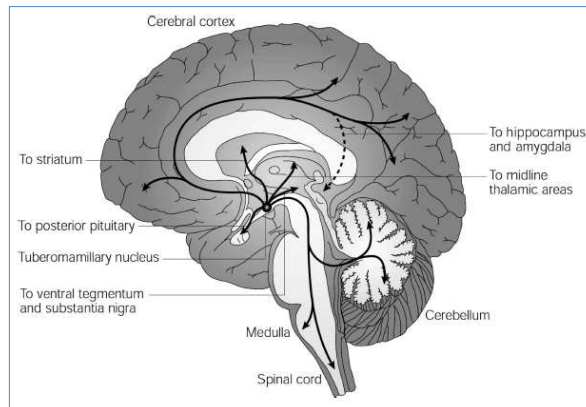


PERFIL FARMACOLÒGIC DE SEGURETAT A NIVELL DEL SISTEMA NERVIÓS CENTRAL D'UN NOU FÀRMAC SELECTIU PEL RECEPTOR D'HISTAMINA H₄



TREBALL DE RECERCA

Joan Cabellos Vique

PALAU PHARMA S.A

Departament de Farmacologia i Toxicologia

Palau-i-solità de Plegamans, Juliol 2010

(Directora del treball: Dra. Dolors Balsa)

Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Farmacologia, Terapèutica i Toxicologia

Unitat de Medicina

(Tutora del treball: Dra. Victòria Clos)

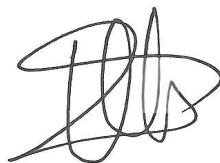
Treball de recerca presentat per Joan Cabellos Vique sota la direcció de la doctora Dolores Balsa al Departament de *Pharmacology & Toxicology* de l'àrea de *Drug Development & Clinical Research* de PALAU PHARMA S.A.

Treball adscrit al departament de Departament de Farmacologia, Terapèutica i Toxicologia , Universitat Autònoma de Barcelona, sota la tutoria de la doctora Victòria Clos.

Vist-i-plau de la directora i de la tutora:



Dra. Dolores Balsa



Dra. Victòria Clos

Joan Cabellos

Agraïments

Vull expressar el meu agraïment per la col·laboració i l'ajuda que m'ha ofert la meva família i totes les persones que han fet possible la realització d'aquest treball de recerca.

A la directora d'aquest treball, la Dra. Dolors Balsa, per confiar en mi a l'hora de realitzar aquest treball i per donar-me el seu suport.

Al Dr. Manel Merlos per haver-me encoratjat a la realització d'aquest treball.

A PALAU PHARMA S.A per donar-me l'oportunitat de presentar-lo.

A la Dr. Victòria Clos per acceptar fer-me de tutora.

Als meus companys, que m'han encoratjat i han col·laborat en la realització d'aquest treball: Adoración Rodríguez, Cristina Gerbolés, Josep Moreno, Hernán Serna, Gemma Janer, José Alfón, Alberto Fernández, Sonia Sanchez, Pedro Michelena, Juan Román, Assumpta Oliveres i Alicia García.

Finalment, vull fer menció especial, a la Carolina Salcedo, perquè va ser la primera persona que em va introduir al món de la Farmacologia i em va transmetre la seva il·lusió i ganes de treballar en aquest camp.

INFORMACIÓ GENERAL

AUTOR.

Joan Cabellos Vique

TÍTOL.

Perfil farmacològic de seguretat a nivell del sistema nerviós central d'un nou fàrmac selectiu pel receptor d'histamina H₄.

ANY D'ELABORACIÓ.

2010

DIRECTOR DEL TREBALL.

Dolors Balsa

TIPUS DE TREBALL.

Treball de recerca

DEPARTAMENT I CENTRE.

Departament de Farmacologia i Toxicologia (Drug Development & Clinical Research). PALAU PHARMA S.A.

PARAULES CLAU.

Sistema nerviós central ; receptor H₄ ; *in vivo*

CONFLICTE D'INTERÈS

L'autor d'aquest treball forma part de la plantilla de PALAU PHARMA S.A.

1. RESUM	1
2. INTRODUCCIÓ.	2
2.1. La histamina i el seu paper en la fisiologia humana.....	2
2.2. Histamina i el seu paper en el sistema nerviós.	4
2.2.1. <u>Història</u>	4
2.2.2. <u>El sistema histaminèrgic.</u>	5
2.2.3. <u>Els receptors histaminèrgics a nivell del SNC.</u>	6
2.2.3.1 Receptors H ₁ (H ₁ R).....	6
2.2.3.2. Receptors H ₂ (H ₂ R)	6
2.2.3.3. Receptors H ₃ (H ₃ R)	7
2.2.3.4. Receptors H ₄ (H ₄ R)	7
2.3. Fàrmacs antihistamínics pel receptor H1. Efectes adversos.....	8
2.4. Estudis de seguretat farmacològica a nivell del sistema nerviós.....	9
2.4.1. <u>Functional Observational Battery Test (FOB).</u>	10
2.4.2. <u>Model de convulsions induïdes per pentilentetrazol.</u>	11
3. OBJECTIUS.	12
4. MATERIALS I MÈTODES.....	13
4.1. Estudis in vitro.....	12
4.1.1. <u>Afinitat del Compost A pels receptors de la histamina H₄ de rata.</u>	12
4.2. Estudis in vivo.....	13
4.2.1. <u>Functional Observational Battery test (FOB)</u>	14
4.2.2. <u>Model de convulsions induïdes per pentilentetrazol.</u>	18

5. RESULTATS	20
5.1. Estudis <i>in vitro</i>. Afinitat del Compost A pels receptors histaminèrgics	20
5.2. Estudis <i>in vivo</i>	20
5.2.1. <u>Functional Observational Battery Test (FOB)</u>	20
5.2.2. <u>Model de convulsions induïdes per pentilentetrazol</u>	27
6. DISCUSSIÓ	28
7. CONCLUSIONS	31
8. BIBLIOGRAFIA	32

Abreviatures

ADN: àcid desoxirribonucleic

ARNm: àcid ribonucleic missatger

ANOVA: analysis of variance

BPL: bones pràctiques de laboratori

CMC: carboximetilcel·lulosa

DRG: dorsal root ganglion

EE: error estàndard

EMA: European Medicines Agency

FDA: Food and Drug Administration

HDC: histidina-decarboxilasa

ICH: International Conference on Harmonization

KO: *knockout*

PTZ: pentilentetrazol

SNC: sistema nerviós central

NTM: nucli tuberomamilar.

1. RESUM

Amb l'objectiu d'identificar els possibles efectes adversos d'una nova molècula antagonista del receptor de la histamina H₄ (Compost A) en el sistema nerviós central (SNC), es va realitzar el test més àmpliament emprat per aquest fi: el test anomenat FOB (Functional Observational Battery test) en el qual es fa servir la rata com a model animal d'estudi.

L'estudi FOB forma part dels d'estudis principals (*Core Battery Studies*) de la farmacologia de seguretat requerida per les autoritats reguladores per tal d'iniciar els estudis clínics en humans (ICH Topic S7A: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals; FDA & EMA).

D'altra banda i per tal de complementar aquests estudis principals, es va avaluar el potencial efecte convulsivant del Compost A mitjançant el model de convulsions induïdes per pentilentetrazol en rata. Aquest efecte proconvulsionant ha estat associat de manera puntual als fàrmacs antagonistes dels receptor H₁ i de manera particular en la població infantil. L'estudi de les convulsions forma part dels *Follow Up Studies* recomenats per la ICH S7A.

El Compost A en cap de les dosis administrades, en cap dels assaigs realitzats, mostra una activitat depressora o estimulants en el sistema nerviós. Es caracteritza per tant, per primera vegada, part del perfil de seguretat a nivell del SNC d'un fàrmac antagonista selectiu del receptor H₄ de la histamina.

2. INTRODUCCIÓ.

2.1. La histamina i el seu paper en la fisiologia humana.

El nom d'histamina que se li va donar a la imidazoletilamina indica que es tracta d'una amina que es troba en teixits (del grec ιστός: histós "teixit"). La presència i l'activitat biològica de la histamina van ser detectades gairebé fa un segle mitjançant l'estudi de la contracció del teixit muscular llis en els intestins i en l'estudi dels mecanismes responsables de la vasodilatació.

La histamina és un missatger químic de presència ubiqua que presenta nombroses funcions a través de, com a mínim, quatre receptors farmacològicament diferents, membres de la família de receptors acoblats a proteïna G (Hill et al.,1997) (taules 1 i 2).

El receptor H_1 s'expressa a en el cervell, les cèl·lules endotelials i les cèl·lules de la musculatura llisa. El paper principal d'aquest receptor el trobem en la contracció de la musculatura llisa i en l'augment de la permeabilitat vascular. Moltes de les seves funcions contribueixen a les respostes al·lèrgiques, de tal manera que els antagonistes pel receptor H_1 han esdevingut fàrmacs de molt èxit en el tractament dels processos al·lèrgics.

El receptor H_2 està implicat en la modulació de la secreció gàstrica d'àcid. Els antagonistes d'aquest receptors s'utilitzen de manera molt extensa en el tractament de les úlceres gàstriques (Soll and Walsh, 1979).

El receptor H_3 s'expressa predominantment en humans en el sistema nerviós central (Lovenberg et al., 1999, 2000). El seu paper en la fisiologia humana no es coneix de manera exacta, però s'hipotetitza la seva funció com autoreceptor presinàptic implicat en la regulació de l'alliberació d'histamina, norepinefrina, serotonina i GABA entre d'altres.

Recentment, un quart receptor histaminèrgic (H_4) ha estat identificat (Nakamura et al., 2000; Oda et al., 2001; Zhu et al., 2001). La homologia de la seva seqüència d'aminoàcids respecte el receptor H_3 és de un 35%, i molt menor respecte als receptors H_1 i H_2 . Aquesta característica es veu reflectida en el perfil farmacològic de lligants coneguts dels receptors d'histamina, on la majoria d'agonistes i antagonistes pels receptors H_1 i H_2 no s'uneixen al receptor H_4 . Tanmateix, alguns dels lligands del receptor H_3 (com la tioperamida, el clobenpropit, imetit, i la R- α -metilhistamina) s'uneixen al receptor H_4 , tot i que amb afinitats diferents a les del receptor H_3 (Jablonowski et al.; 2003 i Fung-Leung et al., 2004).

A diferència del receptor H₃, que s'expressa de manera gairebé exclusiva en el sistema nerviós central, el receptor H₄ s'expressa en cèl·lules del sistema immunitari: mastòcits, eosinòfils, basòfils, cèl·lules dendrítiques, i diversos subtipus de cèl·lules T. Alguns estudis han trobat que el receptor també s'expressa en monòcits, neutròfils i en el sistema nerviós perifèric i central (Nakamura et al., 2000 ; Oda T et al., 2000 ; Liu C et al., 2001 ; Zhu Y et al., 2001 ; Nguyen T et al., 2001). Aquesta prevalent distribució en les cèl·lules hematopoètiques suggereix un paper important en les reaccions immuno-inflamatòries de naturalesa al·lèrgica.

Aquesta hipòtesis ha estat confirmada amb l'estudi del ratolí KO pel receptor H₄ durant processos al·lèrgics així com amb antagonistes selectius pel receptor H₄, els quals han mostrat una activitat prometedora disminuint la resposta immunitària en un ampli número de models patològics incloent models d'inflamació aguda, de malaltia inflamatòria intestinal i de inflamació al·lèrgica respiratòria (Dunford PI et al, 2006, Takeshita K et al, 2003, Varga C et al, 2005, Fogel WA et al, 2005).

Properties	H1R	H2R
Chromosome gene locus	3p25	5q35.2
Protein (amino acids)	487	359
G protein isoforms	G _{q/11}	G _{αs}
Constitutive activity	+	+
Signal transduction	PLC IP ₃ , DAG Ca ²⁺ , PKC AMPK, NF-κB	AC cAMP, PKA CREB
Effector pathways	TRPC I _K leak ↓	I _h (HCN2) I _{AHP} ↓
Cellular function	Postsynaptic excitability and plasticity†	Postsynaptic excitability and plasticity
Systemic function	Behavioral state and reinforcement (novelty, arousal)	Learning and memory (consolidation)
Pathophysiology	Working memory Feeding rhythms Energy metabolism Endocrine control Disorders of sleep, mood, memory, eating, and addiction	Schizophrenia
	Pain and neuroinflammation	Pain and neuroinflammation

Taula 1. Propietats moleculars i funcionals dels receptors H₁ i H₂ de la histamina al sistema nerviós (Hass et al., 2008).

Properties	H3R	H4R
Chromosome gene locus	20q13.33	18q11.2
Protein (amino acids)	445	390
G protein isoforms	G _{v/o}	G _{v/o}
Constitutive activity	++*	?
Signal transduction	AC ↓ cAMP ↓ MAPK Akt/GSK3	AC ↓ cAMP ↓ MAPK
Effector pathways	I _{Ca} ↓	Cytoskeleton
Cellular function	Presynaptic transmitter release‡ and plasticity	?
Systemic function	Numerous CNS functions,‡ cognition, emotion, learning, and memory Blood-brain barrier control	Chemotaxis
Pathophysiology	Disorders of sleep, mood, memory, eating, and addiction pain and neuroinflammation	?

Taula 2. Propietats moleculars i funcionals dels receptors H₃ i H₄ de la histamina al sistema nerviós (Hass et al., 2008).

2.2. Histamina i el seu paper en el sistema nerviós.

2.2.1. Història.

La presència de la histamina en el cervell, predominantment en la matèria grisa, va ser per primer cop descrita al 1941 per Kwiatkowski i al 1959 per White (Haas et al.; 2008) demostrant la seva síntesi i catabolisme en el cervell. Els efectes sedants del antihistamínic van fer iniciar els primers treballs i postular teories sobre el paper de la histamina en l'estat de vigília. Els nous avanços en la metodologia han demostrat amb major detall el procés síntesi de la histamina per part de la histidina Descarboxilasa (HDC), i el recanvi de la histamina en el cervell.

En els anys seixantes, unes altres amines biogèniques van ser descobertes, i la localització exacta dels sistemes catecolaminèrgics i serotoninèrgics, i el seu paper en la majoria de desordres psiquiàtrics va acaparar els interessos de les neurociències. D'altra banda, el paper de la histamina en el sistema nerviós va romandre en un segon pla, tot hi el descobriment de neurones histaminèrgiques i les seves projeccions funcionals. Els efectes de la histamina i els seus antagonistes en cèl·lules de nervis aïllats en diferents regions del sistema nerviós central així com la seva influència en la modificació del comportament després de la seva

infusió en els ventricles cerebrals o en diferents regions del cervell, suggerien clarament el paper de la histamina com a neurotransmissor. No obstant això, aquest paper va guanyar reconeixement de manera molt lenta.

2.2.2. El sistema histaminèrgic

El sistema histaminèrgic es troba ben conservat a través de la filogènia, des dels mol·luscs fins als humans, amb una disposició morfològica i funcional força comparable: en tots ells modula i activa el sistema nerviós en funció de canvis metabòlics i ambientals, des de estats d'alerta relacionats amb el consum de menjar en els còrquils, fins a els estats de vigília i atenció en els vertebrats.

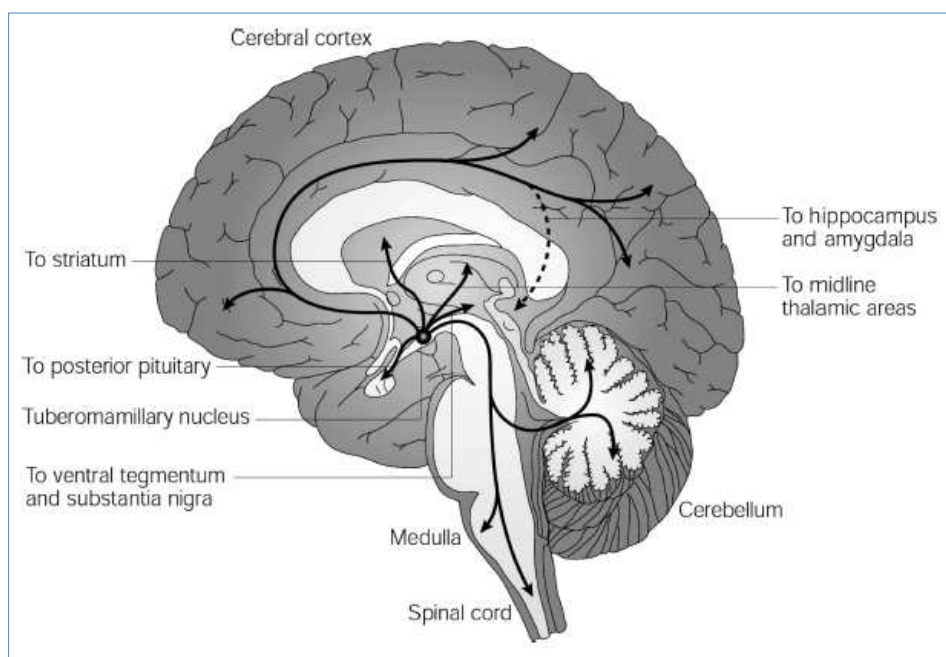


Figura1. Sistema histaminèrgic en el cervell humà: les fibres histaminèrgiques que sorgeixen del nucli tuberomamilar (NTM) es projecten al llarg de tot el sistema nerviós central.

La seva localització anatòmica s'ha descrit de manera precisa en el nucli tuberomamilar (NTM) mitjançant tècniques d'immunohistoquímica per la histamina i la histidina descarboxilasa (HDC). Es coneix també la localització aproximada de neurones histaminèrgiques en l'hipotàlem posterior.

El sistema histaminèrgic en humans és força extens amb unes 64.000 neurones dins i al voltant del NTM. Encara que no es disposa d'una anàlisi detallada de les projeccions histaminèrgiques en el cervell humà, sí que es coneix l'existència d'una xarxa de fibres varicoses immunoreactives en el còrtex, principalment a la làmina I.

En l'hipotàlem dels rosegadors, les dendrites de les neurones del NTM estableixen contacte amb la superfície del cervell. En humans, els axons varicosos de l'hipotàlem posterior també es projecten cap a la mateixa regió cerebral. En la rata quatre subgrups de nuclis histaminèrgics poden ser identificats: una part ventral més gran corresponent al clàssic NTM, una part medial que inclou els nuclis supramamilaris, un àrea caudal paramamilar i finalment una àrea minoritària a nivell lateral.

2.2.2. Els receptors histaminèrgics a nivell del SNC.

2.2.3.1. Receptor H₁ (H₁R).

El H₁R es troba a tot el cos humà incloent el sistema nerviós amb considerables diferències entre espècies. Una elevada densitat de H₁R no sempre correlaciona amb una alta innervació histaminèrgica ja que una major proporció de H₁R es troba associada a elements no neuronals, tals com la glia, cèl·lules y vasos sanguinis. Una alta densitat de H₁R es troba en regions del cervell (l'hipotàlem, els nuclis del tronc cerebral, el tàlem i el còrtex) relacionades amb el sistema neuroendocrí, el comportament i el control nutricional. A través dels H₁R la histamina exerceix un efecte excitador en aquestes regions. En el cervell humà la major concentració de H₁R es troba al còrtex cerebral i en estructures infralímbiques.

La pèrdua total de funció dels H₁R en el ratolí *knockout* (KO) (Masaki T et al., 2006) produeix alteracions immunològiques, metabòliques i alteracions en la conducta similars a les trobades en els ratolins KO per la HDC. D'altra banda, tots els fàrmacs antihistamínics pel receptor H₁ funcionen estabilitzant el receptor en el seu estat inactiu i són per tant agonistes inversos. Els antihistamínics clàssics que actuen sobre els H₁R tenen propietats sedatives prou conegudes (Reiner PB et al., 1994).

2.2.3.2. Receptor H₂ (H₂R).

El receptor tipus 2 per a la histamina es distribueix en el ratolí de manera de manera molt àmplia en el cervell, i de manera més consistent que els receptors H₁, moltes d'aquestes zones es corresponen amb les projeccions histaminèrgiques, indicant que els H₂R són la diana a nivell postsinàptic de moltes de les accions de la histamina.

Els ratolins KO per aquest receptor tenen deficiències cognitives: afectació de les funcions de l'hipocamp, de la percepció del dolor, de les funcions gàstriques i de les funcions immunològiques (taula 1).

2.2.3.3. Receptor H₃ (H₃R).

Els receptor H₃ és un autoreceptor i heteroreceptor que es troba a nivell presinàptic. Es troba abundantment expressat en el SNC en diferents espècies de mamífers (Chazot et al 2001, Pillot et al 2006, Cannon et al 2006) incloent l'espècie humana (Coge et al, 2001a).

Com autoreceptors, els H₃ es troben al soma, dendrites i axons de les neurones del NTM, activats de manera constitutiva i inhibint l'alliberació i la síntesi d'histamina. Com heteroreceptor, els H₃ controlen l'alliberació d'una gran varietat de neurotransmissors, incloent acetilcolina, glutamat, GABA i neuropèptids.

Els H₃R es troben expressats de manera heterogènia en aquelles àrees que reben les projeccions histaminèrgiques. Altes densitats d'aquest receptor es troben de manera particular en les parts anteriors del còrtex cerebral, l'hipocamp, l'amígdala, el *nucleus accumbens*, l'estriat, el cerebel, la substància *nigra* y el tronc cerebral.

La pèrdua de funció dels receptors H₃ en ratolins KO està associada amb anormalitats en el comportament, locomoció reduïda, síndrome metabòlic amb hiperfàgia, obesitat, augment dels nivells d'insulina i leptina, i un augment de patologies neuroinflamatòries (taula 2).

2.2.3.4. Receptor H₄ (H₄R).

L'expressió del receptor H₄ en el cervell és controvertida. Diferents grups d'investigació no han pogut detectar la seva expressió en el SNC, mentre que alguns laboratoris han descrit la seva presència en diferents parts del SNC com l'amígdala, el cerebel, l'hipocamp, el nucli caudat, la substància *nigra*, el tàlem i l'hipotàlem (Coge et al 2001; Liu et al 2001).

En humans, l'expressió més elevada del ARNm del receptor H₄ es troba a la medul·la espinal, seguit de l'hipocamp, el cerebel i altres regions cerebrals (figura 2A). De manera semblant, el receptor H₄ s'expressa també en el SNC de la rata tot hi que els nivells més elevats es troben al còrtex i al cerebel, seguit per l'expressió en el tronc cerebral. De la mateixa manera que en els humans, existeix una expressió significativa a nivell de la medul·la espinal, principalment en els ganglis dorsals (DRG)(Figura 2B).

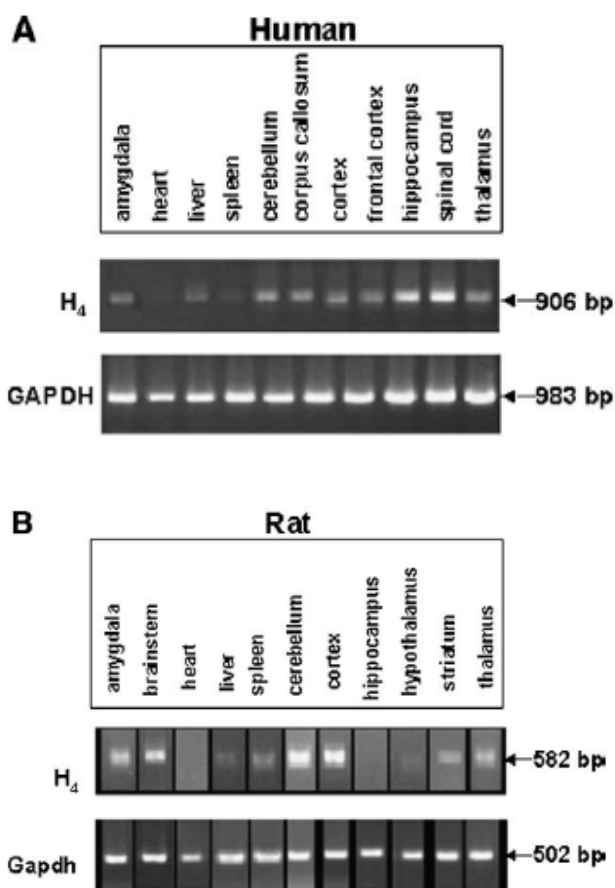


Figura 2. Detecció del ARNm del receptor H₄ en el sistema nerviós central d'humans (A) i en el sistema nerviós de la rata (B). MI Strachova, et al. Brain Res 2009, 1250: 41-48.

Aquesta expressió en els DRG és d'origen neuronal (en les terminals dels nervis aferents perifèrics) i no glial, el que pot suggerir la possibilitat de que els H₄R puguin tenir un paper en la percepció del dolor i de la sensació de picor, postulant els antagonistes per aquest receptor com a tractament potencial del dolor neuropàtic i la prurit. (Strakhova M. I., 2009).

2.3. Fàrmacs antihistamínics pel receptor H₁. Efectes adversos.

El desenvolupament de fàrmacs antihistamínics H₁ de primera generació pel tractament dels processos al·lèrgics ha anat acompanyat de manera inherent d'un seguit de reaccions adverses degudes a la seva relativa manca de selectivitat i la seva acció en el sistema nerviós central.

L'efecte advers més comú és la sedació. Altres efectes adversos comuns en antihistamínics H₁ de primera generació, inclouen marejos, tinnitus, visió borrosa, eufòria, manca de coordinació, ansietat, insomni, tremolors, nàusees i vòmits, restrenyiment, diarrea, boca seca, i tos seca. (Simons F., 2004). Entre els efectes

adversos poc freqüents s'inclouen retenció urinària, palpitations, hipotensió, mal de cap, al·lucinacions i psicosi.

Els fàrmacs antihistamínics de segona generació són molt més selectius pels receptors d'histamina H₁, tenen un pas de barrera hematoencefàlica menor i per tant, tenen un millor perfil de tolerabilitat en comparació amb els de primera generació. No obstant això, no resten lliures de presentar efectes adversos, entre els que es troben: somnolència, mal de cap, fatiga, nàusees i sequedat a la boca. De manera puntual aquest grup de fàrmacs s'ha associat a l'aparició de convulsions principalment en nens.

2.4. Estudis de seguretat farmacològic a nivell del sistema nerviós.

L'origen del terme "Farmacologia de seguretat" va aparèixer per primer cop en els esborranys de les guies de la ICH "Non-Clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals", Topic M3, and "Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology derived Pharmaceuticals", Topic S6. Aquesta última guia va establir que "l'objectiu de la farmacologia de seguretat havia de ser revelar els efectes funcional en els sistemes fisiològics principals (el sistema cardiovascular, el respiratori, el renal i el sistema nerviós central)". El grup d'experts del tema S7 (ICH Topic S7 Expert Working Group) va començar la seva feina al 1999 i la guia va ser finalitzada i aprovada per les autoritats reguladores entre els anys 2000 i 2001 (ICH S7A).

La guia descriu els objectius i els principis de la farmacologia de seguretat i diferencia nivells d'investigació: *Core Battery Studies* o estudis principals, *Follow up Studies* o de seguiment, i *Supplemental Studies* o suplementaris. D'altra banda, estableix el moment en que s'han de portar a terme aquestes investigacions i la seva relació amb els estudis clínics, així com la seva execució sota BPL (Bones Pràctiques de Laboratori) quan sigui aplicable.

El sistema cardiovascular, el respiratori i el sistema nerviós central van ser seleccionats com a objectiu dels "estudis principals" de la farmacologia de seguretat basats en la preocupació de que una fallada aguda d'algun d'aquests sistemes comprometria la vida humana. Els estudis addicionals (*Supplemental Studies*) d'altres òrgans i sistemes (sistema gastrointestinal, sistema renal, etc), poden ser també apropiats si existeixen evidències que indiquen una possible alerta de seguretat en humans. D'altra banda i de manera general, els models

experimentals, els objectius i els dissenys escollits han de ser rellevants per a la predicció del potencial efecte en humans.

2.4.1. Functional Observational Battery Test (FOB).

Els efectes adversos de nous fàrmacs en el sistema nerviós central i el sistema nerviós perifèric no són fàcilment identificables ni quantificables en models d'experimentació animal a nivell preclínic. Mentre que el Test d'Irwin (descriu per primera vegada per Irwin al 1968) va ser introduït inicialment per la indústria farmacèutica com una eina ràpida de cribatge d'efectes psicotròpics, va ser posteriorment modificat al actualment conegut com "Functional Observational Battery" (FOB) en rosegadors (Moser, V.C. 1989 & 2000), com un conjunt de proves per tal d'examinar els efectes neuropatològics de nous fàrmacs en estudi.

Les dades que s'obtenen en aquest tipus d'estudi es basen directament en l'observació per part de l'investigador sobre un subjecte (l'animal observat) i per tant, és difícil diferenciar i/o classificar allò que és un comportament normal o no, i més encara de manera instrumental.

La raó d'aquesta inexactitud de les mesures, que a més es defineixen com a semiquantitatives, resideix en la naturalesa d'allò que coneixem com a comportament, ja que es tracta d'un resultat fenotípic que depèn d'experiències subjectives així com de les variacions fisiològiques del sistema nerviós. Per tant, la mesura d'allò que el fàrmac modifica en el comportament o en l'estat neurofisiològic, es troba influenciat per altres variables a part del fàrmac en si mateix. Entre d'altres, les experiències prèvies de l'animal, el seu "perfil mental", factor ambientals, així com la ruta d'administració i la resposta dosis-depenent dels efectes del fàrmacs (Tilson & Mitchell, 1984). Així doncs, és d'especial importància el control acurat i estandarditzat de tots els factors implicats en l'experiment (l'animal, l'observador, la bateria d'observacions i totes les condicions ambientals), per tal d'assegurar que els estudis siguin reproduïbles, consistents i predictius dels problemes de seguretat.

Els rosegadors, principalment rata i ratolí, són les espècies d'elecció per aquests tipus d'estudi degut a la seva ampla acceptació com a models experimentals per la predicció dels efectes farmacològics dels fàrmacs en humans, i pel seu reconeixement per les autoritats reguladores com a espècies útils en estudis de farmacodinàmia i de toxicologia.

2.4.2. Model de convulsions induïdes per pentilentetrazol.

Els tests per avaluar la modificació de l'activitat convulsivant estimen si una substància indueix canvis en la probabilitat de produir convulsions de manera espontània, o de manera més habitual i rellevant, en associació amb altres tractaments. Encara que les convulsions poden ser detectades amb altres procediments com el test d'Irwin o el FOB, l'activitat proconvulsivant pot aparèixer en absència de convulsions espontànies i per tant necessita ser avaluada amb test específics. L'evidència d'una activitat anticonvulsivant és un factor de risc menys dramàtic, però és un indicador d'una potencial efecte del fàrmac en l'estat cognitiu.

Per tant, en l'àmbit de la farmacologia de seguretat es necessiten procediments que avaluïn els canvis en el llindar convulsivant en les dues direccions. Entre els procediments emprats per avaluar aquest llindar es troba el model de convulsions induïdes amb descàrrega elèctrica (*ECS Threshold*), cada cop menys utilitzats per raons ètiques, i el model de convulsions induïdes de manera química (*pentilentetrazole (PTZ) seizure Test*) (Krall RL., 1978)

Aquest procediment són part habitual dels *Follow up Studies* o estudis de seguiment recomanats per la ICH S7A.

3. OBJECTIUS.

El H₄R és una nova diana farmacològica amb potencial terapèutic en el camp dels processos al·lèrgics. A partir de les evidències que demostren la seva presència en el SNC, l'objectiu principal d'aquest treball de recerca és la caracterització a nivell del sistema nerviós central del perfil de seguretat preclínic d'un nou fàrmac selectiu pels receptors d'histamina H₄, i per tant avaluar per primer cop els possibles efectes adversos d'aquest grup de fàrmacs en un dels sistemes més importants de la fisiologia humana.

Aquest objectiu es pot assolir gràcies al bloc d'estudis principals (*Core Battery Studies*) de la farmacologia de seguretat requerits per les autoritats reguladores, per tal d'iniciar els estudis clínics en humans (ICH Topic S7A: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals ; FDA & EMA).

El desenvolupament d'un fàrmac antagonista selectiu pels receptors H₄, d'administració oral i mancat d'efectes adversos en el del sistema nerviós central, podria millorar de manera substancial la qualitat de vida de malalts que pateixen processos al·lèrgics tals com la rinitis i l'asma, contribuint d'altra banda, a augmentar les opcions terapèutiques en aquest camp.

4. MÈTODES

4.1. Estudis *in vitro*.

4.1.1. Afinitat del Compost A pels receptors de la histamina H₄ de rata.

La unió del Compost A al receptor de la histamina H₄ de rata es va determinar mitjançant membranes purificades a partir de cèl·lules HEK-293 recombinants que sobreexpressen el receptor. Aquestes cèl·lules van ser transitòriament transfectades amb 15µg de plàsmid que expressa el receptor H₄ de rata utilitzant un vector no viral (Lipofectamine 2000, Invitrogen). Quaranta-vuit hores després les cèl·lules transfectades es van recollir i les membranes van ser aïllades.

Per l'assaig d'unió es van incubar 30 µg d'aquestes membranes amb [³H]-histamina com a radiolligand, amb o sense el Compost A, durant 1 hora a 25°C. La concentració de [³H]-histamina emprada va ser de 200 nM.

La unió no específica es va definir mitjançant la coïncubació amb 10 µM d'histamina lliure (freda). La IC₅₀ es va calcular a partir de les corbes de desplaçament a 9 concentracions diferents, des de 0.1 nM fins a 10 µM (*sigmoidal dose-response curve*; GraphPad Prism 4.01). Els resultats obtinguts van ser la mitja de 3 assaigs independents.

També es va calcular la IC₅₀ pel receptor H₄ del compost JNJ7777120 com a inhibidor de referència selectiu del receptor de la histamina H₄ (Thurmond RL et al, 2004). Nota: El compost A ha estat descobert i sintetitzat pel departament de Medicinal Chemistry a Palau Pharma S.A.

4.2. Estudis *in vivo*.

Consideracions prèvies: els animals d'experimentació estan sota les normes establertes pel conveni europeu sobre protecció dels vertebrats utilitzats amb finalitat experimental i altres finalitats científiques, ratificat a Espanya el 18 de març de 1998 (Reial Decret 233/1998), per la Llei 5/1995 aprovada per la generalitat de Catalunya al 1995 sobre la protecció d'animals utilitzats per a la experimentació i altres finalitat científiques, el Decret 214/1997 pel qual es regula la utilització dels animals d'experimentació i pel Reial Decret 1201/2005 sobre la protecció d'animals utilitzats per a la experimentació i altres finalitats científiques.

Els detalls relatius al benestar dels animals durant la realització dels protocols estan descrits en la corresponent Memòria de Procediment aprovada pel Comité Ètic d'Experimentació animal de Palau Pharma S.A. i pel Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya.

4.2.1. Functional Observational Battery test (FOB).

Es fan servir rates mascle Sprague Dawley (SD) amb una edat entre 7 i 8 setmanes i amb un pes entre 200 i 225 grams de pes (Harlan Laboratories).

Els animals es van distribuir en grups de 4 animals per gàbia (gàbies tipus III) i establades en sales amb una ventilació de 10 a 15 renovacions per hora amb una temperatura de 22 ± 3 °C y humitat relativa en un rang de 30 – 70%, amb aigua i menjar *ad libitum*.

Tots els animals van passar un període mínim de 5 dies d'observació i aclimatació entre la data d'arribada a l'estabulari i la seva utilització.

- Compost en estudi:

Compost A administrat a tres dosis diferents: 30 mg/kg, 90 mg/kg i 200 mg/kg per via oral (p.o.).

- Validació de l'estudi i compostos de referència: Per tal de validar els assaigs, entrenar la persona encarregada de portar-los a terme i comparar el perfil obtingut amb cadascun d'ells, es van utilitzar els següents compostos de referència i les dosis corresponents:

Prometazina (promethazine hydrochloride; REF: P4651; Sigma-Aldrich) a una dosis de 250 mg/kg (p.o.) i clonidina (clonidine hydrochloride; REF: C7897; Sigma-Aldrich) a una dosis de 1 mg/kg (p.o.). Les dosis es van escollir a partir de la bibliografia: Moser V.C. et al (2006) i Moscardo E. et al (2007).

- Vehicle: Carboximetilcel·lulosa (CMC-0.2%) i Tween 80 (1%) en aigua destil·lada.

- Volum d'administració: 10 mL/kg per via oral (p.o.).

- Disseny: L'estudi va ser dividit en dues parts (A i B). En cadascuna d'elles es van fer servir grups de 8 animals per a cada tractament. Les observacions es van portar a terme de manera cega per la persona que observava els animals.

Part A. Es va realitzar la següent seqüència d'observacions des de la menys interactiva fins a la més interactiva amb l'animal d'experimentació.

- I. Observacions a la gàbia d'estabulació: postura, mossegades, respiració.
- II. Observacions sostenen l'animal a la mà: reactivitat a la manipulació, llagimeig, salivació, piloerecció, aspecte del pel, tancament palpebral, freqüència cardíaca i to muscular.
- III. Activitat en camp obert: quantitat de moviment, estat d'alerta, número de vegades que l'animal s'aixeca sobre les potes posteriors (*rearings*), mobilitat, marxa, postura de la cua i de la pelvis, número de defecacions i número de taques d'orina dipositades.
- IV. Observacions de moviments involuntaris/anormal: moviments estranys, moviments estereotipats, tremolors i convulsions.
- V. Respostes sensorials: resposta a l'aproximació visual, resposta a un soroll sec, reflex palpebral, reflex auricular, grandària pupil·lar, resposta pupil·lar, resposta la pinçament de la cua, emplaçament visual i catalèpsia.
- VI. Mesures fisiològiques: pes corporal (g) i temperatura corporal (°C).

Cadascuna d'aquestes observacions va ser valorada de manera quantitativa (número de *rearings*, defecacions, miccions, temperatura i pes corporals) o semiquantitativa a partir d'una escala numèrica prèviament establerta. Per exemple, l'escala per valorar l'estat d'alerta va ser la següent:

1. molt baixa (estupor, resposta mínima o absent).
2. baixa (dominen els moments d'estupor però hi ha algun moviment exploratori amb el cap o el cos).
3. lleugerament baixa (lleuger estupor, moviment exploratori però amb moments d'immobilitat).
4. normal (animal en alerta, freqüenten els moviments exploratoris).
5. lleugerament elevada (lleugera excitació, tensió, moviments molt ràpids).
6. molt elevada (hiperalerta, excitació, l'animal corre de esporàdicament).

En el cas dels paràmetres quantitius (número de *rearings*, defecacions, miccions, temperatura i pes corporals) es va calcular la mitja i l'error estàndard (EE).

Els animals van ser observats durant un període basal abans de l'administració i als temps de 1, 4 i 24 hores després de l'administració de les substàncies en estudi.

Representació de les dades

Cadascuna de les observacions realitzades es va classificar en funció de la seva naturalesa en els següents grups en funció dels paràmetres avaluats.

- 1- Comportament.
- 2- Estat neurològic.
- 3- Sistema nerviós autònom o neurovegetatiu.

Per tal de mostrar els resultats s'ha fet servir el tipus de representació gràfica publicada per primer cop per Moser V.C. i Porsolt R.D. al 2006 (veure bibliografia). Només s'han tingut en compte els valors estadísticament significatius.

Grups de tractament

Tractament	Dosis (mg/kg p.o.)
Vehicle	---
Prometazina	250
Clonidina	1
Compost A	30
Compost A	90
Compost A	200

Taula 3. Grups de tractament de l'estudi FOB (PART A) en rata mascle SD (n=8 animals per grup).

Anàlisi estadística.

Les puntuacions semiquantitatives es van comparar en front de la puntuació del grup control durant el mateix període observacional mitjançant els test estadístic no paramètric Mann-Whitney T test. $P > 0.05$ (ns: no significatiu), $P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**); $P < 0.01$ (***) ; GraphPad Prism 4.01).

Les dades quantitatives en van analitzar mitjançant ANOVA de dues vies i Bonferroni post test en front del grup control; $P > 0.05$ (ns: no significatiu), $P < 0.05$ (*) ; $P < 0.01$ (**); $P < 0.01$ (***) ; GraphPad Prism 4.01).

Part B. Durant aquesta part de l'estudi es van avaluar les funcions neuromusculars dels animals:

- I. To muscular de les extremitats.
- II. Distància de les potes posteriors (*hind limb splay*) al caure des d'una altura de 30 cm.

- III. Força d'agafament: Mesurada en grams mitjançant un dinamòmetre corregint els resultat en funció del pes (força (g)/pes corporal (g)).
- IV. Reflex de redreçament.
- V. Rotarod Performance test: Càlcul del temps màxim (temps de latència) en que l'animal es manté sense caure a sobre d'un eix en rotació durant 5 minuts (figura 3).

Els animals van ser avaluats abans de l'administració i als temps de 1, 4 i 24 hores després de l'administració de les substàncies en estudi. Pels paràmetres quantitativs (*hind limb splay*, força d'agafament i temps de latència) es va calcular la mitja i l'error estàndard (EE).

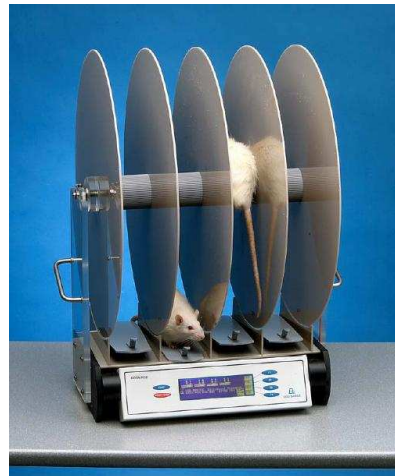


Figura 3 . Rotarod Performance Test.

Grups de tractament

Tractament	Dosis (mg/kg p.o.)
Vehicle	---
Prometazina	250
Clonidina	1
Compost A	30
Compost A	90
Compost A	200

Taula 4. Grups de tractament de l'estudi FOB (PART B; estudi de les funcions neuromusculars) en rata mascle SD (n=8 animals per grup).

Anàlisi estadística

Els paràmetres quantitatius es van analitzar mitjançant ANOVA de dues vies i Bonferroni post test en front del grup control; $P > 0.05$ (NS: no significatiu), $P < 0.05$ (*); $P < 0.01$ (**); $P < 0.001$ (***) ; GraphPad Prism 4.01).

4.2.2. Model de convulsions induïdes per pentilentetrazol.

Es van fer servir 40 rates mascle Sprague Dawley (SD) amb una edat entre 7 i 8 setmanes i amb un pes entre 163 i 205 g (Harlan Laboratories Ltd.)

Els animals es van distribuir en grups de 4 animals per gàbia (gàbies tipus III) i establades en sales amb una ventilació entre 10 i 15 renovacions d'aire per hora amb una temperatura de $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ i una humitat relativa en un rang de 30-70%, amb aigua i menjar *ad libitum*. Els animals van passar un període mínim de 5 dies d'observació i aclimatació entre la data d'arribada a l'estabulari i la seva utilització.

- Compost en estudi:

Compost A administrat a tres dosis diferents: 30 mg/kg, 90 mg/kg i 200 mg/kg per via oral (p.o.).

- Validació de l'estudi i compostos de referència:

Per tal de validar l'assaig es va utilitzar com a compost de referència amb una activitat proconvulsivament coneguda, l'amfetamina (amphetamine sulphate; REF:A3278; Sigma-Adrich) a una dosis de 30 mg/kg (p.o.).

- Agent convulsivament: Pentilentetrazol (PTZ; REF:P6500; Sigma-Aldrich) a una concentració de 15 mg/mL per via intravenosa (i.v.) amb una velocitat d'infusió de 0.3 mL/min.

- Disseny: a l'inici de l'estudi es van repartir els 40 animals en grups de 8 animals per tractament. Cadascun dels animals va rebre una dosis única del vehicle, del compost de referència o del compost en estudi per via oral. Aproximadament 30 minuts després, se'ls hi va administrar una infusió de PTZ per via intravenosa i es van observar de manera continuada per enregistrar el temps fins a l'aparició de la primera convulsió. Immediatament després d'aquesta observació l'animal es va sacrificar per dislocació cervical.

A partir del temps d'aparició de la primera activitat convulsivament, i tenint en compte el pes corporal de cada animal, es va calcular la dosis de PTZ necessària per provocar un efecte convulsivament.

Dosis (mg/kg) = (Velocitat infusió (mL/min) * temps d'infusió (min) * concentració) / pes corporal (kg).

Grups de tractament

Tractament	Dosis (mg/kg p.o.)
Vehicle	---
Amfetamina	30
Compost A	30
Compost A	90
Compost A	200

Taula 5. Grups de tractament en l'estudi de convulsions induïdes per pentilentetrazol (PTZ) en rata mascles SD (n=8 animals per grup).

Anàlisi estadística.

La dosi de pentilentetrazol i el temps necessaris per produir la primera convulsió per a cada grup de tractament es van comparar amb el grup d'animals que van rebre el vehicle, fent servir ANOVA de dues vies seguit del test de Dunnet (P<0.05 *; <0.01 **; <0.001 *** ; GraphPad Prism 4.01).

5. RESULTATS

5.1. Estudis *in vitro*. Afinitat del Compost A pels receptors de la histamina H₄ de rata.

El resultat de les corba de desplaçament del Compost A pel receptors de la histamina H₄ de rata es mostra a continuació:

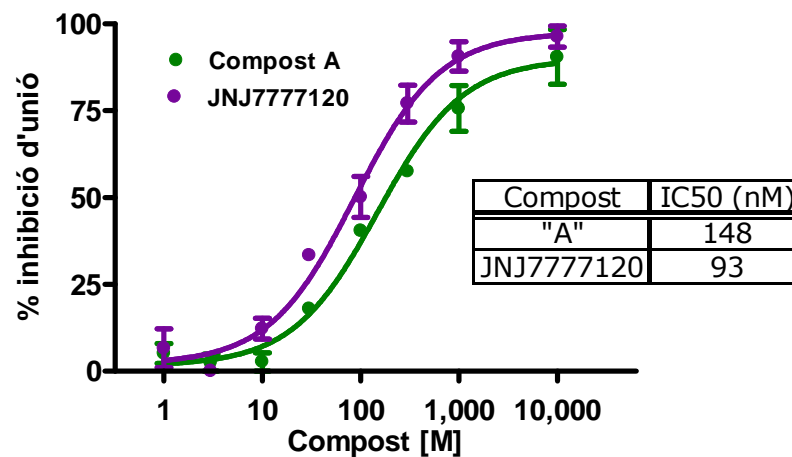


Figura 4. Determinació de la IC₅₀ del Compost A pel receptor H₄ de la histamina de rata en comparació amb el compost JNJ7777120.

El Compost A té una elevada afinitat pel receptor H₄ de la histamina de rata de l'ordre nanomolar i comparable a l'afinitat del compost de referència JNJ7777120. La seva potència d'unió en rata és equivalent a la mostrada pel receptor H₄ humà. En quant a la resta de receptors histaminèrgics humans, El Compost A presenta un marge de selectivitat superior a 240 vegades pel receptor H₃ i de més de 400 vegades pels receptor H₁ i H₂ (dades no mostrades).

5.2. Estudis *in vivo*.

5.2.1. Functional Observational Battery test (FOB).

PART A.

Prometazina.

Els principals efectes observats en el comportament del grup administrat amb prometazina (250 mg/kg p.o.) van ser un major número d'animals que presentaven una postura corbada, la presència d'un increment en el tancament palpebral (ptosis). També es van observar alteracions en la marxa, caracteritzada per una curvatura en el cos. Els animals a més, caminaven sobre els dits de les extremitats

("de puntetes"). Aquesta alteració en la marxa va anar acompanyada de moviments estereotipats: ensumar de manera repetitiva, caminar en cercles (1 hora postadministració) i la presència d'animals caminant cap enrere (4 hores postadministració) (taula 5)

En quant a l'estat neurològic, no hi va haver cap observació significativa, però sí que hi va haver una disminució de la temperatura corporal (aproximadament 2°C) i una marcada midriasis acompanyada d'una clara disminució de la resposta pupil·lar que va estar present a 1, 4 i fins a les 24 hores després de l'administració (taula 5). El pes corporal dels animals al dia següent de l'administració va disminuir de mitja un 7% (figura 6).

Clonidina

Les rates administrades amb clonidina (1 mg/kg p.o.) van presentar efectes clarament depressors a 1 i 4 hores després de l'administració, caracteritzats en quant al comportament, per una disminució de la quantitat de moviment, del número de *rearings* i una marcada disminució en l'estat d'alerta. D'altra banda, aquests animals van mostrar una marxa atàxica acompanyada d'hipotonia a 1 i 4 hores postadministració (taula 5).

En quant al seu estat neurològic, el to corporal i la resposta al tacte estaven clarament deprimits. A més, aquests animals presentaven períodes de catalèpsia.

Respecte al seu estat neurovegetatiu o autonòmic, destaca l'aparició de pil·loerecció, un marcat descens de la freqüència cardíaca i respiratòria, lleugera midriasis acompanyada d'una marcada disminució de la resposta pupil·lar, i disminució de la temperatura corporal (aproximadament 2°C) 1 i 4 hores després de l'administració (taula 5 i figura 6).

Tots aquests paràmetres van tornar a la normalitat en el temps d'observació de les 24 hores després de l'administració. No obstant, el pes corporal dels animals al dia següent de l'administració va disminuir de mitja un 3%.

Compost A

Cap dels paràmetres i observacions efectuades, en cap de les dosis administrades, es van veure modificats de manera estadísticament significativa respecte al animals del grup control. Només es va observar una tendència a disminuir el número de *rearings* (figura 5A) a la dosi més alta, però que no va assolir en cap cas significació estadística.

		PROMETHAZINE			CLONIDINE			COMPOST A								
								30 mg/kg			90 mg/kg			200 mg/kg		
		1h	4h	24h	1h	4h	24h	1h	4h	24h	1h	4h	24h	1h	4h	24h
COMPORTAMENT	Postura	C	A, C			S										
	Mossegades															
	Reactivitat a la manipulació															
	Aproximació visual															
	Tancament palpebral	*	*													
	To corporal															
	Quantitat de moviment				**	*										
	Alerta				***	*										
	Movilitat															
	Marxa	HU T	HU, T		A, H	A, H,HU										
	Marxa atàxica				***	***										
	Posició de pelvis i cua															
	Moviments estranys															
	Moviments estereotipats	RS, C	BU													
NEUROLOGIC	To corporal				**	***										
	Tremolors															
	Convulsions clòniques															
	Convulsions tòniques															
	Catalepsia				*	*										
	Resposta al tacte				**	*										
	Resposta auditiva															
	Resposta al pinçament de la cua															
	Resposta palpebral															
	Resposta auricular															
Emplaçament visual																
AUTONOMIC	Freqüència cardíaca				***	**										
	Freqüència respiratòria				*	***										
	Llagrimeig															
	Salivació															
	Piloerecció				***	***										
	Grandària de la pupil·la	**	***	**	*	*										
	Resposta pupil·lar	***	***	**	**	***										

Postura: R: Aixecat sobre les potes posterior; S: Assegut ; C: Corbat ; F: Aplanat ; A: Enroscat ;
Marxa: A: Ataxia ; H: Hipotonica ; HU: Corbat ; T: Caminant de puntetes
Estereotipia : C: Fent cercles ; RS: Ensumant de manera repetitiva ; CE: Caminant cap enrere

Puntuació: Sense canvis

--

 Disminució

*	**	***
---	----	-----

 Increment

*	**	***
---	----	-----

 Mann Whitney Test
 P value: <0,05 *; <0,01 **; <0,001 ***

Taula 5. Puntuació i anàlisi estadística dels diferents paràmetres semiquantitatius avaluats durant la PART A de l'estudi de FOB. Els valors es presenten en una escala de colors en funció de la significació estadística vs. el grup control (Mann Whitney Test p<0.05 *; <0.01 **; <0.001 *).**

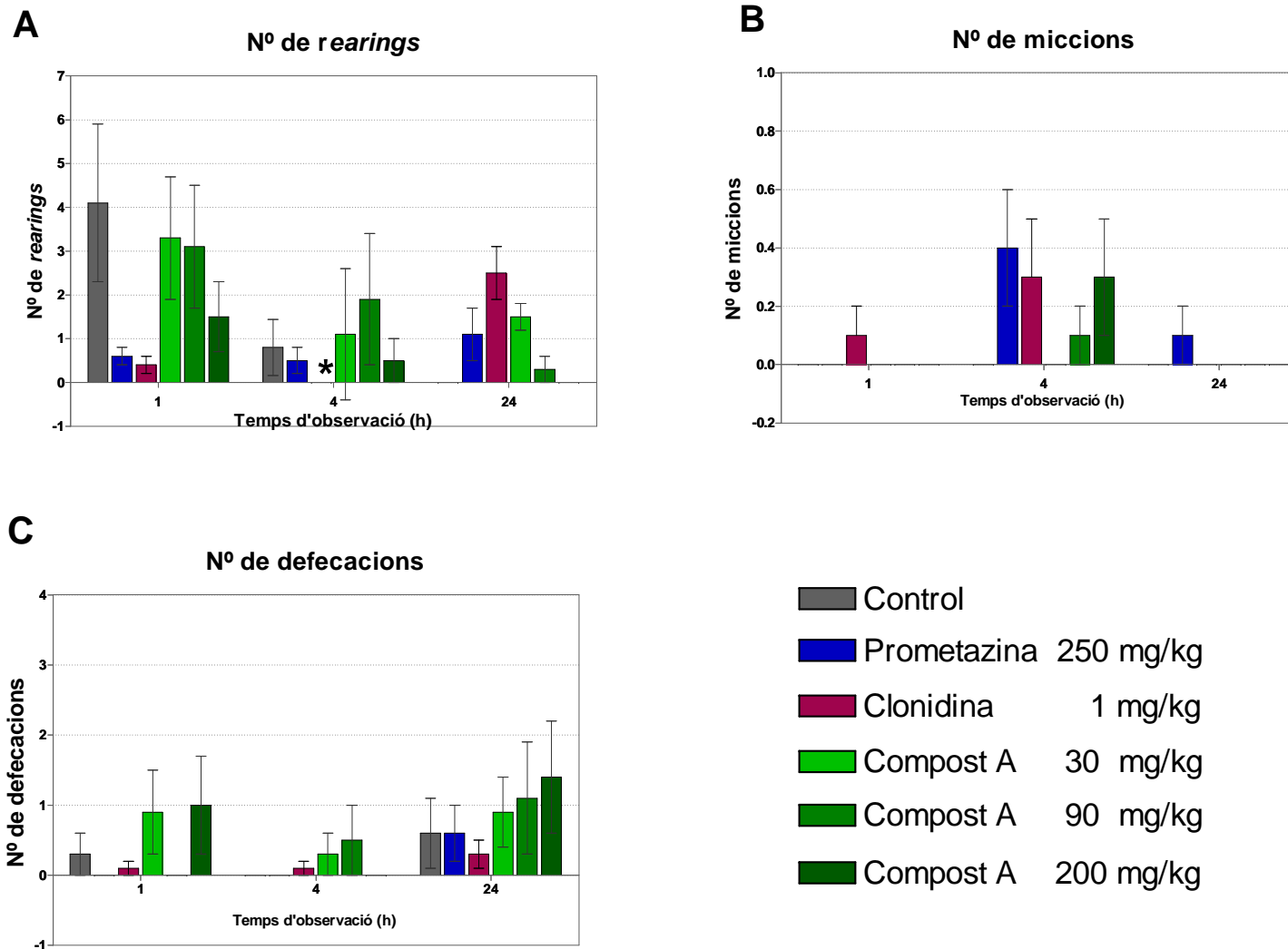


Figura 5. Resultats i anàlisi estadística dels paràmetres quantitatius: n° de vegades aixecat sobre les potes posteriors o rearings (A), n° de punts d'orina o miccions (B) i n° de defecacions (C) avaluats durant la PART A de l'estudi de FOB. Els valors s'expressen com a mitja ± EE. (n=8) ANOVA de dues vies. Dunnet's multiple comparison post-test vs. grup control (p <0.05 *; <0.01 **; <0.001 ***).

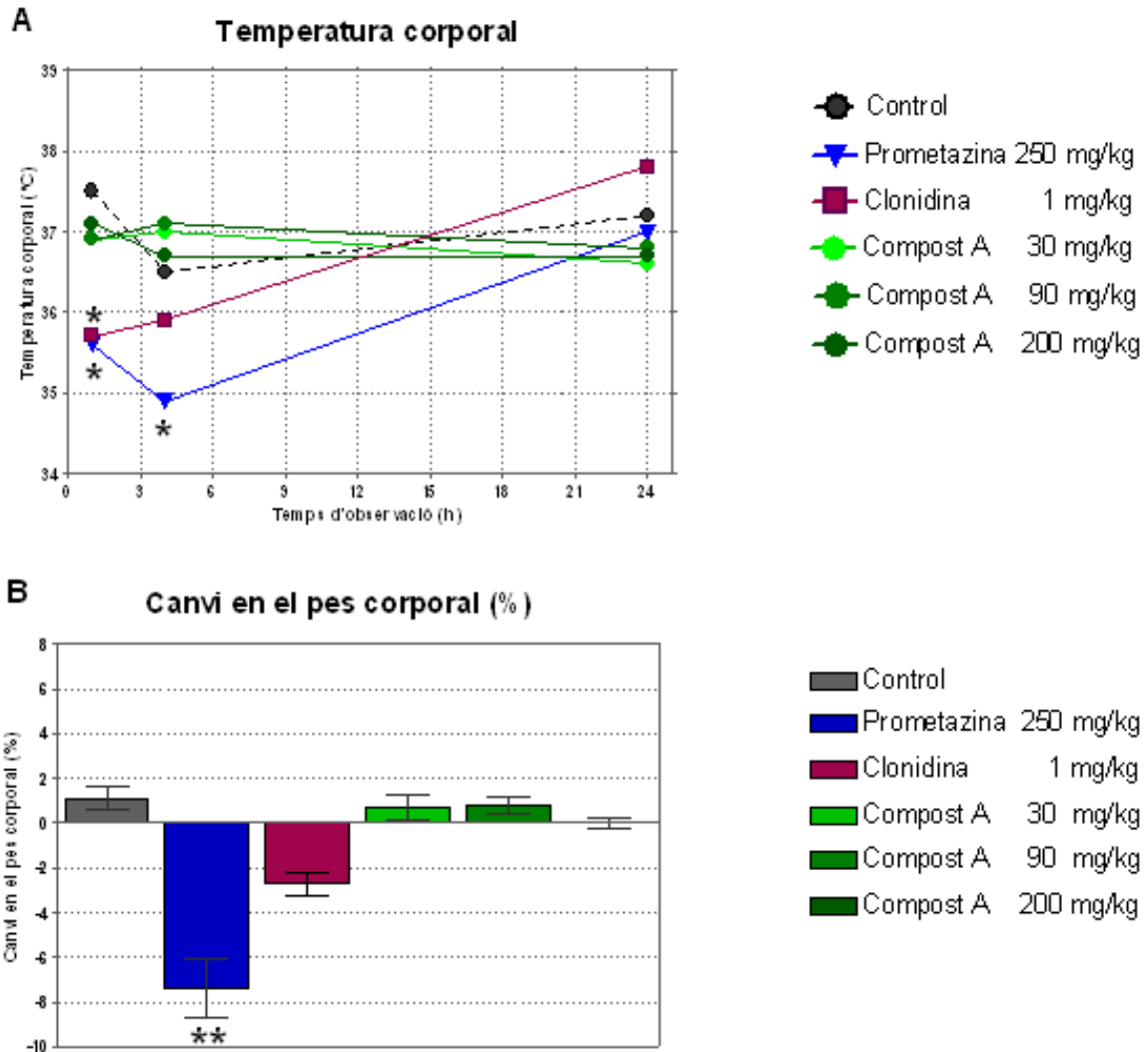


Figura 6. Resultats i anàlisi estadística dels paràmetres quantitius: temperatura corporal (A) i percentatge de canvi en el pes corporal (B) avaluats durant la PART A de l'estudi de FOB. Els valors s'expressen com a mitja ± EE. (n=8) ANOVA de dues vies. Dunnet's multiple comparison post-test vs. grup control (p <0.05 *; <0.01 **; <0.001 *).**

PART BPrometazina.

En les rates tractades amb prometazina es va observar una disminució del temps de latència en el Rotarod 1 hora després de la seva administració (47 seg. vs. 69 seg. del grup control) que no va assolir significació estadística (figura 6).

A més, es va reduir de manera molt significativa la distància entre les potes posteriors al deixar caure l'animal (7.7, 7.5 i 7.2 cm vs. 11.6, 11.3 i 10.3 cm del grup control). Aquests efectes es van sostenir fins a 24 hores després de l'administració (figura 7).

No hi va haver cap diferència significativa en la to de les extremitats, en la força d'agafament ni en el reflex de redreçament en cap dels punts d'observació respecte al grup control.

Clonidina

Les rates tractes amb clonidina van reduir de manera significativa la seva força d'agafament als temps de 1 i 4 hores (2.4 i 2.4 vs. 3.0 i 2.7 del grup control). Només la mesura de 1 hora va assolir significació estadística (figura 7).

En quant al temps de latència en el Rotarod, aquest es va veure clarament disminuït 1 hora i 4 hores postadministració (29 i 37 seg. vs. 69 i 66 seg. del grup control) (figura 7).

No hi va haver cap diferència significativa en el to de les extremitats, en la distància de les potes posteriors o en el reflex de redreçament en cap dels punts temporals d'observació respecte al grup control.

Compost A

Cap dels paràmetres i observacions efectuades (to de les extremitats, distància de les potes posteriors, força d'agafament, reflex de redreçament i temps de latència en el Rotarod) en cap de les dosis administrades, es van veure modificats de manera estadísticament significativa respecte al animals del grup control (figura 7).

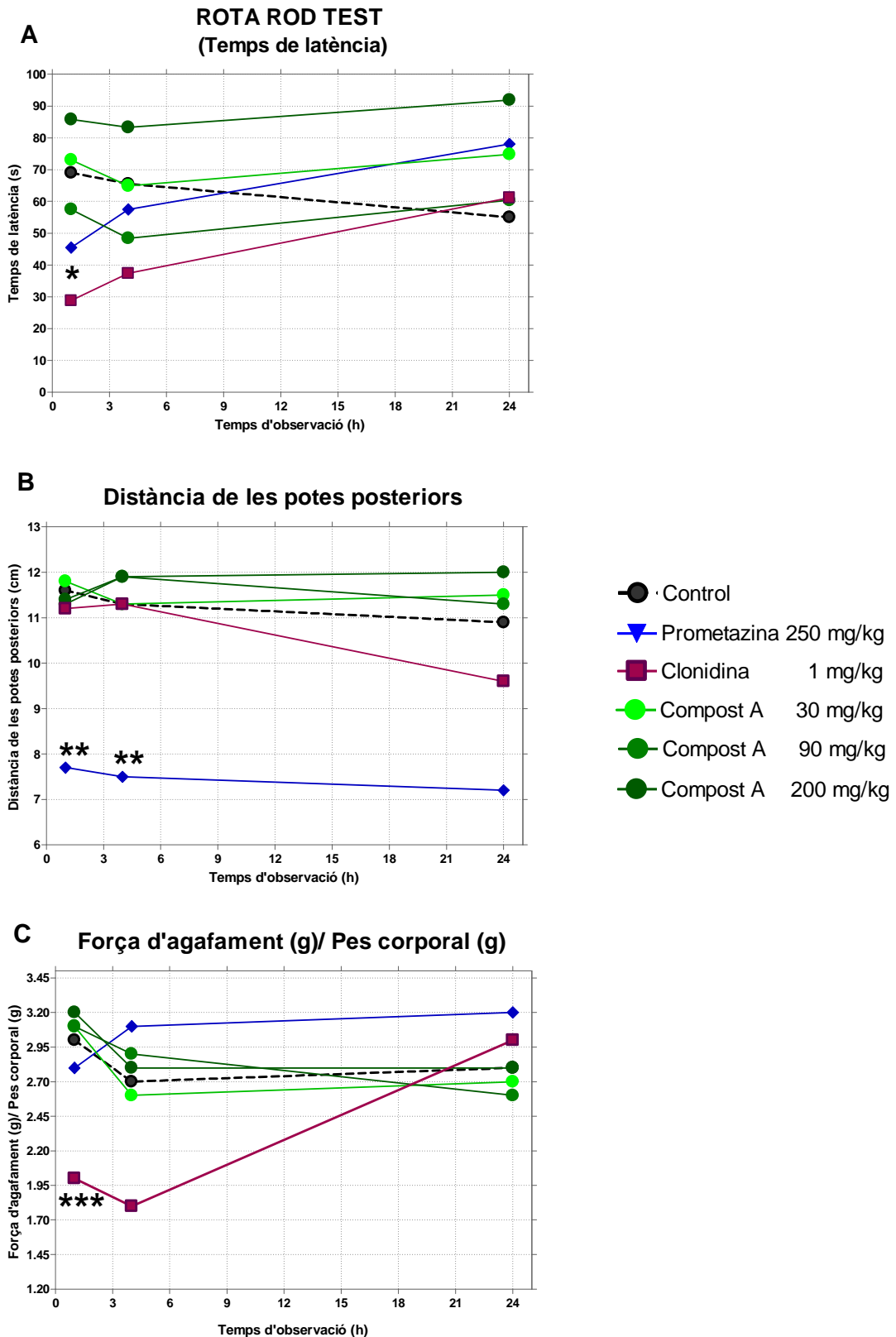


Figura 7. Resultats i anàlisi estadística dels diferents paràmetres quantitius: temps de latència en el Rotarod (A), distància de les potes posteriors (B) i força d'agafament (C) avaluats durant la PART B de l'estudi de FOB. Els valors es presenten com a mitja (n=8). ANOVA de dues vies i Dunnet's multiple comparison post-test vs. control $p < 0.05$ *; < 0.01 **; < 0.001 *).**

5.3.2. Model de convulsions induïdes per pentilentetrazol.

L'administració oral del Compost A en rates SD mascle als tres nivells de dosis (30, 90 i 200 mg/kg p.o.) no va afectar de manera significativa el temps necessari per assolir la primera convulsió (81.5 ± 12.3 , 98.6 ± 10.5 , 87.3 ± 3.4 seg. respectivament), ni va modificar la dosi de PTZ necessària per induir convulsions (29.7 ± 4.3 , 35.3 ± 3.7 i 31.6 ± 1.3 mg/kg respectivament) en comparació amb el grup tractat amb el vehicle (82.1 ± 12.2 seg. i 30.0 ± 4.3 mg/kg) (figura 8A i 8B).

L'administració oral de l'amfetamina, va produir una disminució marcada (però no estadísticament significativa) del temps necessari fins a l'aparició de la primera convulsió (61.9 ± 8.1 seg) i de la dosi necessària de PTZ per induir la primera convulsió (22.2 ± 2.9 mg/kg) en comparació amb el grup tractat amb el vehicle (figura 8A i 8B).

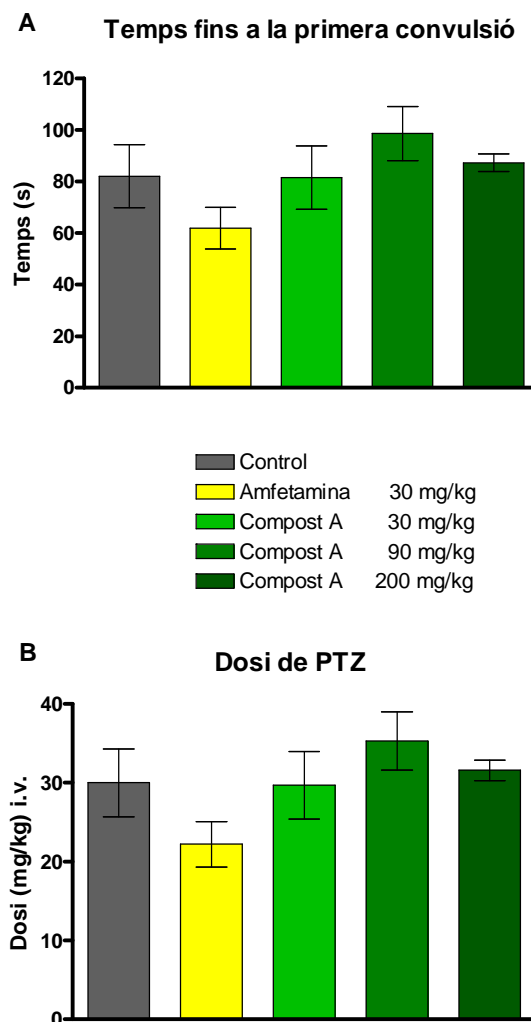


Figura 8. Temps fins a la primera convulsió (A) i dosi de PTZ necessària per induir convulsions (B) després de l'administració oral del Compost A i de l'amfetamina. Els valors es presenten com a mitja \pm EE (n=8). ANOVA de dues vies i Dunnet's multiple comparison post-test vs. control p <0.05 *; <0.01 **; <0.001 ***).

6. DISCUSSIÓ.

El receptor H_4 de la histamina és una diana farmacològica interessant pel tractament de desordres immunoinflamatoris. Arrel de la seva expressió majoritàriament en cèl·lules del sistema immunitari i dels resultats obtinguts en ratolins *knockout* se li ha atribuït un paper potencialment rellevant en la patofisiologia de diferents malalties (Dunford PI et al, 2006, Takeshita K et al, 2003, Varga C et al, 2005, Fogel WA et al, 2005).

El Compost A presenta una elevada potència *in vitro* de l'ordre nanomolar així com una elevada selectivitat per la resta de receptors histaminèrgics humans, superior a 200 vegades per tots ells. Cal destacar, que el Compost A posseeix també una elevada selectivitat en un panell d'unió de més de 150 receptors, enzims i canals iònics (resultats no mostrats). Aquest perfil de selectivitat *in vitro*, és ja un bon indicador d'un perfil "segur" pel Compost A, no només en l'àmbit del SNC, sinó també de la resta de sistemes fisiològics.

El compost A ha demostrat la seva eficàcia en diferents models *in vivo* d'al·lèrgia i asma en rosegadors (resultats no mostrats).

Cal destacar que el receptor H_4 també es distribueix en el SNC de rosegadors i d'humans tot hi que el seu paper específic encara és desconegut (Coge et al 2001; Liu et al 2001). És d'especial importància per tant, l'avaluació del possibles efectes adversos d'un nou compost antagonista selectiu dels receptors H_4 en el SNC.

Els estudis de farmacologia de seguretat relatius al SNC són, a més, de compliment obligatori per a qualsevol molècula candidata que vulgui entrar en fases de desenvolupament clínic (ICH Topic S7A: Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals ; FDA & EMA).

Per tal d'assolir aquests objectius, es va realitzar l'assaig FOB (Functional Observational Battery test) en rates ja que és un dels assaigs més reconeguts i de major importància en el camp de la farmacologia de seguretat en el SNC.

En la validació de l'estudi FOB en rates, es van fer servir com a compostos de referència dos fàrmacs (prometazina i clonidina) amb efectes en el SNC àmpliament coneguts tant en humans com en animals d'experimentació.

La prometazina per la seva banda, és un fàrmac antagonista del receptor H_1 histaminèrgic de primera generació. Bloqueja per tant l'acció de la histamina en aquests receptors a nivell del SNC, exercint així el seu efecte sedant. La prometazina també s'uneix de manera molt afí als receptors muscarínics M_1 i M_2 , i

de manera menys potent als receptors dopaminèrgics D_2 en els que actua com antagonista. És per tant un fàrmac poc selectiu, amb potencials efectes adversos derivats no tan sols de la seua antagonisme sobre els receptors H_1 .

La clonidina és un agonista dels receptors α_2 en el cervell, l'estimulació dels quals disminueix la despesa cardíaca i la resistència vascular perifèrica, disminuint com a efecte final la pressió arterial. La clonidina posseeix especificitat pels receptors presinàptics α_2 en el centre vasomotor en el tronc cerebral, a través dels quals disminueix a nivell presinàptic els nivells de calci i inhibeix l'alliberació de noradrenalina. L'efecte net final de la clonidina és la disminució general del to simpàtic.

Els resultats obtinguts en l'estudi FOB amb la prometazina i la clonidina concorden perfectament amb els resultats esperats segons el seu perfil farmacològic, validant d'aquesta manera l'estudi.

De manera particular, l'administració oral de la prometazina en rates mascles SD va presentar el seu típic efecte sedant (depressor) tant a nivells comportamental, resultat del seu efecte antagonista en els receptor H_1 , com efectes motors (alteracions en la marxa i disminució del temps de latència) deguts al seu efecte antagonista en els receptors dopaminèrgics, així com midriasis i lentitud en la resposta pupil·lar com a resultat dels seus efectes sobre els receptors muscarínics M_1 .

La disminució de la temperatura corporal observat amb la prometazina es deuria principalment al seu efecte final sobre el centre hipotalàmic regulador de la temperatura. La disminució del temps de latència en el Rotarod podria ser resultat tant dels efectes sedants com dels efectes a nivell motor.

Per la seva banda, els animals administrats amb clonidina es van caracteritzar principalment per presentar efectes depressors, entre els que destaca la disminució de la quantitat de moviments i de l'estat d'alerta. Les alteracions en la marxa, en la disminució del to corporal, en la resposta al tacte i en la resposta auditiva, son totes elles resultats de la disminució del to simpàtic. El descens en el temps de latència en el Rotarod també és deguda a aquesta depressió general del sistema simpàtic.

D'altra banda, la marcada disminució de la freqüència cardíaca observada amb la prometazina està causada principalment pels seus efectes inhibidors directes sobre el centre vasomotor localitzat en el tronc cerebral. De manera similar a la

prometazina, el seu efecte sobre el centre regulador de la temperatura sobre hipotàlem, és el responsable de la disminució de la temperatura corporal.

En quant al Compost A, es va administrar a tres nivells de dosis. Resultats previs demostren que l'administració oral del Compost A de les dosis escollides en rata, permet assolir exposicions plasmàtiques del producte amb nivells que garanteixen la inhibició prolongada del receptor i de manera proporcional a la dosi (resultats no mostrats).

Cap de les dosis administrades del Compost A va mostrar diferències estadísticament significativa en els més de 40 paràmetres avaluats en l'estudi FOB.

Tenint en compte els problemes de seguretat dels fàrmacs antihistamínic H_1 , i per tal d'ampliar aquest estudi de FOB, es va estudiar de manera específica els possibles efectes pro o anticonvulsivants mesurant la interacció del Compost A amb el pentilentetrazol.

De la mateixa manera que en el FOB, cap de les dosis administrades del Compost A va modificar el temps necessari per l'aparició de la primera convulsió, ni la dosi de pentilentetrazol necessària per provocar convulsions. Aquest resultat descarta d'aquesta manera un potencial efecte pro o anticonvulsivant del compost A en la rata. Tot i el marcat efecte proconvulsivant de l'anfetamina, aquesta no va assolir però, resultats estadísticament significatius en les nostres condicions experimentals.

7. CONCLUSIONS

1. EL Compost A posseeix una elevada potència (activitat nanomolar) pel receptor H₄ de rata i pel receptor H₄ humà, amb un excel·lent perfil de selectivitat respecte a la resta de receptors histaminèrgics.
2. L'estudi de FOB va ser validat mitjançant dos dels patrons de referència amb efectes en el SNC més coneguts: prometazina (antagonista pels receptors H₁) i clonidina (agonista dels receptors α_2). Aquesta validació va permetre avaluar amb garanties els potencials efectes adversos del Compost A sobre el SNC.
3. El Compost A a cap dels tres nivells de dosis administrats, mostra modificacions del sistema nerviós central en quant al comportament, l'estat neurològic o en l'estat neurovegetatiu en l'assaig de FOB en la rata.
4. L'administració de Compost A a les dosis administrades no presenta cap activitat pro o anticonvulsivants després de la seva administració en la rata.
5. Tenint en compte els resultats obtinguts en els assaigs de FOB i de convulsions induïdes per pentilentetrazol es pot afirmar que el Compost A presenta un perfil de seguretat *in vivo* excel·lent, privat d'efectes sobre el SNC en la rata.
6. El Compost A, en les proves *in vivo* realitzades, no presenta els efectes sedants ni els efectes proconvulsivants típics dels fàrmacs antagonistes pel receptor H₁ de la histamina.
7. Aquest és el primer cop que es descriu el perfil de seguretat farmacològic a nivell de sistema nerviós central d'una molècula selectiva pel receptor d'histamina H₄ a nivell preclínic.
8. Aquestes dades permetrien establir un marge de seguretat del Compost A sobre el SNC i avançar en el procés de desenvolupament cap a les fases clíniques en humans.

8. BIBLIOGRAFIA

Dunford PI, O'Donnell N, Riley JP et al. (2006). The histamine H₄ receptor mediates allergic airway inflammation by regulating the activation of CD4⁺ T cells. *J. Immunol* 176(11):7062-7070.

Fogel WA, Wagner W, Sasiak K, Stasiak A (2005) The role of histamine in experimental ulcerative colitis in rats. *Inflamm. Res* 54:S68-S69 (Supplement).

Fung-Leung W-P, Thurmond RL, Ling P, and Karlsson L (2004) H₄ receptor antagonists: the newantihistamines? *Curr Opin Invest Drug* 5:1174-1183.

Haas HL, Sergeva OA and Selbach O, (2008). Histamine in the nervous system. *Physiol Rev* 88:1183-1241.

Hill SJ, Ganelli CR, Timmermann H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, Schunack W, Levi R, and Hass HL (1997) International Union of Pharmacology XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev* 49:253-278.615-620.

Irwin, S (1968). Comprehensive observational assessment: A systematic quantitative procedure for assessing the behavioural and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacology* 13:222-257.

Jablonowsky JA, Grice CA, Chai W, Dvorak CA, Venable JD, Kwok AK, Ly KS, Wei J, Baker SM, Desai PJ, et al., (2003) The first potent and selective non-imidazole human histamine H₄ receptor antagonist. *J Med Chem* 46:3957-3960.

Krall RL, Penry JK, White BG, Kupferberg HJ, Swinyard EA (1978). Antiepileptic drug development: II. Anticonvulsant drug screening. *Epilepsia* 19:409-428.

Liu C, Max-J, Jiang X et al. (2001). Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H₄) expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol* 59:420-426.

Masaki t, Yoshimatsu H. (2006). The hypothalamic H₁ receptor: a novel therapeutic target for disrupting diurnal feeding rhythm and obesity. *Trends Pharmacol Sci* 27:279-284.

Moscardo E, Maurin A, Dorigatti R, Champeroux P, Richard S (2007). An optimised methodology for the neurobehavioural assessment in rodent. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 56:239-255.

Moser, V.C. (1989). Screening approaches to neurotoxicity: A functional observational battery. *Journal of the American College of Toxicology* 8:85-93.

Moser, V.C. (2000). The functional observational battery in adult and developing rats. *Neurotoxicity*, 21:989-996.

Moser, V.C., Porsolt R.D. (2006). Graphical presentation of Irwin test data as an aid to interpretation. Porsolt & Partners Pharmacology. www.porsolt.com.

Nakamura T, Itadani H, Hidaka Y, Ohta M, and Tanala K (2000). Molecular cloning and characterization of a new a human histamine receptor, HHR₄. *Biochem Biophys Res Commun* 279:615-620.

Nguyen T, Shapiro DA, George SR et al. (2001). Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol* 59:427-433.

Oda T, Morikawa N, Saito Y, Masuho Y, and Matsumoto S-I (2000). Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 275:36781-36786.

Reiner PB, Kamondi A. (1994). Mechanisms of antihistamine-induced sedation in the human brain: H₁ receptor activation reduces a background leakage potassium current. *Neuroscience* 59:579-588.

Ten Eick, A.P, Blumer, J.L, Reed, M.D. et al. (2001). Safety of antihistamines in children. *Drug Safety*, 24: 119-147.

Simons, F. Estelle R. (2004). Advances in H₁-antihistamines. *The New England Journal of Medicine* 351 (21): 2203-17.

Soll AH and Wash JH (1979). Regulation of gastric acid secretion. *Annu Rev Physiol* 41:35-53.

Strakhova MI, Nikkel AL, Manelli AM, Hsieh GC, Esbenshade TA, Brioni JD, Bitner RS. (2009). *Brain Research* 23;1250:41-8.

Takeshita K, Sakai K, Bacon KB, Gantner F: Critical role of histamine H₄ receptor in leukotriene B₄ production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan in vivo (2003). *J. Pharmacol. Exp. Ther* 307(3):1072-1078.

Thurmond RL, Desai PJ, Dunford PJ, Fung-Leung WP, Hofstra CL, Jiang W, Nguyen S, Riley JP, Sun S, Williams KN, Edwards JP, Karlsson L. (2004). JNJ A potent and selective histamine H₄ receptor antagonist with anti-inflammatory properties. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Apr;309(1):404-13.

Varga C, Horvath K, Berko A et al.: Inhibitory effects of histamine H₄ receptor antagonists on experimental colitis in the rat (2005). *Eur. J. Pharmacol* 522(1-3):130-138.

Zhu Y, Michalovich D, Wu H-L, Tan KB, Dytko GM, Mannan IJ, Boyce R, Alston J, Tierney LA, Li X, et al., (2001). Cloning expression and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor. *Mol Pharmacol* 59:734-441.