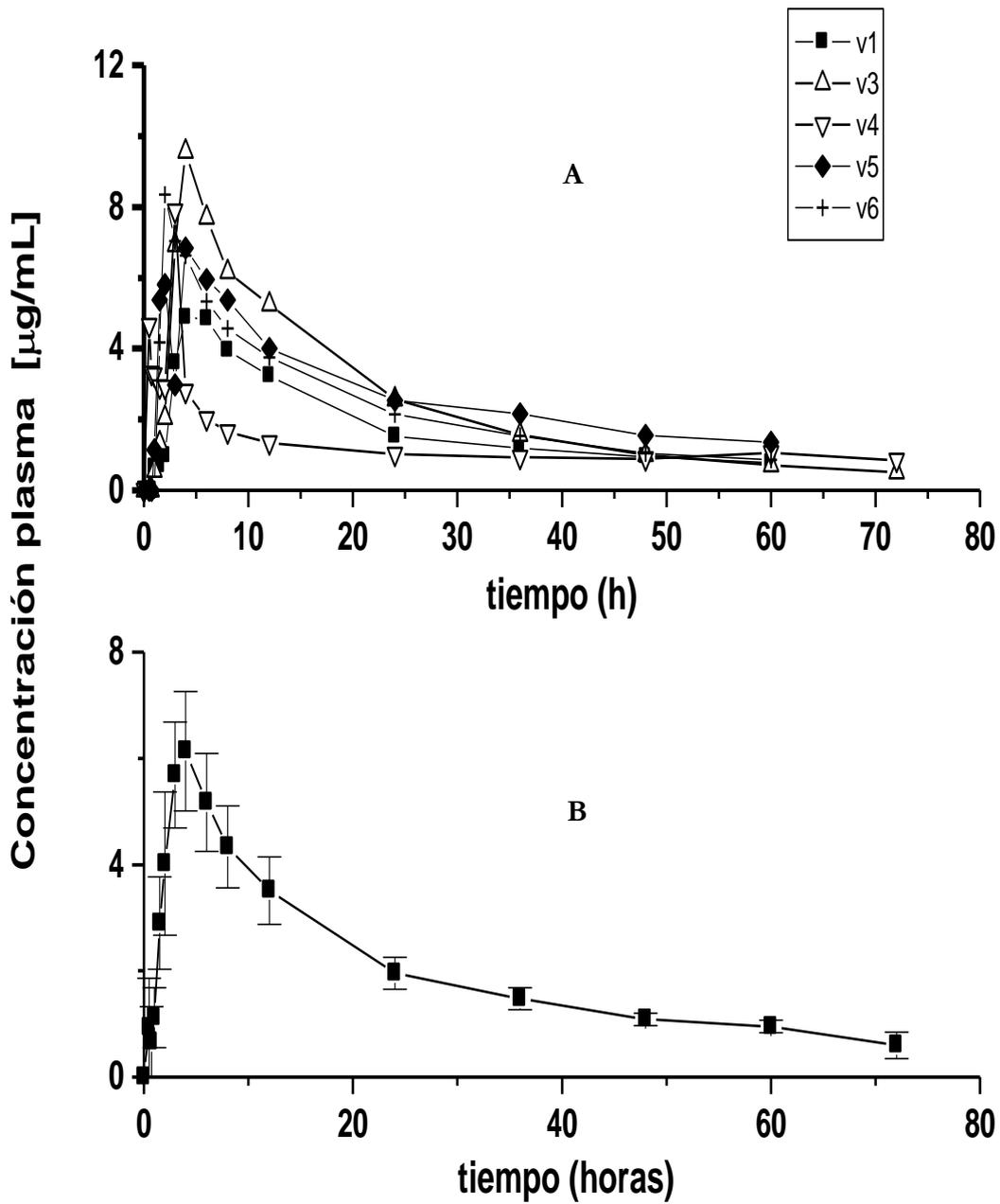
Perfiles plasmáticos de HEPP después de la administración oral de 250 mg en voluntarios sanos. A=Datos individuales. B=Datos promedio (n=6).



Perfiles plasmáticos de HEPP después de la administración oral de 375 mg en voluntarios sanos. A Perfiles individuales. B Perfil promedio, n=6.



Perfiles plasmáticos de HEPP después de la administración de 500 mg en voluntarios sanos. A Perfiles individuales. B Perfil promedio, n=6



Perfiles plasmáticos de HEPP después de la administración de 625 mg en voluntarios sanos. A Perfiles individuales. B Perfil promedio, n=5.

APÉNDICE F

ESTUDIO DE DOSIS MULTIPLE CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Protocolo: **Estudios clínicos farmacocinéticos del HEPP, un nuevo anticonvulsivante en sujetos sanos. Estudio de dosis múltiple.**

Antes de estar de acuerdo en participar en el estudio que se le ha propuesto sobre la administración repetida de un nuevo fármaco con propiedades antiepilépticas, HEPP, es importante que esté informado sobre las características del estudio, los procedimientos a los que será sometido y los eventuales efectos colaterales del tratamiento. La participación en el estudio es enteramente voluntaria. En caso de participar, podrá abandonar el estudio en cualquier momento. Este estudio está respaldado por el Comité de Investigación y el Programa Prioritario de Epilepsia (PPE) del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

Antecedentes.

Previo a éste estudio, se realizó otro estudio clínico en voluntarios sanos. Los sujetos recibieron, de manera escalada, 4 dosis diferentes de HEPP. A los voluntarios se les tomaron muestras de sangre durante 72 horas y se determinaron los niveles plasmáticos de la sustancia bajo estudio. Los sujetos estuvieron bajo supervisión médica y únicamente se observó euforia y ligera somnolencia cuando se administró la dosis más alta de 625 mg.

Propósito Estudio

El estudio pretende determinar las concentraciones plasmáticas de un nuevo fármaco con propiedades antiepilépticas, después de administrarlo de manera repetida, es decir, administrar 375 mg 2 veces al día durante 7 días consecutivos, con la finalidad de determinar si se presenta acumulación así como evaluar la posibilidad de un proceso de inducción o inhibición metabólica.

En el estudio participarán 10 voluntarios de sexo masculino, los cuales deberán cumplir con los criterios de inclusión del protocolo.

Los sujetos que decidan participar firmarán la carta de consentimiento previo a cualquier intervención.

Se les realizará exploración física y toma de signos vitales, electrocardiograma y evaluación neurológica así como todas las pruebas de laboratorio.

Esta fase del estudio tendrá una duración de 14 días. Durante éste periodo, los sujetos serán valorados diariamente por un Neurólogo Residente a cargo del estudio (exploración física, de signos vitales, pruebas neurológicas). Los voluntarios se ajustarán al siguiente protocolo:

Protocolo del estudio.

1. No tomar medicamentos o alcohol por lo menos 1 semana previa al estudio ni durante el mismo.
2. Los voluntarios permanecerán en ayuno 12 horas previas al día 1 del estudio, hasta 4 horas después de la administración del fármaco.
3. El día 1 del estudio, se administrará por vía oral 375 mg del fármaco (HEPP) con 250 ml de agua. Cuatro horas después de la administración del fármaco (12:00 pm) se proporcionará un desayuno estandarizado.
4. Posteriormente, 8 horas después de la administración del fármaco, (16:00h) se proporcionará una comida estandarizada. Los alimentos se proporcionarán después de la toma de muestra sanguínea correspondiente a ese horario.
5. A cada uno de los voluntarios, se les colocará un catéter intracath de calibre 21G en la vena antecubital izquierda, utilizando una llave de 3 vías para la toma repetida de muestras sanguíneas y heparina diluida para mantenerlo permeable durante el tiempo del estudio.

6. Se tomarán muestras sanguíneas de 5.0 ml, a los siguientes tiempos: previo a la administración del HEPP, 0 h, y a los 30, 45, 60 minutos, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0, 30.0, 48.0, 54.0 y 72 h después de la administración del fármaco.
7. Las muestras se coleccionarán en tubos con anticoagulante, previamente etiquetados, se separará el plasma por centrifugación y se congelará hasta el momento de su análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución.
8. El día 4 del estudio, después de la toma de la muestra sanguínea correspondiente a las 72 h, se iniciará la administración múltiple del HEPP, administrándose 375 mg del fármaco cada 12 horas (8:00 h y 20:00 h) con 250 ml de agua.
9. La dosis matutina, administrada previa al desayuno, será proporcionada por el médico responsable de la evaluación clínica de los voluntarios. La dosis vespertina se administrará de la misma manera. Este esquema de dosificación se mantendrá durante 6 días con la finalidad de alcanzar el estado estacionario.
10. El día 9 del estudio se tomarán 2 muestras de sangre, a las 8:00 h (en ayuno), inmediatamente antes de la siguiente dosis del fármaco y a las 14:00 horas, con la finalidad de corroborar el estado estacionario.
11. El día 10 del estudio, los voluntarios recibirán la última dosis del medicamento, 375 mg por la mañana. Los días 10, 11, 12 y 13 se tomarán muestras de sangre durante 72 horas, a los mismos tiempos indicados para los días 1, 2, 3 y 4.
12. Al igual que el día 1 del estudio, las muestras se coleccionarán en tubos heparinizados previamente etiquetados, se separará el plasma por centrifugación y se congelará hasta el momento de su análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución.
13. El día 13 del estudio, con la última muestra sanguínea para análisis de HEPP, se tomarán muestras adicionales de sangre para examen de laboratorio así como una muestra de orina.
14. Durante las 48 horas subsecuentes a la toma de la última muestra de sangre, los voluntarios serán valorados clínicamente por el médico a cargo del estudio.

Administración del HEPP y toma de muestras sanguíneas durante el estudio de dosis múltiple en voluntarios sanos.

DIA	DOSIS/HORA	MUESTRAS SANGRE y EVALUACION
DIA 1	375 mg 8:00 h	Antes de las 8:00 (blanco). A los 30, 45 minutos; a 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, 24.0, horas post-administración.
DIA 2		24.0 y 36.0 horas post-administración
DIA 3		48.0 y 60.0 horas post-administración
DIA 4	375 mg 8:00 am 375 mg 20:00 h	Muestra sangre 72.0 horas post-administración previa a la administración múltiple del fármaco. Evaluación clínica neurológica.
DIA 5	375 mg 8:00 am 375 mg 20:00 h	Evaluación clínica neurológica
DIA 6	375 mg 8:00 am 375 mg 20:00 h	Evaluación clínica neurológica
DIA 7	375 mg 8:00 am 375 mg 20:00 h	Evaluación clínica neurológica
DIA 8	375 mg 8:00 am 375 mg 20:00 h	Evaluación clínica neurológica
DIA 9	375 mg 8:00 am 375 mg 20:00	Muestras de sangre a 8:00 a. m. y 14:00 horas Evaluación clínica neurológica
DIA 10	375 mg 8:00 am	Antes de las 8:00 (blanco). A los 30, 45 minutos; a 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 12.0, horas post-administración.
DIA 11		8:00 y 14:00 horas
DIA 12		8:00 y 14:00 horas
DIA 13		8:00 am

APENDICE G
ESTUDIO DE DOSIS MULTIPLE
DATOS INDIVIDUALES DE CONCENTRACION PLASMÁTICA DE HEPP EN EN HUMANOS
PRIMERA DOSIS

Datos de concentración plasmática individual después de la administración oral de 375 mg de HEPP en humanos (n=10).

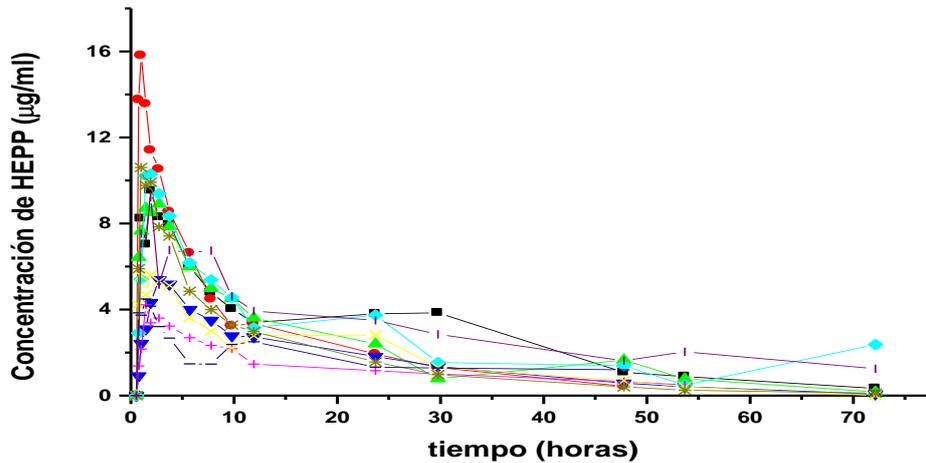
<i>Tiempo (hr)</i>	<i>V1</i>	<i>V2</i>	<i>V3</i>	<i>V4</i>	<i>V5</i>	<i>V6</i>	<i>V7</i>	<i>V8</i>	<i>V9</i>	<i>V10</i>
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5		13.75	6.423	0.918	2.908	1.376	4.228	5.899		2.469
1	8.232	15.81	7.643	2.426	5.412	2.16	5.564	10.605	3.85	7.529
1.5	7.022		8.709	3.097	10.225	4.218	4.693	9.767	3.74	7.404
2.0	9.527	13.557	8.507	4.320	10.305	3.382	5.604	9.918	4.49	9.23
3.0	8.295	11.401	8.906	5.388	9.383	3.606	5.311	7.848	4.16	5.16
4.0	7.942	10.521	7.857	5.176	8.350	3.231	5.116	7.420	3.21	6.77
6.0	5.992	8.548	5.983	4.002	6.176	2.688	3.611	4.851		6.65
8.0	4.786		4.983	3.499	5.386	2.336	3.000	3.996	2.673	6.74
10.0	4.03	6.625	4.514	2.774	4.554	2.177	2.213	3.281	1.472	4.611
12.0	3.401	4.478	3.612	2.729	3.151		2.780	2.980	1.462	3.93
24.0	3.804	3.236	2.400	1.818	3.747	1.462	2.821	1.566	2.38	3.5
30.0	3.847	3.357	0.782	1.354	1.537	1.156	1.308	0.970	2.503	2.85
48.0	1.077	1.934	1.652	0.576	1.389	1.002	0.697	0.408	1.32	1.62
54.0	0.889	1.304	0.778	0.414	0.489	0.657	0.398	0.246	1.28	2.039
72.0	0.333	0.435	0.168	0.074	2.371	0.496		0.111	1.2	1.247

ESTUDIO DE DOSIS MULTIPLE
DATOS INDIVIDUALES DE CONCENTRACION PLASMÁTICA DE HEPP EN EN HUMANOS
DOSIS FINAL

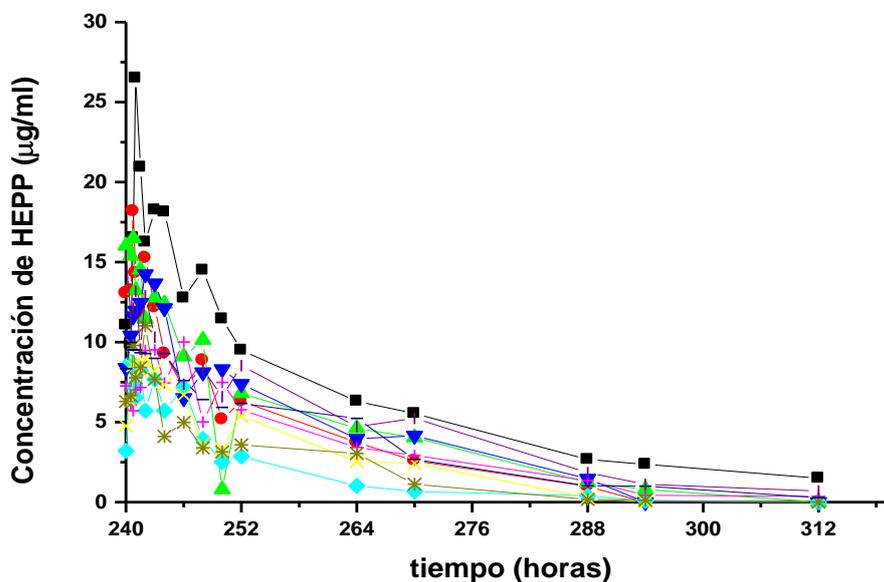
Datos de concentración plasmática individual después de administrar HEPP (375 mg/12h) en dosis múltiple durante 7 días en humanos (n=10).

<i>Tiempo (hr)</i>	<i>V1</i>	<i>V2</i>	<i>V3</i>	<i>V4</i>	<i>V5</i>	<i>V6</i>	<i>V7</i>	<i>V8</i>	<i>V9</i>	<i>V10</i>
216	11.06	13.057	16.015	8.38	3.206	7.258	4.767	6.293	8.339	11.06
228	9.884	13.232	15.390	10.408	8.756	6.058	6.270	6.655	9.985	9.884
240	16.53	18.195	16.476	11.606	7.234	5.706	8.525	9.790	9.509	16.53
240.5	26.51	14.313	13.226	11.955	6.529	7.012	8.765	7.768	9.508	26.51
240.75	20.933	11.768	14.524	12.45	8.222	7.163	8.203	8.415	9.34	20.933
241	16.25	15.259	11.448	14.24	5.712	9.476	8.929	11.014	9.279	16.25
241.5	18.26	12.175	12.789	13.66	7.676	9.5100	8.241	7.675	8.986	18.26
242	18.14	9.283	12.394	12.117	5.717	7.450	7.334	4.106	9.286	18.14
243	12.76	7.146	9.092	6.498	7.176	10.006	6.694	4.980	7.598	12.76
244	14.49	8.862	10.127	8.106	3.941	5.012	3.638	3.386	6.411	14.49
246	11.45	5.167	0.8	8.302	2.502	7.488	3.327	3.133	5.927	11.45
248	9.49	6.307	6.798	7.381	2.848	5.764	5.389	3.576	6.164	9.49
250	6.311	3.731	4.615	3.959	1.018	3.415	2.535	3.038	5.234	6.311
252	5.533	2.587	4.0366	4.1504	0.670	2.916	2.431	1.116	2.678	5.533
264	2.662	0.977	1.226	1.457	0.397	1.343	0.273	0.172	1.021	2.662

**APENDICE H.
DOSIS MULTIPLE
PERFILES INDIVIDUALES DE CONCENTRACIÓN DE HEPP VS TIEMPO EN
HUMANOS.**



Niveles plasmáticos individuales en sujetos sanos voluntarios después de la administración oral de una dosis de HEPP de 375 mg.



Niveles plasmáticos individuales en sujetos sanos voluntarios después de la administración múltiple de HEPP de 375 mg/12 horas durante 7 días. Perfil correspondiente al último día de la administración (n=10).

APENDICE I

DATOS INDIVIDUALES DE CONCENTRACION PLASMÁTICA DE HEPP DESPUÉS DE ADMINISTRARLO EN DOSIS MULTIPLE EN CONEJOS.

PRIMERA DOSIS

Datos individuales de concentración plasmática de HEPP en conejo después de la administración de 30 mg/kg en dosis única.

Tiempo (hrs)	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 5	Conejo 6
0	0	0	0	0	0	0
0.25	4.443	12.318	25.335	6.308	31.962	12.36
0.5	7.19	11.69	24.072	5.512	22.846	17.06
0.75	9.203	12.372	20.2	8.811	21.874	18.468
1	10.242	13.477	18.48	8.804	21.656	18.34
2	13.839	13.4	13.251	8.221	15.067	21.469
3	15.293	10.455	6.992	7.92	8.898	19.33
5	8.74	6.701	2.869	3.874	4.805	8.167
8	1.973	1.825	0.2760	1.313	0.877	1.599
10	0.971			0.580	0.360	0.288

**DATOS INDIVIDUALES DE CONCENTRACION PLASMÁTICA DE HEPP DESPUÉS DE ADMINISTRARLO EN DOSIS MULTIPLE
EN CONEJOS.**

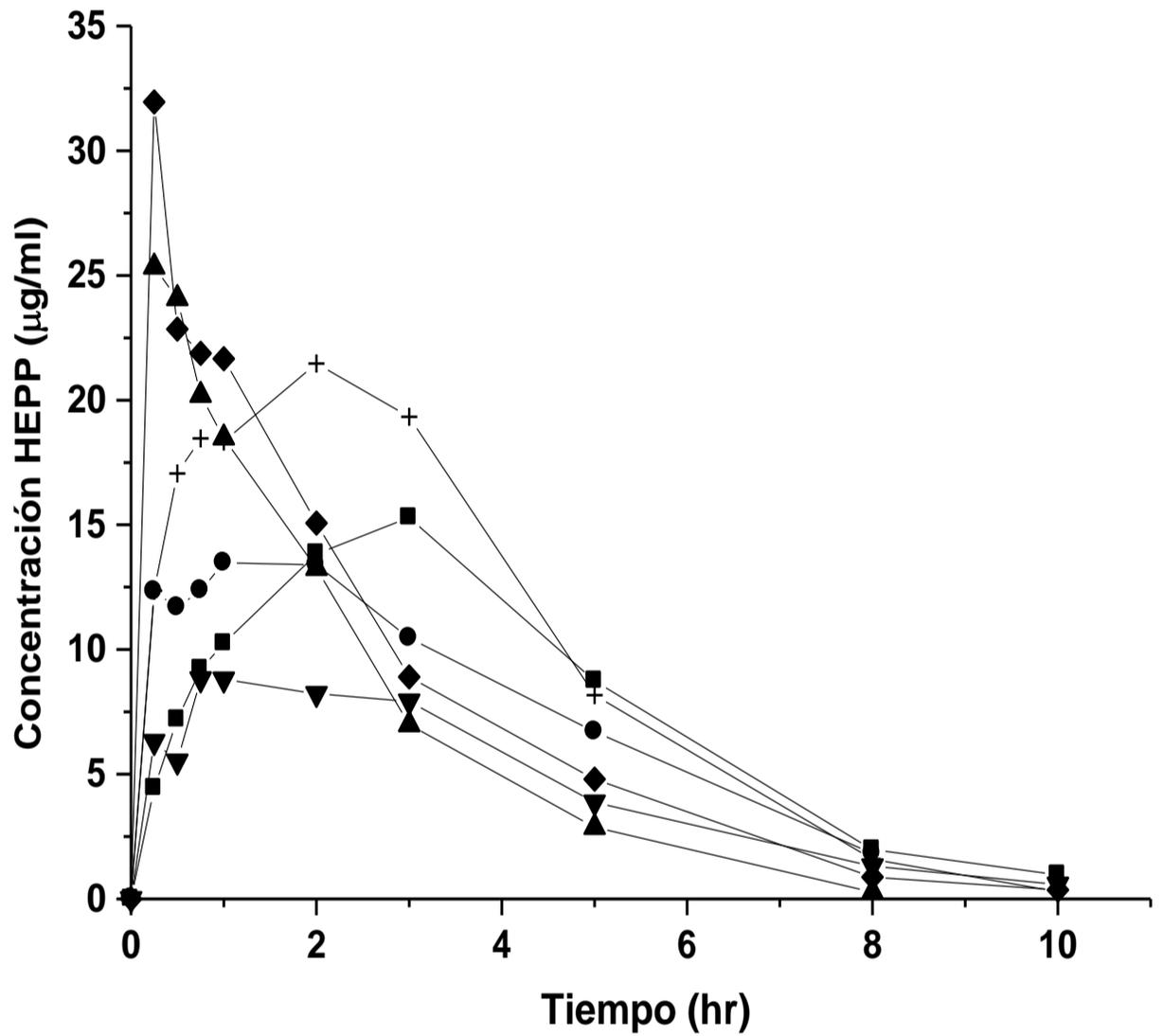
DOSIS FINAL

Datos individuales de concentración plasmática de HEPP en conejo después de la administración de 30 mg/kg durante 8 días

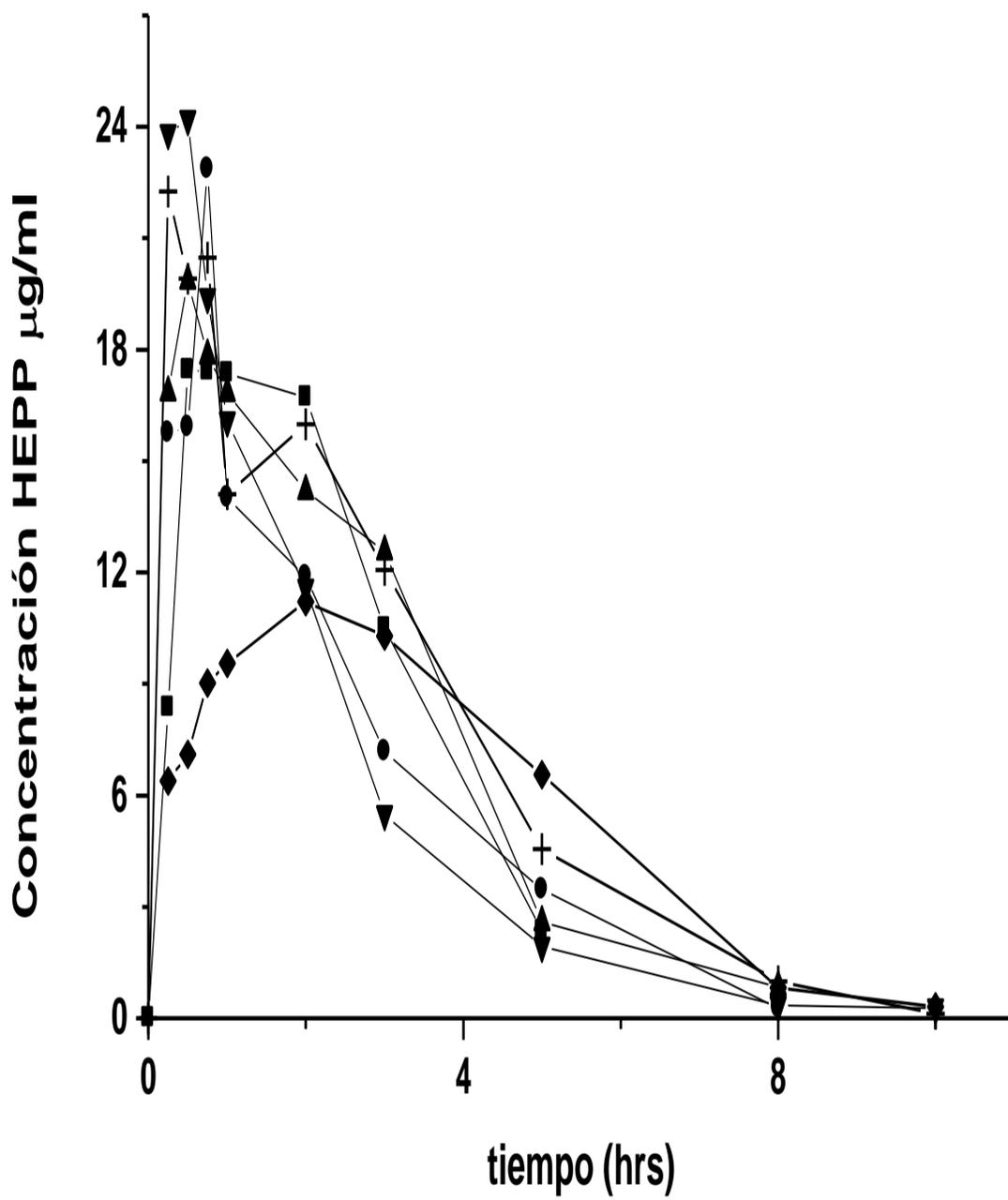
Tiempo (hrs)	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 5	Conejo 6
0	0	0	0	0	0	0
0.25	8.359	15.758	16.847	23.82	6.385	22.258
0.5	17.441	15.91	19.865	24.19	7.11	19.906
0.75	17.417	22.86	17.832	19.396	9.016	20.478
1	17.357	14.01	16.822	16.077	9.546	14.105
2	16.706	11.887	14.197	11.567	11.218	15.999
3	10.503	7.182	12.565	5.476	10.287	12.062
5	2.346	3.466	2.583	1.937	6.561	4.549
8	mnd	0.277	0.830	0.34	0.827	0.993
10	mnd	nc	mnd	0.268	0.313	0.112

Nc= no cuantificable; mnd=muestra no disponible

APENDICE J .
DOSIS MULTIPLE
PERFILES INDIVIDUALES DE CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE HEPP
TIEMPO EN CONEJOS



Perfiles plasmáticos individuales de HEPP en conejo después de la administración de una dosis única de 30 mg/kg, i.p. (periodo 1)



Perfiles plasmáticos individuales de HEPP en conejo después de la administración múltiple de durante 8 días consecutivos (30 mg/kg, i.p.) (periodo 2).

APENDICE K.

PUBLICACIONES DERIVADAS DEL TRABAJO DE TESIS.

Single Dose Pharmacokinetics of HEPP, a New Anticonvulsant in Normal Healthy Volunteers

Dinora F. González-Esquivel^{a,*}, Francisco Rubio-Donnadieu^b, Guillermo Carvajal S.^c and Helgi Jung C.^{a,d}

^a Laboratorio de Neuropsicofarmacología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, 14269 México, D.F., México

^b Programa Prioritario de Epilepsia, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, 14269 México, D.F., México

^c Departamento de Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México, D.F., México

^d Facultad de Química, División de Estudios de Posgrado, Departamento de Farmacia, UNAM, 04360 México, D.F., México

ABSTRACT: The pharmacokinetics and the dose proportionality of a new anticonvulsant compound, HEPP (D,L-3-hydroxy-3-ethyl-3-phenylpropionamide) was studied in healthy male volunteers as part of the pharmacological evaluation for new drugs. Study was performed administering doses of 250, 375, 500 and 625 mg of HEPP to six male volunteers. Blood and urine samples were collected for 72 h postdose and analysed by HPLC. Results showed that in man HEPP is rapidly absorbed from the gastrointestinal tract. T_{max} values were between 1.5 and 6.0 h. Plasma mean terminal half-life after the different doses ranged between 15.83 and 27.62 h with an overall harmonic mean value of 22.8. The mean $AUC_{0-\infty}$ and C_{max} increased linearly with doses of 250, 375 and 500 mg but not with the dose of 625 mg. The amount of unchanged drug excreted in urine was between 3 and 6% of administered dose which shows an extensive metabolism of the drug. © 1998 John Wiley & Sons, Ltd.

Key words: HEPP; anticonvulsants; pharmacokinetics

Introduction

Searching for more effective and safer anticonvulsant drugs, a new group of phenylalkylamide derivatives with significant anticonvulsant potential were synthesized [1]. The homologous HEPP presented the most favorable safety margin and its anticonvulsant properties were demonstrated in several animal models, including maximal electroshock seizures, pentylenetetrazole, bicuculline and 4-aminopyridine induced seizures [1]. The compound also has been shown to be effective against the 'GABA withdrawal syndrome', a new model of epileptogenesis [2–4]. These studies indicate that the anticonvulsant profile of HEPP is similar to that of phenobarbital and wider than valproate.

The pharmacokinetics of HEPP has been characterized in rats [5] and dogs [6] showing that the drug is extensively distributed in extracellular tissues and exhibits low plasma protein binding [5]. Following IV administration of 8, 15 and 30 mg kg^{-1} in dogs, the kinetics of HEPP is linear and shows a biphasic plasma decay pattern with a similar terminal half-life after the three doses [6].

Also, a direct relationship between serum and brain concentration and anticonvulsant effect in a pentylenetetrazole seizure model in rats was found [5].

In order to continue with the pharmacological evaluation of HEPP, the present study was performed in order to determine the pharmacokinetic behavior of this drug in normal healthy volunteers and to evaluate the linearity of HEPP after the oral administration of single doses of 250, 375, 500 and 625 mg.

Materials and Methods

Chemicals and Reagents

HEPP and the internal standard HEPA (D,L-2-hydroxy-2-ethyl-2-phenyl-acetamide), were provided by Dr G. Carvajal S. (Departamento de Bioquímica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México). All the solvents used (HPLC grade) were obtained from Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI, USA). All other chemicals were analytical reagents obtained from J.T. Baker (Xalostoc, México). Capsules containing 125 and 250 mg of HEPP were provided by Armstrong Laboratories.

Clinical Study

The clinical study protocol was approved by the local ethics committee and by the clinical research committee in accordance with the Helsinki declaration. Volunteers signed an informed consent after

* Correspondence to: Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Av. Insurgentes Sur 3877, Col. La Fama, 14269 Tlalpan, D.F., México.

being informed of the purpose, protocol and risks of the study. Six healthy male volunteers (ages 20–35 years; weight 52–69 kg) were admitted after a complete physical evaluation. The evaluation included a neurological and general physical exam, electrocardiogram, blood chemistry, haematology, serology and urinalysis. Subjects did not take any other medication or alcohol for at least 14 days prior the study and throughout the trial. Each subject fasted overnight prior to the experiment and continued to fast for 4 h after dosing, when a light meal was provided. A standard supper was given 4 h after lunch. Subjects remained hospitalized and were monitored during each phase of the study. These procedures were repeated for each dose, with a 4 week washout between doses. A single escalation study design was used, with all subjects given the lowest dose first (250 mg), then 375 mg second, 500 mg third and the largest dose (625 mg) last for safety reasons. Each dose was accompanied by 240 mL of water. Blood samples were collected before dosing and at 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h post dosing. The plasma was separated by centrifugation and stored at -4°C until analysis. This procedure was repeated with each dose of HEPP. Urine samples were collected during 72 h postdose at 8 h intervals. The urine volume was measured and a 10 mL aliquot of each sample was stored frozen at -4°C until the day of analysis.

HEPP Assay

Analysis of plasma and urine samples for HEPP was made by using an high performance liquid chromatography method [7], which is reported briefly here: to 500 μL of plasma or urine sample, 75 μL of a methanolic solution of HEPA (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ internal standard) were added, then 500 μL of 2 M sodium hydroxide solution were added and mixed followed by 500 μL of 0.1 M phosphate buffer (pH 8) and mixed again. The sample was extracted with 5 mL of dichloromethane by mixing for 15 min in an horizontal shaker. After centrifugation for 15 min at $1650 \times g$, the organic layer was separated and evaporated to dryness under stream nitrogen in a water bath, the residue was dissolved in 80 μL of the mobile phase, acetonitrile–water (25:75) and 25 μL were injected into a Hewlett-Packard liquid chromatograph using a Hypersil ODS C18 column (5 μm ; 200×4.6 mm) with ultraviolet detection at 219 nm and flow rate of 0.88 mL min^{-1} .

The method showed a linear relationship in the range of 0.78–100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for plasma and from 0.50 to 100.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for urine. The maximum intra-day assay coefficient of variation was 10% at 0.78 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for plasma and 13% at 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for urine; the lower limit of quantitation was 0.39 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for plasma and urine. It was found that

samples remained stable for at least 4 weeks when stored at -4°C .

Pharmacokinetic Analysis

Peak plasma concentration (C_{max}) and time to reach the peak concentration (t_{max}) were determined directly from the individual plasma concentration–time profiles. The elimination rate constant (β) was estimated by least-squares fit of the terminal concentrations in each data set, usually including the last four or five concentration–time points.

The area under the plasma concentration–time curve (AUC) was calculated to the last sampling point using the trapezoidal rule and extrapolated to infinite time ($\text{AUC}_{0-\infty}$) as appropriate. Both C_{max} and $\text{AUC}_{0-\infty}$ were dose-adjusted by dividing these parameters by the administered HEPP dose.

As only oral dosing was used and the bioavailability of HEPP could not be measured, the apparent total body clearance (Cl/F) was calculated by using the equation $\text{Cl}/F = \text{dose}/\text{AUC}$ and the apparent volume of distribution (V_d) was calculated according to the formula:

$$V_d = \frac{D}{\text{AUC} \times \beta}$$

Mean residence time (MRT) was calculated according to Yamaoka *et al.* [8].

Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) was performed on C_{max} , $\text{AUC}_{0-\infty}$, elimination half-life, as well as on MRT and Cl/F . The pharmacokinetic parameters C_{max} and $\text{AUC}_{0-\infty}$ were also corrected for dose (dose normalized) and reanalysed with ANOVA. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Results and Discussion

Prior to initiation of human antiepileptic drug HEPP trials, the drug was evaluated for safety and tolerance [9]. Also pharmacokinetic studies in animal species were made [5,6]. Studies in dogs [6] showed that after IV administration, HEPP elimination was biexponential with a half-life of 3.4 h. All pharmacokinetic parameters were linear over the range of dose studied (8, 15 and 30 mg kg^{-1}). Studies after a single 50 mg kg^{-1} intravenous, intraperitoneal and oral administration in male albino Wistar rats showed a bioavailability of 0.8 and 0.6, respectively, and a half-life of 3.15 h [5]. To date, there is no information on the disposition of HEPP in humans.

Figure 1 shows the individual plasma concentration–time profiles of HEPP after the single oral dose of 500 mg. With this dose C_{max} values were between

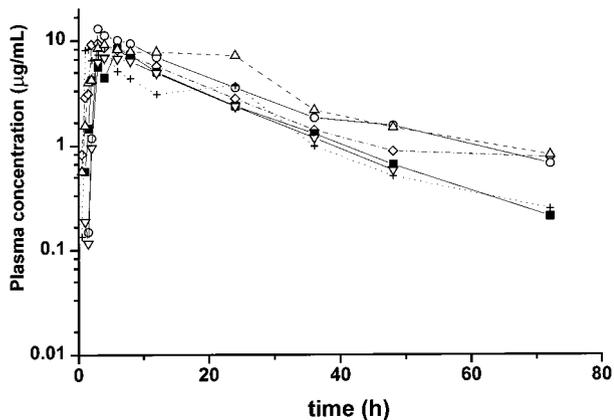


Figure 1. Individual plasma concentration-time profiles of HEPP in six healthy subjects after a single oral dose of 500 mg

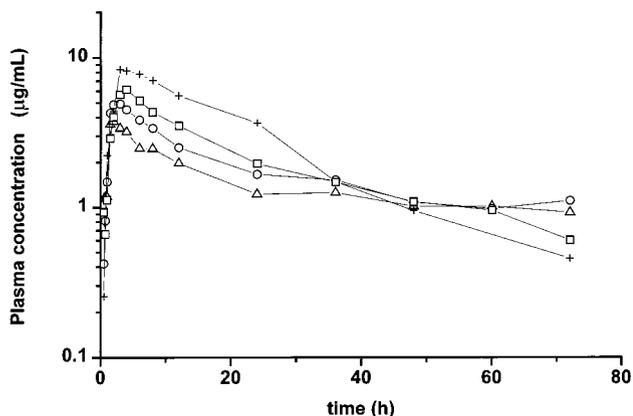


Figure 2. Mean plasma concentration-time profiles after the oral administration of single doses of 250 (Δ), 375 (\circ), 500 (+) and 625 (\square) mg of HEPP in healthy volunteers

6.88 and 12.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and half life ranged from 11.7 to 25.57 h. Figure 2 shows the mean plasma concentration-time profiles after the administration of 250, 375, 500 and 625 mg. For most subjects, plasma concentration-time profiles showed a biphasic decay pattern. A great intersubject variability

was found after all doses. Secondary peaks often occurred between 6 and 8 h after dosing. These secondary peaks added uncertainty to the estimation of elimination half-life. Table 1 summarizes the mean pharmacokinetic parameters.

Results showed that regardless of dose, HEPP was rapidly absorbed after oral administration, reaching peak plasma levels in 2–6 h. Half-life showed a great inter-individual variability with values ranging from 13 to 45 h; the mean elimination plasma half-lives were not statistically different after the administration of the four doses. The overall harmonic mean was 22.80 ± 5.0 h. C_{max} yielded the lowest values at 250 mg HEPP dose ($3.76 \pm 1.54 \mu\text{g mL}^{-1}$) and increased for the 375 and 500 mg doses to 4.92 and 8.35 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. Subjects receiving 675 mg HEPP had mean C_{max} values of $6.13 \pm 2.51 \mu\text{g mL}^{-1}$, which is lower than those obtained at the 500 mg dose. Mean values for $\text{AUC}_{0-\infty}$ increased only for the 250, 375 and 500 mg doses but not with the 625 mg dose ($p = 0.822$). When comparing the values of $\text{AUC}_{0-\infty}$ and C_{max} for the 500 and the 625 treatments no significant difference was found between them. Also, there was no change observed in the MRT for the four doses (Table 1).

When the mean dose normalized plasma concentration-time curve was plotted, it was found that the 625 mg values were not superimposed at any sampling time. C_p/dose values were lower than expected. Analysing dose normalized parameters (Table 2) by means of analysis of variance and pairwise comparisons (Student–Newman–Keuls method), we found no differences among the 250, 375 and 500 mg doses for $\text{AUC}_{0-\infty}/\text{dose}$ ($p = 0.079$) as well as for $C_{\text{max}}/\text{dose}$ ($p = 0.2726$) but with the 625 mg dose there was a significant difference. The overall dose relationship of HEPP and the values for C_{max} and $\text{AUC}_{0-\infty}$ are shown in Figure 3. In dose linearity analysis, t -tests showed no statistical

Table 1. Mean pharmacokinetic parameters of HEPP

Dose (mg)	t_{max} (h)	C_{max} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$t_{1/2}^{\text{h}}$ (h)	$\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h mL}^{-1}$)	Cl/F ($\text{mL min}^{-1}/\text{kg}$)	V_d (L kg^{-1})	MRT (h)
250	2.0	3.76 (1.54)	23.16 (16.6)	136.45 (30.84)	0.550 (0.15)	1.12 (0.39)	50.60 (11.75)
375	3.0	4.92 (0.99)	24.58 (12.64)	157.85 (11.91)	0.643 (0.08)	1.55 (0.55)	43.29 (14.48)
500	3.0	8.35 (2.65)	15.83 (8.24)	206.7 (64.65)	0.677 (0.23)	0.99 (0.23)	51.50 (18.0)
625	4.0	6.13 (2.51)	27.62 (3.99)	198.93 (40.84)	0.853 (0.25)	2.26 (1.12)	51.55 (20.11)
Mean	3.0 (0.81)	5.79 (1.96)	22.80 (5.00)	173.9 (48.9)	0.682 (0.15)	1.79 (0.56)	49.14 (15.46)

The values for the pharmacokinetic parameters at each dose of HEPP were calculated from the individual values for each volunteer. (t_{max} , time to maximum plasma concentration; C_{max} , maximum plasma concentration; $t_{1/2}$, half-life; AUC, area under the plasma concentration-time curve; Cl, clearance; V_d , volume of distribution; MRT, mean residence time). Values are mean with (S.D.).

^a Harmonic mean.

Table 2. Mean dose-normalized HEPP pharmacokinetic parameters estimates

Dose (mg)	C_{\max}/dose ($\mu\text{g mL}^{-1}/\text{mg}$)	$\text{AUC}_{0-\infty}/\text{dose}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h mL}^{-1}/\text{mg}$)
250	0.0182 (0.0049)	0.545 (0.12)
375	0.0149 (0.0033)	0.420 (0.031)
500	0.0185 (0.00405)	0.413 (0.129)
625	0.0120 (0.0028)	0.3182 (0.065)
Mean (S.D.)	0.0159 (0.00307)	0.4240 (0.093)

difference for the intercept, in C_{\max} ($p = 0.6861$) and in $\text{AUC}_{0-\infty}$ ($p = 0.1148$). Also, an F -test showed highly significant p -values ($p \leq 0.05$) for the overall dose and linear effect. Another simple approach to assess dose-proportionality is to fit a quadratic regression of AUC on dose: $\text{AUC} = a + b \cdot \text{dose} + c \cdot \text{dose}^2$ and test for statistically nonsignificant intercept and quadratic terms [10]; if no significance is proven then proportionality is concluded. This equation was tested in the dose range from 250 to 500 mg and no significant differences for a , b , and c terms (the intercept and quadratic terms) were found, and an F -test showed a nonsignificant p -value for the model.

From our results it can be seen that in the dose range of 250–500 mg, the pharmacokinetics of HEPP involve linear process of absorption and elimination, although biliary recycling is likely due to the presence of secondary peaks in some subjects.

The non-proportional increase in plasma levels at the higher dose of 625 mg of HEPP could be attributed to changes in the fraction of HEPP dose absorbed (F) due to a saturable absorption process. Examining fraction of dose absorbed, F , a possible explanation could be that the dose was administered in three capsules (two capsules of 250 mg and one of 125 mg) which could cause some dose-dependency process in the absorption. Considering that HEPP has a low aqueous solubility, dissolution limitations in the release of drug from the dosage form could be the cause of dose dependency after administration of the 625 mg dose. When there is a saturated solution of drug in the absorption site the rate of absorption is constant and the amount of drug absorbed is not proportional to the dose administered. This behavior needs to be confirmed with other studies and under steady-state conditions where dose dependency in the rate constant of absorption is of little consequence unless availability is also altered.

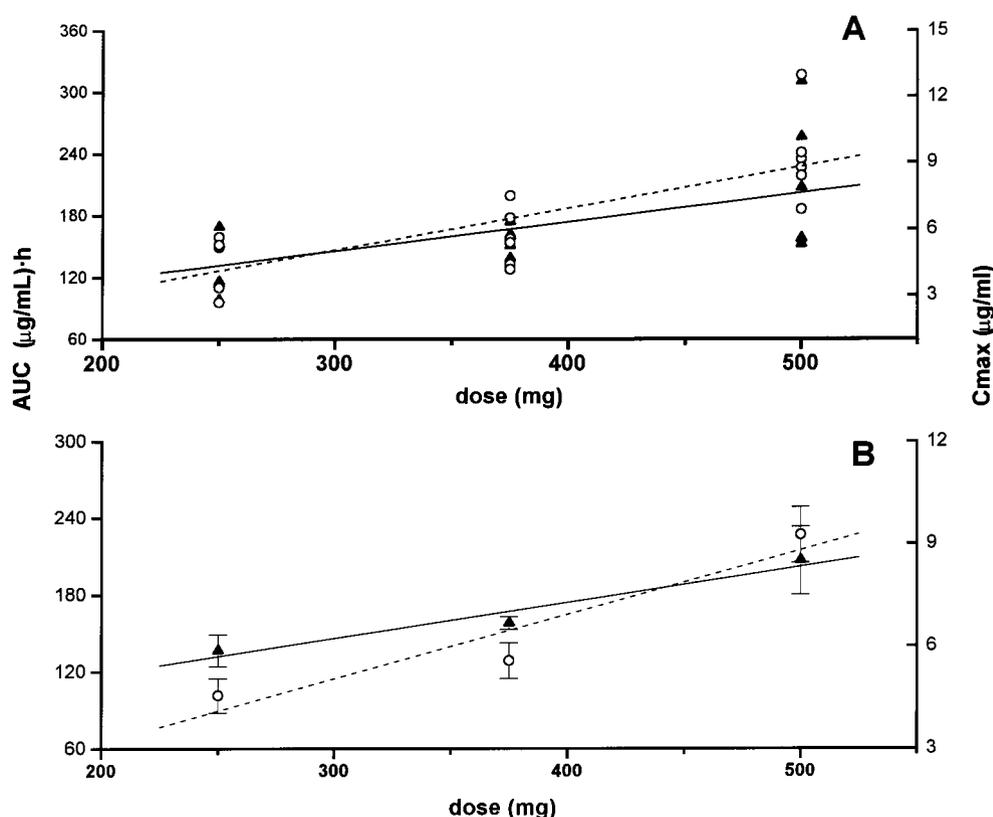


Figure 3. (A) Individual $\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h mL}^{-1}$) (\blacktriangle) and individual C_{\max} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (\circ) ($n = 6$) of HEPP after three oral doses (250, 375 and 500 mg) to healthy volunteers, as a function of the dose ($y = 0.28x + 61.64$; $r^2 = 0.3528$ for AUC and $y = 0.01884x - 0.605$; $r^2 = 0.607$ for C_{\max}). (B) Mean (\pm S.E.) $\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h mL}^{-1}$) (\blacktriangle) and mean C_{\max} ($\mu\text{g mL}^{-1}$) (\circ) of HEPP after three oral doses (250, 375 and 500 mg) to healthy volunteers, as a function of the dose ($y = 0.28x + 61.64$; $r^2 = 0.95$ for AUC and $y = 0.01884x - 0.605$; $r^2 = 0.90$ for C_{\max})

In this study HEPP was also determined in urine and results showed that less than 6% of the HEPP dose was excreted unchanged in the 72 h after administration, regardless of the size of the dose. This finding implies that HEPP is eliminated either by metabolism and/or by biliary excretion, a finding that needs to be confirmed with further metabolism studies.

No adverse events occurred in subjects with the low doses. At the higher dose, 625 mg of HEPP, light sleepiness and dizziness occurred at about the time of peak plasma concentration and resolved 8 h after dosing.

Considering that the drug has a rapid absorption, a long half-life, low protein binding (L.J.R. Medina, L.J.A. García and H.C. Jung, unpublished data for this drug) and clinically adverse effects have been minor, HEPP shows great promise as a useful antiepileptic drug therapy. Further clinical investigation in humans is necessary to determine its use in clinical practice. We suggest a dosage regimen of 325 mg b.i.d. for the phase I multiple-dose study in healthy volunteers.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the support from Armstrong Laboratorios de México.

References

1. S.E. Meza-Toledo, M.T. Zenteno-García, E. Juárez-Carvajal, D. Martínez-Muñoz and G. Carvajal-Sandoval, A new ho-

- mologous series of anticonvulsants: phenyl alcohol amides. *Arzneim. Forsch./Drug Res.*, **40**(II), 12, 1289–1291 (1990).
2. S. Brailowsky, T. Montiel T and E. Hernández, Effects of HEPP on a new model of focal status epilepticus: The GABA-withdrawal syndrome. In *Proceedings of the Symposium on New Anticonvulsant Drugs Synthesized in Mexico*, Colima, May 1990.
3. S. Brailowsky, M. Kunimoto, C. Menini, C. Silva-Barrat, D. Riche and R. Naquet, The GABA withdrawal syndrome: a new model of focal epileptogenesis. *Brain Res.*, **442**, 175–179 (1988).
4. G. Le Gal-La Salle, S. Brailowsky, C. Menini and R. Naquet, Local asymptomatic status epilepticus induced by withdrawal of GABA infusion into limbic structures. *Exp. Neurol.*, **101**, 411–417 (1988).
5. L.E.M. Gómez, R. Cueva-Rolón and P.A.F. Lehmann, Disposition kinetics of HEPP in rats after intravenous, oral, and intraperitoneal administration. Correlation of plasma and brain levels with the anticonvulsant effect. *Biopharm. Drug Dispos.*, **16**, 77–89 (1995).
6. L.E.M. Gómez and P.A.F. Lehmann, Pharmacokinetics of the novel anticonvulsant HEPP after single intravenous administration of three different doses in dogs. *Biopharm. Drug Dispos.*, **16**, 105–112 (1995).
7. L.E.M. Gómez and P.A.F. Lehmann, Rapid and simple HPLC assay for the novel anticonvulsant D,L-3-hydroxy-3-ethyl-3-phenylpropionamide (HEPP) in plasma and urine. In *Proceedings of the Fourth Congress of Chemistry of North America*, Analytical Chemistry Division, New York, USA, 1991.
8. K. Yamaoka, T. Nakagawa and T. Uno, Statistical moments in pharmacokinetics. *J. Pharmacokin. Biopharm.* **6**, 547–558 (1978).
9. G. Chamorro, M. Salazar, S. Salazar, V. Ulloa, G. Carvajal and D. Martínez, Evaluation of the toxic and teratogenic potential of the anticonvulsant drug 4-hydroxy, 4-ethyl, 4-phenylbutyramide in mice. *Arch. Med. Res.*, **4**, 441–446 (1994).
10. K. Gough, M. Hutchinson, O. Keene, B. Byrom, S. Ellis, L. Lacey and J. McKellar, Assessment of dose proportionality: report from the statisticians in the pharmaceutical industry/pharmacokinetics UK joint working party. *Drug Inf. J.*, **29**, 1039–1048 (1995).

Pharmacokinetics of HEPP, A New Anticonvulsant, in Healthy Subjects and Rabbits after Multiple Doses

Dinora F. González-Esquivel^a, Rodolfo Pérez M^b and Helgi Jung Cook^{a,c,*}

^aLaboratorio de Neuropsicofarmacología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, 14269, México D.F., México

^bBioterio, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, 14269, México D.F., México

^cFacultad de Química, Departamento de Farmacia, UNAM, 04360, México D.F., México

ABSTRACT: In the present study the pharmacokinetics of D,L-3hydroxy-3-phenylpropionamide (HEPP) a new anticonvulsant compound was studied after multiple dose administration in healthy male volunteers and in rabbits. The study in humans involved the oral administration of 375 mg of HEPP b.i.d. for 7 consecutive days. The study in rabbits explored doses of 30 mg/kg intraperitoneal (i.p.) given once daily for 6 days. In both studies pharmacokinetic (PK) profiles were characterized after the first dose and after the last multiple dose. Plasma HEPP concentrations were measured by HPLC. Pharmacokinetic parameters were calculated by noncompartmental methods. The results in humans as well as in rabbits showed that after multiple doses the AUC values decreased and CL/F values were significantly increased, which could be due to an induction process in the metabolic disposition of the drug. Copyright © 2004 John Wiley & Sons, Ltd.

Key words: anticonvulsants; HEPP; pharmacokinetics; multiple dose

Introduction

HEPP (D,L-3hydroxy-3-phenylpropionamide) is a novel compound with a broad profile of anti-convulsant activity. It protects mice against seizures induced by pentylentetrazole, bicuculline, 4-aminopyridine, thiosemicarbazide and maximal electroshock [1]. Furthermore, DL-HEPP protects rats against the gamma-aminobutyric acid (GABA) withdrawal syndrome, a model of focal epilepsy, which has shown an extraordinary resistance to the classic antiepileptics [2]. Its safety and pharmacokinetics have been tested in animals showing that it would be a promising anticonvulsant drug [3–6]. Furthermore a pharmacokinetic interaction between HEPP and phenytoin in rabbits [7] was found resulting in decreased plasma concentrations of HEPP which

could be due to an induction by phenytoin on the metabolism of HEPP.

As a part of its pharmacological evaluation in a previous study the pharmacokinetics and dose proportionality in normal healthy volunteers was studied [8], where HEPP was administered as single escalated doses of 250, 375, 500 and 625 mg. The results showed a favourable pharmacokinetic profile with great potential as a useful antiepileptic drug. In order to continue the pharmacological evaluation of HEPP, the present study was performed to determine the disposition kinetics and the tolerability of HEPP in humans and in rabbits after multiple dose administration.

Materials and Methods

Chemicals and reagents

HEPP and the internal standard, HEPA (D,L-2hydroxy-2-ethyl-2-phenyl-acetamide) as well as

*Correspondence to: Laboratorio de Neuropsicofarmacología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, 14269, México D.F., Mexico. E-mail: helgi@servidor.unam.mx

capsules containing 125 and 250 mg of HEPP were provided by Armstrong Laboratories (México). The solvents used, acetonitrile (99.98%), methyl alcohol (99.9%) and dichloromethane (99.9%), were HPLC grade. The analytical reagents used were sodium hydroxide AR (98%), potassium phosphate monobasic AR (99%). All chemicals were obtained from Mallinckrodt-Baker (Xalostoc, México).

Pharmacokinetic studies

In order to determine the disposition kinetics in both species, two separate studies were performed, a clinical study in healthy volunteers and a study in rabbits.

Study in normal healthy volunteers

The clinical study protocol was approved by the local ethics committee and by the clinical research committee in accordance with the Helsinki declaration and the ICH Good Clinical Practices. The volunteers signed an informed consent after being informed of the purpose, protocol and risk of the study. Ten healthy male volunteers (ages 25–33 years; weight 53–83 kg) were admitted after neurological and general physical examination, electrocardiogram, blood chemistry, haematology, serology and urinalysis. The safety and tolerance assessment involved analyses of adverse events, laboratory tests, vital signs, ECGs and neurological tests according to Cramer *et al.* [9].

Subjects did not take any other medication or alcohol for at least 14 days prior to the study and throughout the trial. Each subject fasted overnight prior to the experiment and continued fasting for 4 h after dosing. On day 1 the subjects received a single dose of 375 mg of HEPP with 240 ml of water. Blood samples (5 ml) were collected before dosing and at 0.25, 0.50, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h post dosing. On day 3 the subjects received 375 mg/12 h of HEPP over 7 days in order to reach a steady state. Additional samples were collected on day 9 for assessment of trough levels, before the morning dose and 6 h after. On day 10 after the last dose of HEPP was administered serial blood samples were obtained for the pharmacokinetic profile of the drug at the same times as

the first dose. In all cases, plasma was separated by centrifugation and stored at -20°C until analysis.

Study in rabbits

The study was performed in 12 male New Zealand white rabbits which were randomly divided in two groups of six each (mean weight $2.5\text{ kg} \pm 0.028$). The animals were housed individually and fasted on the day before the experiment and continued fasting for 4 h after dosing with free access to water.

On day 1 both groups received HEPP, 30 mg/kg intraperitoneal (i.p.), and venous blood samples (1–2 ml) were drawn via an indwelling catheter from the marginal ear vein and transferred into K_3EDTA tubes, at time 0 (just before dosing) and at 0.083, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 8.0 and 10.0 h post dosing, in order to characterize the pharmacokinetic (PK) profile.

From days 2 to 6, group I received HEPP i.p. 30 mg/kg/24 h at 7 am and group II (control) received 0.9% saline solution. On day 7 the dosage schedule was modified and the drug was administered at 7 am, 7 pm and 11 pm and on day 8 the administration of HEPP or saline solution was at 3 am and 7 am. At this time blood samples were taken at the same times as the first dose, the PK profile was characterized as on day 1. Group II received saline solution at the same scheme as group I, until day 8 when a 30 mg/kg dose of HEPP was administered and the pharmacokinetic profile was characterized as on day 1. The plasma was separated by centrifugation and stored at -20°C until analysis.

HEPP assay

Analysis of plasma for HEPP was performed by high performance liquid chromatography [10]. Briefly, 50 μl of a methanolic solution of HEPA (*D,L*-2-hydroxy-2-ethyl-2-phenyl-acetamide, internal standard, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and 500 μl of sodium hydroxide (2 M) were added to 500 μl of plasma and mixed. Then, 500 μl of phosphate buffer (0.1 M, pH = 8.0) was added and mixed again. The sample was extracted with 5 ml of dichloromethane by mixing for 15 min in a horizontal shaker. After centrifugation for 15 min at $1650 \times g$, the organic layer was separated and

evaporated to dryness. The residue was dissolved in 200 μ l of mobile phase (acetonitrile–water 25:75 v/v) and 100 μ l was injected into a Hewlett Packard liquid chromatograph using a Hypersil column (5 μ m; 200 \times 4.6 mm) and a flow-rate of 0.8 ml/min. Detection was performed at 219 nm using an UV detector. The assay was linear in the range 0.39 to 100 μ g/ml. Mean within-day and inter-day reproducibility variation coefficients were 4% and 6%, respectively. The recovery ranged between 92% and 100.2%. Samples were stable for 3 months when stored at -20° C.

Pharmacokinetic analysis

The pharmacokinetic parameters of HEPP were calculated as follows: peak plasma concentration (C_{\max}) and time to reach the peak concentration (t_{\max}) were determined directly from the individual plasma concentration–time profiles. The area under the plasma concentration–time curve (AUC) was calculated to the last sampling point using the trapezoidal rule and extrapolated to infinite time as appropriate ($AUC_{0-\infty}$). The area under the curve at steady state was determined by using the trapezoidal rule. Total plasma clearance (Cl/F) was calculated as $Dose/AUC$, the volume of distribution (V_d) was estimated by dividing the clearance by the elimination rate constant, β . Predicted accumulation ratios (R_p) were estimated by the following equation [11].

$$R_p = \frac{1}{1 - e^{-\beta\tau}}$$

where β is the terminal rate constant calculated from the plasma concentration–time data on day 1 and τ is the dosing interval. R_o , the observed accumulation ratio was calculated by dividing AUC_{τ} in steady state by AUC_{∞} on day 1:

$$R_o = \frac{AUC_{\tau_{\text{SS}}}}{AUC_{\infty 1}}$$

Statistical analysis

Pharmacokinetic data were analysed by ANOVA, Student's t -test and by Mann-Whitney rank sum test. Differences were considered significant when $p < 0.05$. The results are expressed as mean (SD).

Results

Study in humans

All ten subjects who were included completed the study. HEPP was well tolerated during the multiple dose regimen, only tiredness of mild to moderate severity being observed. The pharmacokinetic parameters of HEPP are summarized in Table 1. After the first oral administration of a dose of 375 mg, HEPP was absorbed rapidly with a mean absorption half-life of 0.527 ± 0.20 h. The C_{\max} values varied considerably among subjects, from 4.2 to 26.5 μ g/ml. T_{\max} appeared to be independent of the number of doses administered. The values obtained after the single dose ranged from 0.9 to 3 h and after multiple

Table 1. Mean pharmacokinetics parameters of HEPP in humans after a single oral dose of 375 mg and after the last multiple dose (during the interval) of a regimen of 375 mg b.i.d./7 days

HEPP	t_{\max} (h)	C_{\max} (μ g/ml)	$t_{1/2}$ (h) ^a	AUC (μ g/ml h)	Cl/F (l/h)	V_d/F (l/kg)	Accumulation ratio R_o (observed)	Accumulation ratio R_p (predicted)
First single dose	2.25 (1.19)	8.40 (3.58)	18.78 (6.64)	168.76 (63.26) ^b	2.71 (1.0)	69.60 (25.12)	—	—
Last multiple dose	1.48 (0.85)	13.64 (5.56)*	13.43 (4.05)*	100.47 (34.03)* ^c	4.09 (1.27)	78.96 (8.75)	0.6064 (0.2497)	2.8204 (0.787)

Values are mean with (SD). t_{\max} , time to maximum plasma concentration; C_{\max} , maximum plasma concentration; $t_{1/2}$, half-life; AUC , area under the plasma concentration–time curve: ^aharmonic mean; ^b AUC from zero to infinity; ^c AUC during the interval; Cl/F , clearance; V_d , Volume of distribution; $R_o = AUC_{\tau}/AUC_{0-\infty}$ day 1; $R_p = 1/(1 - e^{-\beta\tau})$.

*Significant difference at $p < 0.05$.

administration from 0.5 to 3.0 h (Figure 1). When C_{\max} values were related to AUC (C_{\max}/AUC), significant differences were found between treatments. The mean C_{\max}/AUC values were $0.05377 \pm 0.016 \text{ h}^{-1}$ for a single dose and $0.136 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ for multiple administration ($p < 0.001$). In the same way AUC values showed significant differences ($p = 0.005$). Table 1 shows the Cl/F and V_d/F values obtained after single and multiple doses. It can be seen that after multiple doses Cl/F values increased, but no differences in V_d/F were found.

The sampling time after the last dose was performed over 72 h so the half-life after the multiple dose treatment could be determined. The results show that the half-life value was higher, $18.78 \pm 6.64 \text{ h}$, after the first dose compared with the multiple dose administration, $13.43 \pm 4.05 \text{ h}$. Our data indicate that the differences in Cl/F could be due to the differences in the elimination phase.

When the predicted accumulation ratio (R_p) was calculated, the obtained value did not reflect the observed ratios (R_o). In general, the observed ratio tended to be 78% lower than the predicted.

Study in rabbits

The pharmacokinetic profiles of HEPP after single and multiple doses in rabbits are shown

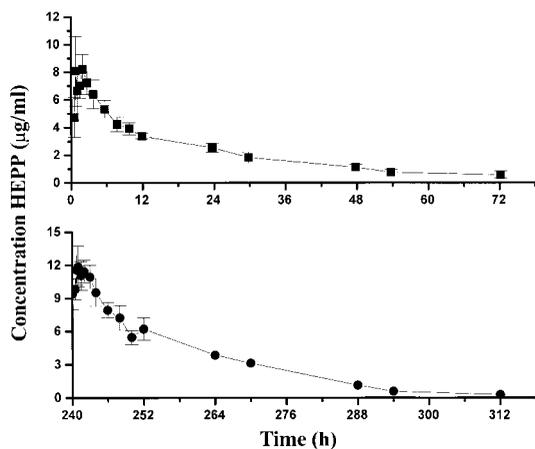


Figure 1. Mean plasma concentration–time profiles after the administration of first dose (■) and last dose (●) of multiple administration during 7 days of HEPP in ten healthy male volunteers

in Figure 2. After single dose administration, HEPP was absorbed with a mean absorption half-life of $0.362 \pm 0.5664 \text{ h}$. T_{\max} values were within 0.5–1 h in most animals. The mean terminal half-life was 1.5 h and the average AUC was $72.053 \mu\text{g/ml h}$. The administration of doses during 6 consecutive days gave similar results to those found in humans, decreased AUC and increased Cl/F values. There were significant differences in AUC , Cl/F and half-life values between regimens (Table 2). Likewise, V_d values did not show any change between the single and multiple dose treatments, 2.401 vs 2.421, respectively.

When the accumulation ratio was calculated it was found that the observed ratio value was lower than those predicted, however, the decrease was far less in rabbits than in man (13% and 78%, respectively), which could be due to differences in metabolism or to differences in the induction time.

Discussion

HEPP is an interesting compound which has been studied in animals and humans and the results have shown several advantages: mild toxicity [1], no teratogenic/mutagenic potential in animal studies [4–6], poor protein binding, suggesting few interactions, long half-life, fewer daily doses required, and it is well tolerated with

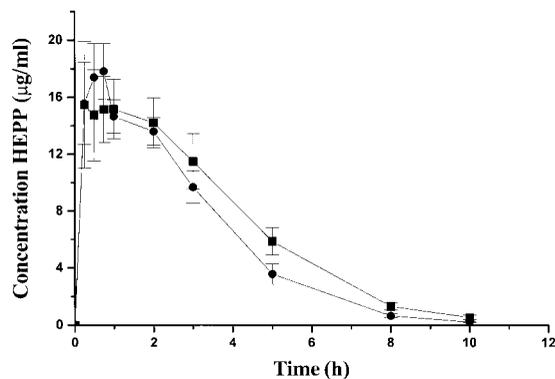


Figure 2. Mean plasma concentration–time profiles after the administration of first dose (■) and last dose (●) of multiple administration during 8 days of HEPP (i.p. 30 mg/kg) in male rabbits

Table 2. Mean plasma pharmacokinetics parameters of HEPP in rabbits after the i.p. administration of 30 mg/kg in single dose and multiple doses for 6 consecutive days

HEPP	t_{\max} (h)	C_{\max} ($\mu\text{g/ml}$)	$t_{1/2}$ (h) ^a	AUC ($\mu\text{g/ml h}$)	Cl/F l/h	V_d (l)	Accumulation ratio R_o (observed)	Accumulation ratio R_p (predicted)
First single dose	1.20 (1.08)	18.38 (8.5)	1.59 (0.36)	72.05 (17.98) ^b	0.92 (0.25)	2.40 (1.44)	—	—
Last multiple dose	0.75 (0.63)	19.84 (4.76)	1.21 (0.13)*	53.54 (7.28)* ^c	1.37 (0.18)*	2.42 (0.43)	0.86 (0.05)	1.00 (3.74E-05)

Values are mean with (SD). t_{\max} , time to maximum plasma concentration; C_{\max} , maximum plasma concentration; $t_{1/2}$, half-life; AUC, area under the plasma concentration-time curve: ^aharmonic mean; ^bAUC from zero to infinity; ^cAUC during the interval; Cl/F, clearance; V_d , volume of distribution; $R_o = \text{AUC interval}/\text{AUC}_{0-\infty}$ day 1; $R_p = 1/1 - e^{-\beta t}$.

*Significant difference at $p < 0.05$.

minor adverse events [7, 8], therefore it was considered important to continue the pharmacokinetic evaluation.

In the present study, the pharmacokinetics of HEPP were evaluated in humans and rabbits under single and multiple dose regimens to study the possibility of metabolic induction or inhibition. When the pharmacokinetic parameters of HEPP in man were evaluated it was found that following repeated oral doses, AUC decreased by 40.5% while Cl/F increased by 50.92%. These findings suggest that the pharmacokinetics of HEPP in man is dependent on the duration of administration.

Analysis of the data obtained in rabbits provided similar results: after repeated i.p. doses the mean AUC decreased by 25.6% while the Cl/F increased by 48.91%. The decrease in AUC and the increase in Cl/F after repetitive oral administration could be due to a decrease in bioavailability or to a metabolic induction process. Considering that in both species systemic clearance increased, it is possible that a metabolic induction process could be the explanation.

When the data obtained in both species were compared, it was found that although the increase in Cl/F was similar, the decrease in AUC was far less in rabbits than in man. These findings could be related to differences in drug administration or to differences in drug bioavailability. Simulations were performed in order to determine the expected C_{\min}

at steady state in humans. The results showed that the observed value was lower than the predicted value ($8.37 \pm 4.38 \mu\text{g/ml}$ vs $27.84 \pm 16.25 \mu\text{g/ml}$). When the accumulation factor was determined the same behaviour was found (0.6064 observed vs 2.820 predicted). In the same way the accumulation factor (R_o) in rabbits was lower than expected (0.8606 vs 1.00). These data again suggest a time dependence of HEPP after repeated doses.

Although efficacy, safety and tolerability are the primary criteria used for selecting an antiepileptic drug (AED) [12], the pharmacokinetic properties of an AED determine its ease of use. The most desirable and clinically important pharmacokinetic properties of an AED include good oral bioavailability, the availability of a parenteral formulation for acute treatment, long half-life, low protein-binding and linear elimination kinetics. The previous studies carried out with HEPP showed that the compound shows great promise as an antiepileptic, however, there are some points that might cause concern and should be further investigated to determine its possible clinical use, such as the metabolic and renal pathway and the induction of liver enzymes.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the support from CONACYT and from Armstrong Laboratorios de México.

References

1. Meza-Toledo SE, Zenteno-García MT, Juárez-Carvajal E, Martínez-Muñoz D, Carvajal-Sandoval G. A new homologous series of anticonvulsant: phenyl alcohol amides. *Arzneimittel forsch/Drug Res* 1990; **40**: 1289–1291.
2. Brailowsky S, Montiel T, Hernández E. Effects of HEPP on a new model of focal status epilepticus: The GABA-withdrawal syndrome. In *Proceedings of the Symposium on New Anticonvulsant Drugs Synthesized in Mexico*, Univ. Colima-CINUESTAV, Colima, México, May 1990.
3. Gómez LE, Cueva-Rolón R, Lehmann PA. Disposition kinetics of HEPP in rats after intravenous, oral, and intraperitoneal administration. Correlation of plasma and brain levels with the anticonvulsant effect. *Biopharm Drug Dispos* 1995; **16**: 77–89.
4. Gómez LE, Lehmann PA. Pharmacokinetic of the novel anticonvulsant HEPP after single intravenous administration of three different doses in dogs. *Biopharm Drug Dispos* 1995; **16**: 105–112.
5. Chamorro G, Salazar M, Salazar S, Ulloa V, Carvajal G, Martínez D. Evaluation of the toxic and teratogenic potential of the anticonvulsant drug 4-hydroxy, 4-ethyl, 4-phenylbutyramide in mice. *Arch Med Res* 1994; **4**: 441–446.
6. Mendoza F, López ML, Hernández A. Estudio preliminar de la hepatotoxicidad del anticonvulsivante DL-4-hidroxi, 4-etil, 4-fenil butiramida (HEPB) y sus homólogos inferiores (HEPP y HEPA). *Arch Neurocién (Mex)* 1996; **1**: 169–172.
7. Medina L, García L, Fernández A, Jung H. Pharmacokinetic interaction in rabbits between a new anticonvulsant DL-3-hydroxy-3-ethyl-3-phenylpropionamide and phenytoin. *J Pharm Pharmacol* 1998; **50**: 1393–1396.
8. González-Esquivel D, Rubio-Donnadieu F, Carvajal G, Jung H. Single dose pharmacokinetics of HEPP, a new anticonvulsant in normal healthy volunteers. *Biopharm Drug Dispos* 1998; **19**: 583–587.
9. Cramer JA, Smith DB, Mattson RH, et al. A method of quantification for the evaluation of antiepileptic drug therapy. *Neurology* 1983; **33** (Suppl 1): 26–37.
10. Gómez LE, Lehmann PA. Rapid and simple HPLC assay for the novel anticonvulsant D,L-3-hydroxy-3-ethyl-3-phenylpropionamide (HEPP) in plasma and urine. In *Proceedings of the Fourth Congress of Chemistry of North America*, Analytical Chemistry Division, American Chemical Society, New York, USA, 1991.
11. Gibaldi M, Perrier D. *Pharmacokinetics*. Marcel Dekker: New York, 1982.
12. Bourgeois BFD. Pharmacokinetic properties of current antiepileptic drugs. *Neurology* 2000; **55** (Suppl 3): S11–S16.

11.- BIBLIOGRAFÍA.

1. Acharya NV, Pickering RM, Wilton LW, Shakir SAW. The safety and effectiveness of newer antiepileptics: a comparative postmarketing cohort study. *Clin Pharmacol.* 2005; 45:385-393.
2. Vajda FJE. Pharmacotherapy of epilepsy: New armamentarium, new issues. *J Clin Neurosci.* 2007; 14:813-823.
3. Rogawski M. Diverse mechanisms of antiepileptic drugs in the development pipeline. *Epilepsy Res.* 2006; 69:273-294.
4. Malawska B. New Anticonvulsant agents. *Current topics in Medicinal Chemistry.* 2005; 5:69-85.
5. Meza-Toledo SE, Zenteno-García MT, Juárez-Carvajal E, Martínez-Muñoz D, Carvajal-Sandoval G. A New Homologous Series of Anticonvulsants: Phenyl Alcohol Amides. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 1990; 40 (II), 12: 1289-1291
6. Brailowsky S, Montiel T, Hernández E . Effects of HEPP on a new model of focal status epilepticus: The GABA-withdrawal syndrome. *Proceedings of the Symposium on New Anticonvulsant Drugs Synthesized in Mexico, Colima, May 1990.*
7. Brailowsky S, Kunimoto M., Silva-Barrat C, Menini, C, Naquet R. Electroencephalographic study of the GABA-withdrawal syndrome in rats. *Epilepsia* 221990; 31:369-377.
8. Brailowsky S, Montiel T, Hernández E, Marescaux C, Vergnes M. Effects of 3-hydroxy, 4-ethyl, 3-phenylpropionamide (HEPP) on rat models of generalized and focal epilepsy. *Epilepsy Res.* 1992; 11:167-172.

-
9. Brailowsky S, Kunimoto M, Menini, C, Silva-Barrat, Riche D Naquet R. The GABA-withdrawal syndrome: a new model of focal epileptogenesis. *Brain Res.* 1988; 442:175-179.
 10. Chamorro G, Salazar M, Salazar S, Ulloa V, Carvajal, Martínez D. Evaluation of the toxic and teratogenic potential of the anticonvulsant drug 4-hydroxy, 4-ethyl, 4-phenylbutyramide in mice. *Arch. Med. Res.*, 1994; 4: 441-446.
 11. Gómez LE. Estudios farmacocinéticos preclínicos del Nuevo anticonvulsante D, L-3-hidroxi-3-etil-3-fenilpropionamida (HEPP). Tesis Doctoral. CINVESTAV-IPN. 1993.
 12. Gómez LE, Cueva-Rolón R, Lehmann PA. Disposition kinetics of HEPP in rats after intravenous, oral, and intraperitoneal administration. Correlation of plasma and brain levels with the anticonvulsant effect. *Biopharm. Drug Disp.*, 1995; 16:77-89.
 13. Gómez ML, Lehmann P. Pharmacokinetics of the novel anticonvulsant HEPP after single intravenous administration of three different doses in dogs. *Biopharm. Drug Disp.* 1995; 16:105-112.
 14. García AL, Medina RL, Jung CH. Unión a proteínas plasmáticas de la DL-3-hidroxi-3-etil-3-fenil-propionamida (HEPP) un nuevo anticonvulsivante. *Rev Soc Quím Méx* 1999; 43:39-42.
 15. García Aguirre Luis. "Farmacocinética preclínica del HEPP" Tesis de Maestría. Fac. de Química, DEPg, UNAM. 1997.
 16. Medina L, García L, Pérez R, Fernández A, Jung H. Pharmacokinetic interaction in rabbits between a new anticonvulsant, DL-3-hydroxy-3-ethyl-3-phenylpropionamide, and phenytoin. *J Pharm Pharmacol.* 1998; 50:1393-1396.
 17. García AL, Medina RL, Pérez MR, Jung CH. Lack of interaction between HEPP, a new antiepileptic agent, and carbamazepine in rabbits. *Biopharm Drug Disposit.* 2003; 24:205-209.

-
18. Meldrum BS, Rogwaski MA. Molecular targets for antiepileptic drug development. *Neurotherapeutics* 2007; 4:18-61.
 19. Holmes GL. The interface of preclinical evaluation with clinical testing of antiepileptic drugs: role of pharmacogenomics and pharmacogenetics. *Epilepsy Res.* 2002, 50:41-54.
 20. Depont Ch. The potential of pharmacogenetics in the treatment of epilepsy. *Europ. J Paediatric Neurol Soc.* 2006; 10:57-65.
 21. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for Industry. Content and format of Investigational new drug applications (INDs) for Phase 1 studies of drugs, including well-characterized, therapeutic, biotechnology-derived products. December 1997
 22. Commission on Antiepileptic drugs of the International League against Epilepsy. Guidelines for clinical evaluation of antiepileptic drugs. *Epilepsia.* 1989; 30:400-408.
 23. Klitgaard H, Matagne A, Lambert Y. Use of epileptic animals for adverse effect testing. *Epilepsy Research.* 2002; 50:55-65.
 24. Perucca E, Berlowitz D, Birnbaum A, Cloyd JC, Garrard J, Hanlon JT, Levy RH, Pugh MJ. Pharmacological and clinical aspects of antiepileptic drug use in the elderly. *Epilepsy Res.* 2006; 68S:S49-S63.
 25. Pitkänen A. Efficacy of current antiepileptics to prevent neurodegeneration in epilepsy models. *Epilepsy Research.* 2002; 50:141-160.
 26. Gracia GF. Epidemiología de la epilepsia en: Medina MT coord., Actualidades en las epilepsias. Series del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. 2002.
 27. de Cabo-de la Vega C, Villanueva-Hernández P, Prieto-Martín A. Neuroquímica de la epilepsia, neurotransmisión inhibitoria y modelos experimentales: nuevas perspectivas. *Rev Neurol.* 2006;42:159-168.

-
28. [Deckers CL](#), [Czuczwar SJ](#), [Hekster YA](#), [Keyser A](#), [Kubova H](#), [Meinardi H](#), [Patsalos PN](#), [Renier WO](#), [Van Rijn CM](#). Selection of antiepileptic drug polytherapy based on mechanisms of action: the evidence reviewed. *Epilepsia* 2000; 41:1364-1374.
29. Arenas Hernández GR. Estudio analítico del anticonvulsivante DL-4 hidroxil, 4-etil, 4-fenil butiramida (HEPB) y de sus homólogos inferiores: propionamida (HEPP) y acetamida (HEPA). *Arch. Neurocienc (Mex)*. 1996; 1:65-68.
30. Hernández-Gallegos Z, Lehman PA. Partition coefficients of three new anticonvulsants. *J Pharm Sci*. 1990; 79:1032-1033.
31. Carvajal G, Russek M, Tapia R, Massieu G. Anticonvulsive action of substances designed inhibitors of gamma-amino-butyric acid beta-ketoglutaric acid transaminase. *Biochem Pharmacol*. 1964; 13:1059-1069.
32. Joseph-Nathan P, Massieu G, Carvajal G, Tapia R. Gamma-hydroxi, gamma-phenyl, caproamide, an anticonvulsant molecule. *Rev Latinoamer Quím*. 1978; 9:90-92.
33. Carvajal G, Massieu. Gama-hidroxi-etil-gama-fenil-butiramida (HEPB) nuevo agente anticonvulsivante agonista del GABA. En: *Neurobiología, Simposio Internacional*, Velasco-Suárez M, Escobedo-Ríos F. (eds), pp 103-115, Progreso, México (1979).
34. Javier AM, Sánchez G, Martínez de Muñoz D. Espectro de acción antiepiléptica de la DL-4-hidroxi, 4-etil, 4-fenil butiramida y sus homólogos inferiores. *Arch Neurocienc (Mex)*. 1996; 1:76-80.
35. Martínez de Muñoz D. Anticonvulsant action of γ -Hydroxy, γ -Ethyl, γ -Phenyl Butyramide in mice treated with 4-aminopyridine. In *Advances in Epileptology: XIth Epilepsy International Symposium*. Canger R, Angelery F, Penry JK, eds. Raven Press, N. Y. 1980:463-465.

-
36. Solís H, Galindo-Morales JA, Bravo J. Efecto de la DL-4-hidroxi,4-etil, 4-fenil butiramida (HEPB) y de su homólogo propionamida (HEPP) sobre la excitabilidad neuronal. *Ciencia*, 1992; 43:1-3.
37. Solís H, Jurado JL, Fernández Guardiola A. La acción de la butiramida sobre el desarrollo de la kindling y el kindling amigdalino ya establecido en el gato. En: *Neurobiología, Simposio Internacional*, Velasco-Suárez M, Escobedo-Ríos F. (eds), pp 83-94, Progreso, México (1979).
38. Bowery NG. GABAB receptor: a site of therapeutic benefit. *Current Opinion in Pharmacology* 2006; 6:37-43.
39. Hammond DL. GABAB receptors: new tricks by an old dog. *Curr Opin Pharmacol*. 2001; 1:26-30.
40. Meza-Toledo SE, Martínez-Muñoz D, Carvajal-Sandoval G. Inhibition of R-[³H]-baclofen binding to rat brain synaptic membranes by a homologous series of phenyl alcohol amides anticonvulsants and their evaluation as GABA_B receptor blockers. *Arzneim. Forsch./Drug Res*. 1998, 48 (II), 11:1051-1057.
41. Meza-Toledo S, Lira-Zárate F, Robles-Martínez EL, Peralta-Álvarez B, Cabrera-Cedillo F, Peralta-Cruz J, Cruz-Peinado C, Miñón-López H. Síntesis of DL-Fluorobenzamides as anticonvulsants. *Arzneim-Forsch Drug Res*. 2008; 58:155-158.
42. Meza-Toledo S, Carvajal-Sandoval G. Preparación de nuevas fenilaminas anticonvulsiantes. *Gac. Méd. Mex*. 2007; 143:34-38.
43. Chamorro G, González Esquivel D. Estudios toxicológicos y farmacocinéticos preclínicos de fenil alcohol amidas, moléculas anticonvulsiantes. E.N.C.B.-IPN. 2001

-
-
44. Roldán ML. Tesis de licenciatura. Farmacocinética de 3 feniletihidroxiamidas anticonvulsiantes en conejo. Universidad de Veracruz.
 45. Luna FMR, Gómez-Martínez LE. Pharmacokinetics of D,L-3-hydroxy-3-ethyl-3-phenylpropionamide (HEPP) in pregnant rats at different stages of gestation and maternal-fetal disposition during late pregnancy. *Reproductive Toxicology* 2003; 17:177-184.
 46. Boxenbaum H, CDilea. First-time-human-dose selection: Allometric thoughts and perspectives. *J Clin Pharmacol* 1995; 35:957-966.
 47. Mahmood I, Green MD, Fisher JE. Selection of the first-time dose in humans: Comparison of different approaches based on interspecies scaling of clearance. 2003; 43:692-697.
 48. ICH Harmonised Tripartite Guidelines Text on validation of analytical procedures. ICH Steering Committee, 1988.
 49. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
 50. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. 18th WMA General Assembly. Helsinki, Finland, June 1964. Amended by 29th (1975), 35th (1983), 41st (1989), 48th (1996), and 52th (2000) WMA General Assemblies.
 51. ICH Harmonised Tripartite Guidelines for Good Clinical Practice. ICH Steering Committee, 1988.
 52. Agard A. Informed consent: theory versus practice. *Nat Clin Pract Cardiovas Med*. 2005; 2:270-272.

-
-
53. U.S. Food and Drug Administration: Draft guidance for industry and reviewers: estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. *Fed Reg* 2003;68:2340-2341
54. Gibaldi M, Perrier D. Pharmacokinetics. 2a edición., Marcel-Dekker, New York, 1982.
55. Gough K, Hutchinson M, Keene O, Byrom B, Ellis S, Lacey L, McKellar J. Assessment of dose proportionality: report from statisticians in the pharmaceutical industry/ pharmacokinetics UK joint working group party. *Drug Inf J*. 1995; 29:1039-1048.
56. Yogeewari P, Vaigunda J, Sriram D. An update on GABA analogs for CNS drug discovery. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*. 2006; 1: 113-118.
57. Morselli PL, Biandrate P, Frigerio A, Garattini S. Pharmacokinetics of carbamazepine in rats and humans. *Europ J Clin Pharmacol Ther*. 1972; 2:297-
58. Levy R, Pitlick WH, Troupin AS, Green JR, Neal JM. Pharmacokinetics of Carbamazepine in normal man. *Clin Pharmacol Ther*. 1975; 17:657-668.
59. Bernus I, Dickinson RG, Hooper WD, Eadie MJ. Dose-dependent metabolism of carbamazepine in humans. *Epilepsy Res*. 1996; 24:163-172.