

Tossicità

Lo scopo della **sperimentazione preclinica** è valutare la mancanza di tossicità nelle molecole in sperimentazione e la possibilità che queste sostanze producano effetti terapeutici. Tale operazione può essere svolta con esperimenti in toto, iniettando direttamente la sostanza nell'animale vivo, o può essere fatta nell'organo isolato, cioè prelevando un certo organo dall'animale da esperimento, mantenerlo sopravvive e trattarlo con il farmaco.



La tossicità si distingue in: acuta, subacuta, subcronica e cronica.

Tossicità acuta: viene effettuata un'unica somministrazione del farmaco; per stabilirla, la dose somministrata varia di lotto in lotto fino a somministrare una dose che sarà la DL50. Lo studio sulla tossicità acuta, inoltre, è utile per l'identificazione clinica di tossicità negli organi bersaglio, l'eventuale reversibilità dell'effetto tossico e per suggerire le dosi da utilizzare in ulteriori esperimenti.

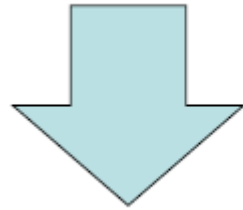
Tossicità subacuta: vengono effettuate somministrazioni ripetute di farmaci per durata di **14 gg**. Non superiore al 10% della durata media della vita dell'animale, durante i quali nello stesso animale viene somministrata la stessa dose in modo da accertare se durante questo periodo di somministrazioni si verificano effetti tossici non manifestatisi negli studi sulla tossicità acuta.

Tossicità subcronica: il trattamento **viene prolungato a 40 giorni** per identificare gli organi bersaglio di questo tipo di tossicità, la sua reversibilità o meno, e per determinare quella dose che sarà usata negli studi di tossicità cronica.

Tossicità cronica: sono studi che durano durata di **18/24 mesi**, considerando un rapporto tra età media del topo (3 anni) e quella dell'uomo.

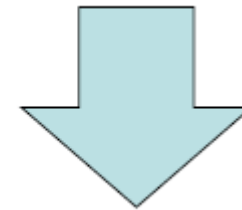
Sperimentazione preclinica

Farmacologia



Valutazione dell'efficacia

Tossicologia



Valutazione della sicurezza

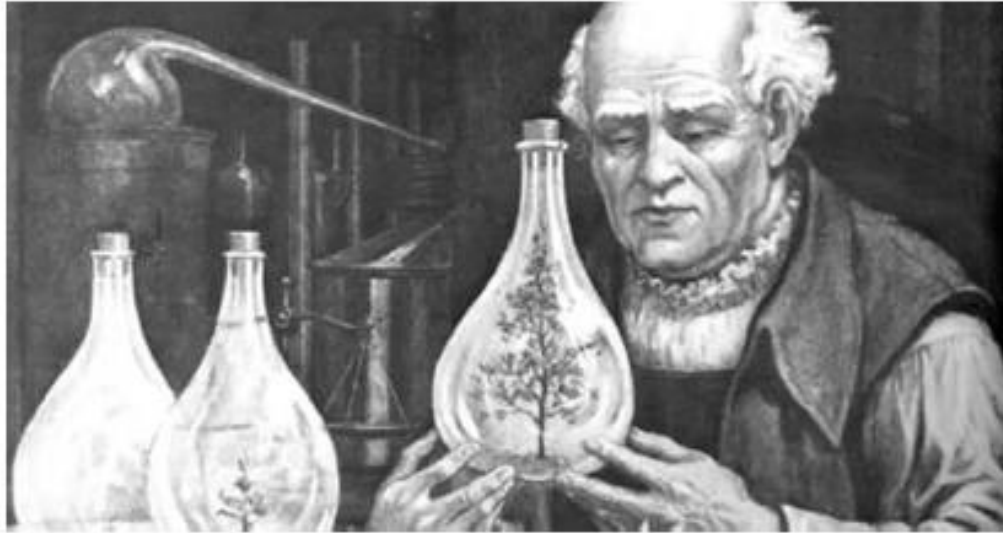
Studi eseguiti in accordo con la legislazione internazionale e le norme di GLP

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

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

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)**

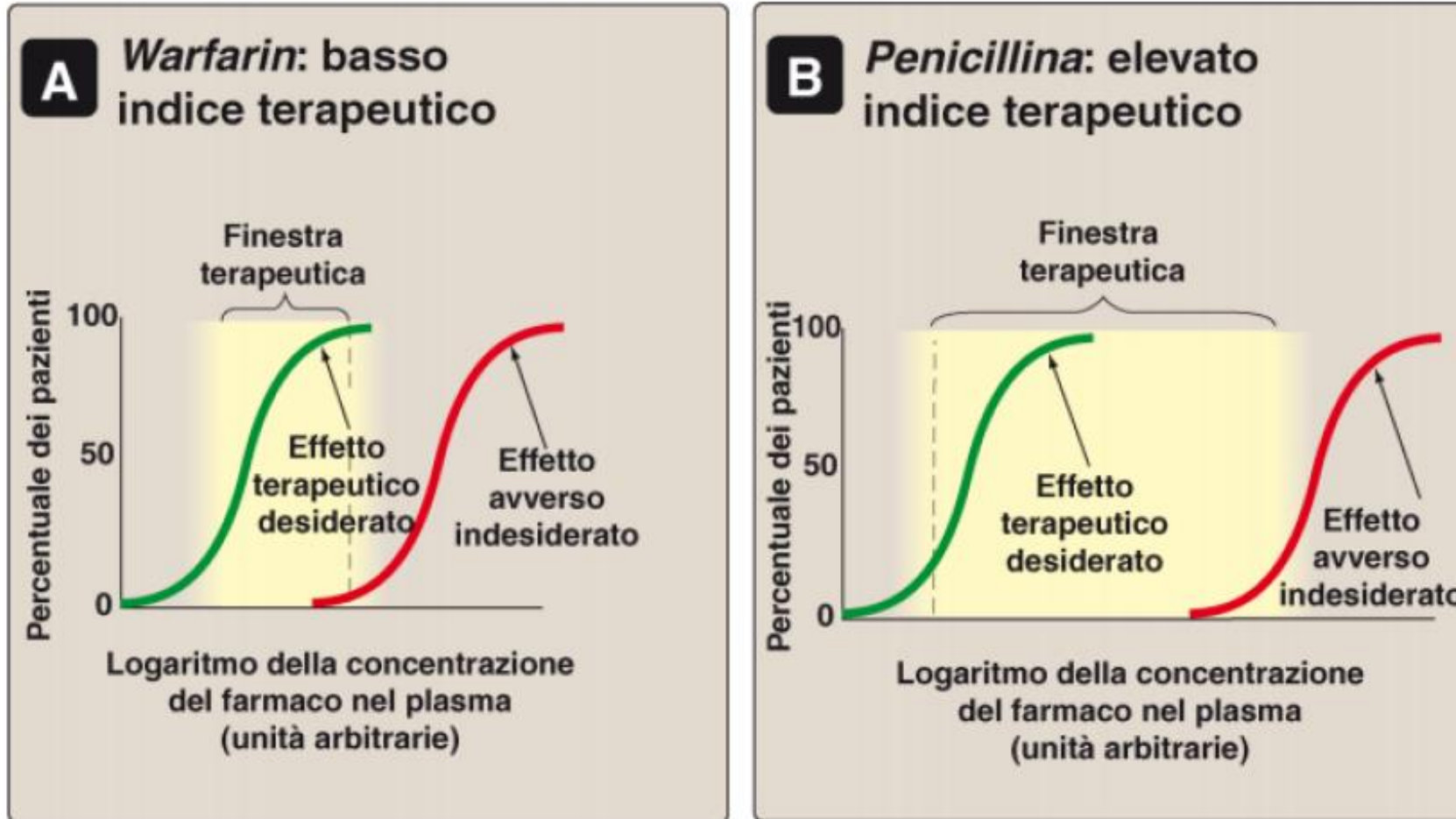


INDICE TERAPEUTICO

- 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



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

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

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

La tossicità si distingue in:

- **acuta,**
- subacuta,
- subcronica,
- cronica.

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

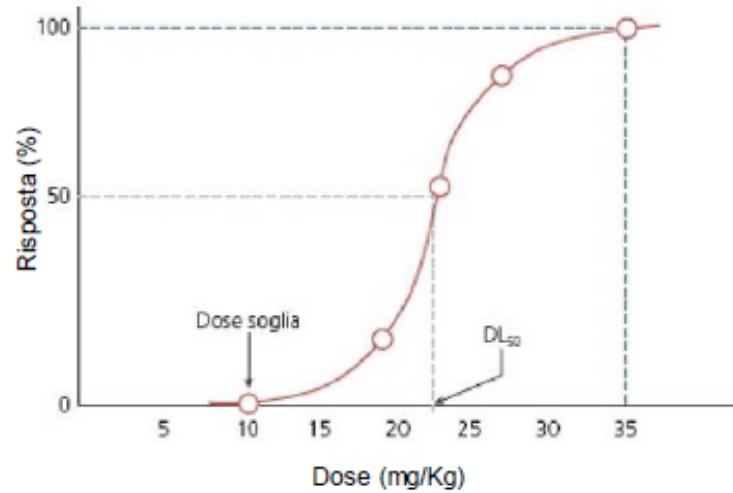
Durata dello studio è circa **14 gg** e comunque mai inferiore a 7 gg e può proseguire per tutto il tempo in cui persistono gli effetti tossici

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, 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 ☺

La tossicità si distingue in:

- acuta,
- **subacuta,**
- subcronica,
- cronica.

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

La tossicità si distingue in:

- acuta,
- subacuta,
- **subcronica,**
- cronica.

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 marginale 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.

La tossicità si distingue in:

- acuta,
- subacuta,
- subcronica,
- **cronica.**

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'

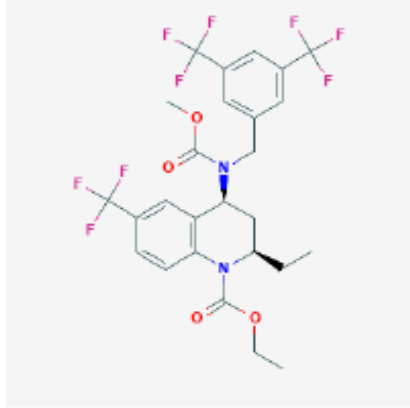
IPOVISIONE

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

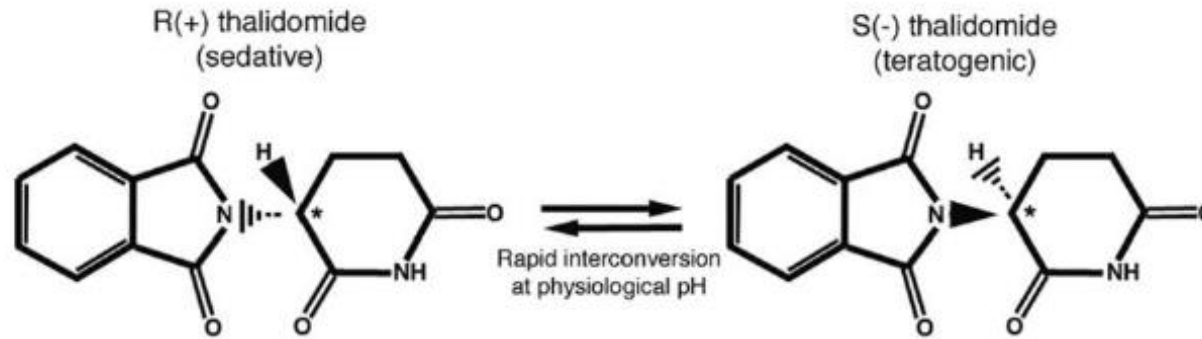
UN CASO DI TERATOGENO: TALIDOMIDE (1957-1962)

'DISTAVAL'
TRADE MARK
NON-BARBITURIC

'DISTAVAL'
SAFE and effective
SEDATIVE AND HYPNOTIC

THE DISTILLERS COMPANY (RIVERSIDE) LIMITED
Bridgway House, The Riverside, Wokingham, London, E.W. 19 Telephone: 11899 6000

>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.

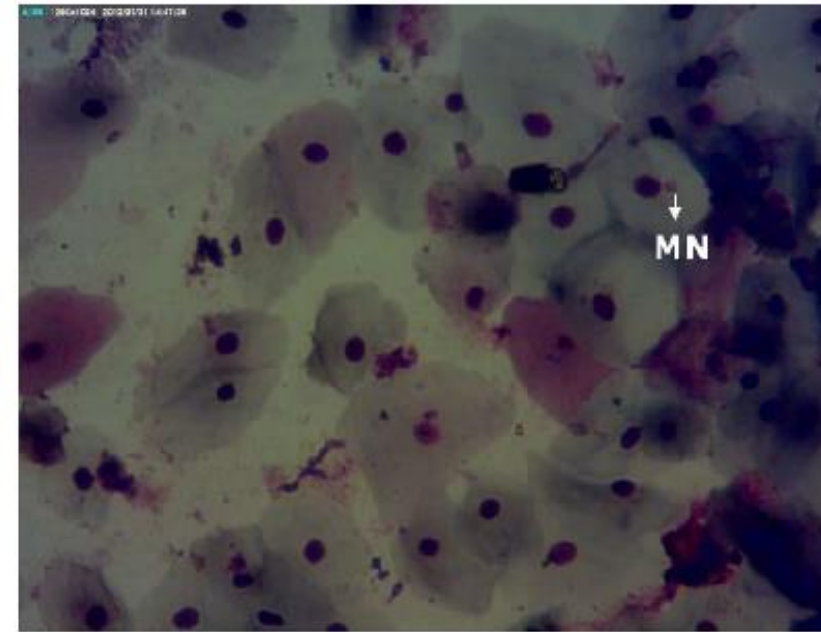
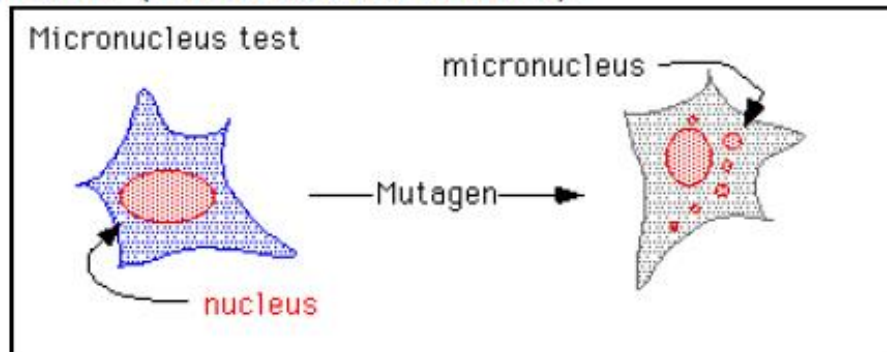
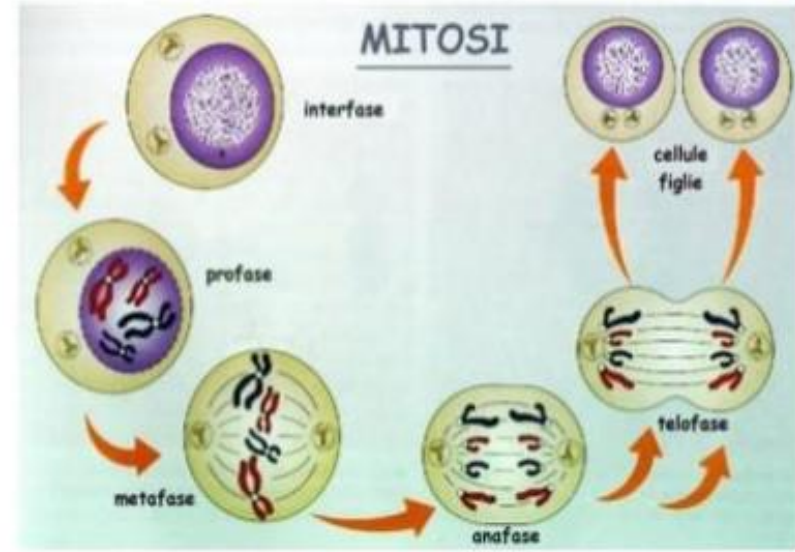
OBIETTIVI

- 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 - 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 evidenzii 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
A <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	B 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)
C <ul style="list-style-type: none">•Completamento genotossicità•Tossicità riproduttiva (m/f)•Tossicità a dosi ripetute 90gg con tossicocinetica•Studi farmacocinetica completi (biotrasformazione)	D Fase II: su ca <i>100 pazienti</i> , valutano efficacia, si individua <u>dose efficace minima</u> e <u>dose massima</u>
E Farmaci per uso cronico: <ul style="list-style-type: none">•Tossicità cronica•Carcinogenicità•Studi aggiuntivi (particolari problemi sicurezza)	F 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>