

Figura 7.2 Il processo di Ricerca & Sviluppo.

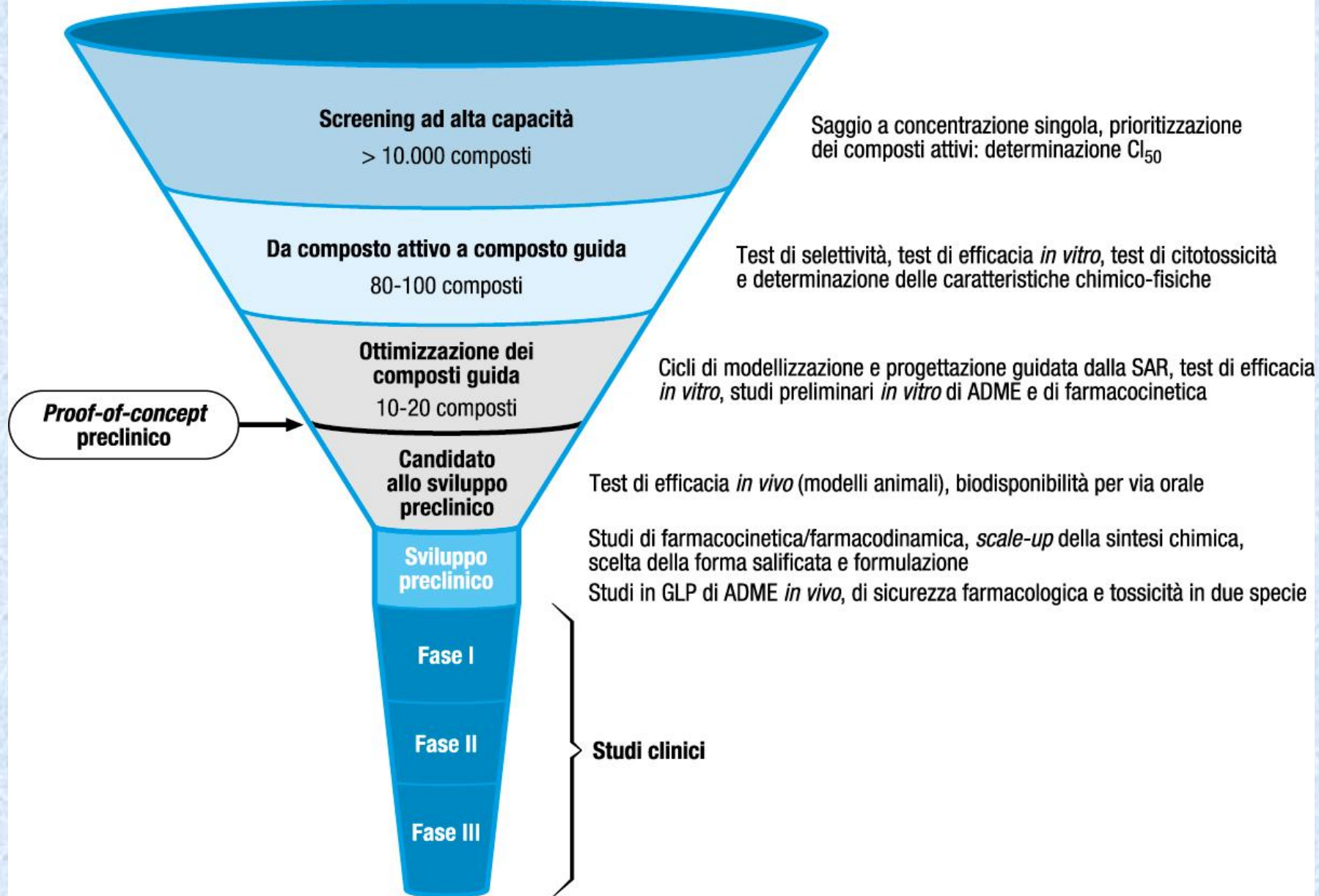


Figura 7.7 Studi condotti nel processo di *drug discovery* e utili per la selezione sempre più stringente di un composto candidato allo sviluppo preclinico.

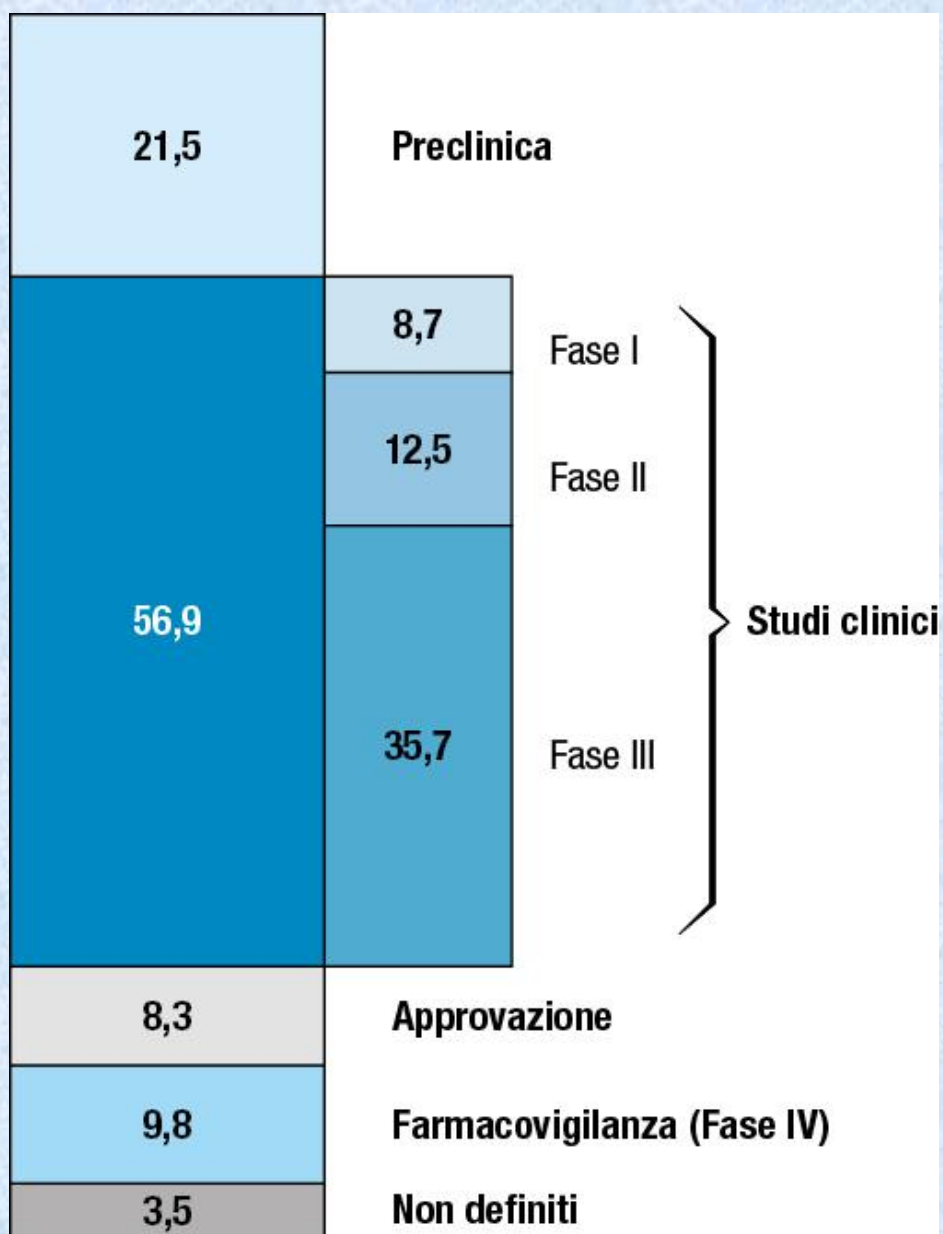


Figura 7.8 Allocazione percentuale degli investimenti in Ricerca & Sviluppo suddivisi per funzione.

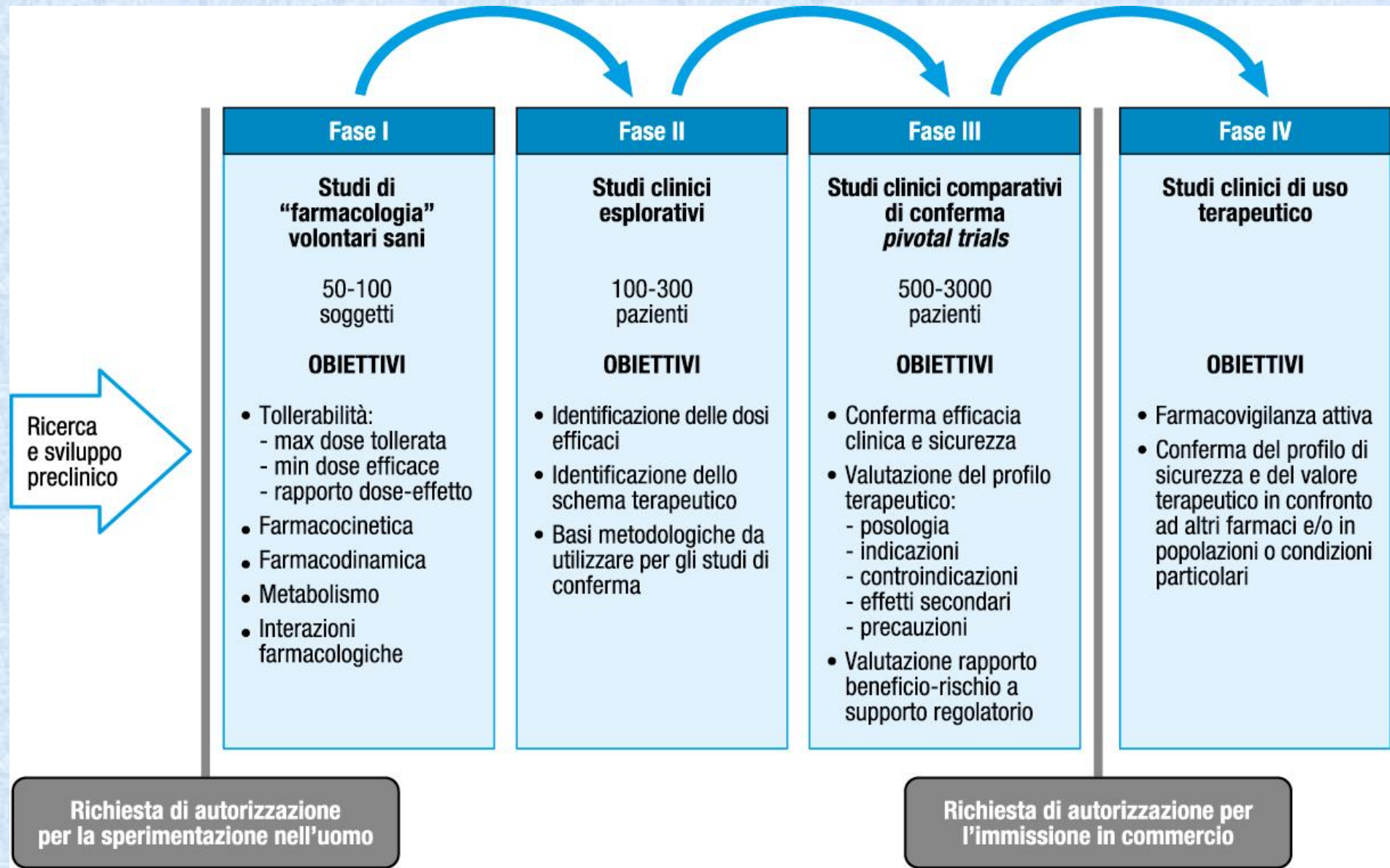
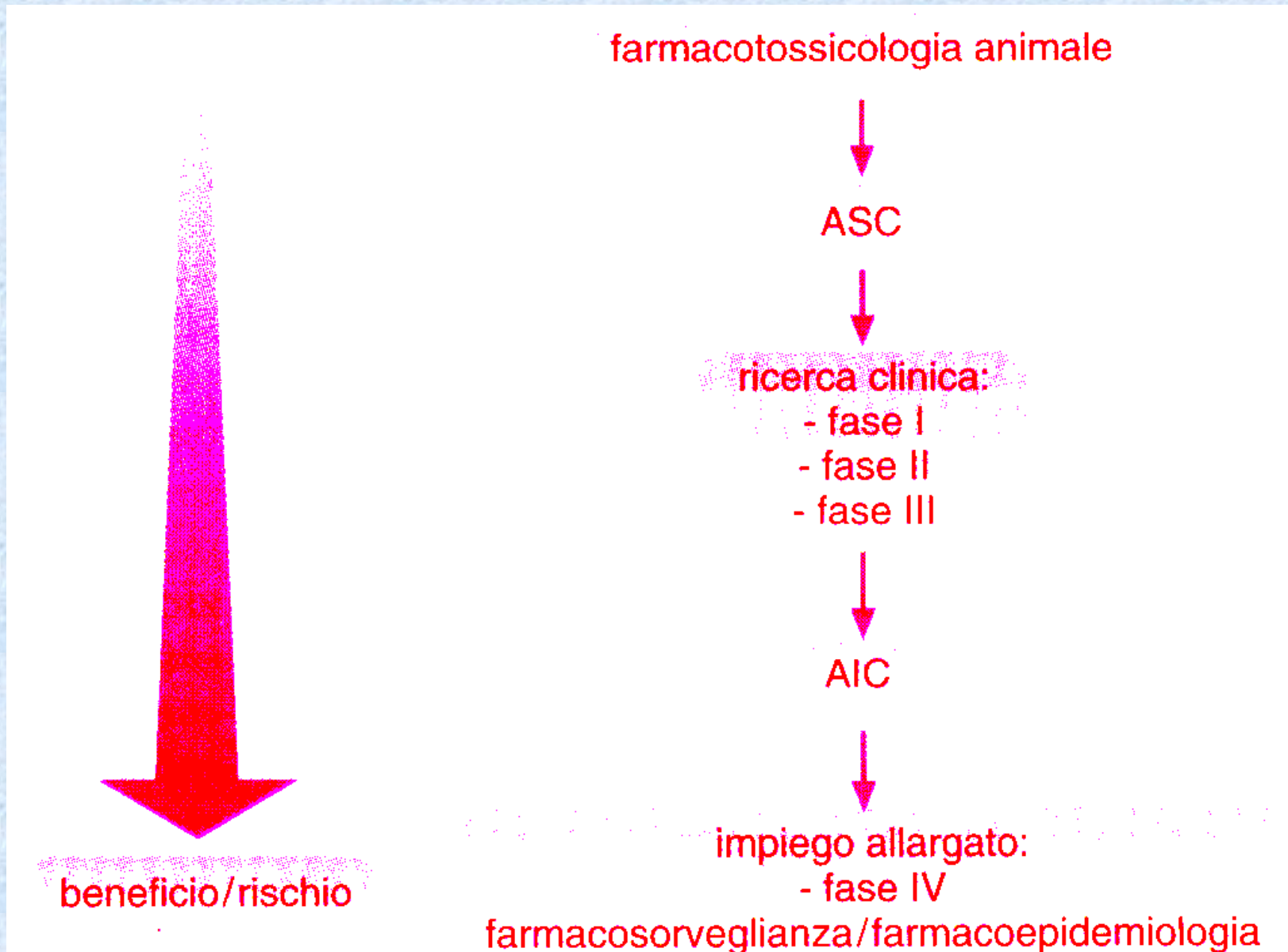


Figura 7.9 Le fasi della ricerca clinica.

FASI DELLO SVILUPPO DI UN FARMACO



STUDI SU ANIMALI (PRECLINICI)

Nel caso di farmaci, STUDI PRE-CLINICI sono spesso una parte delle Autorizzazioni alla Sperimentazione Clinica (ASC o *richiesta di delibazione*) da parte di aziende farmaceutiche. Nel caso di pesticidi o sostanze chimiche industriali, gli studi clinici vengono condotti raramente; gli studi animali costituiscono dunque l'unica predizione del loro rischio tossicologico.

Esistono metodi per valutare moltissimi effetti tossici; alcuni di questi sono altamente standardizzati (Standardized animal toxicity tests) e hanno adeguato valore predittivo della tossicità nell'uomo.

Preoccupazioni per la salute animale richiedono l'impiego delle stesse procedure da utilizzare nell'uomo e l'utilizzo di un numero minimo di animali per raggiungere conclusioni statisticamente valide.

DOCUMENTAZIONE PER OTTENERE L'ASC (AUTORIZZAZIONE SPERIMENTAZIONE CLINICA)

Accertamento della composizione

- Documentazione chimico-farmaceutica
- Campioni di:
 - principio attivo
 - prodotto finito
 - eccipienti (se necessario)

Accertamento dell'innocuità

- Documentazione tossicologica:
 - tossicità acuta
 - tossicità subcronica
 - tossicità cronica
 - mutagenesi
 - tossicità sul ciclo riproduttivo
(interazioni)
(cancerogenesi)
- Documentazione farmacologica:
 - dati quali-quantitativi sull'effetto principale
 - dati su funzioni, sistemi, organi non direttamente coinvolti nell'effetto principale
- Documentazione farmacocinetica

Programma generale della sperimentazione clinica

Struttura del dossier da presentare a corredo delle domande di autorizzazione all'avvio degli studi clinici

1. Descrizione generale
2. Documentazione sulla qualità
3. Documentazione sulla inattivazione/rimozione virale (ove necessaria)
4. Documentazione sulla farmacologia
5. Documentazione sulla tossicologia e safety pharmacology
6. Documentazione sulla mutagenesi
7. Documentazione clinica

1. Descrizione generale

a. Introduzione:

Razionale scientifico

Definizione dei possibili vantaggi della terapia proposta rispetto alle alternative disponibili

Dati giudicati rilevanti ai fini della definizione del problema, del rationale e degli obiettivi proposti

b. Informazioni specifiche

Nome e recapito del responsabile per gli aspetti regolatori della domanda

Nome e recapito dei responsabili di ciascun capitolo o della parte

Riassunto del dossier (massimo dieci pagine)

Copia di eventuali autorizzazioni ottenute precedentemente in ottemperanza a norma di legge aventi rilevanza per la sperimentazione proposta

2. Documentazione sulla qualità

- a. Composizione del prodotto
- b. Forma farmaceutica
- c. Nomenclatura e descrizione del principio attivo
- d. Descrizione del processo di produzione
- e. Caratterizzazione del principio attivo
- f. Controllo del principio attivo
- g. Convalida dei metodi usati
- h. Stabilità del prodotto

3. Documentazione sulla inattivazione/rimozione virale

- a. descrizione delle fasi di inattivazione/rimozione virale nel processo di produzione;
- b. descrizione dei metodi di inattivazione/rimozione virale;
- c. descrizione dei risultati delle prove di validazione virale;
- d. descrizione dello "scaling down" del processo per le prove di validazione virale;

4. Documentazione sulla farmacologia

- a. Attività biologica correlata all'effetto principale del prodotto
- b. Attività farmacodinamica correlata all'effetto principale del prodotto
- c. Altri effetti
- d. Studi di farmacocinetica

5. Documentazione sulla tossicologia e safety pharmacology

- a. Tossicità dopo somministrazione singola
- b. Tossicità dopo somministrazione ripetuta
- c. Tollerabilità locale
- d. Tossicocinetica
- e. Altri studi tossicologici (tossicità per riproduzione)
- f. “safety pharmacology”

VANTAGGI E SVANTAGGI DEGLI STUDI PRECLINICI

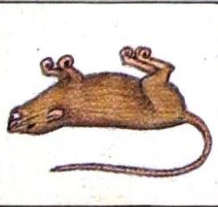
Vantaggi

- **L'esposizione può essere controllata precisamente**
- **Le condizioni ambientali possono essere controllate**
- **Si può valutare virtualmente ogni tipo di effetto tossico**
- **E' possibile studiare il meccansimo dell'effetto tossico**

Svantaggi

- **La valutazione della tossicità di un composto è lunga (2-5 anni) e costosa (miliardi)**
- **Si deve usare un gran numero di animali per ottenere i dati preclinici (problema etico)**
- **L'estrapolazione dei dati di tossicità dagli animali all'uomo non è completamente attendibile**
- **Per ragioni statistiche, un effetto avverso che si presenta con bassa frequenza è difficilmente rilevabile.**

TEST DI TOSSICITA' STANDARD SU ANIMALI



TEST DI TOSSICITÀ ACUTA, SUBCRONICA E CRONICA

Determinano gli effetti di una sostanza sulla salute e sulla mortalità per diversi periodi di esposizione.



TEST DI TOSSICITÀ PER LA RIPRODUZIONE

Stabiliscono gli effetti di una sostanza sulla fertilità e la fecondità.



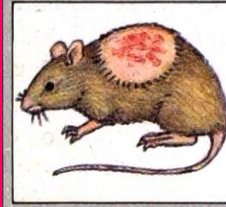
TEST DI TOSSICITÀ PER LO SVILUPPO

Valutano la capacità di una sostanza di provocare malformazioni in un embrione, feto o neonato.



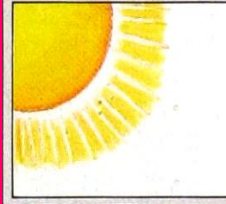
TEST DI IRRITAZIONE OCULARE E CUTANEA

Misurano la capacità di una sostanza di provocare infiammazioni o irritazioni della cute e degli occhi.



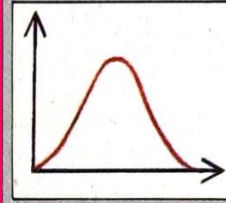
TEST DI IPERSENSIBILIZZAZIONE

Stabiliscono la tendenza di una sostanza a indurre arrossamenti e altre manifestazioni allergiche.



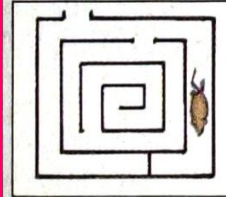
TEST DI FOTOTOSSICITÀ

Determinano il grado in cui una sostanza viene attivata dalla luce del Sole, che ne aumenta così la tossicità.



STUDI TOSSICOCINETICI

Valutano l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo, l'accumulo e l'escrezione di una sostanza.

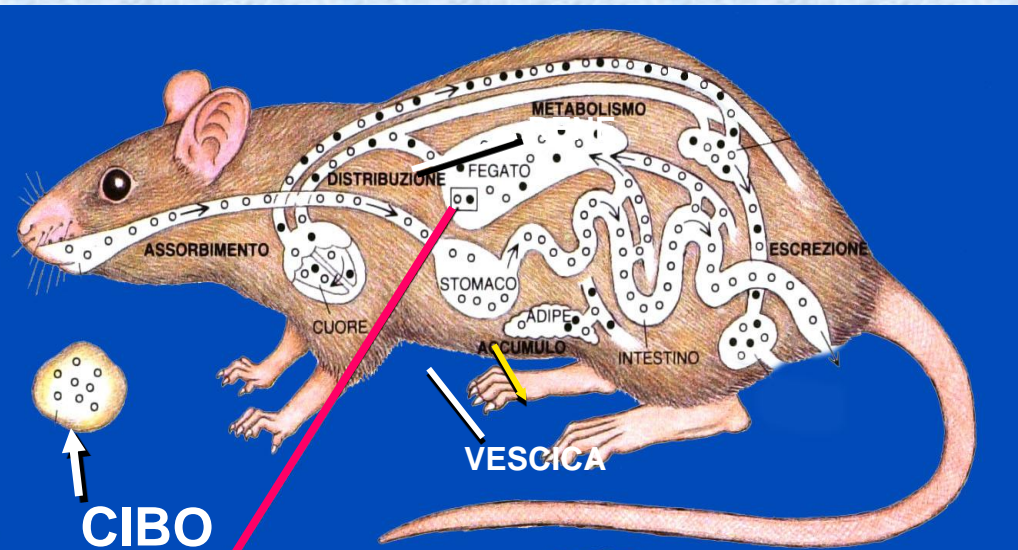


PROVE DI COMPORTAMENTO

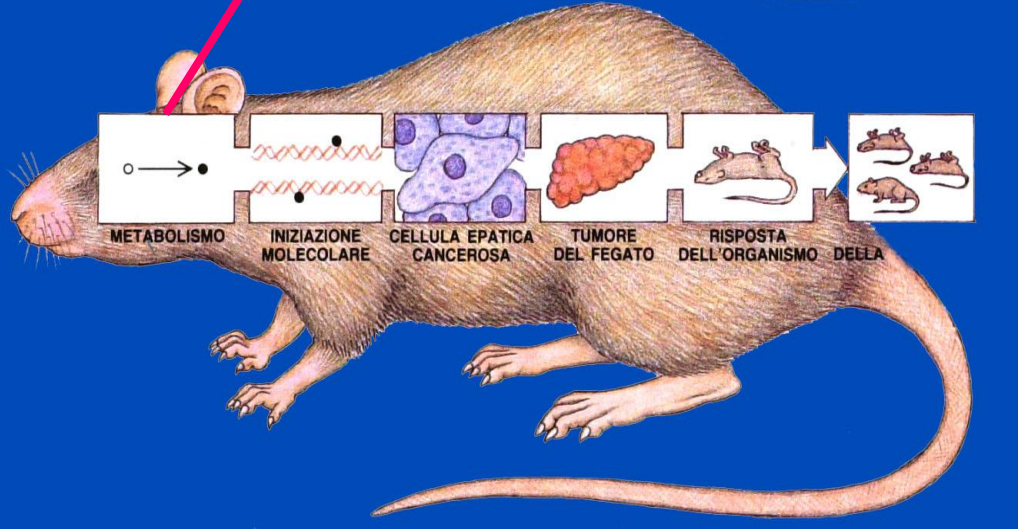
Controllano gli effetti di una sostanza sulle funzioni cognitive durante lo sviluppo e nell'adulto.

CINETICA E DINAMICA DI UN COMPOSTO AD ATTIVITA' TOSSICA

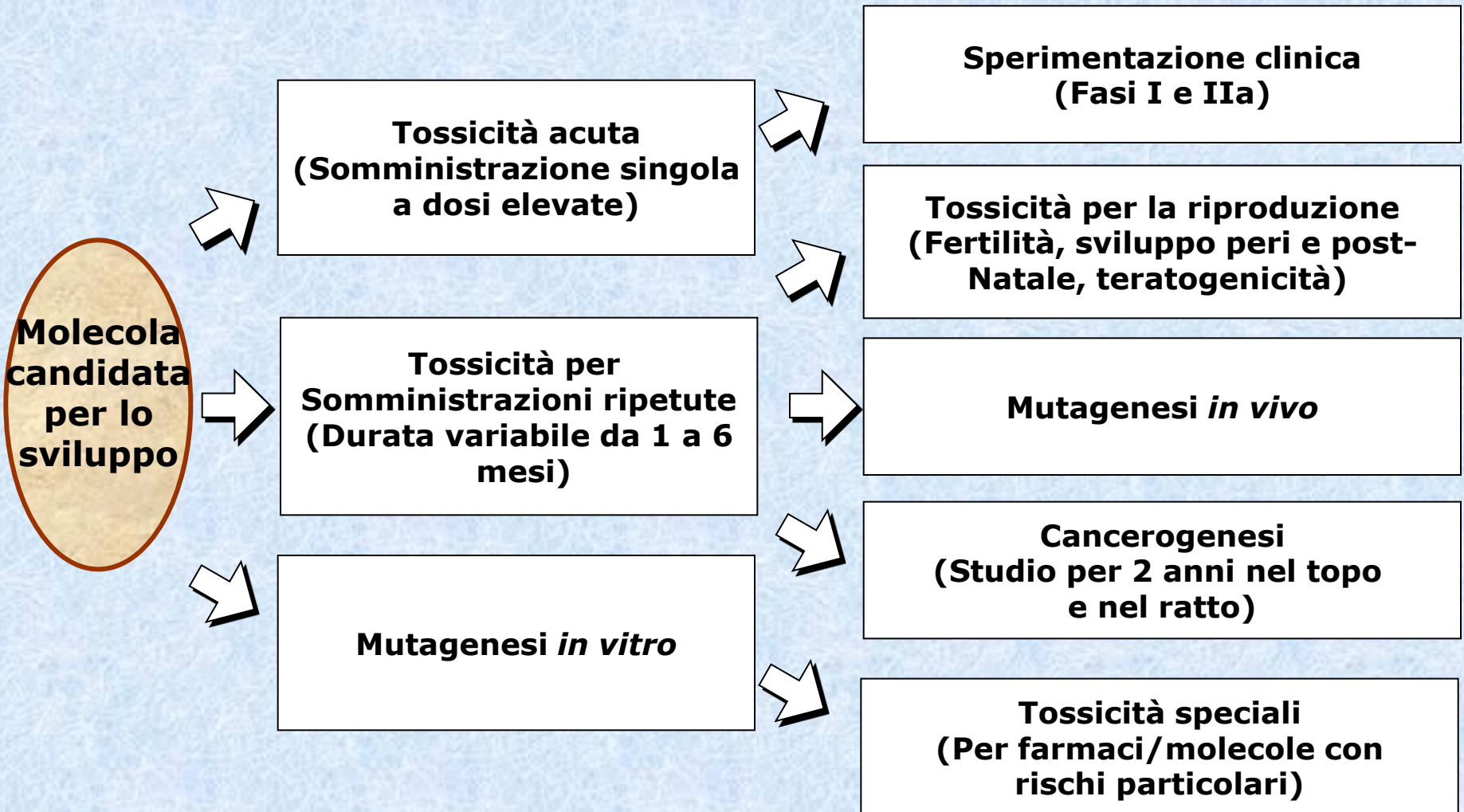
TOSSICOCINETICA



TOSSICODINAMICA



PERCORSO DEGLI STUDI TOSSICOLOGICI PER VERIFICARE LA SICUREZZA DEI NUOVI FARMACI



OBIETTIVI DEGLI STUDI TOSSICOLOGICI

- 1. Definire la dose massima che non induce alcun effetto diretto o indiretto su organi e sistemi**
- 2. Definire la dose che induce effetti tossici ed il tipo di alterazioni indotte**
- 3. Definire la relazione tra dose terapeutica e dose tossica**
- 4. Individuare il bersaglio dell'effetto tossico (struttura cellulare, organo o sistema) sia del composto originale che dei suoi metaboliti**
- 5. Definire se gli effetti sono reversibili**

STORIA E LEGGI SULLA SPERIMENTAZIONE

Sperimentazione dei farmaci

- 1937: sulfanilamide elisir in glicole etilenico, 137 morti
- 1938 Food, Drug and Cosmetic Act
- Fine anni 50: FDA (Frances Oldham Kelsey) non approva l'impiego della talidomide per mancanza di dati sulla sicurezza
- In Europa, Canada, Giappone..... circa 15000 bambini nascono con gravissime malformazioni a causa della talidomide

Sperimentazione dei farmaci

- In Italia: Regio Decreto del 3 marzo 1927, integrato dal Testo Unico delle Leggi Sanitarie del luglio 1934
 - Specialità farmaceutica: “qualsiasi prodotto terapeutico semplice o composto preparato a dose o forma di medicamento, secondo una **formula prestabilita**, contenuto in recipienti ed involucri determinati, pronti per la vendita e chiusi in modo **che non sia possibile apportare al prodotto alcuna modificazione.**”
 - Obbligo di ottenere l' autorizzazione dal Ministero della Sanità per produrre e/o commercializzare prodotti farmaceutici
- Decreto n° 178 del 29 maggio 1991
 - I riferimenti tecnici su cui devono essere basate le decisioni regolatorie sono quelli definiti dalla Comunità Europea e recepisce la direttiva CEE 65/65 e quelle successivamente emanate.

Direttiva CEE 65/65

- Stabilisce che i criteri per l' accettazione dei farmaci da parte degli stati membri sono rappresentati dalla dimostrazione della qualità, sicurezza ed efficacia ed elenca la documentazione che deve essere esibita a sostegno di questa dimostrazione
- Stabilisce anche che la domanda di registrazione può essere respinta solo nel caso di non ottemperanza ai requisiti descritti

- Dal primo gennaio 1995 Agenzia Europea per la valutazione dei farmaci (EMA)

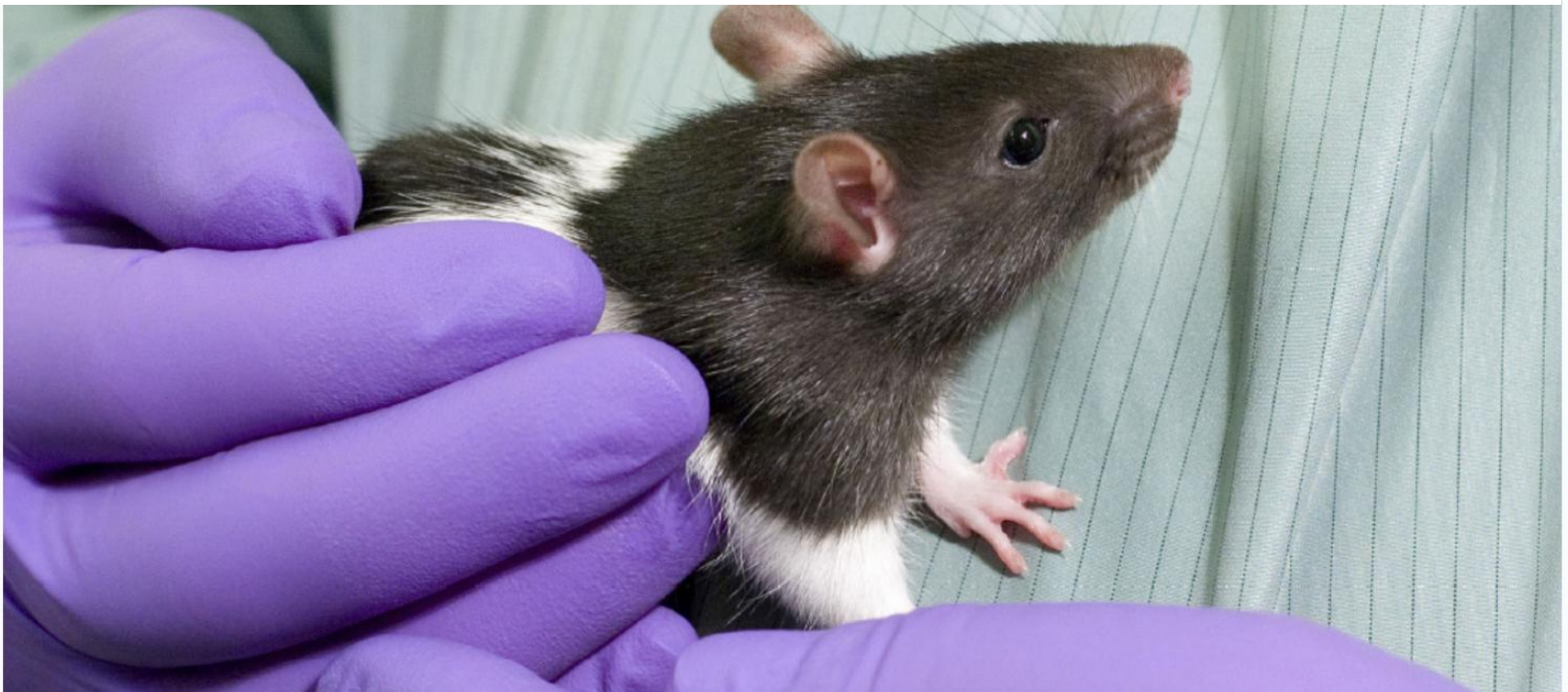


Uso di animali nella ricerca farmaceutica

Ratti, topi e altri roditori	85-90%
Cani e gatti	< 1%
Primati non umani	0,3%

- L'attività di ricerca sull'animale è regolamentata da:

[DECRETO LEGISLATIVO 4 marzo 2014, n. 26 - Gazzetta Ufficiale.](#) Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici



In Italia l'impiego di animali per fini scientifici è regolamentato dal **Decreto legislativo 4 marzo 2014, n. 26** che ha attuato la Direttiva n. 2010/63/UE. In base a questa norma, tutti i progetti di ricerca che contemplano l'impiego di animali vertebrati e di taluni invertebrati, come i Cefalopodi, devono essere autorizzati dal Ministero della salute e portati avanti all'interno di stabilimenti utilizzatori autorizzati.

Le norme sono ovviamente tese alla massima protezione degli animali: il loro impiego, infatti, è consentito soltanto quando il responsabile del progetto di ricerca sia in grado di dimostrare e di documentare l'impossibilità di raggiungere il risultato ricercato utilizzando un altro metodo di sperimentazione scientifica che non implichi l'impiego di animali vivi.

Dimostrato ciò, a parità di risultato, sono favorite le procedure che:

- richiedono il minor numero di animali;
- utilizzano animali con la minore capacità di provare dolore, sofferenza, distress o danno prolungato;
- sono in grado di minimizzare dolore, sofferenza, distress o danno prolungato;
 - offrono le maggiori probabilità di risultati soddisfacenti;
 - hanno il più favorevole rapporto tra danno e beneficio.

La novità introdotta dalla Direttiva n. 2010/63/UE e recepita con il Decreto legislativo n. 26 del 4 marzo 2014 riguarda lo sviluppo, la convalida, l'accettazione e l'applicazione dei "metodi alternativi", procedure che consentano di evitare il ricorso all'utilizzo di animali nella sperimentazione scientifica.

Questo nuovo approccio ha segnato un cambio di passo nel settore della sperimentazione animale. **REGOLA 3R (*replacement, reduction, refinement*)**.

5a. Tossicità dopo somministrazione singola (acuta)

- Studio degli effetti tossici dopo somministrazione di dose singola in due specie animali.
- Si impiegano due vie di somministrazione a dosi elevate e si osservano gli effetti fino a 15 giorni dopo.
- Esame anatomoistologico degli organi
- Si definisce la massima dose tollerata.

5b. Tossicità dopo somministrazioni ripetute

- Si utilizzano tre dosi, somministrate tutti i giorni, utilizzando la stessa via di somministrazione prevista per l'uomo. A tempi definiti si valutano le condizioni degli animali, l'insorgenza di sintomi e alla fine si analizzano organi e apparati.
 - Tossicità subacuta (fino a 3 mesi)
 - Tossicità subcronica (fino a 6 mesi)
 - Tossicità cronica (fino a 12 mesi)

Durata proposta per il trattamento nell'uomo	Durata minima degli studi di tossicità per somministrazioni ripetute nell'animale
Somministrazione singola di dosi particolarmente basse di alcuni radiofarmaci per impiego diagnostico	1 giorno
Somministrazione unica o ripetuta fino a 2 settimane	2 settimane
Somministrazione ripetuta fino a 4 settimane	4 settimane

5e. Tossicità per riproduzione

- Effetti sulla fertilità: si utilizza il ratto, trattato con tre o più dosi. I composti sono somministrati agli animali maschi e femmine per lunghi periodi prima dell'accoppiamento e poi si valuta l'indice di fertilità.
- Effetti sullo sviluppo peri- e post-natale, possibilità di indurre malformazioni (teratogenesi): i farmaci devono essere testati in femmine gravide di due specie di roditori e di una di non roditori (ad es. coniglio).

5e. Tossicità speciali

- Per farmaci che hanno rischi particolari di tossicità o per cui esistono alcuni indizi derivati dalle altre prove di tossicità.



5f. “Safety pharmacology”

Somministrazione unica a partire dalla dose efficace con dosi crescenti fino a multipli di 5-10 volte. La via di somministrazione deve essere quella prevista per la terapia.

Test essenziali:

SNC: effetti sul comportamento spontaneo, sull'attività motoria, sulle risposte a stimoli sensoriali, eventuale azione convulsivante.

Sistema cardiovascolare: effetti su pressione, frequenza, forza di contrazione..., ECG.

Sistema respiratorio: frequenza, volume corrente, resistenze bronchiali, gas ematici...

Test accessori:

Escrezione renale: filtrazione glomerulare, volume, pH, bilancio idroelettrolitico...

Sistema immunitario

Sistema digerente: secrezione gastrica, transito intestinale...

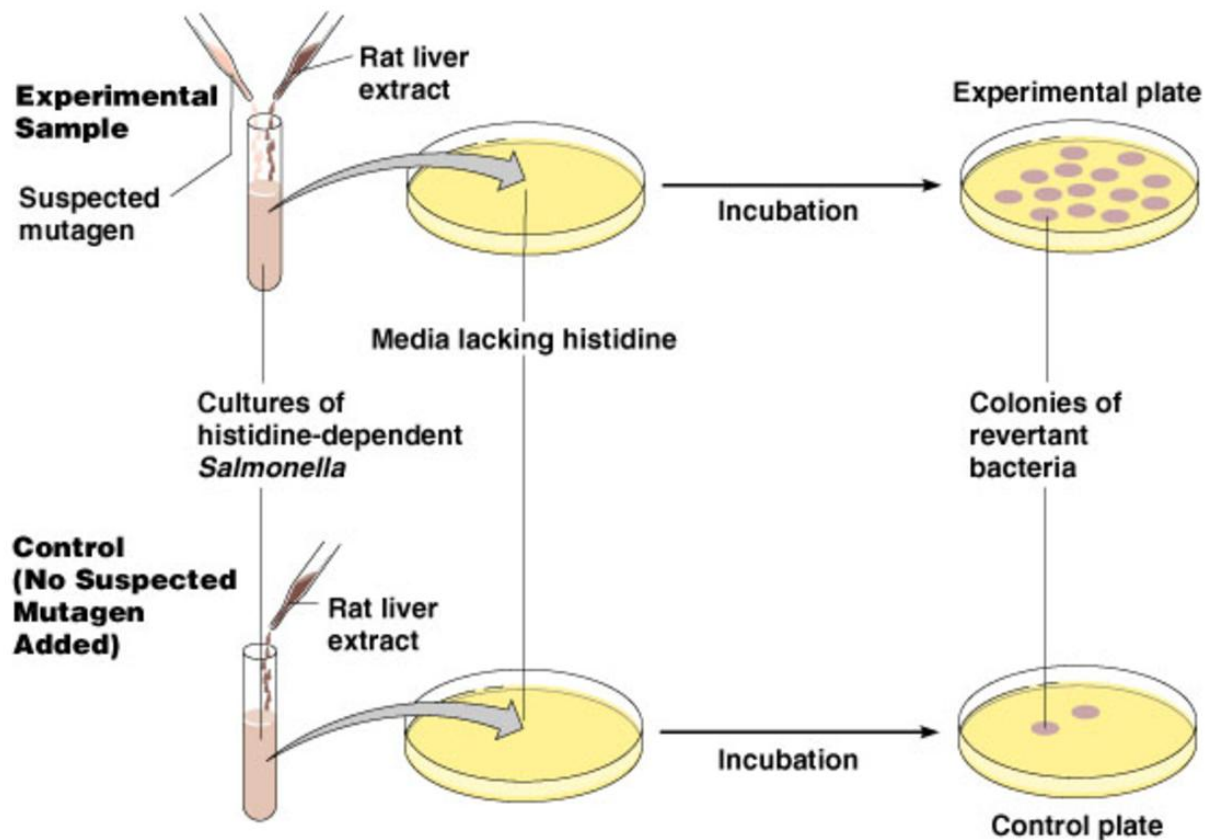
6. Documentazione sulla mutagenesi

- a. Test di mutazioni geniche in cellule batteriche
- b. Test *in vitro* di aberrazioni cromosomiche in cellule di mammifero

In genere non è richiesta per i prodotti biotecnologici

a. Test di mutazioni geniche in cellule batteriche

- Retromutazione di un ceppo mutante di *Salmonella typhimurium* in un terreno di coltura che non contiene istidina. Questo mutante, diversamente dal tipo selvaggio, non può crescere in assenza di istidina. Nella coltura batterica vengono aggiunte:
 - la sostanza chimica da testare
 - una preparazione di enzimi microsomiali epatici per indurre la formazione di metaboliti reattivi.
- La crescita della colonia indica l'avvenuta mutagenesi.



- Two cultures are prepared of *Salmonella* bacteria that have lost the ability to synthesize histidine (histidine-dependent).
- The suspected mutagen is added to the experimental sample only; rat liver extract (an activator) is added to both samples.
- Each sample is poured onto a plate of medium lacking histidine. The plates are then incubated at 37°C for two days. Only bacteria whose histidine-dependent phenotype has mutated back (reverted) to histidine-synthesizing will grow into colonies.
- The numbers of colonies on the experimental and control plates are compared. The control plate may show a few spontaneous histidine-synthesizing revertants. The test plates will show an increase in the number of histidine-synthesizing revertants if the test chemical is indeed a mutagen and potential carcinogen. The higher the concentration of mutagen used, the more revertant colonies will result.

Test di carcinogenesi

- I test di carcinogenesi prevedono il trattamento cronico di gruppi di animali. Richiedono un notevole investimento di tempo ed economico.
- Si studiano gli effetti di tre dosi, nel topo e nel ratto, per la durata di due anni (corrispondente alla durata della loro vita). Si analizzano tutti gli organi e apparati.

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

- **Convulsioni**
- **Tremore**
- **Sedazione**
- **Sonnolenza**
- **Eccitazione**
- **Amnesia**
- **Neurotossicità**
- **Demielinizzazione**

- **Ototossicità**
- **Ipovisione**
- **Vomito**
- **Ipertermia**
- **Cachessia**
- **Iperfagia**
- **Diarrea**
- **Cataratta**

- **Fragilità Ossea**
- **Iperensione**
- **Ipotensione**
- **Asma Cronico**
- **Calcoli Renali**
- **Ulcera Gastrica**
- **Infiammazione Acuta E Cronica**
- **Anuria**

DURATA MINIMA DEGLI STUDI DI TOSSICITA' PER SOMMINISTRAZIONI RIPETUTE

**Durata prevista
degli studi sull'uomo**

**Durata minima
degli studi di tossicologia**

Roditore

Non-Roditore

Fino a 2 settimane	1 mese	1 mese
Fino a 1 mese	3 mesi	3 mesi
Fino a 3 mesi	6 mesi	3 mesi
Oltre 3 mesi	6 mesi	9 mesi

Schema aggiornato secondo le più recenti indicazioni di ICH (The International Conference on Harmonisation) (1999)

LA SPERIMENTAZIONE ANIMALE

Selezione della specie.

Non esiste un'unica specie che possa essere utilizzata per tutti i tests di tossicità. Anche considerazioni etiche ed economiche restringono la scelta (cani, scimmie).

I roditori ed i conigli sono quelle più frequentemente utilizzate per la loro reperibilità, i bassi costi di stabulazione ed accoppiamento, e per l'esperienza passata che documenta risultati riproducibili.

Il disegno sperimentale deve essere il più vicino possibile alla situazione reale nell'uomo, relativamente a:

- **Via di somministrazione**
- **Età degli animali**
- **Sesso degli animali**
- **Dosaggio, tale da consentire di determinare dei valori soglia e le relazioni dose-risposta (minimo tre dosi)**

TOSSICITA' ACUTA

Sono i primi ad essere condotti, e forniscono dati sulla tossicità in seguito ad esposizione singola o breve. Sono disponibili tests specifici per somministrazione orale, dermica, ed inalatoria

Species	rats preferred for oral and inhalation tests; rabbits preferred for dermal tests
Age	young adults
Number of animals	5 of each sex per dose level
Dosage	three dose levels recommended; exposures are single doses or fractionated doses up to 24 hours for oral and dermal studies; and 4-hour exposure for inhalation studies
Observation period	14 days

COSA SI VALUTA?

Tossicità acuta:

Parametri letali (DL50; esame istopatologico degli animali morti o sacrificati) e non letali (segni di tossicità acuta)

Tossicità sub-acuta:

Peso corporeo, consumo di cibo, comportamento e stato di salute dell'animale, valutazioni biochimiche ematologiche ed urinarie, peso degli organi e valutazione istopatologica

Tossicità cronica:

Accrescimento corporeo, osservazione clinica quotidiana, peso degli organi al termine dell'esperimento, autopsia degli animali morti, valutazione istopatologica dei tessuti prelevati, esami emato-chimici periodici

- **VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA' ACUTA**
- **Gli obiettivi del test di tossicità acuta possono essere così riassunti:**
- **a] Definire la tossicità intrinseca di un prodotto**
- **b] Valutare la sensibilità delle specie animali**
- **c] Identificare l'organo bersaglio**
- **d] Fornire informazioni circa il rischio per esposizione acuta al prodotto**
- **e] Fornire informazioni circa la scelta delle dosi per studi prolungati**
- **Nella valutazione di tale tipo vengono seguiti dei protocolli standard secondo le normative CEE.**
- **1] Stabulazione: gli esperimenti vanno effettuati in condizioni ambientali controllate di:**
- **a] temperatura ($22 \pm 3^{\circ}\text{C}$)**
- **b] umidità relativa (30 a 70%)**
- **c] ciclo luce-buio (12 ore luce-12 ore buio)**
- **d] dieta standard ed idonea alla specie.**
- **e] condizioni di stabulazione nelle gabbie a seconda della specie ed il tipo di gabbie**
- **2] Tipo di somministrazione: in genere unica per via orale o parenterale**
- **3] Specie animali: per le prove preliminari in genere topi o ratti (talora cavie o conigli), successivamente cani o gatti**
- **4] Animali adulti ma giovani di entrambi i sessi**
- **5] Nel caso di topi o ratti i lotti sono formati da non meno di 5 animali talora di 10 animali; in genere 8 animali**
- **6] Lotti di animali di peso uniforme; dal momento che il peso (sino ad un certo valore) è legato all'età ciò garantisce una certa età uniforme**

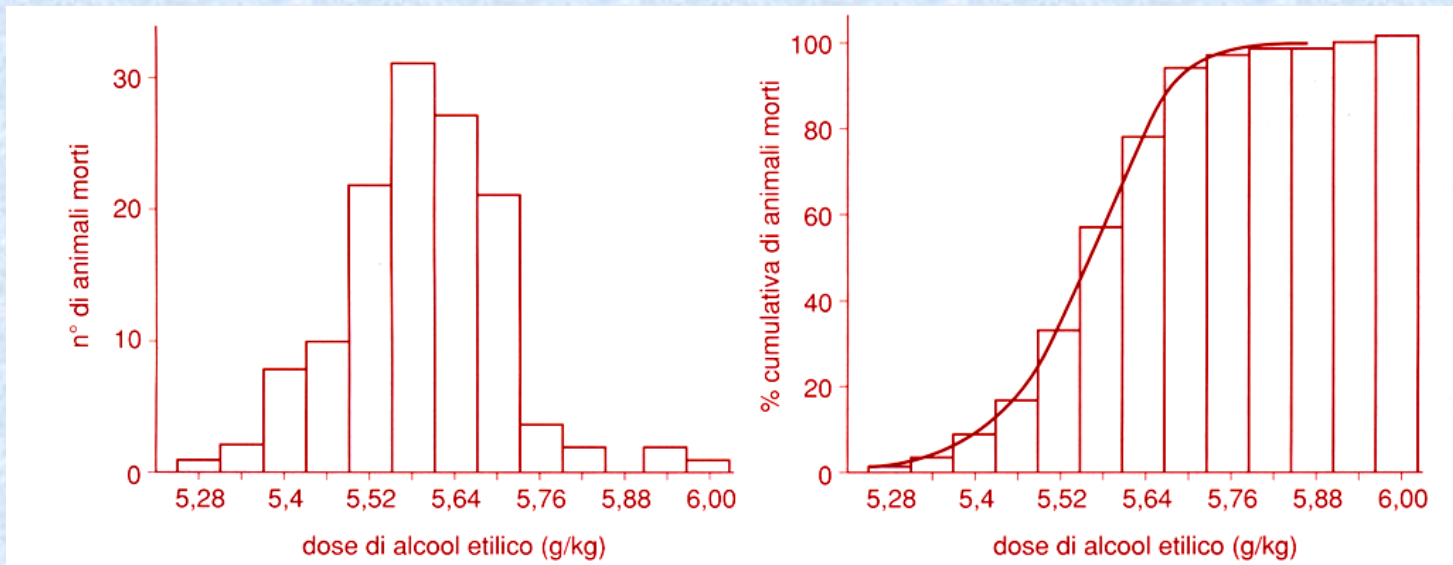
- **VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA' ACUTA (segue)**
- **7] Animali a digiuno almeno 18 ore prima del test**
- **8] Farmaci somministrati a volume costante (in genere 10 ml/Kg) per evitare variabili dovute a variazioni di volume**
- **9] La quantità massima di sostanza usabile deve essere limitata (non > 5 g/Kg) perchè si potrebbero avere dei fenomeni tossici non legati a meccanismi specifici, ma solo a carico. In genere si usano dosi simili a quelle ottenibili nell'uomo per esposizione accidentale.**
- **10] Solvente di scelta è l'acqua o soluzione fisiologica. Per sostanze insolubili si può usare acqua:etanolo o DMSO o sospensioni (in questo caso va saggiato anche il solvente)**
- **11] Scelta delle dosi: nel caso di sostanza completamente sconosciuta si va a tentativi scegliendo inizialmente una dose doppia dell'altra**
- **12] Per la determinazione della LD50 è necessario giungere alla determinazione di almeno 3 dosi (che diano risultati diversi da 0 e da 100%)**
- **13] Importante l'osservazione di eventuali segni di tossicità negli animali dopo la somministrazione in quanto possono essere un buon indizio per individuare l'organo od il sistema bersaglio dell'azione tossica.**
- **14] Valutazione statistica della LD50, dello slope e dei limiti fiduciali. Può essere fatta graficamente mediante analisi dei probit o ovviamente mediante programmi computerizzati.**

COME SI CALCOLA LA DL₅₀?

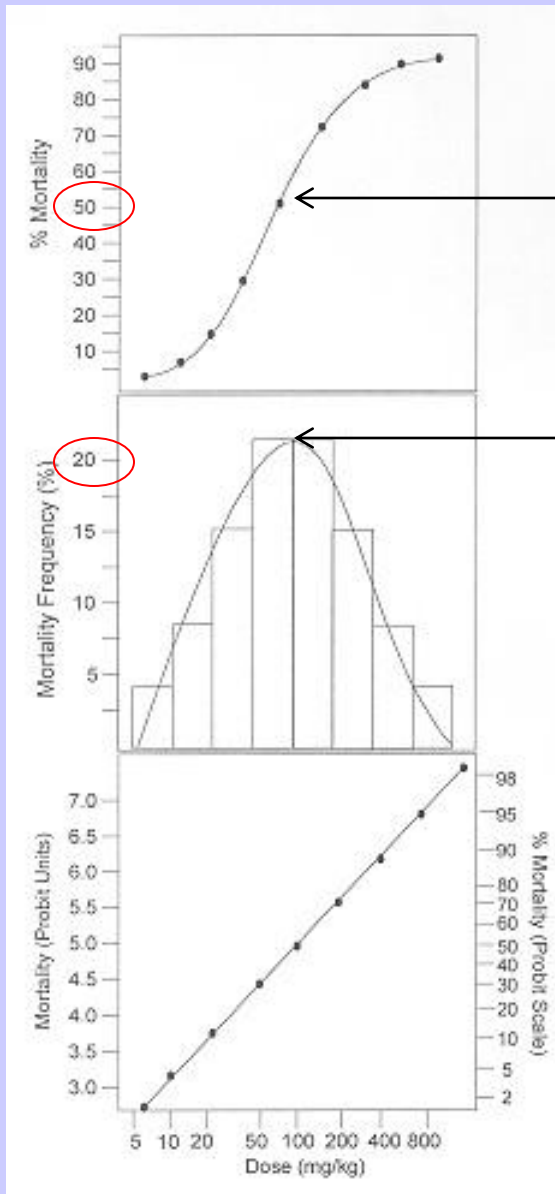
Si deve preliminarmente stabilire la specie animale da utilizzare e la via di somministrazione da adoperare

Si dividono gli animali in quattro o cinque gruppi di 8-10 animali ciascuno, cui vengono somministrate DOSI CRESCENTI della sostanza nel range delle dosi letali (dati già posseduti o si procede per tentativi)

I dati ottenuti vengono graficati e si procede alla rettificazione della curva attraverso: A) approssimazione grafica; B) le dosi vengono trasformate nei log delle dosi; le percentuali vengono trasformate in probit (Prabability Units=ogni probit rappresenta una deviazione standard) con una apposita scala di conversione.



Distribuzione delle frequenze di risposta della popolazione
⇒ curve dose risposta quantali.



percentuali cumulate

**percentuali non
cumulate (frequenze)**

Analisi della probabilità di un evento

Un evento può o meno verificarsi, ne consegue che questa certezza, che può essere immaginata come un grado infinito di probabilità, è giustamente rappresentata dal n° 1 o dal n° 0.

E' necessaria una scala di gradi di probabilità che va da più a meno infinito. Quando i gradi di probabilità si avvicinano all'infinito, l'esito diventa una certezza.

Nel 1944 Berkson studiava LD50 di un veleno nei ratti.

L' idea del Probit è di assumere che ci sia negli animali una distribuzione normale di tolleranza al veleno.

Al valore medio di tolleranza il 50% degli animali muore. La dose di veleno è trasformata in unità Probit, espressione della deviazione standard della tolleranza.

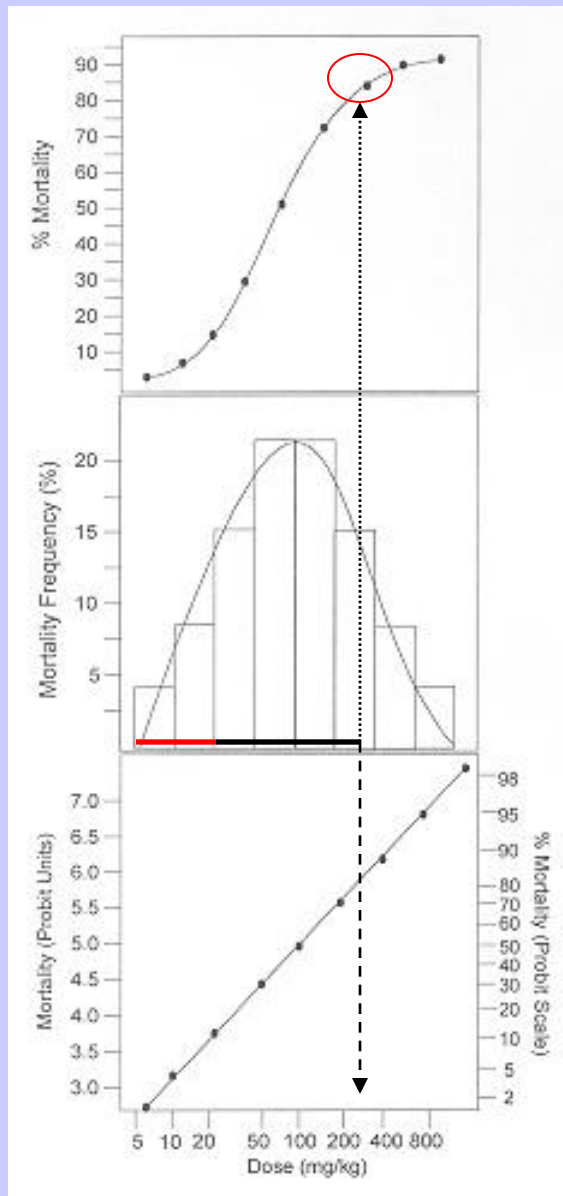
Le unità probit (*probability unit*)

Se la distribuzione è normale, la media ± 1 D.S. comprende il 68,3% della popolazione. Alla dose superiore corrispondente a questo intervallo, la percentuale cumulata di soggetti che risponde è pari a 84,15%.

Infatti a 68,3% si deve aggiungere la percentuale di soggetti che risponde a dosi più basse del limite inferiore dell'intervallo; tale percentuale è data da: $(100 - 68,3)/2 = 15,85$

$68,3 + 15,85 = 84,15\%$.

N.B. la risposta percentuale 84,15% corrisponde al punto di flesso della curva sigmoide



Con i grafici log-probit si ottengono delle rette, che comprendono le risposte in un intervallo di dosi molto ampio.

I vantaggi conseguenti sono:

- ✓ è più facile estrapolare la dose che determina una certa percentuale di risposta
- ✓ è più facile confrontare curve dose-risposta di diverse sostanze, o della stessa sostanza ma per effetti diversi
- ✓ si possono calcolare gli intervalli di confidenza associati ad ogni risposta

COME SI CALCOLA LA DL_{50} ?

Es: dosi scelte: x , $2x$, $4x$ (25, 50 e 100 mg)

Gruppi di 10 animali, mortalità che si verifica:

$X=10\%$ (1/10); $2X=40\%$ (4/10); $4X=90\%$ (9/10).

Si mettono le percentuali sul grafico che ha in ordinata il probit ad in ascissa il log della dose e si traccia la retta che passa per i 3 punti.

Es. nel grafico:

farmaco blu

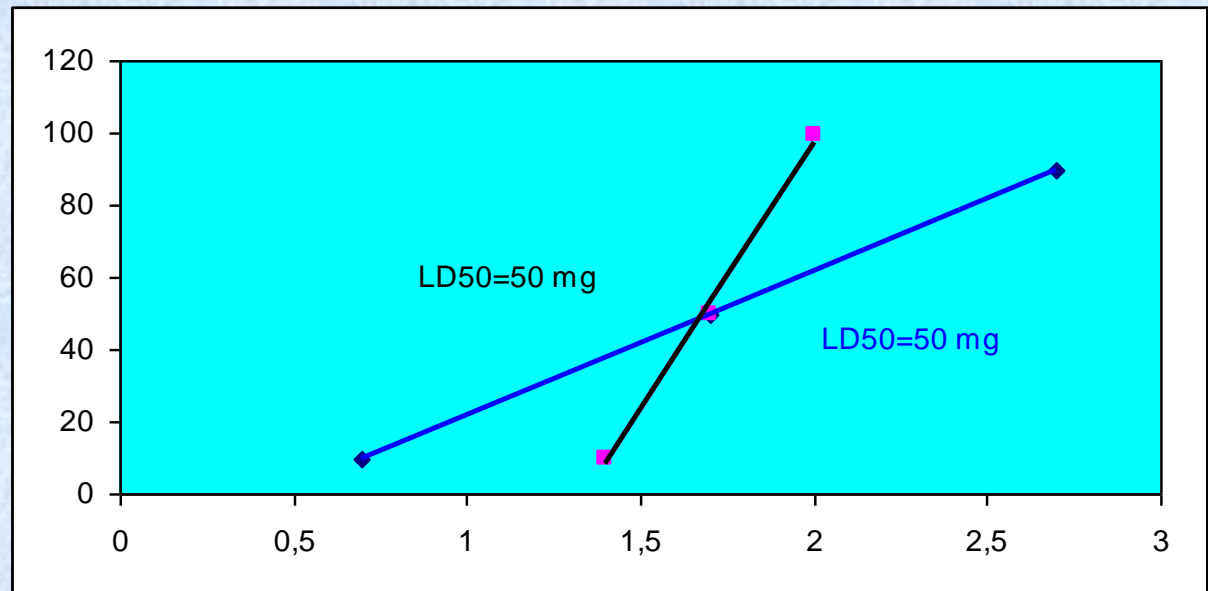
Dosi 5,50,500

% 10,50,99

Farmaco nero

Dosi 25,50,100

% 10,50,90



E' importante anche la pendenza della curva

COME SI CALCOLA LA LD₅₀?

Bisogna conoscere anche i limiti fiduciali (superiore ed inferiore)

Che si calcolano così:

Limite superiore LD50xfLD50 e Limite inferiore LD50/fLD50

Dove: fLD50= S elevato a 2.77/radice quadrata di N (che è il numero di animali usati)

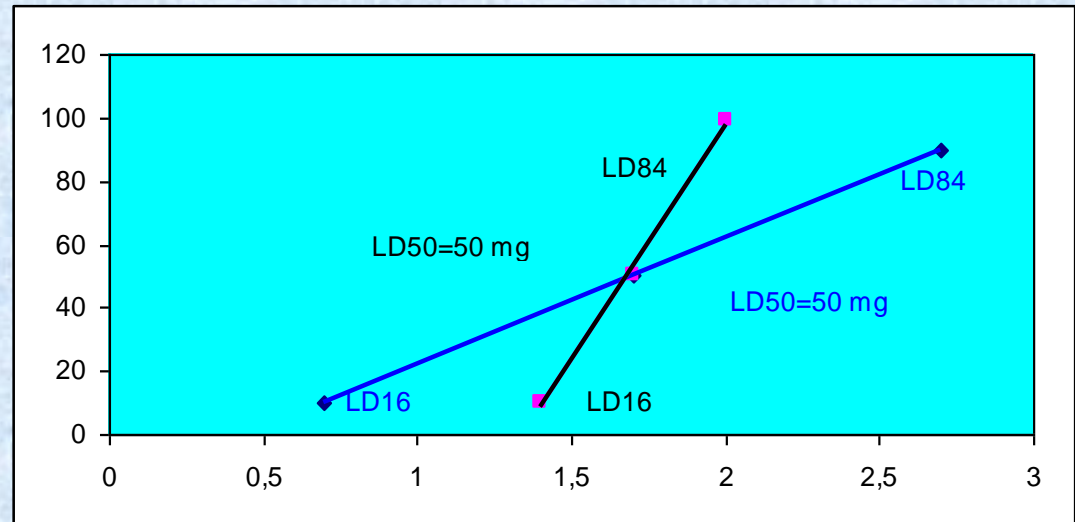
$$S = (LD84/LD50 + LD50/LD16)/2$$

Farmaco Blu:

LD50= 50 mg (18-140)

Farmaco Nero:

LD50= 50 mg (34-73)



SEGNI E SINTOMI DI TOSSICITA' ACUTA

Apparato respiratorio: *Dispnea, tachipnea, cianosi*

Apparato motorio: *Ipermotilità, ipomotilità, sonnolenza, tremori*

SNC: *Convulsioni toniche, tonico-cloniche, Riflesso corneale, miotonico, riflesso alla luce*

Apparato visivo: *Lacrimazione, miosi, midriasi*

Apparato cardiovascolare: *Ipotensione, ipertensione, bradicardia, vasodilatazione, vasocostrizione*

SNV: *salivazione, piloerezione*

Apparato Gastrointestinale: *Vomito, diarrea, stipsi*

Apparato Urinario : *Diuresi aumentata, diminuita, assente*

Cute: *Edema, eritema*

TOSSICITA' SUBACUTA (O SUBCRONICA)

Forniscono dati sulla tossicità in seguito ad esposizione ripetuta per settimane o pochi mesi.

Sono disponibili tests specifici per somministrazione orale, dermica, ed inalatoria

Richiedono un'osservazione clinica ed anatomo-patologica dettagliata.

Species	rodents (<i>usually rats</i>) preferred for oral and inhalation studies; rabbits for dermal studies; non-rodents (<i>usually dogs</i>) recommended as a second species for oral tests
Age	young adults
Number of animals	10 of each sex for rodents, 4 of each sex for non-rodents per dose level
Dosage	three dose levels plus a control group; include a toxic dose level plus NOAEL; exposures are 90 days
Observation period	90 days (<i>same as treatment period</i>)

TOSSICITA' CRONICA

Forniscono dati sulla tossicità in seguito ad esposizione ripetuta per una parte sostanziale della vita dell'animale.

Sono simili ai tests di tossicità subcronica, ma si estendono per periodi più lunghi e coinvolgono un numero maggiore di animali

Species	two species recommended; rodent and non-rodent (<i>rat and dog</i>)
Age	young adults
Number of animals	20 of each sex for rodents, 4 of each sex for non-rodents per dose level
Dosage	three dose levels recommended; includes a toxic dose level and NOAEL; exposures generally for 12 months; FDA requests 24 months for food chemicals
Observation period	12-24 months

- **STUDI DI TOSSICITA' RIPETUTA A MEDIO E A LUNGO TERMINE**

- L'effetto [prodotto della durata della somministrazione per livello di dose] non è una costante, ma una variabile.
- Accumulo di dose
- Accumulo di danno
- La differenza fra le prove di tossicità ripetuta: le due variabili, durata del trattamento e livelli di dose, sono combinate in rapporto inverso
- Scopo finale di tali prove:
 - a) *minima dose che provoca effetti tossici* (LOEL: observed effect level).
 - b) *massima dose priva di effetti tossici* (NOEL: no-observed effect level).
- Gazzetta Ufficiale CEE n.L 332 del 1983 riporta quanto segue:

Durata prevista di trattamento nell'uomo →	Durata studi tossità
• Una o più dosi in un unico giorno →	2 settimane
• Somministrazioni ripetute sino a 7 gg →	4 settimane
• Somministrazioni ripetute sino a 30 gg →	3 mesi
• Somministrazioni ripetute oltre 30 gg →	6 mesi

• **DETERMINAZIONE TOSSICITA' SUBCRONICA**

- Tossicità subcronica si estendono per periodi sino al 10% del ciclo vitale
- Mima una frequente esposizione degli individui per periodo di tempo limitato a vari agenti
- Gli studi subcronici forniscono informazioni su:
 - a] effetti cumulativi
 - b] sugli eventuali organi bersaglio
 - c] sul periodo di latenza prima del manifestarsi della tossicità
 - d] sulla reversibilità dei fenomeni tossici
 - e] sui rapporti dose-risposta
 - f] importanza fondamentale nella programmazione di studi di tossicità cronica, riproduttiva e di carcinogenicità. .
- 1] Via di somministrazione: quella di probabile impiego nell'uomo: per os il prodotto viene mescolato al cibo.
- 2] Specie animale: due di cui una non roditori
- 3] Età: in genere simile a quella della popolazione che verosimilmente sarà esposta a quel tipo di prodotto. Di solito animali adulti ma giovani e quindi ancora in crescita: topi e ratti tra 6 e 8 settimane di vita, cani tra 4 e 9 mesi di vita.
- 4] Sesso e numero animali: entrambi i sessi- Roditori gruppi di 10 animali per sesso e per livello di dose e 4 nel caso dei cani
- 5] Condizioni di stabulazione e dieta accuratamente controllate. Animali sani e mai usati in precedenza.
- 6] Assegnazione degli animali ai vari gruppi a caso ma uniformità di peso nei lotti.
- 7] Pesare gli animali all'inizio dell'esperimento e identificarli

• **DETERMINAZIONE TOSSICITA' SUBCRONICA (segue)**

- 8] Selezione delle dosi:
 - a] dose bassa che non produca segni evidenti di tossicità immediata
 - b] una dose intermedia che non dia segni o tossicità molto leggera
 - c] una dose alta che produca chiari fenomeni tossici (con incidenza della mortalità non superiore al 10%).
- Le dosi vengono scelte sulla base di alcune informazioni:
 - a] ottenute negli studi di tossicità acuta (DL50, slope della retta)
 - b] relative a sostanze con analoga struttura chimica
- Criterio di scelta: studi preliminari (Range Finding Study)
- 9] Ulteriore gruppo di animali di controllo costituito da animali non trattati o trattati con il solvente eventualmente impiegato.
- 10] Rilievi, osservazioni ed esami:
 - a] Peso corporeo e consumo di cibo:
 - b] Osservazioni generali: comportamento ed ogni altra anormalità. Animali morti o sacrificati se moribondi esame macroscopico, meglio se anche microscopico degli organi.
- Osservazione giornaliera degli animali
- c] Indagini di laboratorio:
 - Esami prima, durante ed alla fine del trattamento.

• **DETERMINAZIONE TOSSICITA' SUBCRONICA (segue)**

- - Ematologici: ematocrito ed emoglobina
- conteggio dei globuli rossi e bianchi
- conta differenziale dei leucociti
- conta delle piastrine
- tempo di protrombina e VES
- - Biochimici: Glutammico-ossalacetico transaminasi (SGOT) [se aumento → danno generale ai tessuti]
- Glutammico piruvico transaminasi (SGPT) [se aumento ð epatotossicità]
- Fosfatasi alcalina [se aumento → cirrosi o ittero ostruttivo]
- Fosfatasi acida [se aumento → carcinoma prostatico]
- Azoto ureico [se aumento → danno renale]
- Proteine totali e albumine e globuline [se diminuzione → necrosi epatica]
- Bilirubinemia diretta ed indiretta
- Creatinemia [se aumento → nefropatie]
- Colesterolemia
- Lipemia [se aumento → nefrosi, cirrosi] [se diminuzione → insufficienza epatica]
- Glicemia
- - Analisi delle urine: peso specifico-colore-trasparenza-pH
- Albuminuria-glicosuria-chetonuria-emoglobinuria
- Presenza eritrociti e leucociti
- Presenza cellule epiteliali di sfaldamento
- Presenza di urati-ossalati di calcio-fosfati batteri

• **TOSSICITA' CRONICA**

- Scopo : valutare rischi connessi con l'impiego di un prodotto, prevedibilmente destinato a somministrazioni ripetute, tenendo conto anche dei suoi prodotti di biotrasformazione.
- Normative CEE:
- 1] Durata della somministrazione (sempre giornaliera):
 - a) 2 settimane → impiego 1 o più dosi in un unico giorno
 - b) 4 settimane → impiego somministrazioni ripetute sino a 7 giorni
 - c) 3 mesi → impiego somministrazioni ripetute sino a 30 giorni
 - d) 6 mesi → impiego somministrazioni ripetute o globali > 30 giorni → impiego: ritenzione molto prolungata del farmaco
- 2] Via di somministrazione:
 - a) La stessa prevista per l'uomo purchè vi sia assorbimento
 - b) Se si impiega la via orale in genere il prodotto viene mescolato al cibo
 - c) Considerare anche la possibilità di una tossicità locale
- 3] Scelta del dosaggio: difficile da determinare; 3 dosi che sono mantenute costanti
 - a) Dose alta: deve dare chiari segni di tossicità. Definita come Massima Dose Tollerata (MTD)
 - b) Dose intermedia: in genere 1/4 della MTD o la media geometrica delle due dosi
 - c) Dose bassa: in genere 1/8 della MTD o la dose sufficiente a produrre l'effetto terapeutico
- 4] Specie animale:
 - a) sulla base delle similitudini farmacodinamiche e metaboliche con l'uomo.
 - b) Se il prodotto è un profarmaco, occorre dimostrare che nella specie scelta si trasforma in principio attivo.
 - c) Estremamente importanti le condizioni di stabulazione e la randomizzazione
 - d) Necessario pesare ed identificare gli animali all'inizio del trattamento

• **TOSSICITA' CRONICA (segue)**

- 5] Dimensione dei gruppi di trattamento:
 - a) Adeguata da permettere di rilevare tutti i possibili effetti tossici.
 - b) Tale da permettere la conservazione di un certo numero di animali per studiare la eventuale reversibilità delle alterazioni
 - c) Gruppo di controllo
- 6] Controlli da eseguire:
 - a) Accrescimento corporeo, consumo di cibo e di acqua
 - b) Accuratissimo esame giornaliero degli animali (eventuali morti, comportamento, segni grossolani di tossicità)
 - c) Esami delle urine
 - d) Esami ematologici
 - e) Esami di chimica clinica
 - f) Esame autoptico di tutti gli animali
 - g) Autopsia ed esame istologico di tutti i tessuti stabiliti da farsi sui controlli e sugli animali trattati con la dose più elevata

SPERIMENTAZIONI SULL'UOMO

Tipi di studi di Tossicologia clinica



Clinical investigations	administration of chemicals to human subjects with careful clinical observations and laboratory measurements
Epidemiological studies	observations of humans that have been exposed to xenobiotics in the normal course of their life or occupation
Adverse reactions to drug reports	reports voluntarily submitted by physicians to the FDA after a drug has been approved and is in widespread use

Nel caso di farmaci, STUDI CLINICI sono spesso una parte delle Autorizzazioni all'Immissione in Commercio (AIC) da parte di aziende farmaceutiche; essi vengono condotti successivamente al completamento della sperimentazione preclinica su animali.

Sebbene spesso la tossicità sia simile tra uomo ed altre specie animali, sono possibili differenze. Da ciò l'esigenza della sperimentazione clinica.

FASI DELLA SPERIMENTAZIONE CLINICA

Fase I:

Tipo di studi: non terapeutici; farmacologia umana.
Soggetti: generalmente volontari sani; popolazioni speciali (insufficienza renale, epatica; anziani; bambini).
Numerosità: 100-200 soggetti
Obiettivi: tollerabilità
farmacocinetica
metabolismo
farmacodinamica.

Fase II A:

Tipo di studi: primi studi terapeutici orientativi, aperti.
Soggetti: pazienti accuratamente selezionati con patologia in cui il nuovo farmaco è elettivamente indicato.
Numerosità: 100-200 soggetti.
Obiettivi: identificazione del *range* di dosi attive («dose finding»)
identificazione della posologia ottimale
tollerabilità
conferma della farmacocinetica in popolazioni speciali (anziani, insufficienza renale, insufficienza epatica).

Fase II B:

Tipo di studi: primi studi controllati in doppia cecità (placebo e/o prodotto attivo di confronto).
Soggetti: pazienti accuratamente selezionati con patologia in cui il nuovo farmaco è elettivamente indicato.
Numerosità: 400-600 soggetti.
Obiettivi: conferma, in condizioni sperimentali corrette, delle dosi terapeutiche e della posologia ottimale
tollerabilità.

Fase III:

Tipo di studi: terapeutici.
Soggetti: pazienti; criteri di inclusione progressivamente meno restrittivi
popolazioni speciali (anziani, bambini, insufficienza renale, epatica).
Numerosità: 2000-4000 soggetti.
Obiettivi: conferma dell'attività terapeutica su popolazioni più ampie e meno selezionate
tollerabilità
farmacocinetica di popolazione
interazioni principali.

Fase IV:

Tipo di studi: a) terapeutici
b) osservazionali (farmacovigilanza).
Soggetti: a) pazienti selezionati e trattati come nella fase III
b) pazienti seguiti nella situazione «naturale».
Numerosità: a) da poche centinaia a migliaia («mega-trials»)
b) tende all'infinito.
Obiettivi: i) conferma attività e tollerabilità in confronto ad altri prodotti nelle indicazioni autorizzate o in nuove indicazioni o con nuove posologie (in questi 2 ultimi casi sono da considerare studi di fase II o III)
ii) stima del rapporto benefici/rischi
iii) identificazione di eventi avversi importanti ma rari.

FASE I DELLA SPERIMENTAZIONE CLINICA

Fase I:

- Tipo di studi:* non terapeutici; farmacologia umana.
- Soggetti:* generalmente volontari sani;
popolazioni speciali (insufficienza renale, epatica; anziani; bambini).
- Numerosità:* 100-200 soggetti
- Obiettivi:* tollerabilità
farmacocinetica
metabolismo
farmacodinamica.

FASE II DELLA SPERIMENTAZIONE CLINICA

Fase II A:

- Tipo di studi:* primi studi terapeutici orientativi, aperti.
- Soggetti:* pazienti accuratamente selezionati con patologia in cui il nuovo farmaco è elettivamente indicato.
- Numerosità:* 100-200 soggetti.
- Obiettivi:* identificazione del *range* di dosi attive («*dose finding*»)
identificazione della posologia ottimale tollerabilità
conferma della farmacocinetica in popolazioni speciali (anziani, insufficienza renale, insufficienza epatica).

Fase II B:

- Tipo di studi:* primi studi controllati in doppia cecità (placebo e/o prodotto attivo di confronto).
- Soggetti:* pazienti accuratamente selezionati con patologia in cui il nuovo farmaco è elettivamente indicato.
- Numerosità:* 400-600 soggetti.
- Obiettivi:* conferma, in condizioni sperimentali corrette, delle dosi terapeutiche e della posologia ottimale tollerabilità.

FASE III DELLA SPERIMENTAZIONE CLINICA

Fase III:

Tipo di studi: terapeutici.

Soggetti: pazienti; criteri di inclusione progressivamente meno restrittivi
popolazioni speciali (anziani, bambini, insufficienza renale, epatica).

Numerosità: 2000-4000 soggetti.

Obiettivi: conferma dell'attività terapeutica su popolazioni più ampie e meno selezionate
tollerabilità
farmacocinetica di popolazione
interazioni principali.

FASE IV DELLA SPERIMENTAZIONE CLINICA

Fase IV:

- Tipo di studi:* a) terapeutici
b) osservazionali (farmacovigilanza).
- Soggetti:* a) pazienti selezionati e trattati come nella fase III
b) pazienti seguiti nella situazione «naturale».
- Numerosità:* a) da poche centinaia a migliaia («mega-trials»)
b) tende all'infinito.
- Obiettivi:* i) conferma attività e tollerabilità in confronto ad altri prodotti nelle indicazioni autorizzate o in nuove indicazioni o con nuove posologie (in questi 2 ultimi casi sono da considerare studi di fase II o III)
ii) stima del rapporto benefici/rischi
iii) identificazione di eventi avversi importanti ma rari.



Gestione del rischio da farmaci

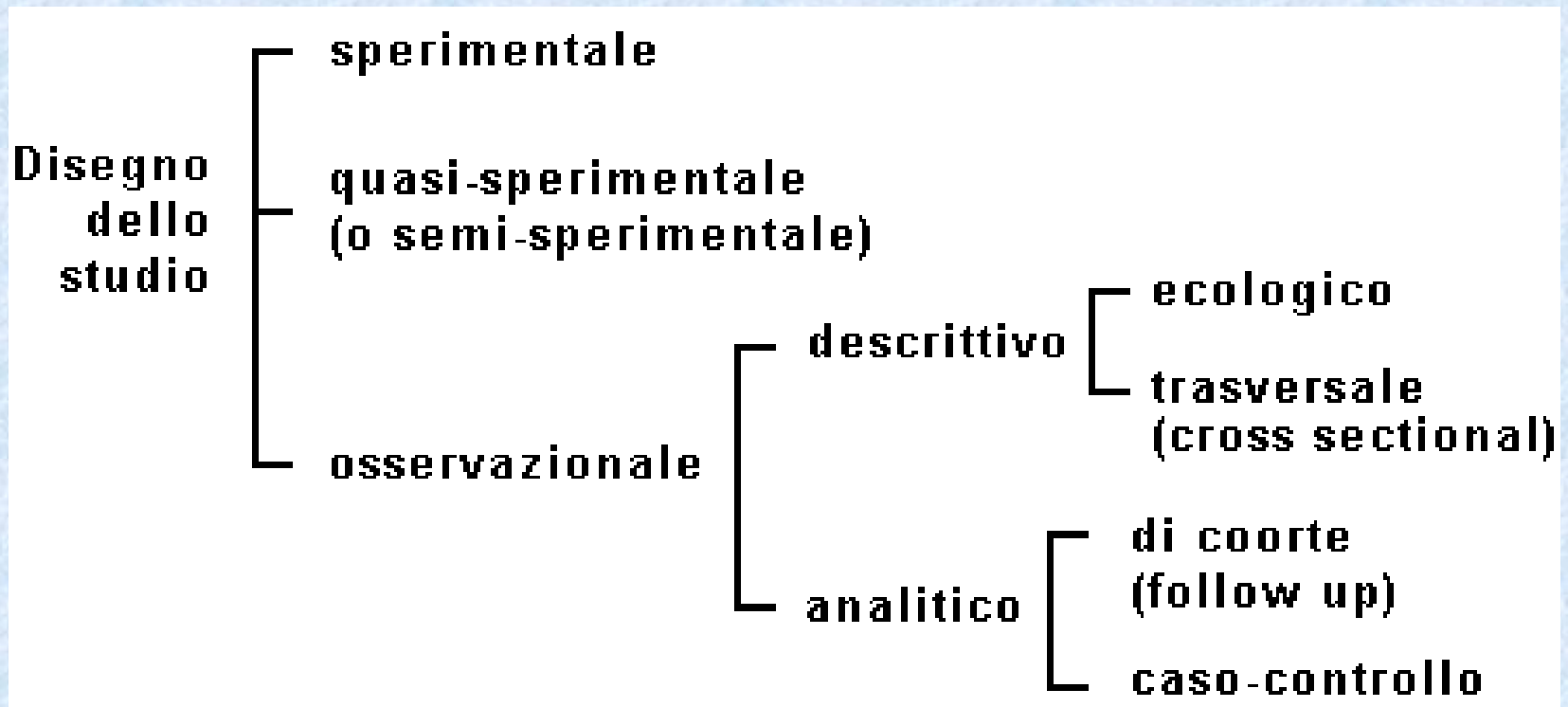
- **Approvazione dell'immissione al commercio (AIC) → EMEA o FDA: il dossier deve contenere dati di efficacia e sicurezza, sia sull'animale che sull'uomo.**

L'AIC comprende:

- **Effetti farmacocinetici e farmacodinamici**
- **Metabolismo e meccanismo d'azione**
- **Rischio associato al farmaco**
- **Uso consentito ed efficacia**
- **Relazioni rischio-beneficio**
- **Contenuto del foglietto illustrativo, incluso delle informazioni sugli usi approvati, posologie, precauzioni, interazioni, ed effetti del sovradosaggio**

- a) studi sperimentali (trials clinici)
- b) studi quasi sperimentali (o semi-sperimentali)
- c) studi osservazionali.

Schema 1 – *Principali disegni di studio epidemiologico.*



Negli studi osservazionali ci sono 3 misure importanti:

1) Rischio – 2) Odd – 3) Tasso.

Rischio = viene definito come probabilità di transizione (in genere di incidenza o di morte) condizionata al tempo di osservazione. Il rischio essendo definito in termini di probabilità, assume valori compresi fra 0 e 1 e viene espresso sotto forma di un numero puro (privo di unità di misura), talvolta moltiplicato per cento ed espresso quindi come percentuale.

Odd = rappresenta il rapporto tra una probabilità (in genere stimata da una proporzione) e il suo complemento a 1. (Es. odd di rischio, definito come il rapporto tra il rischio ed il suo complemento a 1, odd di esposizione, ottenuto dal rapporto tra la proporzione di esposti e di non esposti.

Tasso = Il **tasso** rappresenta una misura della transizione nel tempo da uno stato ad un altro, (Es. sano-malato; vivo-morto)

STUDIO CASO-CONTROLLO

Lo studio caso-controllo è uno studio retrospettivo (ossia uno studio in cui gli eventi di interesse si sono già tutti verificati prima dell'inizio dello studio stesso e l'osservazione riguarda il passato) nel quale i confronti delle proporzioni di esposizione ad un sospetto fattore di rischio vengono effettuati fra soggetti affetti da una determinata patologia (**casi**) e individui esenti da tale patologia (**controlli**). In questo studio, un campione di casi viene scelto nella popolazione dei casi e un campione di controllo viene scelto nella popolazione dei soggetti non affetti dalla malattia. L'informazione sulla pregressa esposizione è quindi rilevata per gli uni e per gli altri retrospettivamente, esaminando cartelle cliniche o certificati redatti in passato, intervistando direttamente i soggetti, o intervistando i parenti qualora i casi non fossero in grado di dare informazioni. Per rendere quanto più possibile i controlli rappresentativi della popolazione che ha generato i casi, per quanto riguarda l'esposizione al fattore di rischio sospetto, si ricorre spesso all'appaiamento di casi e controlli (*studio caso-controllo con appaiamento*). Età, sesso e condizione socio-economica sono le variabili per cui più frequentemente si procede ad appaiamento.

STUDIO CASO-CONTROLLO

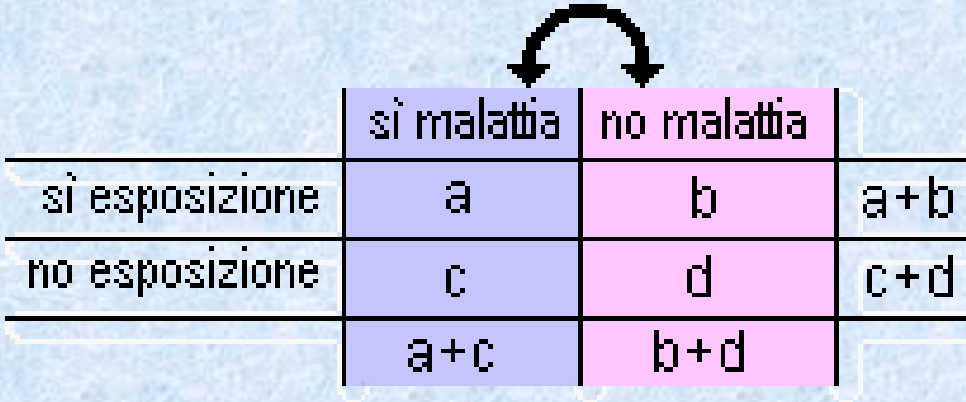
Studio analitico basato sul confronto tra un gruppo di individui affetti da una certa malattia, condizione cronica o tipo di trauma o reazione avversa (casi) ed un gruppo di individui che ne sono privi.

Nel caso dell'impostazione retrospettiva, lo sperimentatore inizia raccogliendo i cosiddetti «casi», ossia gli individui che presentano la malattia in studio.

Nella tabella i casi sono rappresentati dal totale degli individui (a+c). Viene anche scelto un adatto gruppo di paragone (o di controllo) che comprenderà individui sani (b+d).

A questo punto, attraverso una accurata anamnesi su TUTTI i soggetti in studio, si stabilisce come gli ammalati (a+c) debbano essere assegnati alle celle a e c. Analogamente si stabilisce quanti, fra i sani, debbano essere assegnati alle celle b e d.

La tabella risulta ora completata, e si può impostare l'analisi, **confrontando la proporzione di esposti nel gruppo dei casi** [$a/(a+c)$] **con la proporzione di esposti nel gruppo dei controlli** [$b/(b+d)$] (confronto fra *colonne*)



	si malattia	no malattia	
si esposizione	a	b	a+b
no esposizione	c	d	c+d
	a+c	b+d	

Casi **controlli**

Uno studio retrospettivo ha il vantaggio di fornire un risultato relativamente rapido, in quanto all'inizio dello studio *il tempo necessario all'accadimento degli eventi è già trascorso*.

Un altro punto a favore degli studi retrospettivi, rispetto a quelli prospettivi, è la applicabilità ad indagini su malattie rare, per le quali i casi possono essere raccolti retrospettivamente anche da ospedali.

STUDIO DI COORTE

Un'indagine nella quale un gruppo di individui (la coorte) viene identificato, seguito in modo prospettico, a volte per anni, e dei quali si raccoglie la storia sanitaria.

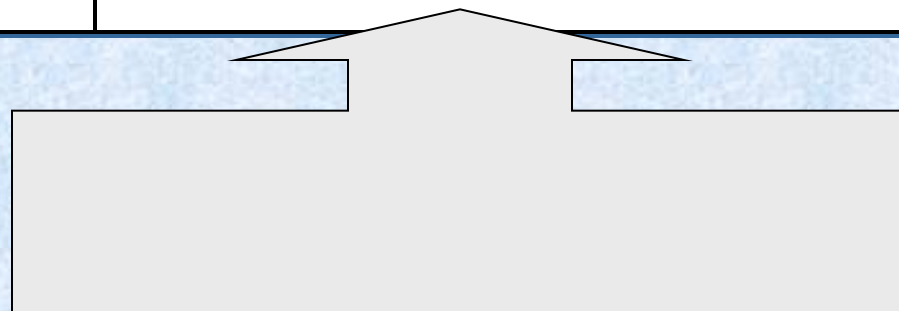
La coorte può essere suddivisa, dall'inizio, in gruppi con caratteristiche differenti: ad esempio, esposti e non esposti ad un *fattore di rischio*, portatori o non portatori di una determinata condizione, sottoposti e non sottoposti ad un determinato trattamento, ecc.

Nello studio si rileva l'incidenza di una particolare malattia (o evento avverso) in ogni gruppo e si confrontano le diverse incidenze.

STUDI DI COORTE

Gli studi di coorte sono gli studi epidemiologici più frequentemente condotti. Studio analitico in cui l'arruolamento è basato sullo stato di esposizione ad un certo fattore o all'appartenenza ad un certo gruppo. Gli individui arruolati vengono quindi seguiti nel tempo per verificare e confrontare l'occorrenza di malattie, morte o altri outcome relativi alla salute. Spesso coinvolgono esposizioni lavorative a livelli maggiori di una sostanza rispetto alla popolazione generale.

Prospective cohort study	cohorts are identified based on current exposures and followed into the future
Retrospective cohort study	cohorts are identified based on past exposure conditions and follow-up proceeds forward in time



Tipi di studi di coorte

STUDIO DI COORTE

Un'indagine nella quale un gruppo di individui (la coorte) viene identificato, seguito in modo prospettico, a volte per anni, e dei quali si raccoglie la storia sanitaria.

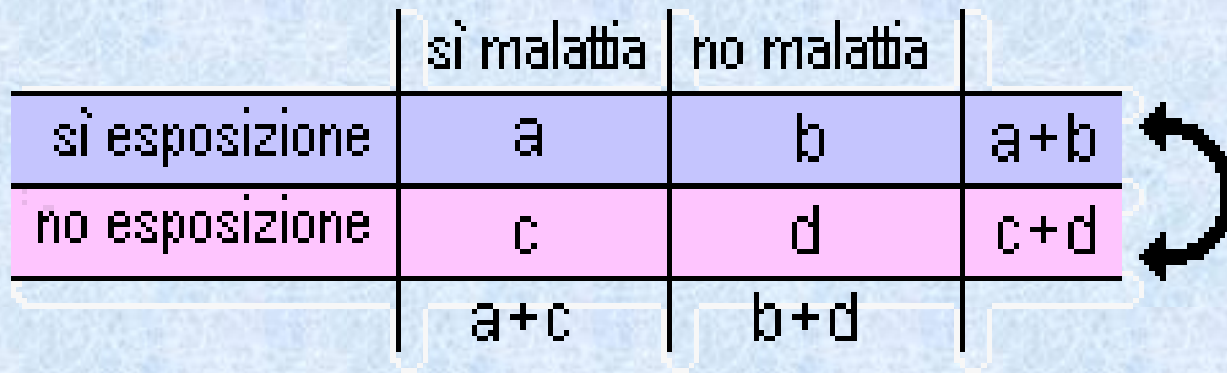
Nello studio si rileva l'incidenza di una particolare malattia (reazione avversa) in ogni gruppo e si confrontano le diverse incidenze.

L'avvio degli studi epidemiologici di tipo prospettivo è rappresentato dai totali di riga (a+b) e (c+d). In altre parole, il ricercatore inizialmente seleziona due gruppi, entrambi costituiti da (soggetti) sani; un gruppo comprende soggetti che saranno esposti alla presunta causa, e l'altro soggetti che non saranno esposti.

Quindi, i soggetti vengono seguiti nel tempo e andranno a distribuirsi nelle colonne degli ammalati o dei sani.

Si prosegue effettuando la *analisi dei dati*, confrontando la proporzione di malati tra gli esposti [$a/(a+b)$] con la proporzione di malati tra i non esposti [$c/(c+d)$] (confronto fra *righe*)

	sì malattia	no malattia	
sì esposizione	a	b	a+b
no esposizione	c	d	c+d
	a+c	b+d	



Lo studio prospettivo (detto anche «di coorte») ha lo svantaggio di richiedere più tempo, in quanto si deve seguire nel tempo la comparsa degli eventi. Inoltre, esso non è applicabile a malattie rare per la difficoltà nel reperimento di un numero di casi sufficiente.

Gli studi prospettivi sono superiori a quelli retrospettivi perché meno soggetti ad «errori sistematici», in quanto essi non dipendono da dati raccolti in precedenza magari con modalità poco affidabili.

Lo studio di coorte, o studio di *follow-up*, è considerato lo studio analitico per eccellenza, nel senso che permette di osservare l'insorgenza della patologia dopo l'avvenuta esposizione, di misurare quindi i tempi di esposizione e di ottenere stime di associazione tra esposizione e occorrenza di una determinata patologia, confrontando gruppi ("coorti") di esposti e di non-esposti.

Tuttavia, in alcune condizioni lo studio di coorte può essere di difficile realizzazione. In particolare, per lo studio di patologie a lunga latenza può necessitare di un tempo di osservazione estremamente prolungato. Inoltre, esso comporta costi piuttosto elevati e presenta il limite di poter indagare una sola (o pochissime) esposizioni alla volta, per cui in genere non può essere impiegato per generare nuove ipotesi.

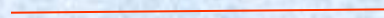
Al contrario, lo studio caso-controllo, anche se molto più esposto al rischio della presenza di fattori che possono introdurre distorsioni sistematiche (denominate "*bias*") nelle stime, presenta il vantaggio di risultare realizzabile in condizioni in cui lo studio di coorte non può essere effettuato, ad esempio quando non si conosce la dimensione della popolazione in studio.

Differenze tra i due studi



**Studi
caso-
controllo**

esposizione al farmaco



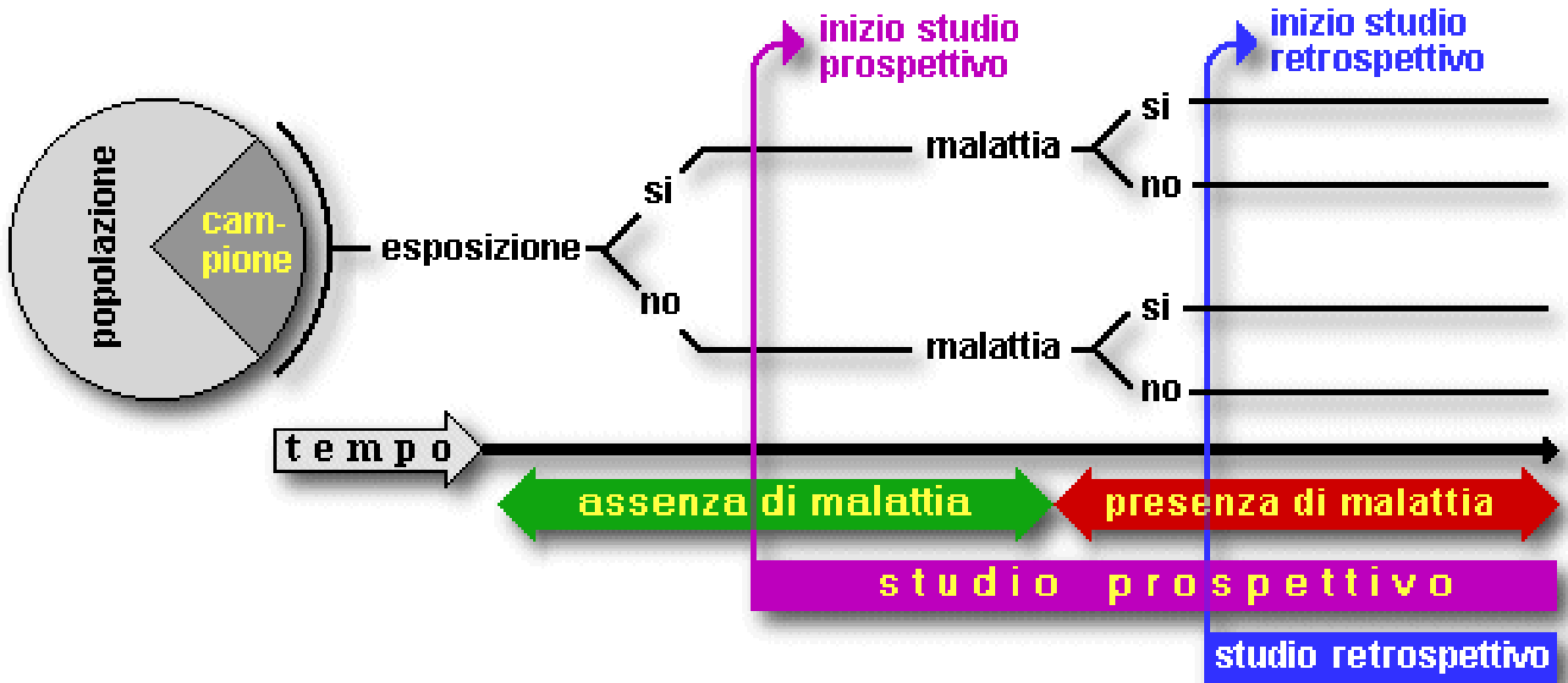
reazione avversa

**Studi di
coorte**



Nella figura seguente è illustrata schematicamente la differenza fra studi prospettivi e retrospettivi; in particolare, viene evidenziato il diverso momento di inizio dell'osservazione della popolazione in rapporto alla comparsa di malattia.

Schema delle differenze fra studi prospettivi e retrospettivi in rapporto al tempo di osservazione



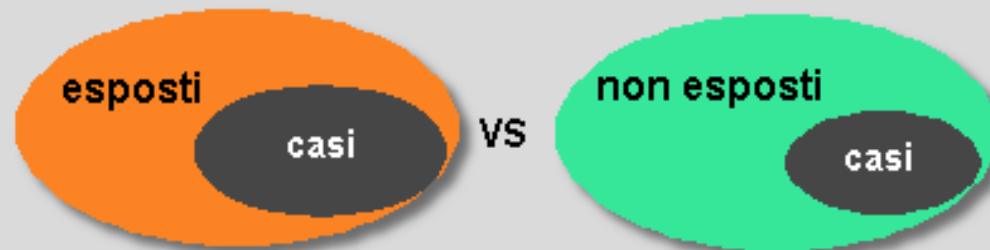
NB: uno studio di coorte può anche essere retrospettivo: l'esposizione è già avvenuta.



Studi RETROSPETTIVI

Confrontare la frequenza degli

- esposti nei casi
- esposti nei controlli



Studi PROSPETTIVI

Confrontare la frequenza dei

- casi negli esposti
- casi nei non esposti

Studi Retrospettivi

ODDS RATIO !

Studi Prospettivi

RISCHIO RELATIVO !

PARAMETRI DI MISURAZIONE DEL RISCHIO DERIVANTI DA STUDI EPIDEMIOLOGICI

Odds Ratio (O/R)	The ratio of risk of disease in a case-control study for an exposed group to an unexposed group. An $O/R=2$ means that the exposed group has twice the risk as the non-exposed group.
Standardized Mortality Ratio (SMR)	The relative risk of death based on a comparison of an exposed group to non-exposed group. An $SMR=150$ indicates that there is a 50% greater risk.
Relative Risk (RR)	The ratio expressing the occurrence of disease in an exposed population to that of an unexposed population. An $RR=175$ indicates a 75% increase in risk.

ODDS RATIO IN STUDI EPIDEMIOLOGICI

Il calcolo dell'**odds ratio** prevede il confronto tra le frequenze di comparsa dell'evento (ad esempio, malattia o ADR) rispettivamente nei soggetti esposti e in quelli non esposti al fattore di rischio in studio.

Viene utilizzato negli studi retrospettivi (**caso-controllo**), dove **non** è necessaria la raccolta dei dati nel tempo.

“**odds**” in statistica si intende il rapporto tra la probabilità p di un evento e la probabilità che tale evento non accada (cioè la probabilità $(1-p)$ dell'evento complementare)

$$\text{Odds} = p/1-p$$

- Se il valore dell'**OR** è uguale a **1**, significa che l'odds di esposizione nei sani è uguale all'odds di esposizione nei malati, cioè il fattore di rischio è **ininfluente** sulla comparsa della malattia.
- Se il valore dell'**OR** è maggiore di **1**, il fattore di rischio **è** o **può** essere implicato nella comparsa della malattia.
- Se il valore dell'**OR** è minore di **1** il fattore di rischio in realtà è **una difesa** contro la malattia.

- Gli *odds* si utilizzano nel mondo delle scommesse, perché consentono allo scommettitore di calcolare facilmente la somma da incassare in caso di vittoria.

Ad esempio, le probabilità di vittoria della nazionale italiana di calcio ai mondiali di Francia del '98 erano date dai bookmakers a 4:1 "a sfavore". Questo equivale a dire che, *su una scala da 1 a 5*, le probabilità di sconfitta (p) della squadra italiana erano considerate 4 volte più alte di quelle di una sua vittoria ($1-p$), e quindi la vittoria dell'Italia sarebbe stata pagata 4 volte la cifra scommessa.

•

Ovviamente, gli odds si possono trasformare in probabilità: secondo i bookmakers, l'Italia aveva 1 probabilità su 5 ($p=0.2$) di vincere e 4 probabilità su 5 di perdere ($p=0.8$). Nota che (p di perdere = $1-p$ di vincere) e viceversa.

- L'"odds ratio" si calcola attraverso i semplici rapporti (odds) fra le frequenze osservate e non attraverso le *proporzioni*. Nell'esempio successivo della urolitiasi del cane, calcoliamo gli odds (ricordati: odds = p a favore / p contro) di esposizione nel gruppo dei casi e gli odds di esposizione nel gruppo dei controlli, e poi ne facciamo il rapporto

Studio retrospettivo: calcolo dell'odds ratio

Consideriamo l'associazione fra obesità e urolitiasi del cane, ricordando che in uno studio retrospettivo si inizia selezionando i casi e i controlli e poi andando ad accertare quanti fra i casi (e quanti fra i controlli) sono stati esposti alla presunta causa. Lo studio ha fornito i seguenti risultati:

Risultati dello studio retrospettivo

		calcolosi urinaria		
		+	-	
obesità	+	383 (a)	322 (b)	705 (totale esposti)
	-	631 (c)	1165 (d)	1796 (totale non esposti)
		1014 (totale casi)	1487 (totale controlli)	2501

- Il metodo da utilizzare per la misurazione dell'associazione in uno studio retrospettivo è il calcolo del cosiddetto «**odds ratio (OR)**» o «**rappporto incrociato**».
- Per comprendere questa misura, occorre introdurre il concetto di "odds" (termine che non ha un corrispondente in italiano; può essere reso con "probabilità a favore"). Gli odds sono rappresentati dal rapporto fra il numero di volte in cui l'evento si verifica (o si è verificato) ed il numero di volte in cui l'evento non si verifica (o si è verificato).

$$\text{Odds ratio} = \frac{\text{odds di esposizione nei casi}}{\text{odds di esposizione nei controlli}}$$

$$\text{Odds ratio} = \frac{a/c}{b/d} = \frac{a}{b} * \frac{d}{c} = \frac{ad}{bc}$$

	si malattia	no malattia
si esposizione	a	b
no esposizione	c	d

- Notare che si utilizzano i semplici rapporti tra le frequenze osservate (a/c , b/d) e non le proporzioni ($a/a+c$ e $b/b+d$). Notare anche che, applicando le proprietà delle frazioni, l'odds ratio può venire più facilmente calcolato attraverso i prodotti delle celle incrociate della tabella ($a*d$ e $b*c$); perciò viene anche detto, in italiano, "**rapporto incrociato**".
- Ritorniamo all'esempio dell'obesità-urolitiasi e calcoliamo l'OR:

RISCHIO RELATIVO IN STUDI EPIDEMIOLOGICI

Il **rischio relativo** (*risk rate*, **RR**) è la probabilità che un soggetto, appartenente ad un gruppo esposto a determinati fattori, sviluppi la malattia (o ADR), rispetto alla probabilità che un soggetto appartenente ad un gruppo non esposto sviluppi la stessa malattia (o ADR).

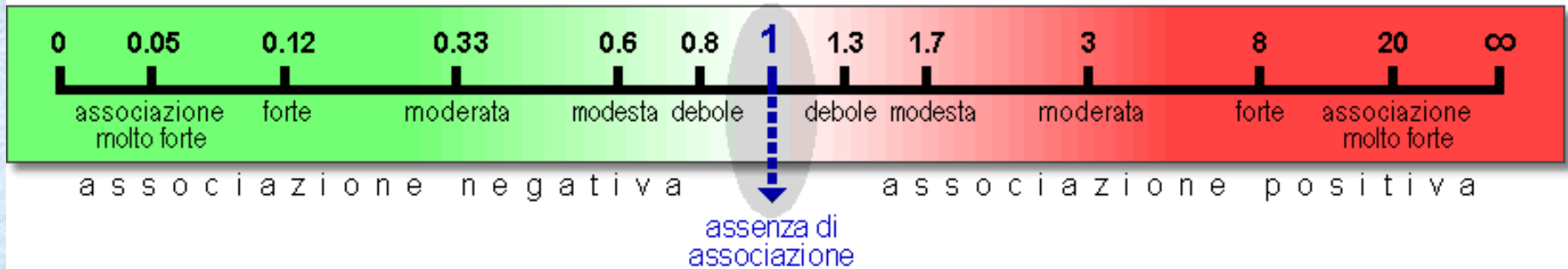
Questo indice è utilizzato negli studi di **coorte** dove l'esposizione è misurata nel tempo:

$$\mathbf{RR = I (esposti) / I (non-esposti)}$$

dove I = incidenza, che si definisce come

- Se **RR** risulta uguale a **1** il fattore di rischio è **ininfluente** sulla comparsa della malattia.
- Se **RR** è maggiore di **1** il fattore di rischio è **implicato** nel manifestarsi della malattia.
- Se l'**RR** è minore di **1** il fattore di rischio dipende dalla malattia (fattore di difesa).

Schema di interpretazione dei valori di Rischio Relativo e Odds Ratio



Studio prospettivo: calcolo del rischio relativo.

Supponiamo di voler verificare se esiste una associazione fra allevamento dei vitelli in ricoveri chiusi (esposizione, o variabile indipendente) e la comparsa di polmonite (variabile dipendente). Per questo scopo si effettua uno studio prospettivo, seguendo nel tempo gruppi di vitelli allevati al chiuso oppure all'aperto e contando i casi di polmonite che si verificano nei due gruppi.

Alla fine dello studio i risultati ottenuti vengono tabulati nella «solita» tabella di contingenza.

Risultati dello studio prospettivo

		polmonite		
		+	-	
allevamento	chiuso	240 ^a	230 ^b	470
	aperto	160 ^c	1070 ^d	1230
		400	1300	1700

variabile indipendente (esposizione) ←

→ variabile dipendente (malattia)

→ totale esposti

→ totale non esposti

↓ totale casi

↓ totale controlli

Percorso per il calcolo del RR

$$\text{RISCHIO RELATIVO} = \frac{\text{incidenza negli esposti}}{\text{incidenza nei non esposti}}$$

$$\text{RISCHIO RELATIVO} = \frac{a / (a+b)}{c / (c+d)}$$

dove

		malattia	
		SI	NO
esposizione	SI	a	b
	NO	c	d

		polmonite	
		SI	NO
allevamento	chiuso	240	230
	aperto	160	1070

**INCIDENZA
negli esposti:**
 $240 / (240+230) = 0.511$

**INCIDENZA
nei non esposti:**
 $160 / (160 + 1070) = 0.130$

$$\text{RISCHIO RELATIVO} = 0.511 / 0.130 = 3.93$$

Esempio con i
dati in studio

		urolitiasi	
		SI	NO
obesità	SI	383	322
	NO	631	1165

ODDS di esposizione
nei casi:
 $383 / 631 = 0.607$

ODDS di esposizione
nei controlli:
 $322 / 1165 = 0.277$

$$\text{ODDS RATIO} = 0.607 / 0.277 = 2.19$$

Calcolo alternativo:

$$(383 \cdot 1165) / (322 \cdot 631) = 2.19$$

- In termini matematici, non è importante se l'OR viene calcolato come $(a/c)/(b/d)$ oppure come $(a/b)/(c/d)$, perché in entrambi i casi si ottiene lo stesso rapporto incrociato: ad/bc . Tuttavia, in termini razionali non ha senso usare la seconda formula. Infatti in uno studio retrospettivo, il rapporto a/b (così come il rapporto c/d), non dipende dalla malattia né dall'esposizione, ma bensì soltanto dallo sperimentatore stesso che ha avuto libertà di reclutare un numero di casi e di controlli a suo piacimento.*

La tabella di contingenza ha il seguente aspetto:

STUDI RETROSPETTIVI (o STUDI CASO-CONTROLLO)

All'inizio dello studio gli eventi "esposizione" e "malattia" sono già avvenuti

esposizione o presunta causa	effetto (malattia)	
	+	-
+	a	b
-	c	d

Si inizia raccogliendo i "casi" (a+c) e quindi si seleziona un gruppo di controllo (b+d)

esposizione	malattia	
	+	-
+	?	?
-	?	?
	a+c	b+d

Gli individui vengono quindi assegnati retrospettivamente alle righe della esposizione. Infine, si confronta il tasso di esposizione negli ammalati $[a/(a+c)]$ e nei controlli $[b/(b+d)]$

STUDI PROSPETTIVI (o STUDI DI COORTE)

All'inizio dello studio l'esposizione è già avvenuta, ma la malattia non è ancora comparsa

Si considerano i gruppi degli esposti (a+b) e non esposti (c+d)

espos.	malattia		
	+	-	
+	?	?	a+b
-	?	?	c+d

Col tempo gli individui vanno a distribuirsi nelle colonne degli ammalati e dei sani. Infine, si confronta il tasso di incidenza (malattia) negli esposti $[a/(a+b)]$ e nei non esposti $[c/c+d]$

OR

RR

Inferenza statistica nello studio caso-controllo

Nel caso più semplice di una sola variabile di esposizione e in assenza di confondenti, il risultato di uno studio caso controllo può essere riassunto in una tabella 2x2, nel modo seguente:

	Casi	Controlli	
Esposti	100(a)	20(b)	a+b
Non-esposti	100(c)	180(d)	c+d
	a+c	b+d	

Odd casi: a/c

$$100/100=1.0$$

Odd contr: b/d

$$20/180=0.11$$

	Casi	Controlli	
Esposti	100 (a)	20(c)	120
Non-esposti	100(b)	180 (d)	280
	200	200	

➤ Lo stimatore di associazione più utilizzato nello studio caso-controllo è l'Odds Ratio (OR) di esposizione che rappresenta una stima dell'OR di rischio e quindi è stimatore di rischio relativo

➤ L'OR può essere ottenuto applicando la seguente formula:

$$OR = \frac{a \cdot d}{b \cdot c}$$

$$100 \cdot 180 / 20 \cdot 100 = 9$$

Esempio di studio caso-controllo

- Hurwitz (1987) ha studiato la relazione tra uso di aspirina e malattia di Reye (encefalopatia rara e grave). Casi: 27 bambini ricoverati con sindrome di Reye che hanno avuto malattia batterica 3 settimane prima.
- Controlli: 140 bambini senza sindrome di Reye ma che hanno avuto malattia batterica 3 settimane prima.
- Tra i 27 casi, 26 hanno preso aspirina, tra i controlli 53.

	Casi	Controlli	
Esposti	26(a)	53(b)	79
Non-esposti	1(c)	87(d)	88
	27	140	167

Frequenze esposizione nei casi (a/c) $26/1 = 26$

Frequenze esposizione nei controlli (b/d) $53/87 = 0.61$

$$\text{OR: } 26 * 87 / 53 * 1 = 42.7$$

Esempio di studio caso-controllo

- Determinare relazione tra rischio di sanguinamento gastrointestinale ed uso di nitroderivati o FANS o aspirina (in 4 ospedali con 1122 pazienti ricoverati per **sanguinamento**) (retrospettico)

Esempio di studio di coorte

- Determinare il rischio relativo di reazioni avverse (una o più) in pazienti trattati con diuretici (in ospedali o ambulatori con 890 pazienti trattati (prospettico e/o retrospettico)

- Tra i vantaggi principali dello studio caso-controllo, vi è la possibilità di valutare l'effetto di diverse esposizioni e quindi l'eventuale presenza di interazione tra di esse.
- Permette inoltre un'agevole raccolta di informazioni su diversi possibili confondenti e risulta in genere molto potente, poiché è in grado di includere un numero di casi molto elevato.
- Rispetto allo studio di coorte risulta in genere meno costoso e richiede tempi di realizzazione più brevi.
- Infine risulta particolarmente adatto per indagare patologie molto rare, in cui si possono selezionare tutti i casi incidenti (nuovi casi) in un determinato territorio per l'intero periodo di osservazione.

- Tuttavia il limite principale dello studio caso-controllo risiede probabilmente nella sua suscettibilità a diversi fattori di distorsione (*bias*).
- Il *bias* di selezione può originare dalla scelta inadeguata dei casi o, più comunemente, dei controlli (es. i controlli non sono rappresentativi della popolazione generale).
- Un *bias* di informazione può invece derivare dal fatto che i casi tendono maggiormente ad attribuire l'insorgenza della loro patologia ad avvenute esposizioni.
- I *bias* da confondimento derivano dalla presenza di fattori associati sia all'esposizione che al rischio della patologia, denominati confondenti.

DISEGNO DEGLI STUDI EPIDEMIOLOGICI

Fattori critici per un efficace studio epidemiologico

Controlli appropriati (stessa razza, età, sesso, ...)

Durata adeguata (rilevazione del rischio oncogeno: >20 anni!)

Capacità statistica di rilevare delle differenze

**Tipi di errori
(bias)**



Selection bias	Occurs when the study group is not representative of the population from which it came.
Information bias	Occurs when study subjects are misclassified as to disease or exposure status. Recall bias occurs when individuals are asked to remember exposures or conditions that existed years before.
Confounding factors	Occur when the study and control populations differ with respect to factors which might influence the occurrence of the disease. For example, smoking might be a confounding factor and should be considered when designing studies.

STUDIO ECOLOGICO

Studio analitico osservazionale basato su dati aggregati, cioè non individuali. **L'associazione** tra **i fattori di rischio** e la malattia oggetto di studio viene valutata mettendo in relazione dati sui fattori di rischio e la prevalenza della malattia in uno o più gruppi di individui o popolazioni. Tali studi possono facilmente portare ad errori di valutazione (fallacia ecologica), in quanto, essendo basati su dati aggregati, non permettono di determinare l'associazione tra esposizione ed esito a livello del singolo individuo.

Sono tuttavia semplici da eseguire in quanto si basano spesso su dati già disponibili, e vengono quindi usati spesso in fase esplorativa e di formulazione di ipotesi

STUDIO TRASVERSALE

Studi cross-sectiona(trasversali): Studio analitico: *in una popolazione si valuta, in un determinato istante (o al più in un intervallo di tempo ridotto) l'esposizione ad un possibile fattore di rischio e la presenza di malattia (prevalenza).*

Come in uno studio caso-controllo gli individui a cui è stata diagnosticata la malattia, condizione cronica, o trauma, costituiscono i **casi**, mentre i restanti individui della popolazione costituiscono i **controlli**.

VALUTAZIONE DELLA DOSE-RISPOSTA

Serve a determinare la relazione esistente tra dose ed effetti tossici nell'uomo.

Richiede due tipi di estrapolazioni:

- 1. Dalle alte dosi sperimentali alle basse dosi ambientali**
- 2. Dall'animale all'uomo**

Relativamente al fattore 1, esistono importanti differenze tra gli effetti *non-carcinogenici* (considerati come aventi un effetto soglia) e quelli *carcinogenici* (sprovvisti di effetto soglia).

VALUTAZIONE DELLA DOSE-RISPOSTA

Per *effetti non-carcinogenici (neurotossicità)*, il margine di sicurezza viene espresso come Assunzione Quotidiana Accettabile (ADI, Acceptable Daily Intake) o Dose di Riferimento (RfD)

L'ADI è la quantità di sostanza cui il soggetto può essere esposto quotidianamente per un periodo lungo (tutta la vita!) senza che si verificano eventi dannosi. Viene determinata applicando un fattore di sicurezza (safety factors) alla NOAEL.

$$\text{ADI (human dose)} = \frac{\text{NOAEL (experimental dose)}}{\text{Safety Factor(s)}}$$

Fattori di Sicurezza utilizzati per il calcolo dell'ADI

10X	human variability
10X	extrapolation from animals to humans
10X	use of less than chronic data
10X	use of LOAEL instead of NOAEL
0.1 - 10X	modifying factor

Esempio del calcolo dell'RfD

Uno studio animale subcronico ha rilevato una LOAEL di 50 mg/kg/die.

Quindi i fattori di sicurezza saranno:

- 10 per la variabilità umana
- 10 per lo studio animale
- 10 per un'esposizione subcronica
- 10 per l'utilizzo della LOAEL invece della NOAEL

$$\text{RfD} = \frac{50 \text{ mg / kg / day}}{10 \times 10 \times 10 \times 10} = 0.005 \text{ mg / kg / day}$$

- Indice terapeutico: DL_{50}/DE_{50} . E' un indice molto approssimativo della sicurezza di un farmaco; non tiene conto delle pendenze delle curve
- Margine di sicurezza: DL_1/DE_{99} . E' un indicatore migliore della sicurezza del farmaco.
- *N.B. per sostanze senza effetti positivi, si intende con il termine margine di sicurezza indica la differenza tra dose cui è esposta la popolazione umana e la dose più elevata non tossica (NOEL)*

VALUTAZIONE DELLA DOSE-RISPOSTA PER SOSTANZE CANCEROGENE

Due fasi:

1. La valutazione quantitativa degli studi epidemiologici, animali, e in vitro (*mutagenicità*). Sulla base di questi, la sostanza viene classificata come certamente, probabile o possibile carcinogeno umano.

Group A	<i>Human Carcinogen</i>	sufficient human evidence for causal association between exposure and cancer
Group B1	<i>Probable Human</i>	limited evidence in humans
Group B2	<i>Probable Human</i>	inadequate evidence in humans and sufficient evidence in animals
Group C	<i>Possible Human Carcinogen</i>	limited evidence in animals
Group D	<i>Not Classifiable as to Human Carcinogenicity</i>	inadequate evidence in animals
Group E	<i>No Evidence of Carcinogenicity in Humans</i>	at least two adequate animal tests or both negative epidemiology and animal studies

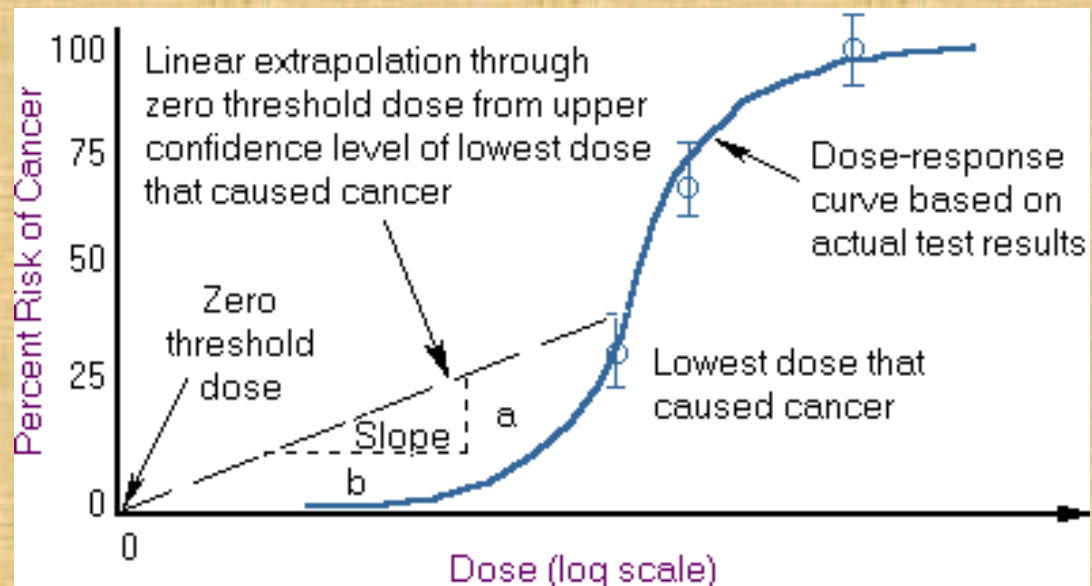
- **Evidenze umane sufficienti: studi epidemiologici positivi.**
- **Evidenze umane limitate: possibili spiegazioni alternative.**
- **Evidenze umane inadeguate: non vi sono studi epidemiologici.**
- **Evidenze animali sufficienti: studi animali positivi su due specie.**
- **Evidenze animali limitate: studi animali positivi su una sola specie.**

VALUTAZIONE DELLA DOSE-RISPOSTA PER SOSTANZE CANCEROGENE

2. Quantificazione del rischio per sostanze certamente o probabilmente cancerogene. Modelli matematici vengono utilizzati per estrapolare dalle alte dosi sperimentali alle basse dosi ambientali.

Il parametro chiave è la pendenza tumorale (cancer slope factor). Questa è una stima della massima probabilità che un soggetto sviluppi un tumore se esposto ad una sostanza per 70 anni. Viene espresso in mg/kg/day.

Linearized Multistage Model (LMS)



VALUTAZIONE DELLA DOSE-RISPOSTA PER SOSTANZE CANCEROGENE

Altri Modelli

One hit model	This is a very conservative model. It assumes that there is a single stage for cancer and that one molecular event induces a cell transformation.
Multi hit model	This model is one of the least conservative models. It assumes several interactions are needed before a cell can be transformed.
Probit model	This model assumes log normal distribution (<i>Probit</i>) for tolerances of exposed population. While sometimes used, it is generally considered inappropriate for the assessment of cancer risk.
Physiologically Based Pharmacokinetic Models (PB-PK models)	This model incorporates pharmacokinetic and mechanistic data into the extrapolation process. It requires extensive data and is becoming commonly used.

Stima delle concentrazioni di clordano nell'acqua potabile che causerebbero un rischio di un caso di morte da tumore, in funzione del modello utilizzato

Probit model	50 µg/L
Multi-hit model	2 µg/L
Linearized multistage model	0.07 µg/L
One-hit model	0.03 µg/L

Conversione delle dosi animali in dosi equivalenti umane

La dose equivalente umana viene calcolata assumendo che le diverse specie sono ugualmente sensibili agli effetti di una sostanza per unità di peso corporeo o di superficie corporea.

Sia la Food and Drug Administration (FDA) che la Environmental Protection Agency (EPA) utilizzano il peso corporeo elevato alla potenza di $3/4$ per calcolare le dosi equivalenti umane.

Calcolo della possibile esposizione

L'ultima fase della valutazione del rischio è l'espressione del rischio stesso in termini di possibile esposizione rispetto a sorgenti contaminate.

Il rischio viene espresso come concentrazione della sostanza nell'ambiente dove si verifica il contatto umano (mg/m³ nell'aria; mg/L nell'acqua potabile).

Per sostanze cancerogene, la stima dei valori di rischio in uno specifico mezzo (liquido, solido, aria, ...) vengono calcolate dividendo le pendenze tumorali (cancer slope factors) per 70 kg (*peso medio dell'uomo*) e moltiplicando per 20 m³/giorno (*media del volume di aria in/espirstata*) o 2 litri/giorno (*consumo medio di acqua di un adulto*).

Valutazione dell'esposizione

Senza alcuna esposizione, anche le sostanze più tossiche non rappresentano un problema.

In tale fase, vengono :

- Analizzate le caratteristiche dell'esposizione (*punti di origine*)
- Caratterizzate le vie di esposizione (*acqua sotterranea*)
- Quantificate le esposizioni ($\mu\text{g}/\text{L}$ *acqua*)

Le principali variabili della valutazione dell'esposizione sono:

- La popolazione esposta (*complessivamente o gruppi*)
- Il tipo di sostanze (*farmaci, sostanze lavorative, inquinanti ambientali*)
- Sostanza singola o miscela
- La durata dell'esposizione (*breve, intermittente o protratta*)
- Le vie ed i mezzi di diffusione (*ingestione, inalazione, dermica*)

Caratterizzazione del rischio

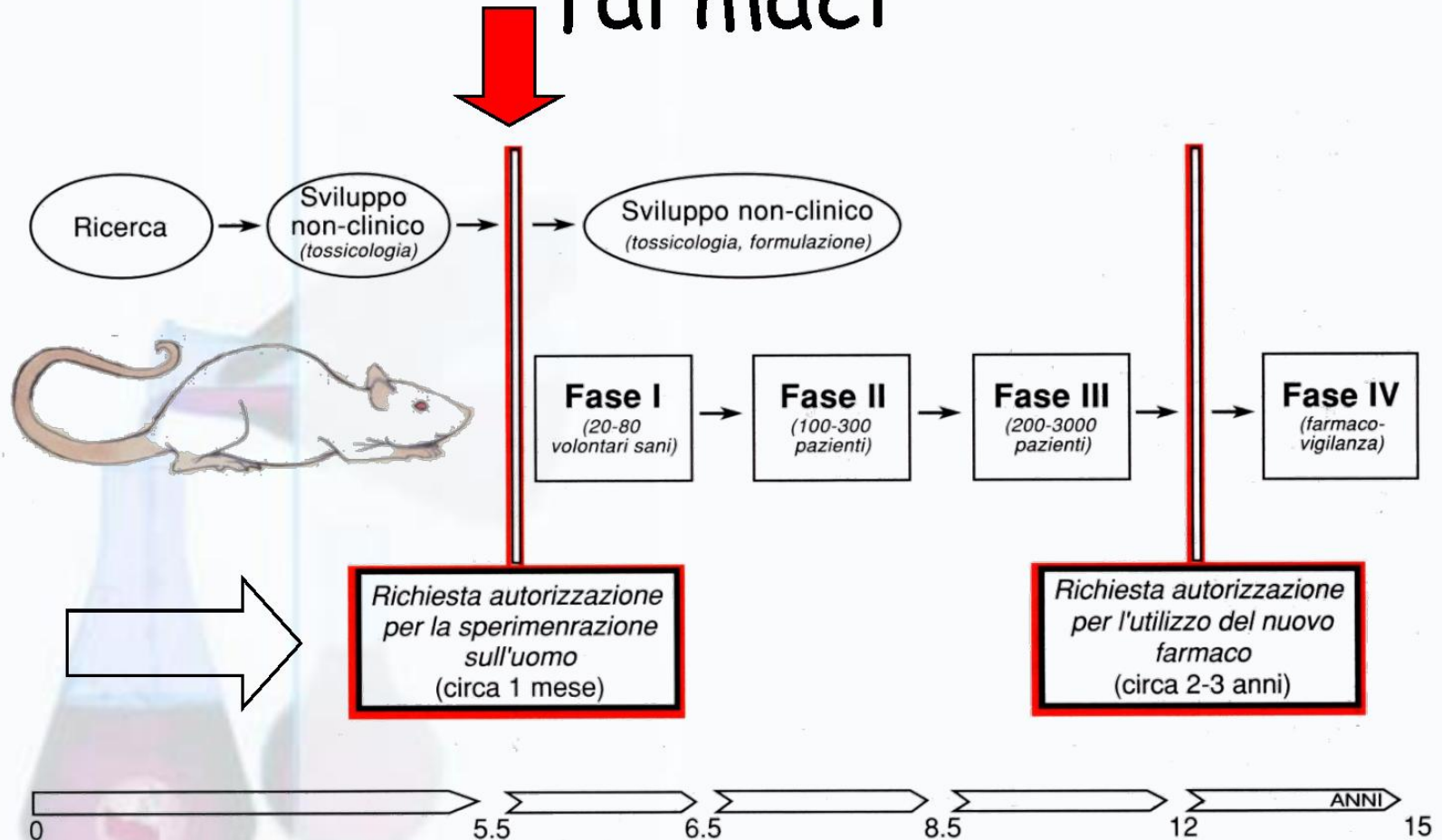
- **In questa fase si integrano le informazioni che derivano dall'identificazione del pericolo e dalla valutazione dell'esposizione per calcolare la frequenza e la severità di effetti sulla popolazione esposta**
- **Il potenziale rischio cancerogeno viene espresso come aumento della probabilità di sviluppare un tumore nel corso della vita, ottenuto moltiplicando le pendenze tumorali della sostanza (mg/kg/die) per l'assunzione cronica quotidiana (mg/kg/die per 70 anni – mediamente).**
- **Per effetti non-cancerogeni, il livello di esposizione viene confrontato con i valori di ADI o RfD calcolati per tempi di esposizione simili (acute, intermedie, o croniche).**
- **Additività del danno per esposizioni multiple (valida se il meccansimo d'azione è analogo!)**
- **Si sommano le esposizioni per diverse vie (*bere acqua contaminata + respirare polveri contaminate*)**

Gestione del rischio

- **Standards di esposizione e linee guida sono spesso il risultato di decisioni sulla gestione del rischio, allo scopo di proteggere la popolazione da un rischio inaccettabile.**
- **Spesso contengono valori limite di esposizione o misure per ridurre l'esposizione.**

Standards	These are legal acceptable exposure levels or controls issued as the result of Congressional or Executive mandate. They result from formal rulemaking and are legally enforceable. Violators are subject to punishment, including fines and imprisonment.
Guidelines	These are recommended maximum exposure levels which are voluntary and not legally enforceable. Guidelines may be developed by regulatory and non-regulatory agencies, or by some professional societies.

Ricerca e sviluppo di nuovi farmaci



Documentazione clinica.

- a. introduzione:
 - i. razionale scientifico;
 - ii. risultati degli studi clinici già effettuati in altri Paesi anche se per altre indicazioni con il prodotto oggetto della richiesta (non con prodotti analoghi o simili);
- b. informazioni specifiche;
 - i. obiettivi della sperimentazione clinica;
 - ii. numero massimo di soggetti che si intende arruolare;
 - iii. numero di centri che si intende coinvolgere;
 - iv. formulazione(i) proposta(e);
 - v. giustificazione dei dosaggi proposti, della via di somministrazione e della durata del trattamento;
 - vi. indicazione dei livelli di tollerabilità massima accettabili, raggiunti i quali verrà interrotto il trattamento;
 - vii. criteri di inclusione ed esclusione;
 - viii. misure da attuare a salvaguardia dei soggetti da arruolare anche a distanza di tempo dal termine del trattamento e, per i prodotti per terapia genica e cellulare somatica, i controlli di sicurezza previsti sia per i soggetti arruolati che per i loro contatti (personale medico e paramedico coinvolto nonché dei familiari, se del caso);
 - ix. durata del follow-up;
 - x. End-point per la valutazione dell'attività farmacologica nel caso di prodotti da utilizzare sul volontario malato.

Autorizzazione alla sperimentazione clinica

- Nel caso di farmaci già sperimentati sull' uomo, la richiesta viene inoltrata al Comitato Etico del centro che coordina lo studio
- Nel caso di farmaci nuovi, mai sperimentati sull' uomo, la richiesta viene inoltrata all' Istituto Superiore di Sanità

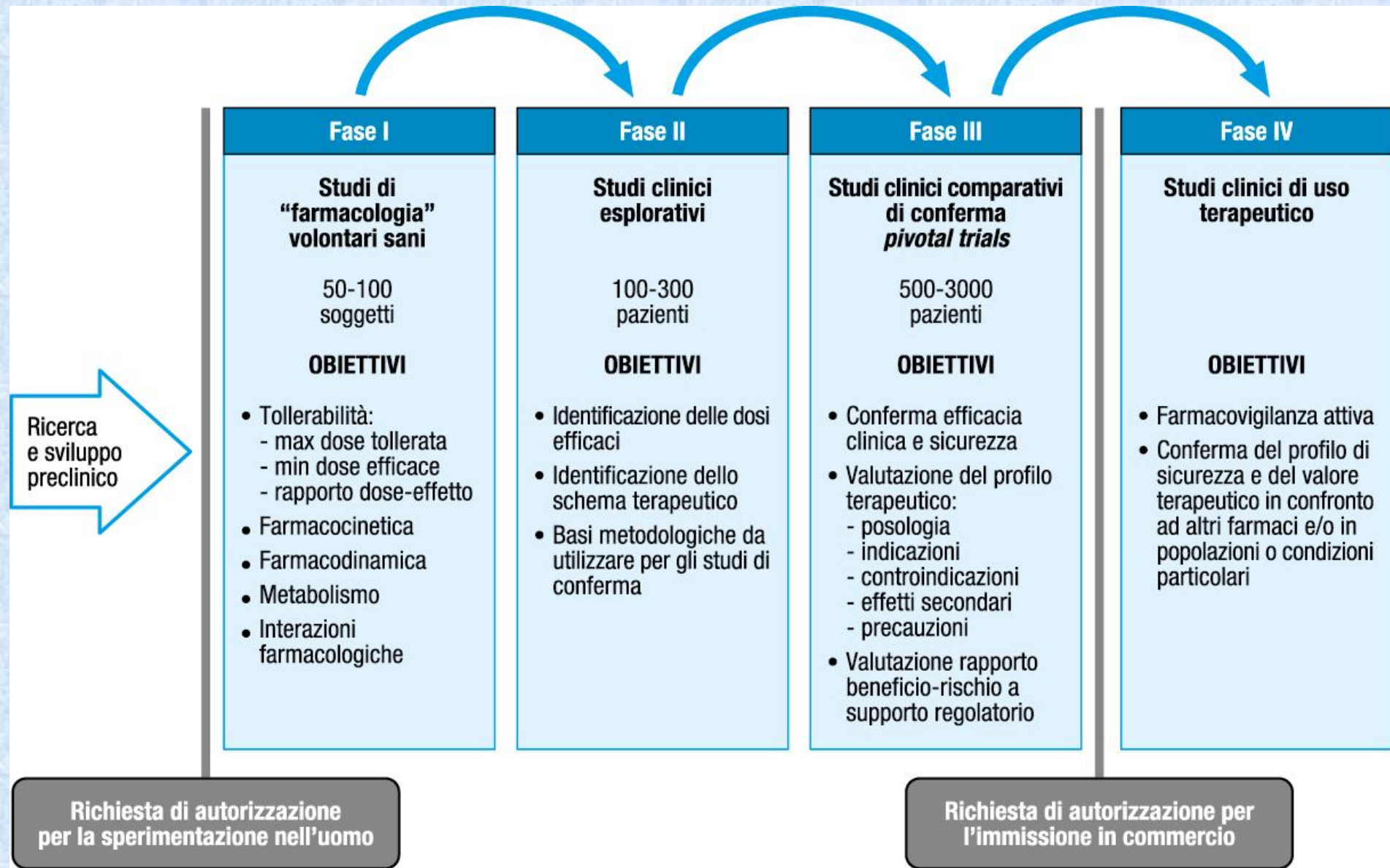
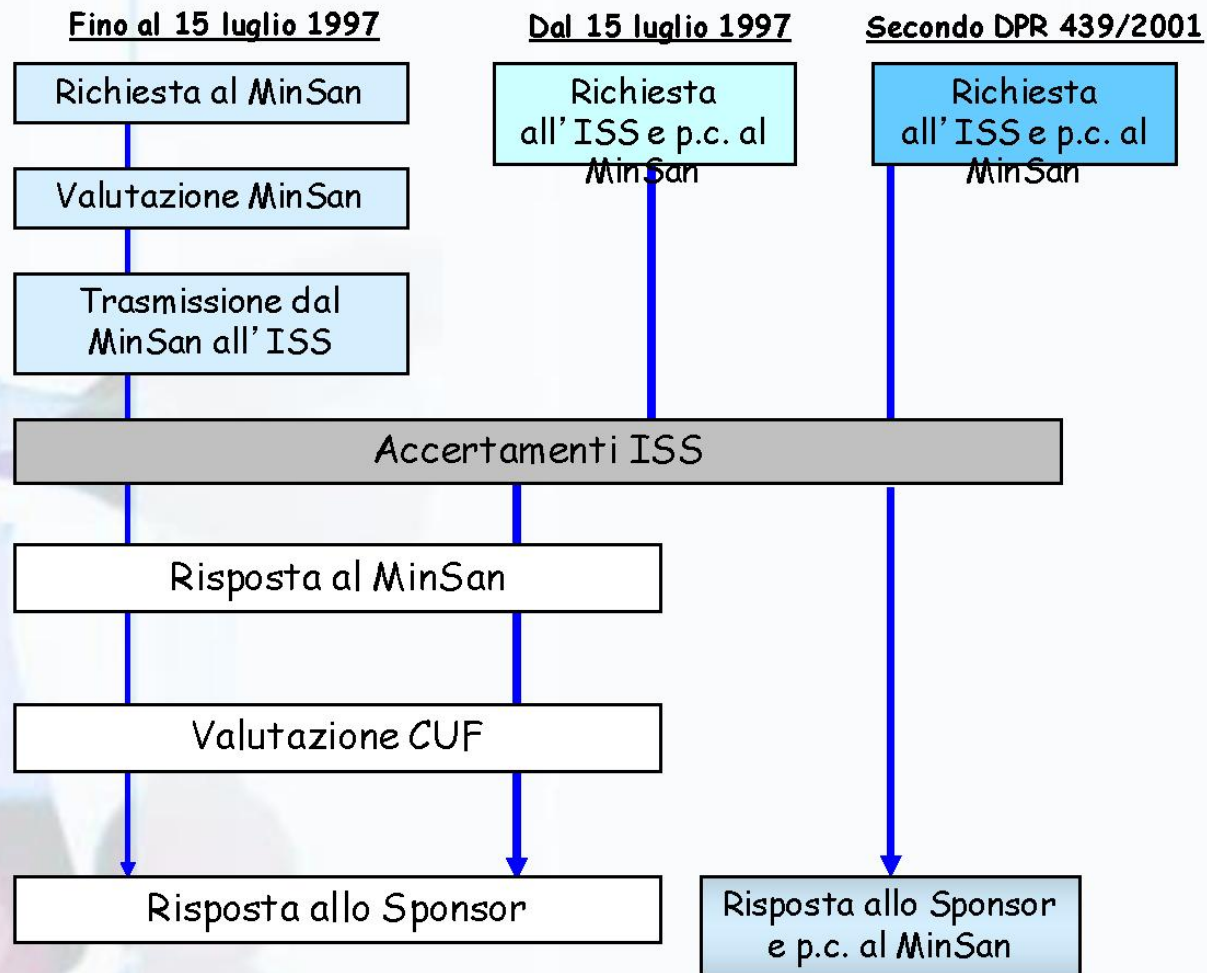


Figura 7.9 Le fasi della ricerca clinica.

PROCEDURE PER LE SPERIMENTAZIONI CLINICHE DI FASE I



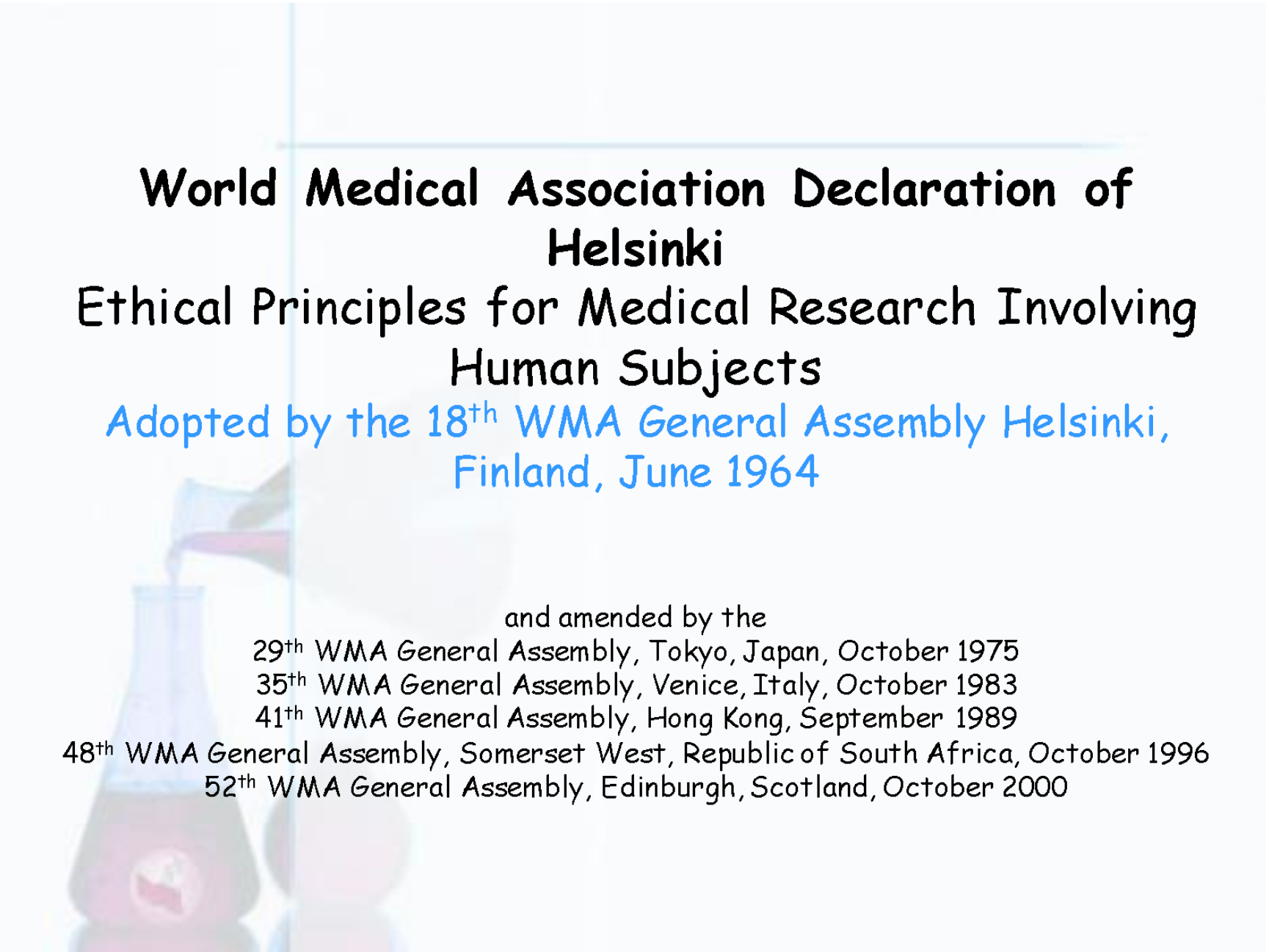
Autorizzazione alla sperimentazione clinica

- Ottenuta l' ASC ogni centro partecipante dovrà poi richiedere l' approvazione da parte del proprio Comitato Etico di riferimento



Comitati Etici

- Organismi indipendenti multidisciplinari che valutano, in senso etico e metodologico la sperimentazione clinica
- Hanno la responsabilità di garantire la tutela dei diritti, della sicurezza e del benessere dei soggetti in sperimentazione, esprimendo un parere sul protocollo di sperimentazione, sull' idoneità degli sperimentatori, sull' adeguatezza delle strutture e sui metodi e documenti che verranno impiegati per informare i soggetti.



World Medical Association Declaration of Helsinki

Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects

Adopted by the 18th WMA General Assembly Helsinki,
Finland, June 1964

and amended by the

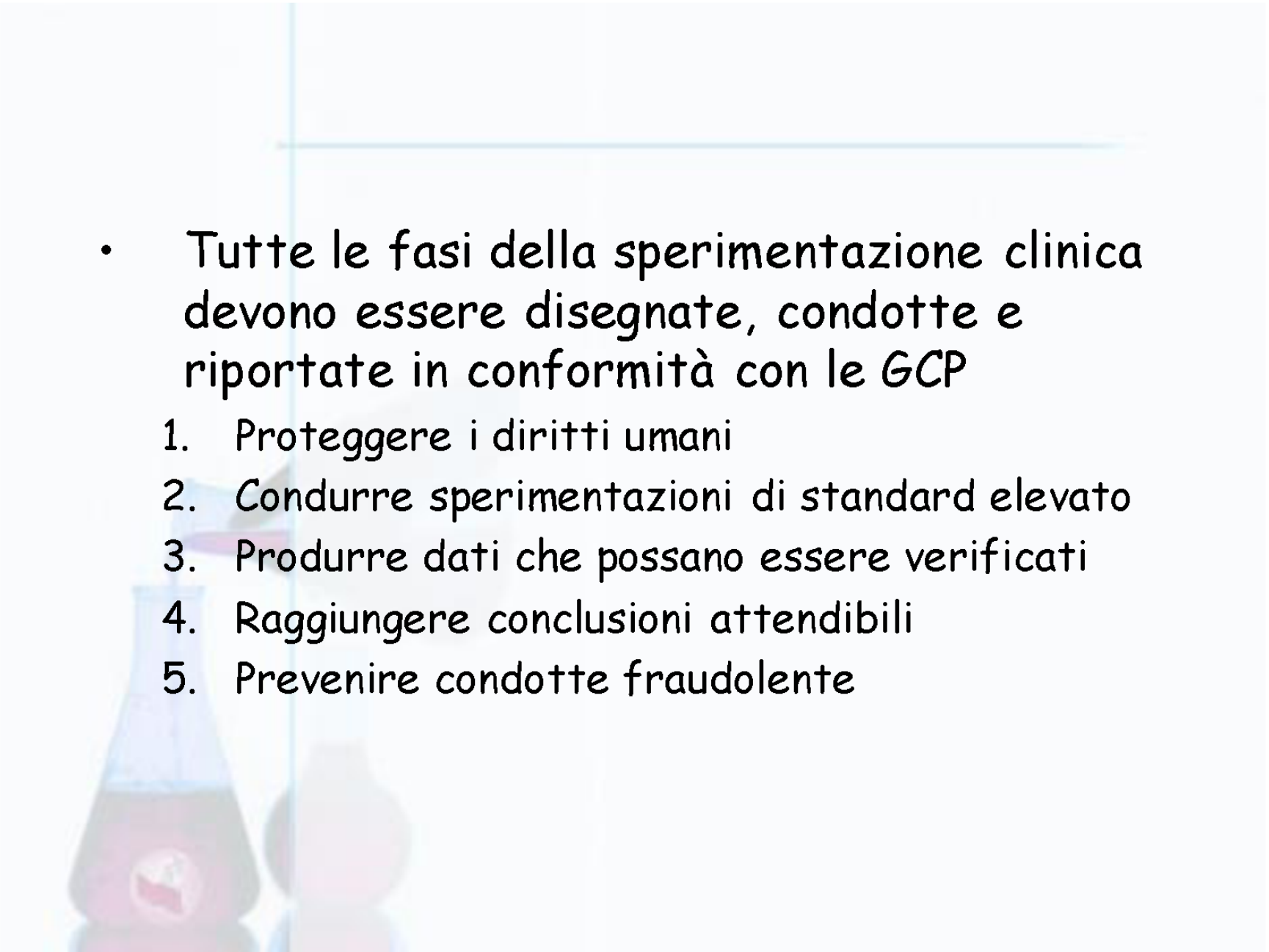
29th WMA General Assembly, Tokyo, Japan, October 1975

35th WMA General Assembly, Venice, Italy, October 1983

41th WMA General Assembly, Hong Kong, September 1989

48th WMA General Assembly, Somerset West, Republic of South Africa, October 1996

52th WMA General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 2000

- 
- Tutte le fasi della sperimentazione clinica devono essere disegnate, condotte e riportate in conformità con le GCP
 1. Proteggere i diritti umani
 2. Condurre sperimentazioni di standard elevato
 3. Produrre dati che possano essere verificati
 4. Raggiungere conclusioni attendibili
 5. Prevenire condotte fraudolente

- Le procedure applicative sono dettagliate nelle linee guida del CPMP (Committee for Proprietary Medicinal Products, III/3976/88), suddivise in 5 capitoli che corrispondono ai concetti fondamentali delle norme di buona pratica clinica:
 1. Etica: come proteggere i soggetti partecipanti allo studio
 2. Responsabilità: chi deve fare che cosa, come e quando; obblighi dello sponsor, del ricercatore clinico e del monitor
 3. Gestione dei dati: come i dati debbono essere raccolti, elaborati, riportati e archiviati
 4. Statistica: la credibilità delle conclusioni di uno studio clinico dipende dal disegno del protocollo; nel caso di studi comparativi la competenza statistica è fondamentale per giustificare il disegno sperimentale, il numero di soggetti e l'analisi dei dati
 5. Assicurazione di qualità: come i dati devono essere controllati e verificati

Dichiarazione di Helsinki

- Articolo 19: la ricerca medica è giustificata solo se vi è una ragionevole probabilità che le popolazioni in cui la ricerca è condotta possano beneficiare dei risultati della ricerca.

Fase I

<i>Tipo di studi</i>	Non terapeutici.
<i>Soggetti</i>	Generalmente volontari sani.
<i>Numerosità</i>	100-200 soggetti.
<i>Obiettivi</i>	Tollerabilità (identificazione della Massima Dose Tollerata; si inizia con una dose che è 1/20 - 1/50 della DE50 ottenuta nei test preclinici di farmacodinamica), farmacocinetica, metabolismo, farmacodinamica.

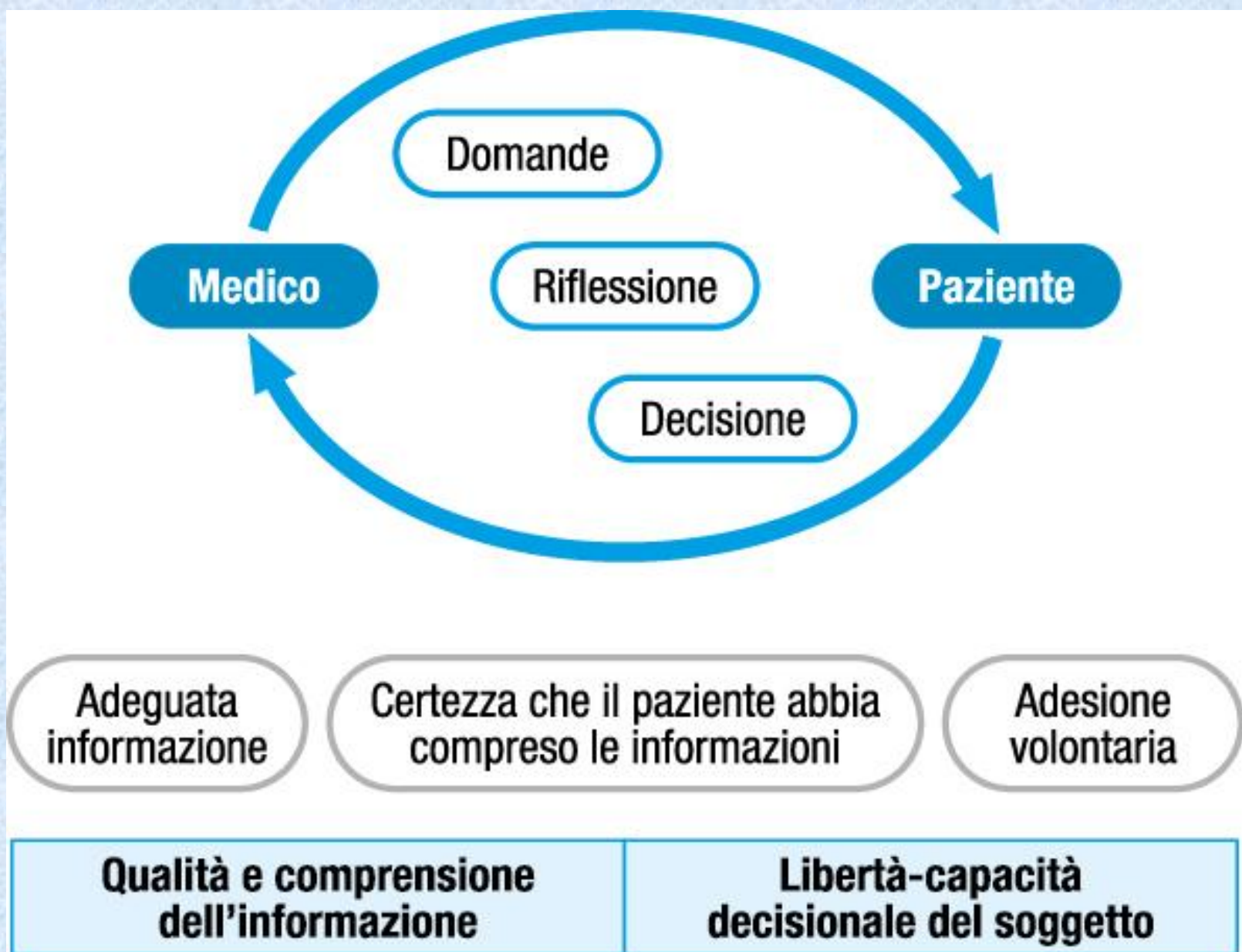


Figura 7.11 Il consenso informato: i tre cardini.

REPUBBLICA.IT

Redazione
Scriveteci
Servizio Clienti
Pubblicità

MOBILE

via SMS
i-mode
Umts
Gprs

SERVIZI





L'archivio
di Repubblica
Repubblica Voice
Repubblica Voice
English version
FreeInternet
Pagine Bianche
Pagine Gialle

PERIODICI



SUPPLEMENTI
DIARIE E EDIMENICA
Metropoli

Lettera Finanziaria
Affari & Finanza
Dweb
Salute

cronaca delle città 
periodici 
giornali locali 
annunci legali 

ESTERI

 Stampa questo articolo  Invia questo articolo

Londra, inaspettata reazione a un nuovo anti-infiammatorio
I medici: "Un evento senza precedenti". Sospeso l'esperimento

Facevano da cavie per un farmaco Sei persone in gravi condizioni

LONDRA - Sei persone sono ricoverate in serie condizioni al Northwick Park Hospital di Londra. Tutte partecipavano volontariamente alla sperimentazione di un nuovo farmaco anti-infiammatorio. Due sono in pericolo di vita, mentre gli altri quattro, sebbene ancora gravi, sono in via di miglioramento. L'agenzia di regolamentazione per i prodotti farmaceutici, Mhra, ha sottolineato che una cosa del genere non era mai avvenuta e ha sospeso il test lanciando un allarme internazionale per evitare che il medicinale venga sperimentato in altri Paesi.



Sotto accusa è finito il Tgn 1412, nome provvisorio di un farmaco contro la leucemia e le infiammazioni croniche come l'artrite reumatoide prodotto dall'azienda farmaceutica tedesca TeGenero. L'incidente è avvenuto in una sezione dell'ospedale gestita privatamente dalla società per la ricerca farmaceutica Parexel, che però afferma di aver seguito tutte le norme del caso nello svolgimento dei test. L'esperimento, il primo sull'uomo, coinvolgeva soltanto volontari che venivano poi ricompensati con una somma di 2.000 sterline, circa 3.500 euro.

Qualcosa però è andato storto. Poche ore dopo la somministrazione, le sei 'cavie' si sono sentite male e sono state ricoverate in terapia intensiva. "Il mio fidanzato si è gonfiato fino a diventare irriconoscibile - ha raccontato Myfanwy Marshall, la ragazza di uno dei volontari in condizioni più gravi - "molti dei suoi organi hanno iniziato a cedere. E i medici non sanno come affrontare l'emergenza".

Una circostanza unica, secondo Gamesh Suntharalingam, direttore del reparto di terapia intensiva a Northwick Park. "Questo farmaco, mai stato sperimentato sull'uomo, ha creato una reazione infiammatoria che colpisce alcuni organi del corpo", ha detto il dottore, "ma stiamo facendo tutto il possibile". I medici della Parexel definiscono la situazione "sfortunata e inusuale" e assicurano di essere intervenuti tempestivamente alle prime reazioni dei volontari.

Sconcertata anche Bendikte Katz, direttore della TeGenero: "Un evento totalmente inatteso, che non riflette quanto finora osservato nei test di laboratorio". Proprio gli effetti positivi sugli animali avevano aperto la strada alla sperimentazione sull'uomo, e la Parexel possedeva tutte le autorizzazioni necessarie. La Mhra, intanto, ha annunciato un'indagine approfondita per determinare le cause dell'incidente.

(15 marzo 2006)

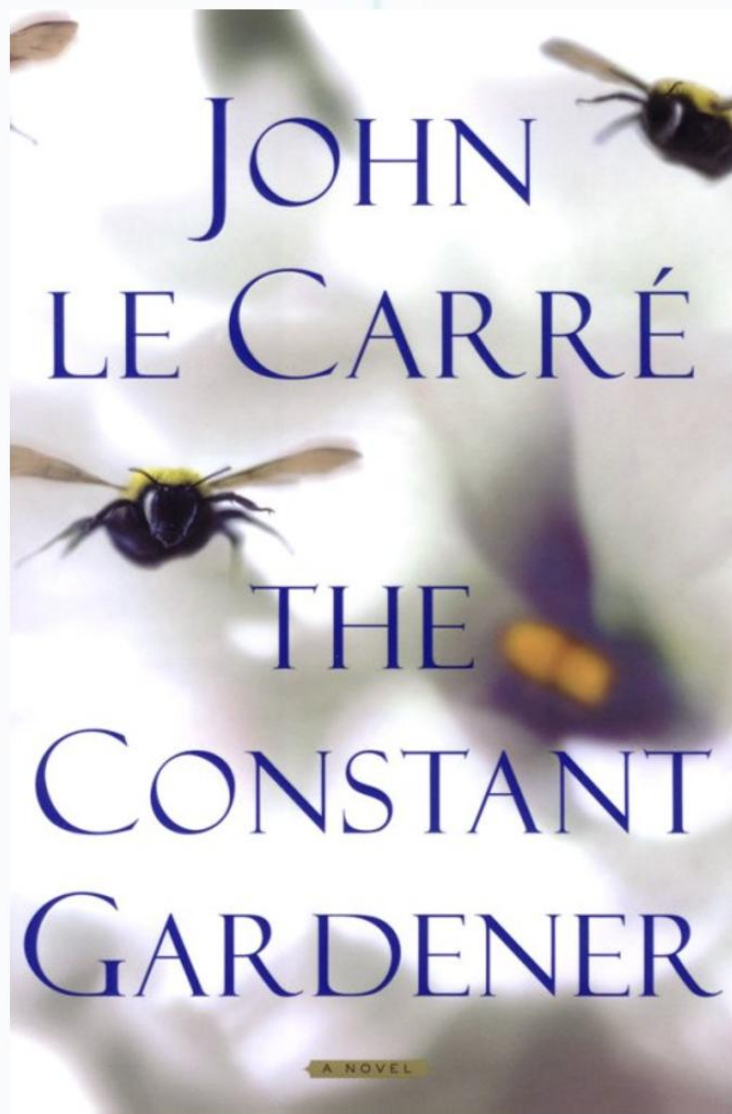
TGN1412: anticorpo monoclonale umanizzato antiCD28

IN AFRICA MANCANO LEGGI SUL CONTROLLO ETICO DELLA RICERCA SUI FARMACI

I risultati di una ricerca congiunta di Unicri e Aifa

Su 53 Paesi africani, solo 3 hanno leggi relative al controllo etico sulla ricerca clinica sugli esseri umani, solo in 8 e' presente un orientamento nazionale sul tema, mentre in 30 Paesi sono presenti comitati di controllo etico, spesso non indipendenti e in cui esiste anche il problema della formazione degli operatori, oltre al fatto che tutti scontano una completa mancanza di fondi. E' quanto emerso da una ricerca condotta dall'Unicri, l'Agenzia delle Nazioni Unite per la Ricerca e la Sicurezza e l'Aifa, l'Agenzia Italiana del Farmaco, per verificare la presenza di normative di controllo e l'esistenza di commissioni etiche in Africa. 'Troppe volte le aziende farmaceutiche vanno in questi Paesi e con la giustificazione di regalare farmaci ai bambini o alle donne incinta - ha aggiunto il direttore dell'Unicri, Sandro Calvani - fanno sperimentazioni che neanche annunciano o adottano comportamenti illeciti'. L'Unicri e l'Aifa hanno avviato una collaborazione per un progetto di coordinamento e armonizzazione delle norme esistenti nei Paesi in via di sviluppo. Lo scopo è quello di mettere in atto un coordinamento adeguato tra le strutture internazionali e le iniziative locali nei Paesi in via di sviluppo e armonizzare le normative esistenti.





La sperimentazione dei farmaci nei paesi in via di sviluppo



La vicenda a cui si ispira il film è avvenuta nel 1996 in Nigeria.



Nella città di Kano, nord del Paese, era scoppiata un'epidemia di meningite. Nel momento peggiore si registravano fino a 120 nuovi casi al giorno. Moltissimi erano bambini.

Un'equipe di Medici senza frontiere (Msf) era arrivata per aiutare l'ospedale locale a far fronte alla situazione. Ai bambini veniva dato un antibiotico raccomandato dall'organizzazione mondiale della sanità per questi casi.

Ma, ad un certo punto, un veloce jet privato aveva scaricato a Kano un'equipe superattrezzata.

Erano i medici della Pfizer, grande casa farmaceutica americana, che, saputo quasi per caso dell'epidemia, si erano precipitati con un nuovo prodotto, il Trovan® (tovafloxacin).

I medici della Pfizer sapevano di averlo provato, fino a quel momento, su un solo bambino. Il dottor Juan Walterspiel, esperto di malattie infantili della Pfizer, peraltro, era fortemente contrario agli esperimenti sui bambini a Kano e lo aveva anche scritto in una lettera alla società. Che lo licenziò.

I medici si installarono nell'ospedale di Kano, indistinguibili - per la gente - da quelli di Msf. Scelsero 200 bambini. Secondo la Pfizer chiesero ad un'infermiera di spiegare, nella lingua locale, che si trattava di una sperimentazione. E, poiché si trattava di persone analfabete - dicono - il consenso venne dato oralmente. Un genitore affermò poi di aver creduto che i medici fossero di Msf e di aver scoperto solo successivamente, controllando la documentazione, che si trattava di un test.

La lettera di approvazione della sperimentazione del comitato etico dell'ospedale sarebbe stata scritta solo un anno dopo i fatti. Dettagli. Per l'esperimento era necessario il gruppo di controllo. A cui veniva dato l'antibiotico classico (ceftriaxone). Ma, affermano i genitori di trenta bambini che hanno fatto causa alla Pfizer, a questi fu dato un dosaggio più basso, per dimostrare che il Trovan® era più efficace. Ci sono stati undici morti in quell'esperimento. Sei curati col Trovan® e cinque del gruppo di controllo.

Il Trovan® fu approvato nel 1997 dalla Food and Drug Administration, massima autorità americana in materia di controllo dei farmaci. Ma il suo uso venne poi fortemente ristretto nel 1999, dopo che una serie di morti per complicanze epatiche furono fatte risalire al Trovan®.

In Europa il Trovan® non è mai entrato in commercio.

Fase II

<i>Tipo di studi</i>	Studi terapeutici preliminari.
<i>Soggetti</i>	Pazienti accuratamente selezionati con patologia per cui il nuovo farmaco è indicato.
<i>Numerosità</i>	100 - 600 soggetti.
<i>Obiettivi</i>	Identificazione del range di dosi attive; identificazione della posologia ottimale; tollerabilità.

Fase III

<i>Tipo di studi</i>	Terapeutici.
<i>Soggetti</i>	Pazienti; criteri di inclusione progressivamente meno restrittivi: popolazioni speciali (anziani, bambini, insufficienza renale, epatica).
<i>Numerosità</i>	2000-4000 soggetti.
<i>Obiettivi</i>	Conferma dell'attività terapeutica su popolazioni più ampie e meno selezionate, tollerabilità, farmacocinetica di popolazione, interazioni principali.

Randomizzazione:

- Assegnazione casuale dei trattamenti in studio ai pazienti, ricorrendo alla generazione di numeri casuali con tavole apposite o con un programma al computer.

Cecità:

- **Cecità singola:** il paziente non è a conoscenza dell'identità del trattamento (pur essendo stato informato ed avendo acconsentito di partecipare ad uno studio in cui potrà ricevere uno dei vari trattamenti a confronto 🙄 **consenso informato**).
- **Doppia cecità:** né il paziente né lo sperimentatore sono a conoscenza dell'identità del trattamento.

Dichiarazione di Helsinki

- Articolo 29: i benefici, i rischi, gli aggravati e l'efficacia di un nuovo metodo devono essere valutati in confronto con quelli dei migliori metodi preventivi, diagnostici e terapeutici attualmente in uso. Ciò non esclude l'impiego del placebo, o l'assenza di trattamento, negli studi dove non esistono metodi comprovati di prevenzione, diagnosi o terapia.

Effetto placebo



- Tutte le procedure mediche sono associate a un complesso contesto psicosociale che può influenzare l' esito della terapia.
- L' effetto placebo corrisponde all' effetto di ogni medicamento o procedimento terapeutico **indipendente** dall' effetto farmacologico del medicinale.

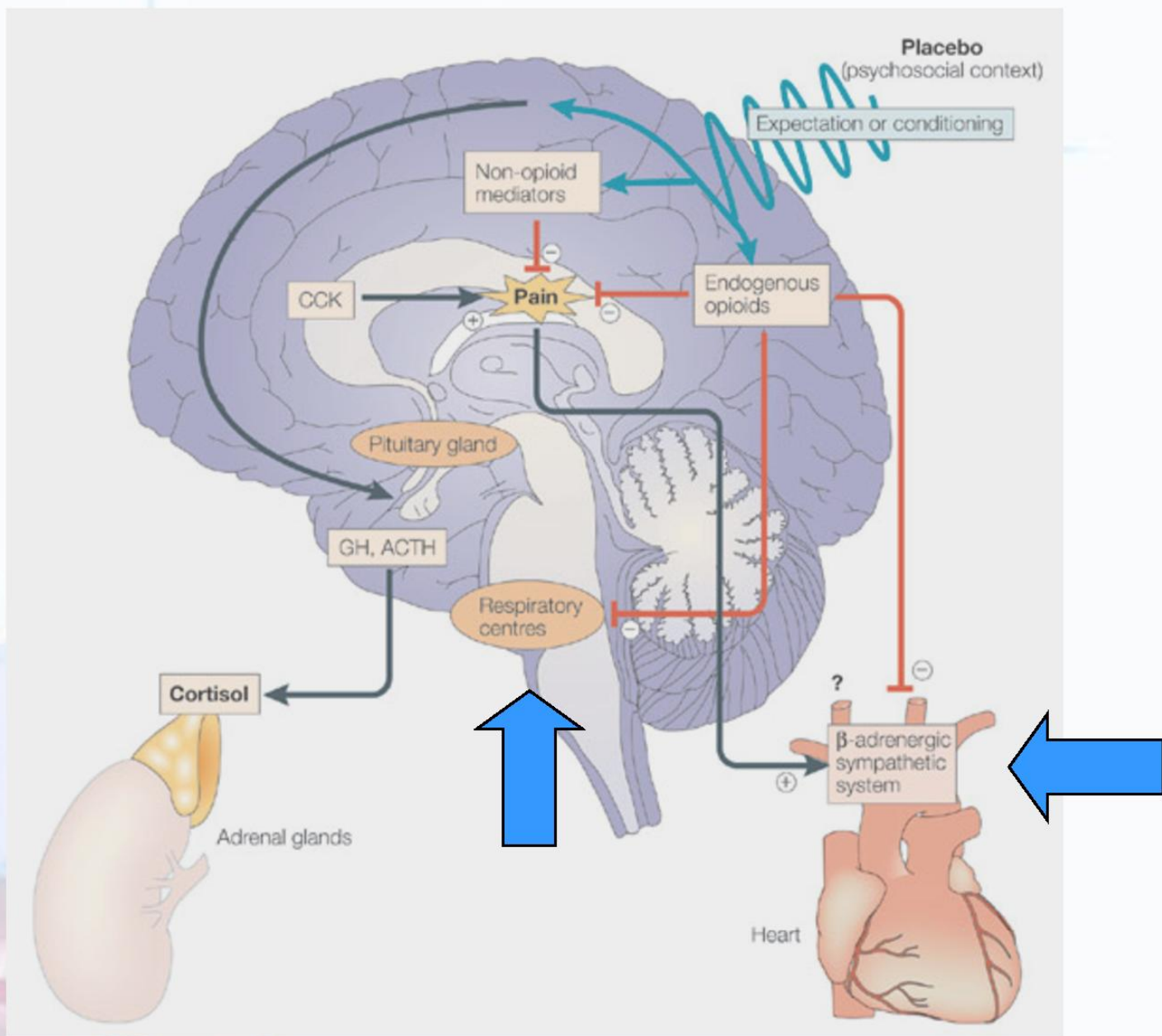
Effetto placebo



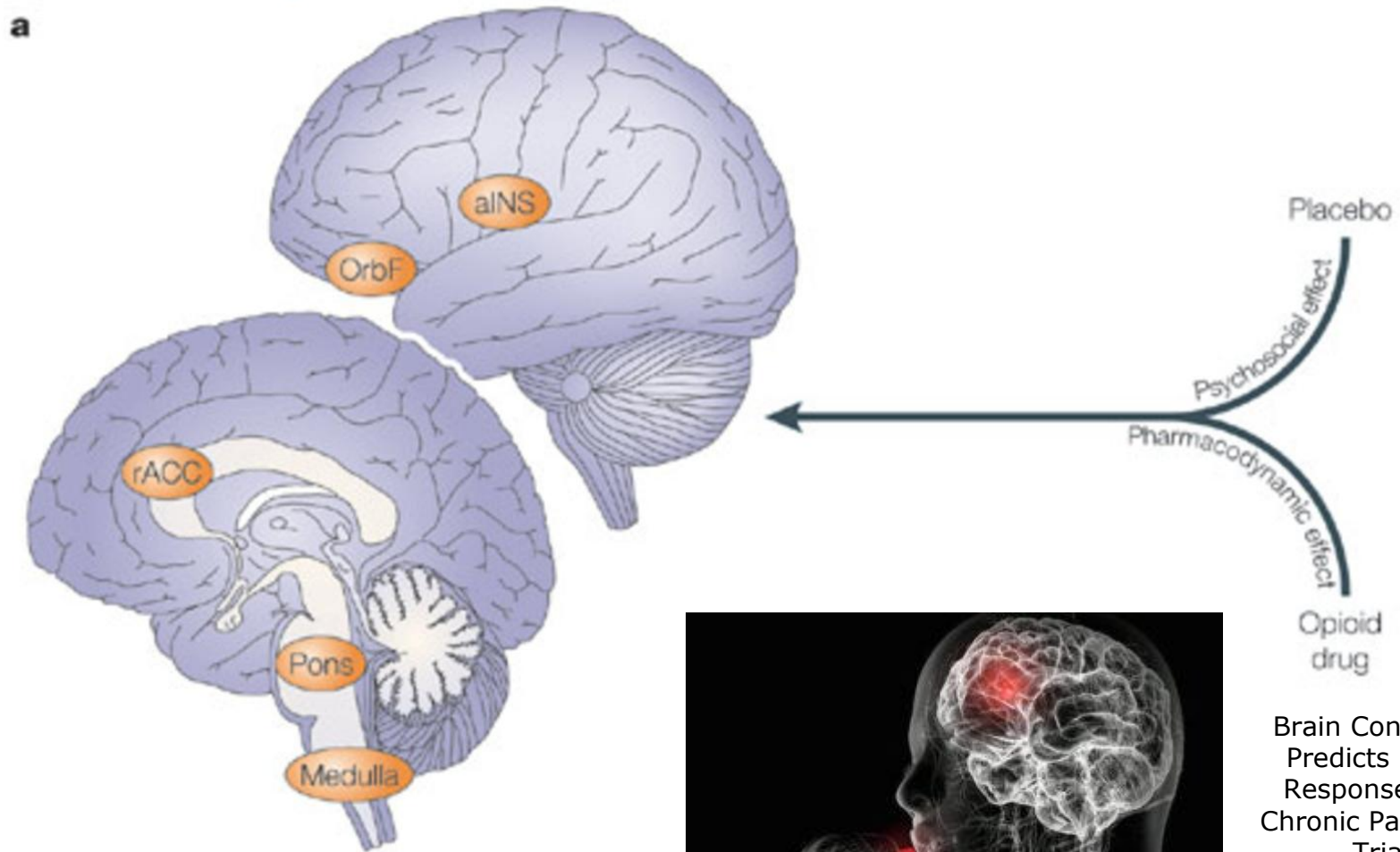
- Levine e coll. (1978): l'analgesia da placebo è mediata dal rilascio di oppioidi endogeni e viene inibita dalla somministrazione di naloxone

Il **naloxone** è un farmaco di sintesi ed è stato il primo antagonista oppioide puro, con affinità per tutti e tre i tipi di recettori degli oppioidi

(μ δ κ)

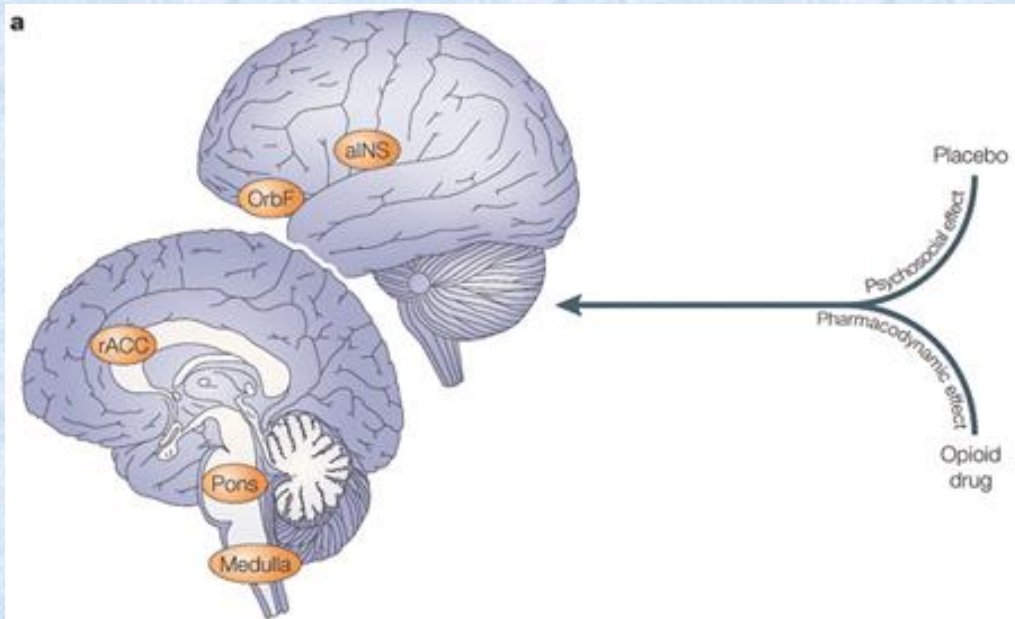


Regioni del cervello attivate dal placebo o dalla somministrazione di oppioidi (PET)

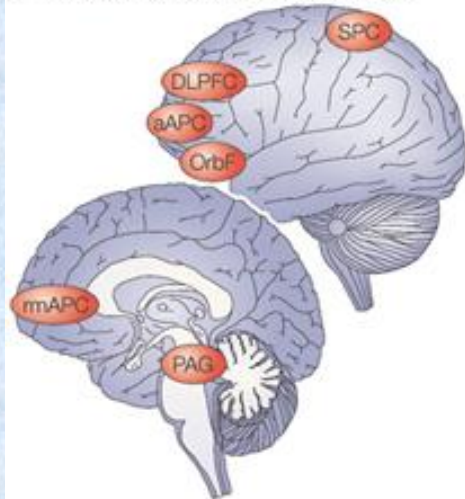


Brain Connectivity Predicts Placebo Response across Chronic Pain Clinical Trials.

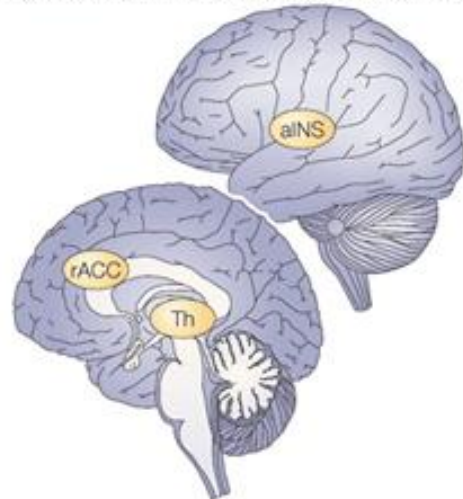
Tétreault P. et al. ,
PLOS Biology,
27.10.2016.



b Increased activity during anticipation



c Decreased activity during placebo analgesia



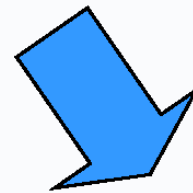
- Dolore post operatorio da chirurgia orale
- Una iniezione “nascosta” di morfina (6 - 8 mg) ha lo stesso effetto analgesico di una iniezione di salina di cui il paziente è consapevole (placebo).

<http://www.sanjiao.it/effetto-placebo-e-nocebo/>

- Per i farmaci che superano con successo la fase III: richiesta l' **autorizzazione alla commercializzazione**
- Procedure di registrazione



**Centralizzate
(EMEA e CPMP)**



**Decentralizzate (in
Italia: Ministero della
Salute e Agenzia
Italiana del Farmaco)**

Procedure di registrazione europee

- Procedura centralizzata:

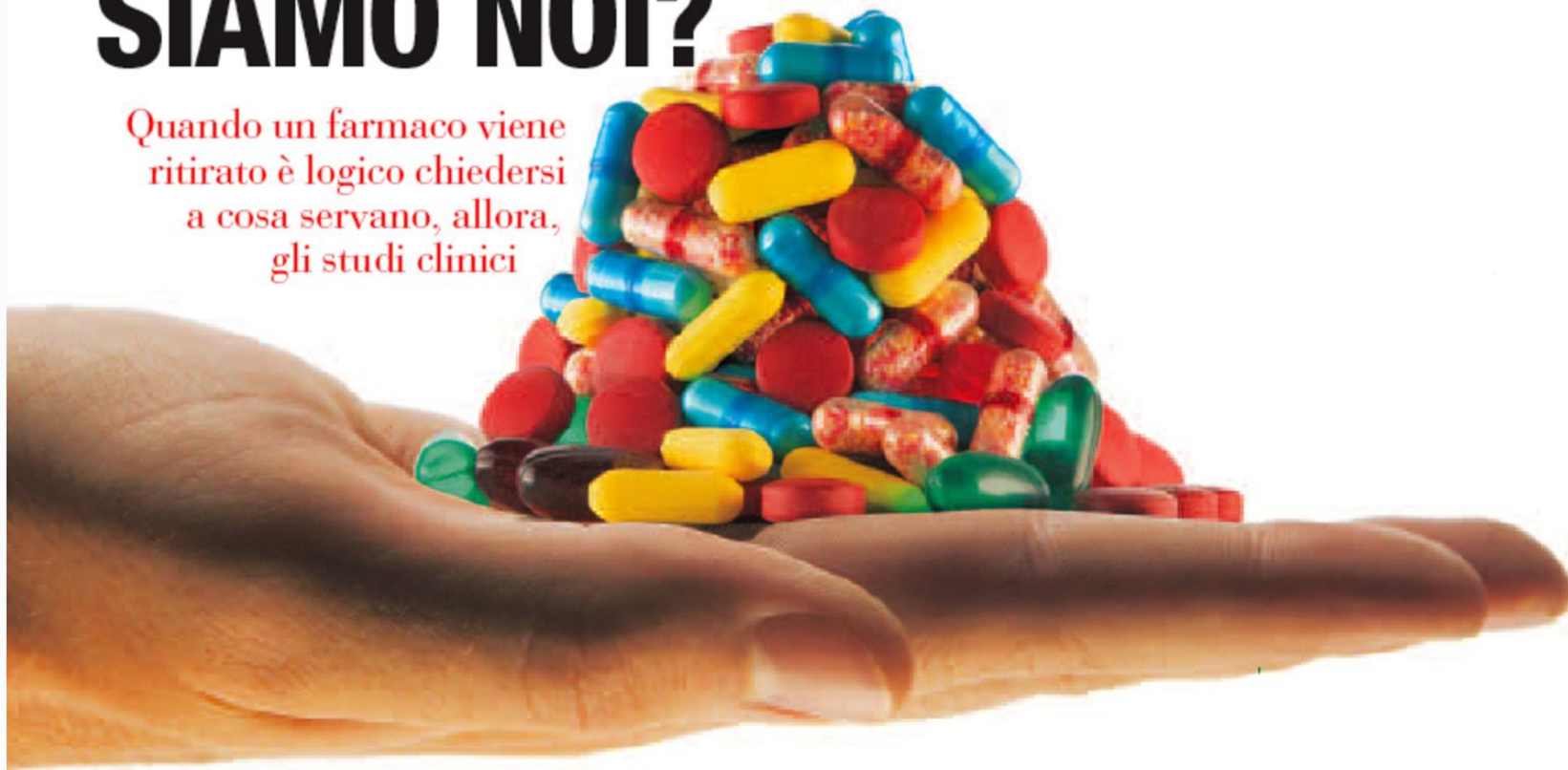
- è direttamente gestita dall' EMEA e dà luogo a decisioni vincolanti per l' intera UE. Il dossier viene presentato all' EMEA da una persona o organizzazione residente nella UE.
- La valutazione deve essere conclusa entro 210 giorni, che decorrono dall' accettazione della domanda.
- Il parere viene trasmesso agli stati membri, al richiedente e alla Commissione per essere convertito, entro 90 giorni in un' autorizzazione all' immissione in commercio valida per tutti i paesi dell' UE.
- I paesi membri sono tuttavia liberi nella definizione dei prezzi e nell' inclusione del prodotto nei sistemi sanitari nazionali (in Italia CUF).



Figura 7.12 Tempo di accesso del paziente ai nuovi farmaci.

MA LE CAVIE SIAMO NOI?

Quando un farmaco viene
ritirato è logico chiedersi
a cosa servono, allora,
gli studi clinici



1960 -1999: ritirati dal commercio 121 farmaci

Terfenadina	Ritiro della confezione da 120 mg dal mercato europeo (novembre 1997)
Mibefradil	Ritirato dalla Ditta produttrice (giugno 1998)
Astemizolo	Ritirato dalla Ditta produttrice (1999)
Grepafloxacin	Ritirato dalla Ditta produttrice (1999)
Cisapride	Aggiunte di avvertenze in scheda tecnica (1998) Ritirato in alcuni paesi (Italia), disponibile solo per indicazioni ristrette in altri (2000)
Cerivastatina	Ritirato dalla Ditta produttrice (agosto 2001)
Rofecoxib	Ritirato dalla Ditta produttrice nel settembre 2004 (> 100 milioni di prescrizioni in USA, 2, 5 miliardi di \$/anno)

Il percorso per la nascita di un nuovo farmaco

