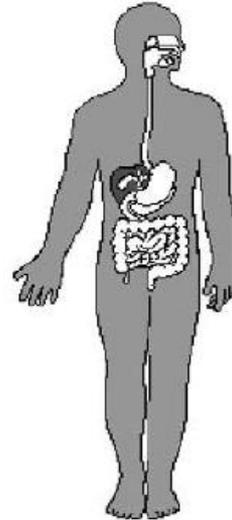
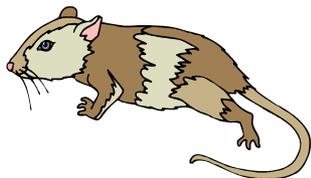


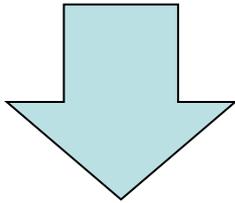
SVILUPPO PRECLINICO DEL FARMACO

TOSSICOLOGIA



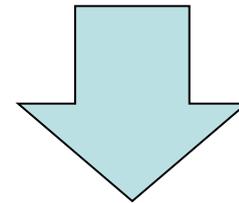
Sperimentazione preclinica

Farmacologia



Valutazione dell'efficacia

Tossicologia



Valutazione della sicurezza

Studi eseguiti in accordo con la legislazione internazionale e le norme di GLP

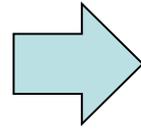
Sperimentazione preclinica

Principali tappe storiche che hanno portato alla regolamentazione tossicologica per i Farmaci in fase pre-clinica

- 1930 (USA): gravi reazioni tossiche oculari per usi di cosmetici con p-fenilendiammina
- 1937 (USA): qualche centinaio di morti per somministrazione di sulfamidici in glicole etilenico
(il Food and Drug Act del 1906 non richiedeva di determinare in maniera dettagliata la sicurezza di un prodotto prima della sua commercializzazione)
- 1938 (USA): nascita della FDA e della Federal Food, Drug and Cosmetic Act in cui si stabilì che il produttore di un farmaco (cosmetico o additivo alimentare), dovesse fornire prova della **sicurezza** ed **efficacia** del prodotto stesso prima di poterlo commercializzare.
- 1958-1961 (EU): la Talidomide farmaco antiemetico somministrato in gravidanza provoca la nascita di una decina di migliaia di bambini focomelici. Negli USA il farmaco non fu mai approvato a causa della segnalazione di una sospetta neuropatia periferica sensoriale

TOSSICOLOGIA

«scienza dei veleni»

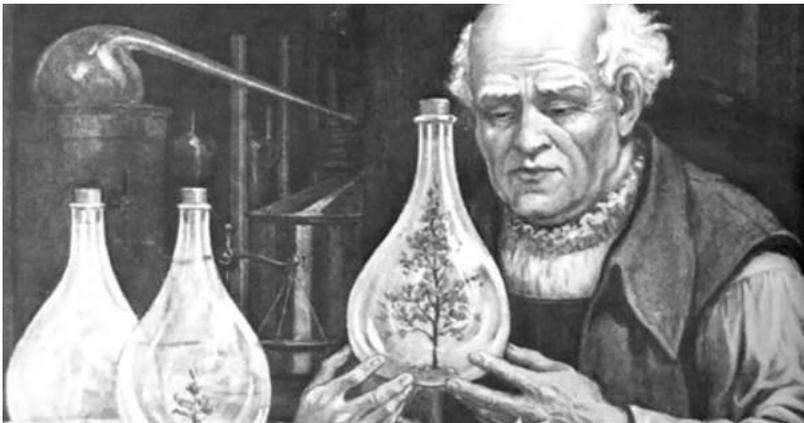


scienza multidisciplinare

Veleno: agente che causa morte o danni permanenti dopo esposizione anche in piccole quantità

indagini sugli effetti avversi delle nuove molecole (XENOBIOTICI), allo scopo di predire rischi per l'uomo

Effetti collaterali (avversi): aspetti tossicologici (indesiderati)



«Tutte le sostanze sono veleni, non ve n'è nessuna che non lo sia. E' la dose che differenzia un veleno da un rimedio»

(Paracelso 1493-1541)

- ❖ Sperimentazione essenziale
- ❖ Proprietà terapeutiche/proprietà tossiche
- ❖ Dose

“Tossico” è un concetto quantitativo:

qualunque sostanza può divenire un tossico **letale a partire da certe dosi/concentrazioni** pur non producendo alcun tipo di effetto al di sotto di livelli decisamente più bassi.

Tra questi due limiti si producono una serie di possibili effetti che vanno da una lieve tossicità cronica da esposizione per lunghi periodi ad immediata letalità.

Nessun effetto

Lieve tossicità

Tossicità

Un esempio: consumo di alcol



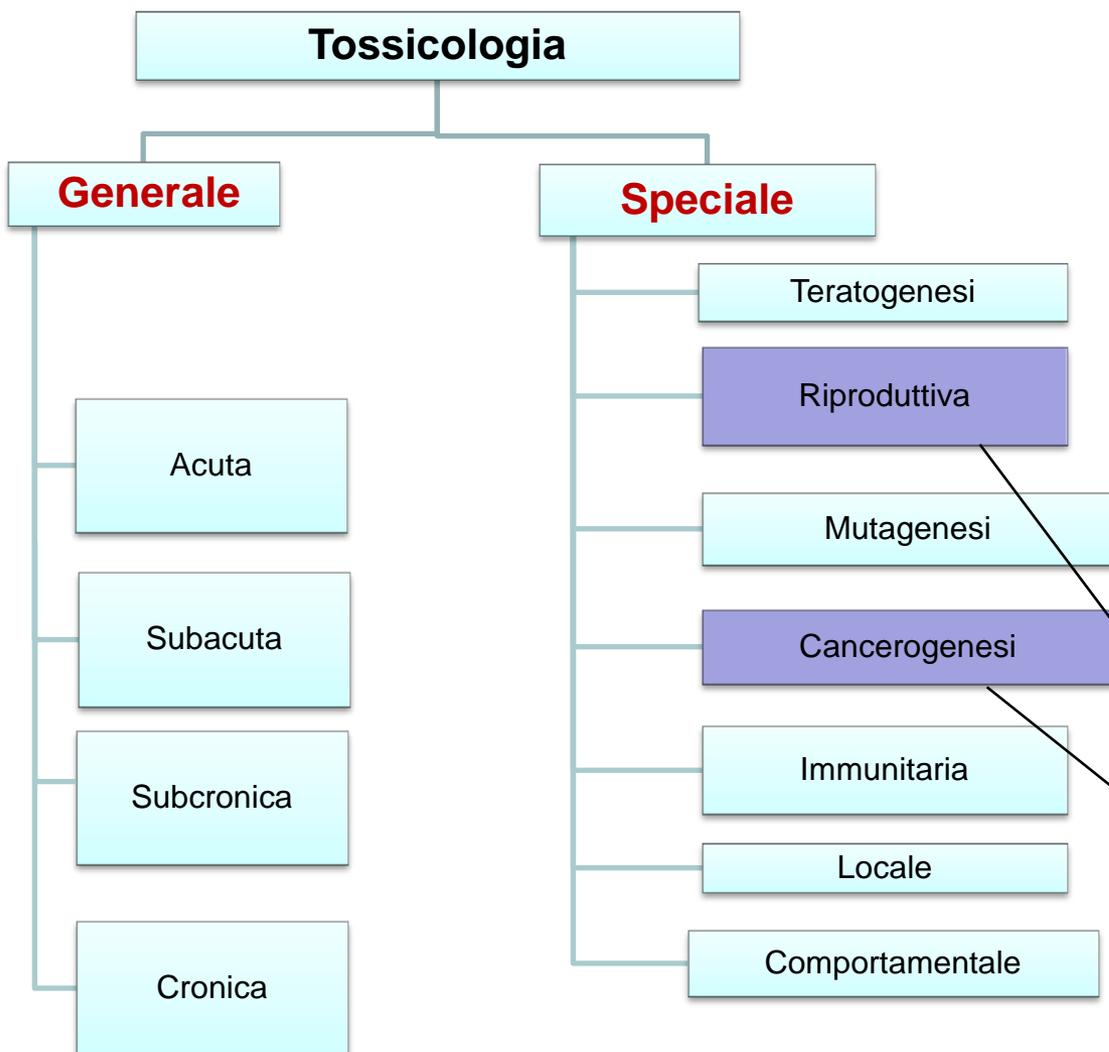
disinibizione

Impaccio
motorio

Disturbi
dell'equilibrio/
confusione mentale

coma

TOSSICOLOGIA



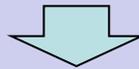
Tali studi sono volti alla caratterizzazione degli effetti morfologici e funzionali che le NME possono determinare, cercando di individuare **come** esplicano i loro effetti tossici, la **dose** dipendenza, **latenza**, **reversibilità** degli effetti.

Da condurre parallelamente agli studi clinici di fase I e II prima della AIC

TOSSICOLOGIA

Gli studi effettuati in **preclinica**, sono mirati a formulare le **prime ipotesi sulla sicurezza d'uso** della nuova preparazione, al fine di predisporre interventi per la **prevenzione o al contenimento** e al monitoraggio di **possibili effetti avversi** all'atto della **somministrazione all'uomo negli studi di fase I.**

- Definire la **minima dose che produce effetti tossici** e la **massima che non induce alcun effetto**, diretto od indiretto
- Definire la relazione tra **dose terapeutica e dose tossica (margine sicurezza)**



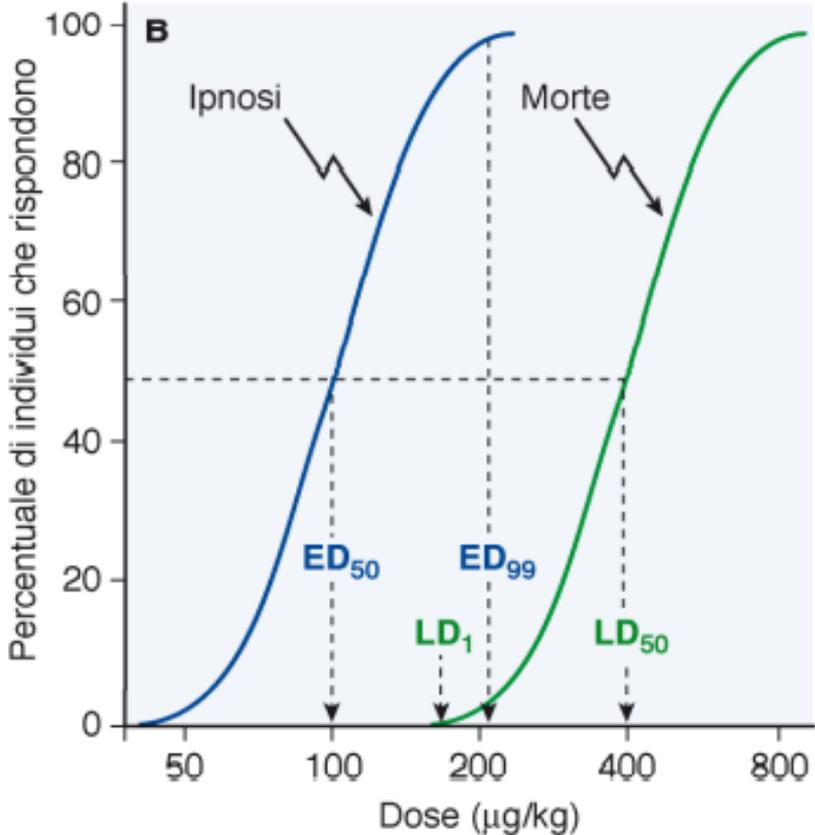
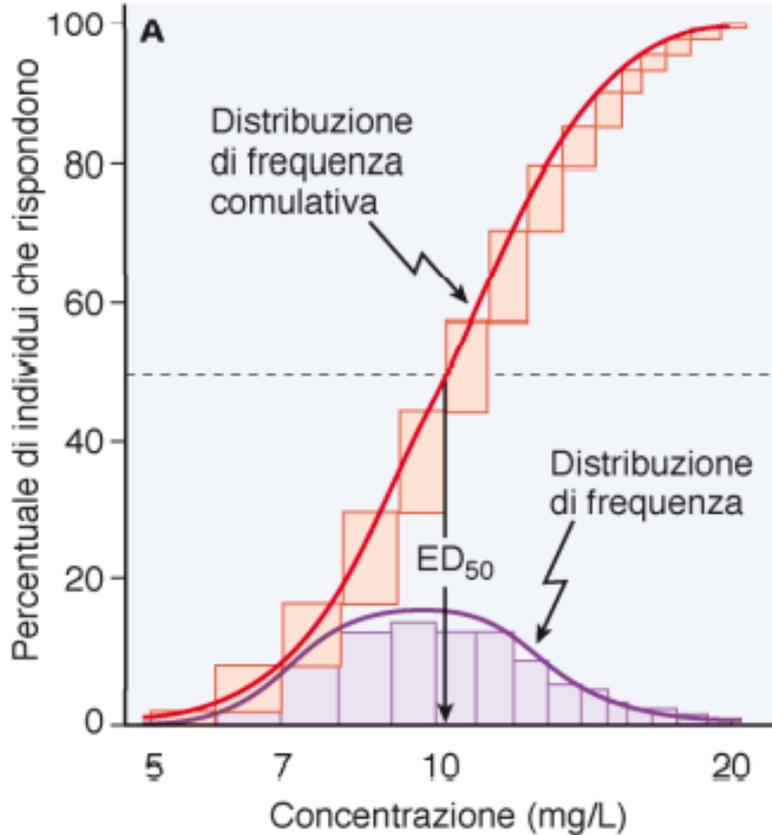
INDICE TERAPEUTICO

- Individuare quale **struttura cellulare, organo o sistema** sia il **bersaglio** della tossicità
- Definire le **caratteristiche dell'effetto tossico** determinato dalla molecola o dai suoi metaboliti
- Stabilire la **reversibilità** o meno degli effetti tossici osservati

TOSSICOLOGIA

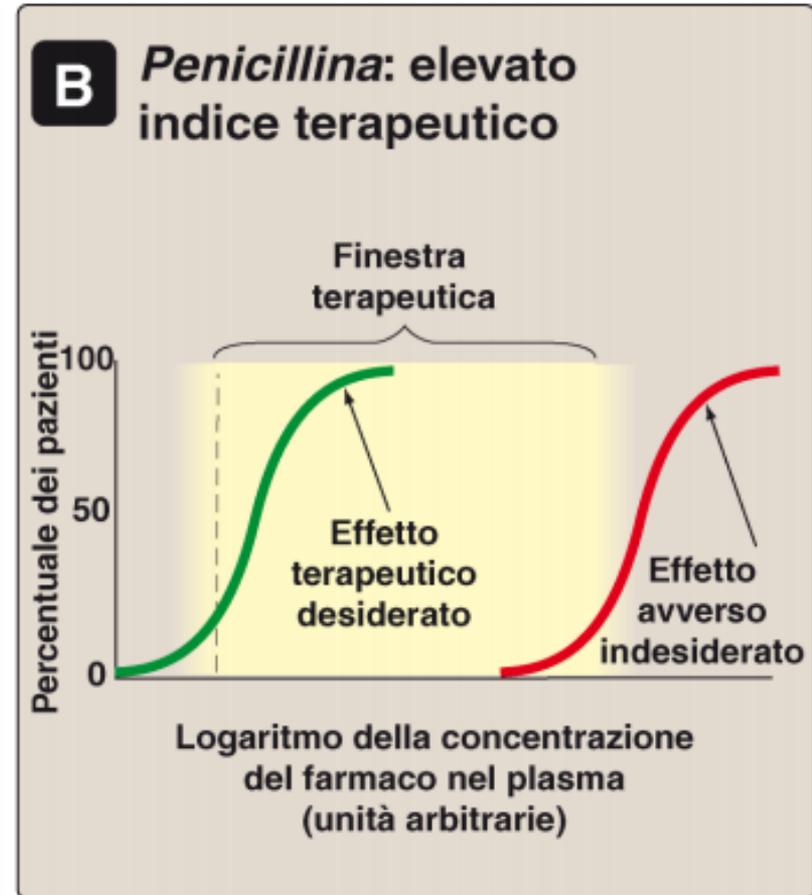
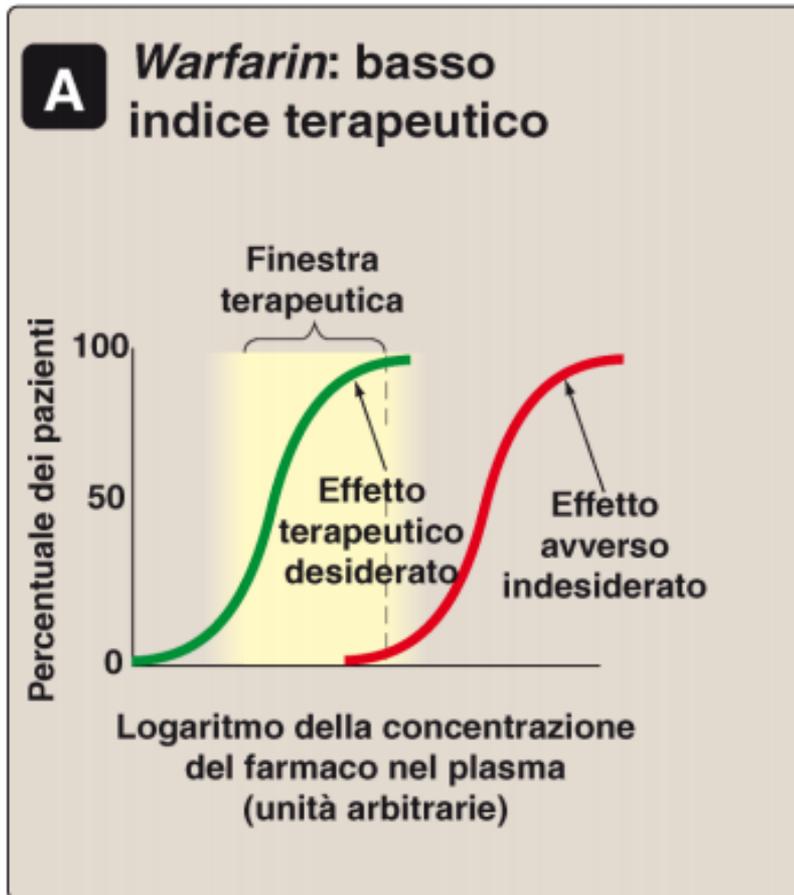
INDICE TERAPEUTICO

$$\text{Indice terapeutico: } \frac{LD_{50}}{ED_{50}} = \frac{400}{100} = 4$$



TOSSICOLOGIA

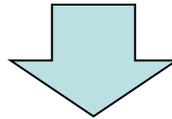
INDICE TERAPEUTICO



Variabilità della risposta tra individui

DATI RICAVABILI

NOEL	No Observed Effect Level	Dose che non causa alcun effetto
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	Dose che non causa alcun effetto avverso
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level	Dose più bassa che causa un effetto avverso



esempio

Dose (mg/kg/die)	Osservazione	Livello di effetto	
0	Controllo	-	
2	Nessuna differenza dai controlli	NOEL	
5	Diminuzione di peso (2%, $p < 0,05$)	NOAEL	2% non significativo biologicamente C'è un effetto, ma non considerato avverso)
20	Diminuzione di peso (20%, $p < 0,01$)	LOAEL	
50	Diminuzione di peso (35%, $p < 0,01$)	-	

Come si arriva alla dose da somministrare all'uomo

NOAEL usato per **calcolare la massima dose iniziale somministrabile (MRSD)** nella prima somministrazione all'uomo (studi clinici *First in Man*).
L'**algoritmo** prende in considerazione **differenze di peso, superficie corporea** e un fattore di sicurezza che **considera la variabilità inter e intra-specie**.

HED (*Human Equivalent Dose*) = NOAEL/fattore di conversione

MRSD (*Maximum Recommended Starting dose*) = HED/Fattore di sicurezza

Conversion of Animal Doses to Human Equivalent Doses Based on Body Surface Area

Species	Reference Body Weight (kg)	To Convert Animal Dose in mg/kg to HED in mg/kg, Either	
		Divide Animal Dose By	Multiply Animal Dose By
human	60		
Mouse	0.020	12.3	0.081
Hamster	0.080	7.4	0.135
Rat	0.150	6.2	0.162

Fattore di default pari a 10

Fattore di sicurezza (>10)
esempi: tossicità irreversibile, dati sull'animale limitati

Fattore di sicurezza (<10)
esempi: classi di molecole già note, profilo di tossicità ben caratterizzato, NOAEL ottenuti da studi di più lunga durata sull'animale rispetto all'impiego previsto nell'uomo

ESEMPIO:

NOAEL (ratto) = 15 mg/kg
HED = $15/6.2 = 2.42$ mg/kg

MRSD (default): $2.42/10 = 0.242$ mg/Kg

TEST DI TOSSICITÀ: durata dell'esposizione

Durata esposizione suggerita per gli studi di tossicità

Una o più somministrazioni nell'arco di 24 h
(studi di tossicità **acuta**)

14 gg
(studi di tossicità **subacuta**)

3 mesi (10-25% della vita dell'animale)
(studi di tossicità **subcronica**)

>6 mesi (>50% vita dell'animale)
(studi di tossicità **cronica**)



Se nell'uomo si prevede un trattamento > 30 gg

STUDI DI TOSSICITA' ACUTA

DEFINIZIONE:

“Effetti collaterali insorgenti dopo “breve” tempo dall’assunzione di una **dose singola di sostanza o di più dosi assunte nell’arco di 24 ore”**

Somministrazione unica (acuta) del principio attivo su **due o più specie** di mammiferi (di cui una non-roditore) = ratto/topo + coniglio

Dosi somministrate: - Ci si riferisce a parametri già noti quando possibile
3 dosi fisse - Se si tratta di una sostanza non nota o complessa si procede per **tentativi**

Vie di somministrazione: **due diverse vie (orale + una a seconda dei casi)** di somministrazione una delle quali identica a quella proposta nell’uomo (solitamente via orale)

STUDI DI TOSSICITA' ACUTA

BATTERIE DI TEST UTILIZZATI:

Tossicità orale
Tossicità inalatoria
Tossicità dermica
Tossicità oculare

IRRITAZIONI CUTANEE (i.c.) ED OCULARI (i.o.)

- Vie di somministrazione: **locale**
- Specie animali: **coniglio**
- Esecuzione del test:

I.C. = Sulla pelle del dorso precedentemente rasata viene applicata la sostanza (0,5 ml se liquida o 0,5 g se solida), ricoperta con la garza e tenuta a contatto per 4 ore.

I.O. = instillazione in un solo occhio della sostanza in esame.

- Osservazione a vari intervalli e viene osservato il grado di irritazione

METODI ALTERNATIVI (*in vitro*)

-Colture di cheratinociti epidermici

-Colture di cellule epiteliali corneali

STUDI DI TOSSICITA' ACUTA

DETERMINAZIONI:

Segni clinici di tossicità

Mortalità a determinati intervalli

Esame **autoptico** degli animali deceduti e di quelli sacrificati

Esame **istopatologico** degli organi

STUDI DI TOSSICITA' ACUTA

I **sintomi** più comunemente descritti e monitorati negli esperimenti di tossicità acuta sono:

- **respiratori** (dispnea, apnea, cianosi, tachipnea, edema polmonare)
- **cardiovascolari** (variazioni della frequenza, extrasistoli, variazioni dell' ECG, ipotensione, ipertensione, vasocostrizione o vasodilatazione cutanea)
- **nervosi** (convulsioni, variazioni del tono muscolare, variazioni della motilità, sonno, analgesia, piloerezione, variazioni delle funzioni motorie superiori)
- **cutanei** (eritema, edema, alterazioni del pelo)
- **gastroenterici** (vomito, diarrea, emorragie gastrointestinali)

STUDI DI TOSSICITA' ACUTA

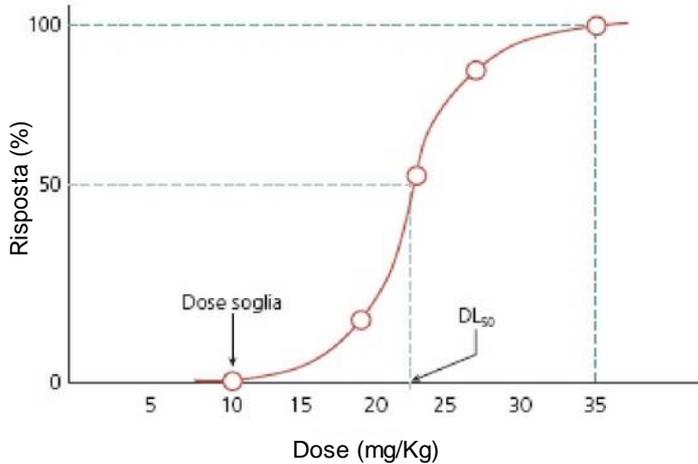
Durata dello studio è circa **14 gg** e comunque mai inferiore a 7 gg e può proseguire per tutto il tempo in cui persistono gli effetti tossici

Il **periodo di osservazione** deve essere adeguato a mettere in luce i danni ai tessuti e agli organi, oppure il ritorno alla norma delle condizioni dell' animale

Ottenere dati su relazione:

DOSE/EFFETTO (DT50) e DOSE/MORTALITA' (DL50)

STUDI DI TOSSICITA' ACUTA



Dose letale media (DL₅₀): quantità di farmaco, in unità di peso o volume per unità di peso corporeo (es mg/Kg), che somministrata ad un gruppo di animali per una determinata via ed in definite condizioni sperimentali, **produce la morte del 50% degli animali.**

Problemi della DL₅₀

Valore legato a fattori esogeni/endogeni (valore variabile)

Il dato numerico, eppur calcolato con procedure omogenee e corrette su un elevato numero di animali, non può essere considerato come una costante biologica, e permette quindi solo una stima approssimativa dell'intervallo di dosi tossiche per la specie in cui il test è stato condotto.

Problema etico

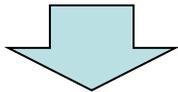
La determinazione della **DOSE LETALE (DL₅₀)**: da più di un decennio non è più ritenuta necessaria (alto numero di animali utilizzati ☹)

STUDI DI TOSSICITA' ACUTA: Sostituibili dall'analisi accurata degli effetti della prima dose negli studi con dosi ripetute (linea guida ICH M3) per ridurre al minimo l'uso di animali 😊

Esempio:

Saggio tossicità acuta per os

«..Dose iniziale più suscettibile di cagionare la morte di almeno una parte degli animali trattati..»

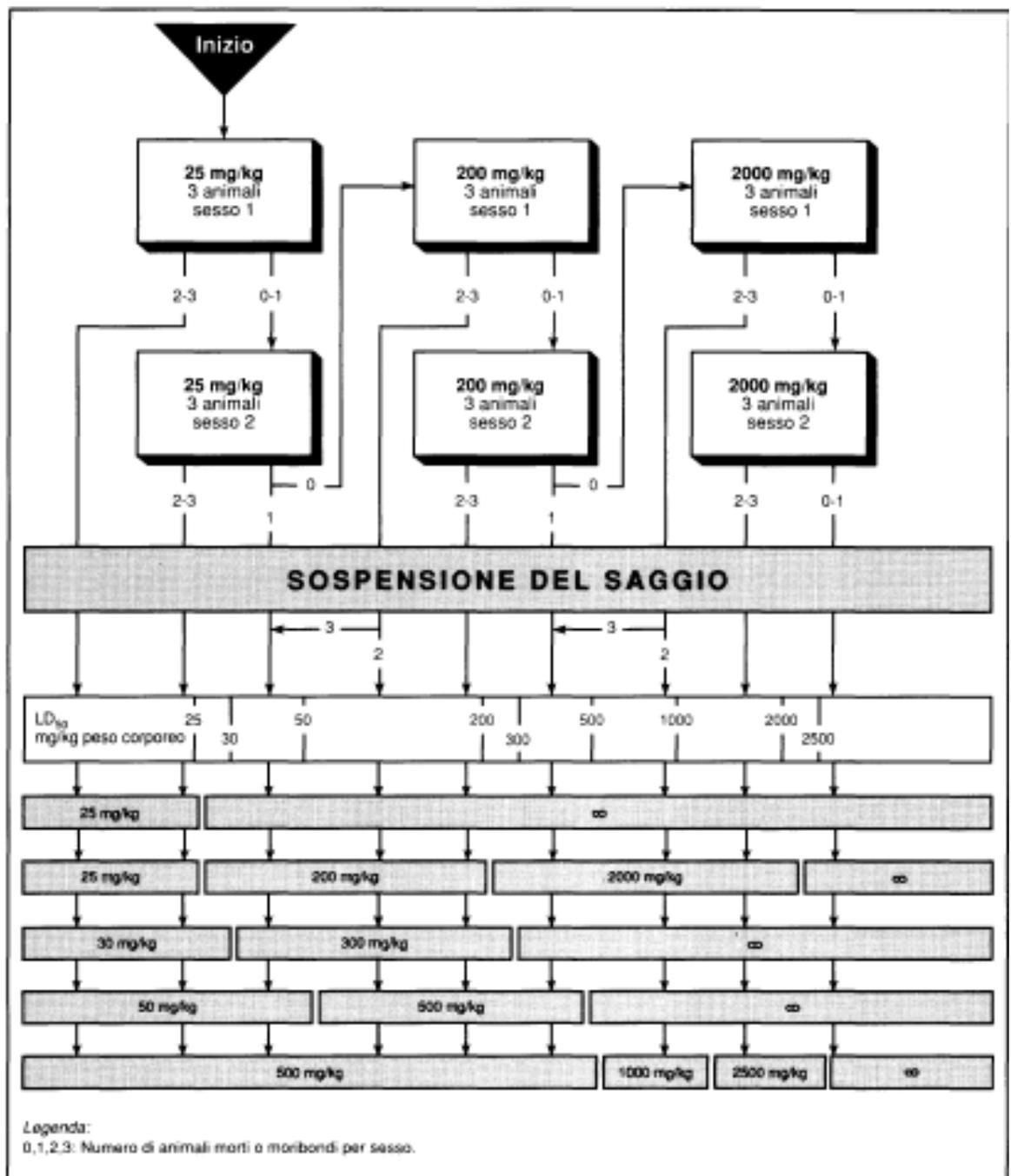


Scelta dosaggio minimo

- ❖ Proprietà chimico-fisiche
- ❖ Relazioni struttura-attività
- ❖ Dati provenienti da altri saggi di tossicità
- ❖ Uso previsto della sostanza

Linee guida CE:

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/dansub/pdfs/annex5b_it.pdf



STUDI CON SOMMINISTRAZIONI RIPETUTE

- ❑ **TOSSICITA' SUBACUTA: si eseguono per fornire informazioni sulla dose da utilizzare negli studi di tossicità subcronica** (tossicità dose subletale per un breve periodo di tempo)

Effetti collaterali insorgenti dopo l'assunzione attraverso la dieta di **almeno 3 dosi** della sostanza

Ratto: 3 o 4 dosi, 10 animali per dose e per ogni sesso

Cane: 3 dosi, 3 o 4 animali per sesso

DOPO 14 giorni di esposizione: analisi chimico-cliniche e istopatologiche

STUDI CON SOMMINISTRAZIONI RIPETUTE

- **TOSSICITA' SUBCRONICA:** Stabilire NOAEL
Stabilire LOAEL
Organo bersaglio

Tempo: 10% della durata media della vita dell'animale.

3 dosi a 3 gruppi diversi di animali (nel caso dei roditori, 20 animali per gruppo, di cui 10 maschi e 10 femmine)

due specie di mammifero (ratto, cane, maiale o primati non umani) di cui una di roditori

VIE DI SOMMINISTRAZIONE: Orale, Inalatoria, Dermica

DETERMINAZIONI (una o due volte al giorno ed alla fine dello studio)

Comportamento e stato di salute dell'animale (Peso corporeo, Consumo di cibo, ...)

Parametri ematologici, biochimici ed urinari

Peso degli organi e valutazioni istopatologiche

TOSSICITA' SUBCRONICA

Esempio Saggio tossicità subcronica per via orale:

Ogni giorno, **per un periodo di 90 giorni**, si somministra per via orale la sostanza in esame in dosi crescenti a vari gruppi di animali da esperimento, laddove ad ogni gruppo corrisponde un determinato livello di dose.

La sostanza di prova viene somministrata mediante **sonda gastrica**, oppure con la **dieta** o **l'acqua di abbeveraggio**.

Periodo di osservazione di almeno 90 giorni.

1. La **dose più elevata** produce tossicità ma non causa più del 10% di mortalità
2. La **dose minore** permette di fissare il margine di tolleranza del prodotto nell'animale e va scelta in base alla capacità di ottenere l'effetto farmacologico (non causa apparenti segni di tossicità)
3. La **dose intermedia** è la media fra la dose maggiore e la minore.

TOSSICITA' CRONICA

Studi condotti per tempi più lunghi rispetto agli studi di tossicità subcronica e vengono di norma richiesti quando il farmaco deve essere somministrato con regolarità per lungo periodo di tempo

- esposizione >3 mesi
- **DOSI** stabilite in modo che:
 - ✓ la **dose maggiore**: MDT (massima dose tollerata, ottenuta da studi tossicità subcronica->dose che in uno studio subcronico di 90 gg diminuisce di poco (10%) la velocità di crescita corporea)
 - ✓ la **dose intermedia** sia la minima dose in grado di indurre il **primo chiaro effetto tossico**
 - ✓ la **dose minore**: ben tollerata e se possibile, sia da 2 a 10 volte superiore a quella giornaliera prevista **per l'uso terapeutico** in clinica umana

GLI STUDI DI TOSSICITA' POSSONO CONTINUARE ANCHE DURANTE DELLA SPERIMENTAZIONE CLINICA

ALCUNI EFFETTI TOSSICI MISURABILI SOLO *IN VIVO* PER CUI NON ESISTONO TEST *IN VITRO*

TREMORE

ECCITAZIONE

VOMITO

IPERFAGIA

FRAGILITA' OSSEA

CONVULSIONI

INFIAMMAZIONE ACUTA E
CRONICA

ASMA CRONICA

SEDAZIONE

AMNESIA

IPERTERMIA

DIARREA

IPERTENSIONE

SONNOLENZA

NEUROTOSSICITA'

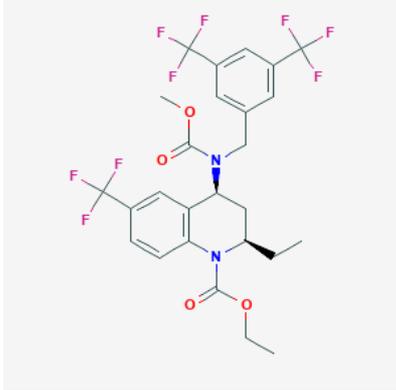
IPOVISIONE

CACHESSIA

CATARATTA

IPOPENSIONE

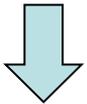
IMPORTANZA DEGLI STUDI DI TOSSICITA' : il caso del Torcetrapib



Inibitore dell'enzima **CEPT** (Cholesteryl Ester-Transfer Protein) che trasferisce colesterolo dalle HDL (colesterolo buono) a LDL e VLDL

- Studi **preclinici**: **OK**
- Studio **FASE 1**: **OK** (nessun effetto avverso)
- Studio **FASE 2**: efficacia nell'aumento di HDL, ed aumento della pressione di pochi mmHg...che fu ritenuto **INSIGNIFICANTE**
- Studio **FASE 3**: studio su 15000 pazienti (metà trattati con statine, metà trattati con statine e Torcetrapib → eccesso di mortalità nel gruppo che riceveva Torcetrapib)

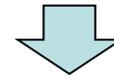
Tossicità al surrene



Aumento aldosterone



Farmaco abbandonato: perdita di 800-900 milioni di dollari



Necessità di evidenziare effetti tossici prima possibile con metodi alternativi

Tossicologia speciale

Teratogenesi

Periodo: dal concepimento alla nascita

Riproduttiva

Sistema riproduttivo maschile e femminile

Mutagenesi

Mutazioni del genoma cellulare

Cancerogenesi

Cellula normale → cellula cancerosa

Immunitaria

Locale

Comportamentale

Tossicologia **RIPRODUTTIVA** e dello **SVILUPPO**

Cosa valuta:

Alterazione della fertilità

Alterazione della capacità riproduttiva

Danni all'organismo in crescita (periodo intrauterino/postnatale)

Effetti multigenerazionali

Quando si somministra il tossico:

Prima del concepimento (maschi e femmine)

Durante gravidanza e allattamento

TOSSICITA' RIPRODUTTIVA

ANIMALI UTILIZZATI: Due specie animali (ratto, coniglio)

MODALITA' CON CUI VENGONO CONDOTTI GLI STUDI

Somministrazione del composto a **maschi e femmine**

> *prima dell'accoppiamento (60 gg maschi-14 gg femmine)*

> *durante la gravidanza e l'allattamento*

Si valuta:

% femmine gravide

N° animali nati morti

N° animali nati vivi (peso, crescita, sopravvivenza)

Viene seguito lo sviluppo dei nuovi nati fino al loro nuovo accoppiamento per giungere ad una successiva generazione

TOSSICITA' RIPRODUTTIVA

Cosa si evidenzia

- modifiche della fertilità o procreazione anomala dovuta a danni dei gameti maschili e o femminili
- Interferenze con le fasi di impianto del feto e del suo sviluppo
- Effetti tossici **sull'embrione**
- Effetti tossici sul **feto**
- Mettere in rilievo le modifiche della fisiologia materna con conseguenti effetti tossici secondari sull'embrione o sul feto
- Effetti sulla crescita oppure sullo sviluppo dell'utero o della placenta
- **Interferenze con il parto**
- Effetti sullo sviluppo postnatale (allattamento, capacità di assumere il latte da parte dei neonati)
- Effetti **tardivi sulla discendenza**

TERATOLOGIA

- ❑ Studia gli effetti dei teratogeni (sostanze che interferiscono con omeostasi, crescita, differenziamento e sviluppo di embione/feto causandone **morte** o determinando **malformazioni**)

PERIODO EMBRIONALE: maggiore suscettibilità

PERIODO FETALE: ritardo nello sviluppo fisico e mentale

- ❑ Periodo di esposizione
- ❑ Dose soglia

TEST: due specie (una non-roditrice): 12 conigli/24 ratti o topi
somministrazione di 3 dosi **durante organogenesi** (conigli 7- 19 gg)
feti prelevati per taglio cesareo **un giorno prima di quello stimato** per la nascita

UN CASO DI TERATOGENO: TALIDOMIDE (1957-1962)

'DISTAVAL'
TRADE MARK
NON-BARBITURIC

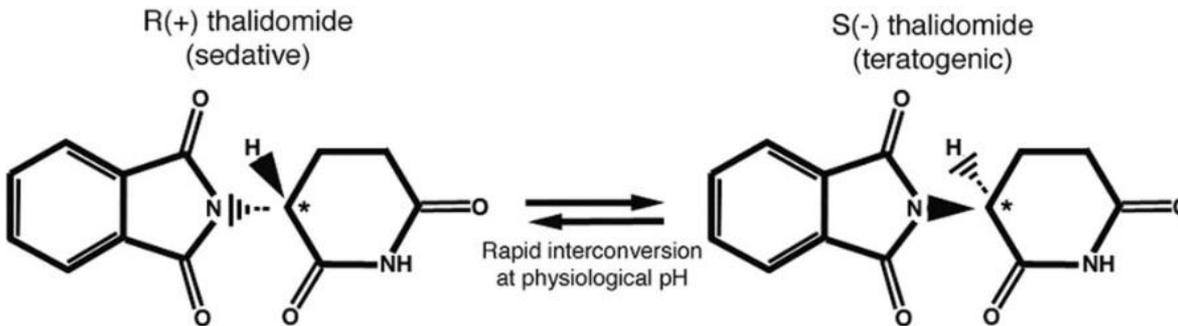
'DISTAVAL'
TRADE MARK
NON-BARBITURIC

SAFE and effective
SEDATIVE AND HYPNOTIC

DOSAGE:
As a sedative. ADULTS, one 25 mg. tablet 2 or 3 times a day.
INFANTS & CHILDREN, half from 2 mg. to 10 mg. 4 times a day.
As a hypnotic. ADULTS 50 mg. or 200 mg. INFANTS and CHILDREN 25 mg. to 10 mg. as bedtime.

THE DISTILLERS COMPANY (Biochemicals) LIMITED
Broadway House, The Broadway, Wimbledon, London, S.W.19 Telephone: L11891 6600
Owners of the trade mark 'Distaval'

>10000 malformazioni in pochi anni



Review

Thalidomide-Induced Teratogenesis: History and Mechanisms

Neil Vargesson

Birth Defects Research (Part C) 105:140-156, 2015.

TEST DI MUTAGENESI

Mutagenesi: introduzione di cambiamenti permanenti trasmissibili del **materiale genetico** di cellule o organismi, a livello **somatico** o **germinale**.



*Può portare al cancro
o mutazioni*



Malattie ereditarie

Genotossicità: termine più ampio, comprende oltre alle mutazioni, effetti diversi sul materiale genetico, ad es. danni al DNA come **rottture** a singola o doppia elica, addotti del DNA, sintesi non programmata del DNA, **scambi fra cromatidi fratelli**, ricombinazione mitotica.

OBIETTIVI

- i. Identificazione delle sostanze capaci di indurre danni genetici nella progenie in seguito all'interazione con il materiale genetico e una stima quantitativa del danno genetico trasmissibile
- ii. Predizione dell'attività cancerogena conseguente alla interazione con il materiale genetico delle cellule somatiche
- iii. Valutazione del meccanismo d'azione

TEST DI MUTAGENESI

Una raccomandazione CEE del 5 novembre 1984 ha stabilito che i test di mutagenesi per composti nuovi prima dell' immissione sul mercato devono comprendere: (Indicati da linea guida dedicata ICH S2B Genotoxicity)

In vitro – Standard

Test di Ames	Mutazione genica in batterio (vedi Box 4.4)
Aberrazione cromosomica	Danno cromosomico in cellule di criceto o umane
Micronucleo	Danno cromosomico in cellule (presenza di micronuclei)
Test del linfoma di topo	Mutazione genica in cellule di linfoma di topo

In vitro – Altri

Comet	Danno al DNA in cellule
Trasformazione cellulare	Trasformazione morfologica in cellule

In vivo – Standard

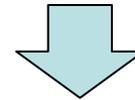
Micronucleo	Danno cromosomico (presenza di micronuclei) in cellule ematiche o di midollo osseo di topo
Aberrazione cromosomica	Danno cromosomico in linfociti di topo

In vivo – Altri

Comet	Danno al DNA in vari tessuti di topo
Test di UDS (Unscheduled DNA Synthesis)	Riparazione del DNA in linfociti di topo

Batteria di test **in vitro** (cellule batteriche e mammifero) e *test in vivo*

1 risultato positivo e 2 negativi

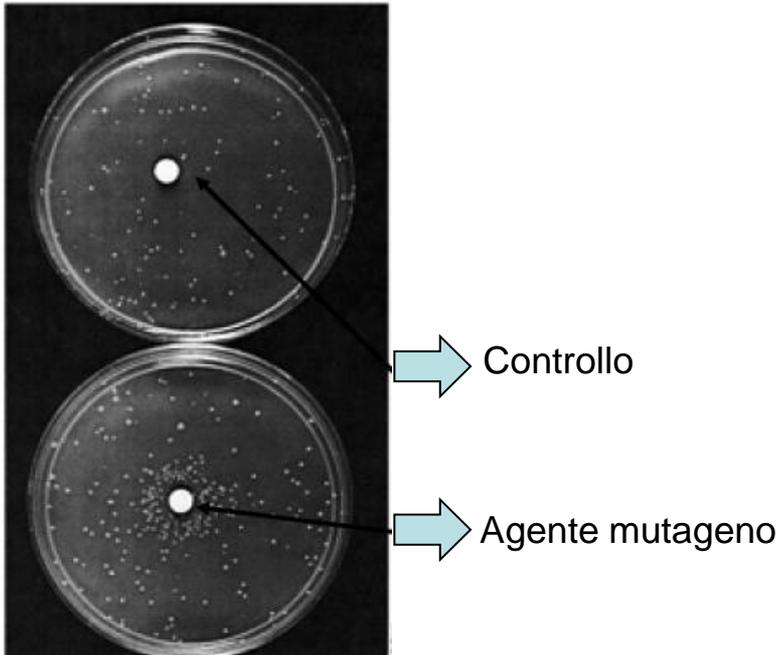


Test supplementari

TEST DI MUTAGENESI – test di Ames

Utilizza ceppi mutanti di *Salmonella typhimurium*, che hanno perso la capacità di sopravvivere in assenza di uno specifico nutriente presente nel terreno, l'istidina

Una sostanza mutagena può produrre una **retromutazione** ⇒ i batteri riacquistano la capacità di sopravvivere in assenza di istidina.



Spot test:

Al centro di una piastra, sulla quale sono stati piastrati i batteri, si applica una piccola quantità di agente sospettato di essere mutageno.

La sostanza diffonde dal centro verso la periferia formando un gradiente di concentrazione decrescente.

Il mutageno determinerà la formazione di un anello di colonie revertanti in funzione del gradiente.

NB: l'istidina è presente in **quantità limitanti** (vi è abbastanza istidina da permettere solo un certo numero di divisioni cellulari).

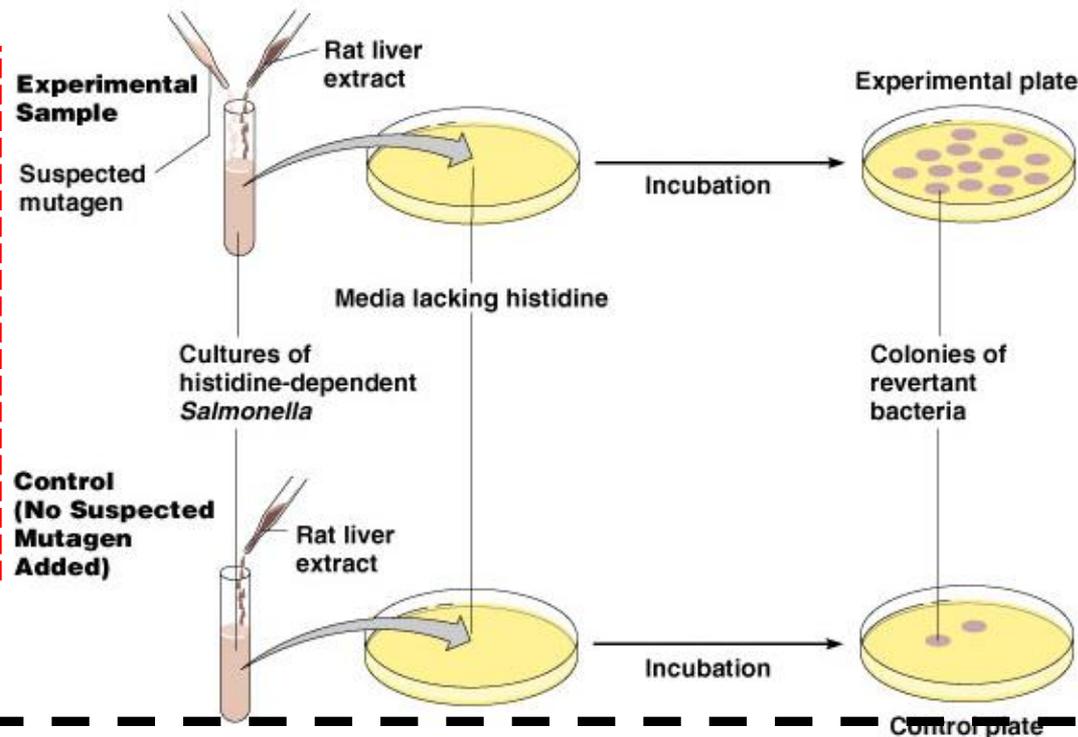
TEST DI MUTAGENESI – test di Ames

Utilizza ceppi mutanti di *Salmonella typhimurium*, che hanno perso la capacità di sopravvivere in assenza di uno specifico nutriente presente nel terreno, l' istidina

Una sostanza mutagena può produrre una **retromutazione** ⇒ i batteri riacquistano la capacità di sopravvivere in assenza di istidina.

La **maggior parte** dei mutageni sono **indiretti**

⇒ il test è effettuato (anche) in presenza di una frazione microsomiale epatica (S9), che contiene gli enzimi metabolizzanti.



Il test di mutagenesi di Ames ha evidenziato una netta **correlazione tra mutageni e cancerogeni (60-80%)**.

Viene quindi generalmente accettato che una evidenza di mutagenicità indichi anche rischio cancerogeno.

TEST DI MUTAGENESI – test di Ames

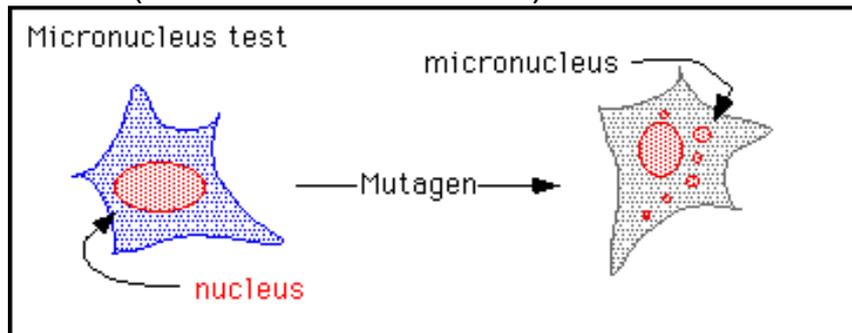
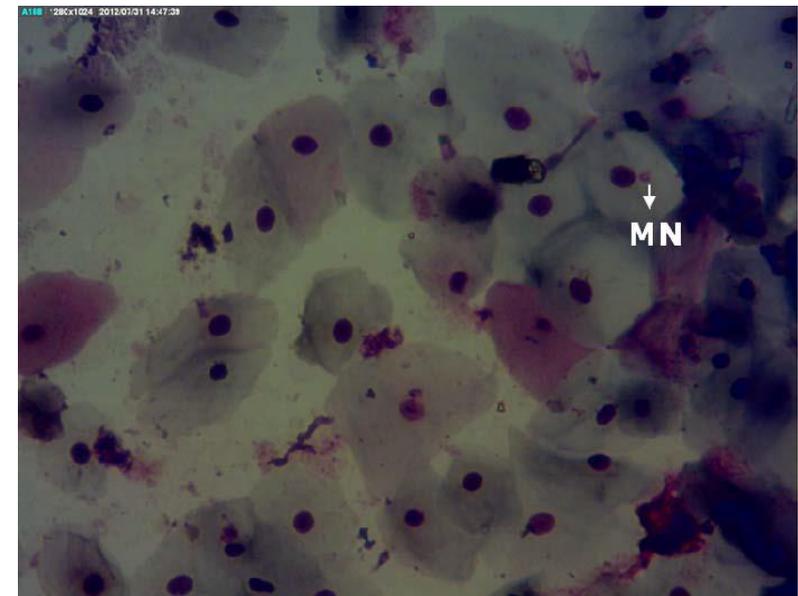
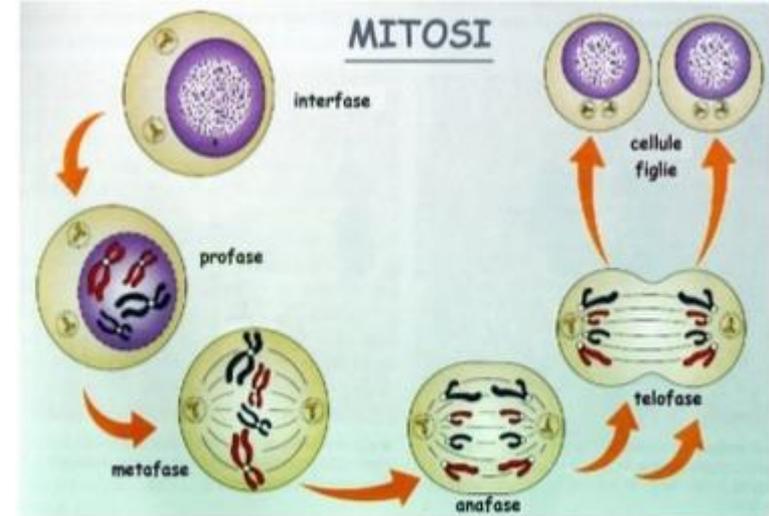
VALUTAZIONE ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

- Un composto viene considerato mutageno se determina un incremento dose-dipendente del numero di colonie revertenti in uno o più ceppi (≥ 2 volte)
- Un composto viene considerato non mutageno se non induce un aumento dose-dipendente del numero di colonie revertenti in tutti i ceppi impiegati
- I risultati del test si definiscono inconclusivi quando non permettono di identificare il composto in esame come mutageno o non mutageno

TEST DI MUTAGENESI - micronucleo

Il **test del micronucleo** è un test di mutagenesi che consente di osservare in cellule **interfasiche** viste al **microscopio ottico** eventuali errori della mitosi causati da agenti mutageni.

Consiste nel prelevare, da un organismo sottoposto all'agente mutageno, cellule durante la mitosi, e osservarne un discreto numero (almeno un centinaio) al microscopio, dopo aver effettuato una colorazione differenziale che evidenzi il materiale genetico: in **caso di errori (provocati dal mutageno)**, sono visibili, oltre al nucleo, frammenti di DNA sparsi per il citoplasma e che dunque non sono stati incorporati nel nucleo principale durante le ultime fasi della divisione cellulare (chiamati *micronuclei*).



TEST DI CANCEROGENICITA'

Gli studi di cancerogenicità sono effettuati *in vivo*. Devono registrare **l'incidenza dei tumori**, soprattutto di quelli che colpiscono determinati tessuti e/o di quelli maligni, ed il **periodo di latenza prima della loro manifestazione**.

CARATTERISTICHE:

- due specie animali (una generalmente è il ratto)
- stessa via proposta per l'uomo,
- somministrazioni giornaliere (7 gg. su 7)
- gruppi sperimentali di almeno 100 animali (50 m-50 f), uno per ogni livello di dose (3 dosaggi) e un gruppo controllo.
- Durata 18-24 mesi

Tutte le sostanze cancerogene per l'uomo lo sono anche per altre specie, ma non per tutti gli animali da laboratorio.

Non si sa con certezza se è vero l'opposto (cioè se tutte le sostanze cancerogene per l'animale da laboratorio lo sono anche per l'uomo).

TEST DI CANCEROGENICITA'

Obiettivi degli studi di cancerogenicità

Identificare capacità di indurre tumori nell' animale e possibile rischio per l' uomo

*Sono richieste per nuove molecole (da effettuare prima della AIC) ma particolarmente, per quelle appartenenti a **determinate categorie**:*

- molecole di una classe chimica che ha già dimostrato effetti cancerogeni rilevanti anche per l' uomo;
- relazione **struttura-attività** che **suggerisce un rischio** cancerogeno;
- evidenza di lesioni neoplastiche negli studi di tossicità ripetuta;
- ritenzione **a lungo termine della molecola o suoi metaboliti, in determinati organi**;
- evidenze di **positività nei test di mutagenesi**.

PROCESSO AUTORIZZATIVO

Studi pre-clinici/non clinici a supporto delle sperimentazioni cliniche di fase I-III	Studi clinici
<p>A</p> <ul style="list-style-type: none"> •Farmacodinamica •Sicurezza farmacologica (SNC, CV, apparato respiratorio) •Studi tossicologici (dose singola, dosi ripetute a 14 e 28gg con tossicocinetica e esame organi riproduttivi) •Genotossicità preliminare •Tollerabilità locale •Tossicocinetica e farmacocinetica 	<p>B</p> <p>Fase I: si valuta la <u>tollerabilità</u> dose dipendente e la <u>farmacocinetica</u>. Su <i>volontari sani</i> (o malati terminali per patologie specifiche come AIDS o tumori)</p>
<p>C</p> <ul style="list-style-type: none"> •Completamento genotossicità •Tossicità riproduttiva (m/f) •Tossicità a dosi ripetute 90gg con tossicocinetica •Studi farmacocinetica completi (biotrasformazione) 	<p>D</p> <p>Fase II: su ca <i>100 pazienti</i>, valutano efficacia, si individua <u>dose efficace minima</u> e <u>dose massima</u></p>
<p>E</p> <p>Farmaci per uso cronico:</p> <ul style="list-style-type: none"> •Tossicità cronica •Carcinogenicità •Studi aggiuntivi (particolari problemi sicurezza) 	<p>F</p> <p>Fase III: su <i>migliaia di pazienti</i> (meno x patologie gravi) si valuta <u>efficacia</u> farmacologica e la <u>sicurezza a breve termine</u></p>